

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier

Développement de peptides vasoactifs photoactivables

Par
Steve Bourgault

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Christiane Ayotte
INRS - Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Richard Leduc
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Alain Fournier
INRS - Institut Armand-Frappier

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Pr Alain Fournier, pour ses précieux conseils, sa disponibilité et ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire d'Études Moléculaires et Pharmacologiques des Peptides et plus spécifiquement, Myriam Létourneau et Chantal Langlois pour leur contribution à la réalisation de mon projet de recherche.

Finalement, je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour son soutien financier.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Remerciements..... | ii |
| Table des matières..... | iii |
| Abréviations..... | v |
| Liste des figures..... | vi |
| Liste des tableaux..... | vii |
| Sommaire..... | viii |
| Hypothèses et objectifs du projet de recherche..... | x |
| Revue de la littérature..... | 1 |
| 1. Composés cagés..... | 1 |
| 1.1 Définition des composés cagés..... | 1 |
| 1.2 Groupements photolabiles..... | 2 |
| 1.2.1 Groupements de type nitrobenzyle..... | 3 |
| 1.2.2 Groupements dérivés du <i>p</i> -hydroxyphénacyle..... | 6 |
| 1.2.3 Dérivés de coumarine..... | 8 |
| 1.4 Exemples et applications de biomolécules cagées..... | 9 |
| 2. Peptides et protéines cagés..... | 11 |
| 2.1 Introduction..... | 11 |
| 2.2 Synthèse de peptides et de protéines cagés..... | 11 |
| 2.2.1 Modification chimique du peptide ou de la protéine..... | 12 |
| 2.2.2 Synthèse peptidique en phase solide..... | 16 |
| 2.2.3 Mutagenèse dirigée à l'aide d'acides aminés non-naturels..... | 17 |
| 2.3 Applications des protéines et peptides photoactivables..... | 19 |
| 2.3.1 Exploration de l'hypothèse d'une action intracrine via l'utilisation de peptides cagés..... | 20 |

| | |
|---|----|
| 3. Urotensine II..... | 21 |
| 3.1 Historique et généralités du système U-II/UT..... | 21 |
| 3.2 Effets biologiques chez les mammifères..... | 24 |
| 3.3 Relation structure-activité..... | 27 |
| 4. Endothéline-1..... | 30 |
| 4.1 Historique et généralités du système endothéline..... | 30 |
| 4.2 Effets biologiques..... | 34 |
| 4.3 Relation structure-activité..... | 35 |
| Article A..... | 37 |
| Article B..... | 63 |
| Références..... | 97 |

Abréviations

ATP, adénosine triphosphate ; NB, nitrobenzyle; NPE, (2-nitrophényle)éthyle ; DMNPE, (4,5-diméthoxy-2-nitrophényle)éthyle ; DMNB, 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle ; AMPc, adénosine-3', 5'-cyclique monophosphate ; GMPc, guanosine-3', 5'-cyclique monophosphate ; EDTA, éthylènediamine tétraacétate ; ADP, adénosine diphosphate ; GDP, guanosine diphosphate ; ARN, acide ribonucléique ; ADN, acide désoxyribonucléique ; SPPS, synthèse peptidique en phase solide ; U-II, urotensine II ; UT, récepteur de l'urotensine II ; ET-1, endothéline-1 ; RMN, résonance magnétique nucléaire ; Fmoc, 9-fluorénylméthyloxycarbonyle ; BOC, *tert*-butoxycarbonyle ; PGI₂, prostacycline ; Gly, glycine ; Ala, alanine ; Val, valine ; Leu, leucine ; Ile, isoleucine ; Met, méthionine ; Pro, proline ; Phe, phénylalanine ; Trp, tryptophane ; Ser, sérine ; Thr, thréonine ; Asn, asparagine ; Gln, glutamine ; Tyr, tyrosine ; Cys, cystéine ; Lys, lysine ; Arg, arginine ; His, histidine ; Asp, acide aspartique ; Glu, acide glutamique.

Liste des figures

| | |
|--|----|
| 1- Schéma montrant le principe des composés cagés..... | 2 |
| 2- Dérivés cages de type nitrobenzyle | 5 |
| 3- Mécanisme de photolyse simplifié des dérivés cages <i>ortho</i> -nitrobenzyle | 6 |
| 4- Groupements cages dérivés du <i>p</i> -hydroxyphénacyle | 7 |
| 5- Schéma de l'intermédiaire de photolyse des groupements <i>p</i> -hydroxyphénacyle . | 8 |
| 6- Dérivé de coumarine et photolyse subséquente | 8 |
| 7- Incorporation d'un groupement nitrobenzyle au niveau d'une fonction amine ainsi que sa photolyse subséquente..... | 13 |
| 8- Incorporation d'un groupement nitrobenzyle au niveau d'une fonction thiol ainsi que sa photolyse subséquente..... | 14 |
| 9- Incorporation d'un groupement nitrobenzyle au niveau d'un groupement carboxylique ainsi que sa photolyse subséquente..... | 15 |
| 10- Schéma montrant l'approche de la synthèse de peptides cagés en utilisant la SPPS..... | 17 |
| 11- Structure primaire de l'urotensine II humaine..... | 21 |
| 12- Précurseurs de l'urotensine II chez l'homme, la carpe et la grenouille..... | 23 |
| 13- Représentation schématique du récepteur de l'urotensine II humaine, UT..... | 24 |
| 14- Structure de l'urotensine II humaine obtenue par modélisation moléculaire..... | 28 |
| 15- Structure primaire de l'endothéline-1 humaine..... | 30 |
| 16- Biosynthèse de l'endothéline-1..... | 32 |
| 17- Mécanisme d'action de l'endothéline-1 au niveau des muscles lisses vasculaires..... | 33 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| I- Exemples de biomolécules cagées..... | 10 |
| II- Structure primaire de l'urotensine II provenant de différentes espèces animales. | 22 |
| III- Résumé partiel des effets biologiques médiés par l'urotensine II chez les mammifères..... | 26 |
| IV- Structure primaire des peptides de la famille des endothélines..... | 31 |
| V- Résumé partiel des effets biologiques médiés par l'endothéline-1 chez les mammifères..... | 34 |

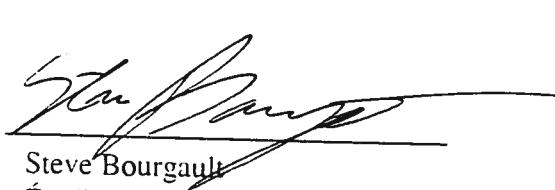
Sommaire

L'urotensine II (U-II) et l'endothéline-1 (ET-1) sont considérés comme les deux plus puissants agents vasoconstricteurs connus à ce jour. Ces deux peptides cycliques de 11 et de 21 acides aminés, respectivement, participent également à une multitude d'autres effets biologiques et ceux-ci sont répertoriés tant au niveau du système cardio-vasculaire qu'au niveau du système endocrinien, des reins, des poumons et du système nerveux central. Dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant ces différents phénomènes biologiques, des analogues photoactivables de U-II et de ET-1 ont été développés. Ces analogues peptidiques, également connus sous le nom de « cagés », sont sélectivement dérivés à l'aide d'un groupement photolabile attaché par un lien covalent photosensible sur une région clé du peptide. Ce groupement protecteur rend donc la molécule biologiquement inerte et ce n'est que suite à une exposition à la lumière UV que la molécule-mère peut être récupérée.

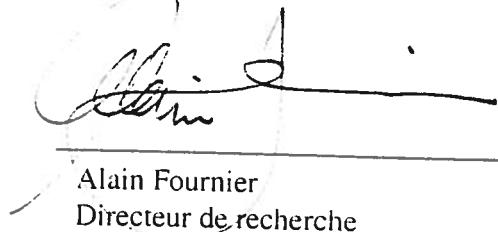
En utilisant une approche rationnelle reposant sur les données des études de type structure-activité, un groupement photolabile 4,5-diméthoxynitrobenzyle a été introduit sur les chaînes latérales des résidus Lys-8 et Tyr-9 de U-II et Lys-9, Tyr-13 et Asp-18 de ET-1 ainsi que sur la fonction carboxylique C-terminale de ce dernier. Pour ce faire, des dérivés Fmoc d'acides aminés (Fmoc-Lys(DMNB)-OH, Fmoc-Tyr(DMNB)-OH et Fmoc-Asp(DMNB)-OH) ont été synthétisés avant d'être incorporés lors de la synthèse peptidique en phase solide. Le peptide [Trp- α (DMNB)²¹]hET-1 a quant à lui été obtenu par une méthode basée sur la libération du peptide protégé d'une résine super-acide labile et par la dérivation subséquente de son groupement carboxylate C-terminal. Après clivage et purification, les analogues cagés ont été caractérisés et testés pharmacologiquement sur des anneaux d'aorte thoracique de rat (U-II et ET-1) et sur des lanières de parenchyme pulmonaire de cobaye (ET-1). La cinétique de libération des molécules-mères a également été déterminée. Finalement, une photolyse *in situ* a été effectuée pour les analogues [Lys(DMNB)⁸]U-II et [Tyr(DMNB)⁹]U-II.

Les acides aminés synthétisés ont été obtenus avec des rendements et des degrés de pureté très satisfaisants. Les analogues cagés de ET-I et de U-II ont tous été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et leur masse respective correspondait à la masse théorique. Suite aux étapes de cyclisation et de purification, ceux-ci ont tous démontré un degré de pureté, déterminé par HPLC analytique, supérieur à 95%. Les dérivés photoactivables de U-II ont montré une baisse très significative de leur potentiel à induire la contraction des aortes de rat. Par contre, les quatre dérivés cagés de ET-I ont tous conservé une capacité relativement similaire à leur molécule mère à lier et à activer les récepteurs ET_A et ET_B. En ce qui concerne les cinétiques de photolyse, le photoclavage du groupement cage s'est effectué plus rapidement à partir du groupement phénolique de la tyrosine que des groupements carboxyliques (C-terminal et acide aspartique) et de la fonction ε-aminée de la lysine. Finalement, l'utilisation des analogues cagés de U-II a servi à démontrer que la contraction de l'aorte thoracique de rat peut être contrôlée par des dérivations chimiques ciblées ainsi que par l'exposition subséquente au rayonnement UV.

Cette étude a également permis de démontrer que l'incorporation d'un groupement 4,5-diméthoxynitrobenyle sur la chaîne latérale d'un acide aspartique favorise une réaction secondaire lorsque le produit est en milieu acide. En effet, le caractère électro-attracteur du groupement nitrobenzyle favorise l'attaque nucléophile du carbone γ de la chaîne latérale de l'acide aspartique par la paire d'électrons libres située sur l'atome d'azote du lien amide situé du côté C-terminal. Ceci entraîne le clivage du composé cage ainsi que la formation d'un composé succinimide cyclique. Ce cycle s'ouvre par hydrolyse lorsque le peptide est placé en milieu aqueux et il y a formation d'un peptide de type α- et/ou β-aspartyle. L'incorporation d'un groupement méthyle sur l'atome d'azote du squelette peptidique, placé du côté C-terminal du résidu acide aspartique, a permis d'inhiber cette réaction secondaire.



Steve Bourgault
Étudiant



Alain Fournier
Directeur de recherche

Hypothèses et objectifs du projet

Le développement d'une forme photoactivable d'un peptide requiert une analyse des pharmacophores clés de la molécule et de sa structure secondaire, deux paramètres responsables de l'activité biologique et/ou de l'affinité de celle-ci. En effet, l'introduction du composé cage photolabile doit se faire de façon ciblée dans l'optique de masquer une région précise et/ou de modifier la structure secondaire du peptide afin de causer une inhibition ou à tout le moins une diminution significative de la reconnaissance biologique.

Dans cet optique, nous avons planifié la synthèse de formes cagées efficaces du peptide vasoactif urotensine II (U-II) en ciblant les chaînes latérales des résidus Lys-8 et Tyr-9 pour l'incorporation d'un groupement photolabile. De façon similaire, nous avons également exploré les propriétés de dérivés cagés de l'endothéline-1 (ET-1) après l'incorporation du groupe 4,5-diméthoxynitrobenzyle (DMNB) sur les résidus Asp-8, Lys-9, Glu-10, Tyr-13 et Asp-18 ainsi qu'au niveau de la fonction acide C-terminale. L'utilisation du groupement photolabile DMNB nous a permis d'employer ces composés cagés dans des systèmes d'études biologiques puisque celui-ci est très sensible à l'irradiation aux longues ondes UV ($>360\text{nm}$) et que son sous-produit de photolyse est peu réactif et non toxique.

Donc, le principal objectif de ce projet a été de développer des formes photoactivables des peptides U-II et ET-1. Pour ce faire, nous avons employé la synthèse chimique d'acides aminés non-naturels ainsi que la dérivation moléculaire de peptides en solution. À plus long terme, il est envisagé d'utiliser ces peptides cagés dans des systèmes d'exploration cellulaires afin de vérifier si ces deux peptides possèdent, comme postulé, une action de type intracrâne. De plus, ceux-ci permettront, le cas échéant, la caractérisation moléculaire de certains processus biologiques régulés par ces deux hormones peptidiques.

Revue de la littérature

1. Composés cagés

1.1 Définition des composés cagés

Les composés cagés sont des biomolécules chimiquement modifiées dont l'activité biologique peut être contrôlée par la lumière; généralement par la conversion photolytique d'une entité inactive vers une forme active. Ces composés inertes sont donc des précurseurs photochimiques de molécules biologiquement actives. La majorité des molécules cagées efficacement ont été obtenues par la formation d'un lien covalent entre une molécule-mère et un groupement cage qui en masque une fonctionnalité importante pour la reconnaissance biologique (Figure 1). Ce n'est qu'après un clivage photochimique subséquent de ce lien que nous récupérons une espèce active. L'appellation de composé cagé, provenant de la traduction littérale du terme anglais *caged compounds*, est évidemment symbolique et ne repose pas sur l'emprisonnement de molécules à l'intérieur de cages moléculaires. Bien que certaines avancées dans le domaine de la chimie aient permis d'emprisonner une molécule à l'intérieur d'une autre, cette technologie ne semble pas applicable, du moins pour l'instant, pour les objectifs poursuivis avec les composés cagés photolabiles. Conséquemment, le terme cagé, malgré son ambiguïté, demeure largement répandu puisqu'il est court et qu'il renvoie à une image permettant la création d'une association simple et efficace au phénomène de masquage et de récupération sous l'effet des rayons UV. (Adams et Tsien, 1993)

Les biomolécules photoactivables sont de puissants outils d'exploration de processus biologiques complexes puisque la libération du composé actif peut être facilement contrôlée en termes de temps, d'amplitude et de localisation. En effet, le relargage efficace et spécifique d'un composé cagé à l'intérieur d'un tissu, d'une cellule ou de tout autre système d'étude biologique permet d'assurer un contrôle de l'action de la molécule active. Le principal avantage de l'utilisation des composés photoactivables est de pouvoir contourner les problèmes de diffusion lors d'études dynamiques de

phénomènes biologiques rapides. La photolyse des composés cagés est également une excellente méthode pour examiner la cinétique d'une réponse biochimique dans un système d'étude où l'agitation mécanique est impraticable. (Nerbonne, 1996)

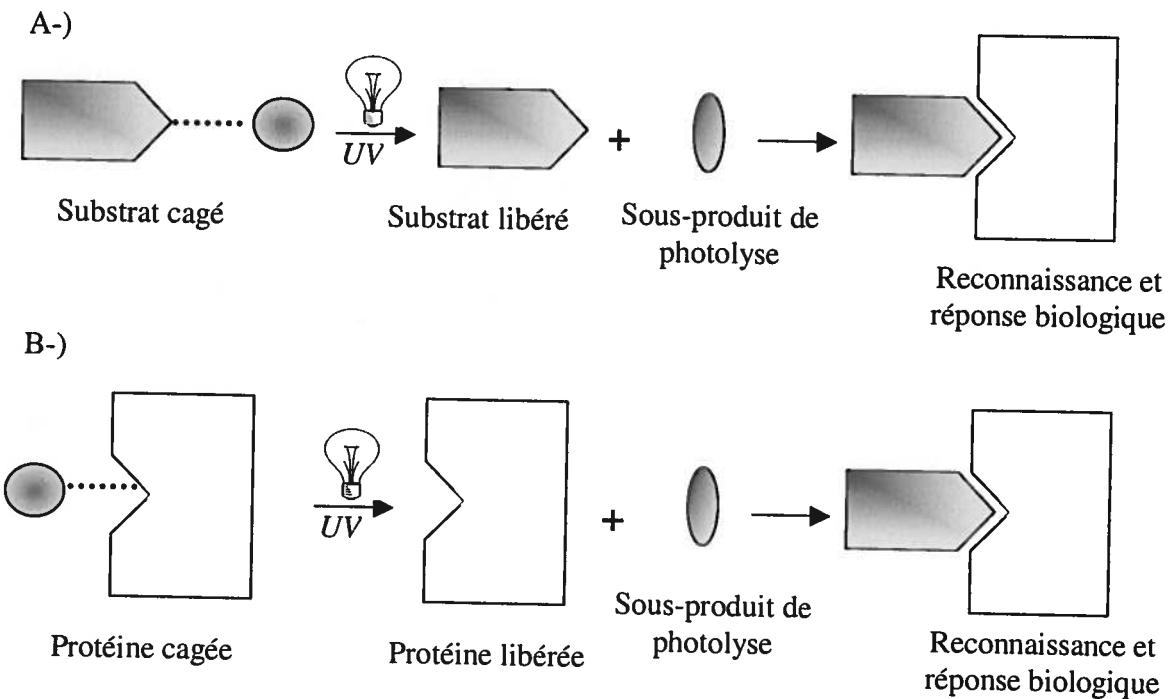


Figure 1 : Schéma démontrant le principe des composés cagés. (A) substrats, ligands, effecteurs. (B) enzymes, récepteurs, transporteurs. La liaison covalente photosensible est représentée par un trait pointillé.

1.2 Groupements photolabiles

Les composés cagés sont généralement obtenus en modifiant la molécule désirée avec une fonction photolabile. Pour être utile et efficace dans un système d'expérimentation biologique, le groupement protecteur photosensible ou groupement cage doit répondre à certains critères de base. Il doit rendre la molécule cagée biologiquement inerte à l'intérieur du système où elle est utilisée (i). Le complexe réunissant la molécule-mère et la fonction cage doit être stable dans ce même système et

ne doit pas induire de réactions secondaires (ii). Le relargage de la biomolécule doit être rapide et ce avec un rendement élevé suite à la photolyse (iii). La longueur d'onde nécessaire pour la photolyse ne doit pas être dommageable pour le système biologique étudié (iv). Les sous-produits de la photoréaction, autre que la biomolécule à l'étude, ne doivent pas interagir ou interférer avec le système d'expérimentation (v). (McCray et Trentham, 1989)

Depuis l'introduction des composés cagés, les chimistes ont su développer une multitude de groupements protecteurs photosensibles. Les premiers dérivés cagés ont été obtenus à l'aide de groupements photolabiles de type *ortho*-nitrobenzyle. Encore de nos jours, les composés cages reposant sur la photoisomérisation des substituants de type 2-nitrobenzyle sont de loin les plus utilisés. Cependant, depuis quelques années de nouveaux groupements cages très prometteurs, tels que certains dérivés de type coumarine, cinnamate ou *para*-hydroxyphénacyle ont été développés. Puisqu'un nombre très important de groupements photocliviaux différents sont répertoriés dans la littérature, nous ne mettrons donc l'accent que sur les principaux groupes utilisés dans l'élaboration de biomolécules cagées et qui reposent sur une technologie prometteuse.

1.2.1 Groupements de type nitrobenzyle

Les nombreux avantages des dérivés nitrobenzyles ainsi que le fait que ce sont les premiers groupements cages ayant été utilisés, expliquent le fait que ceux-ci soient encore aujourd'hui les plus couramment utilisés. Les principaux avantages de leur utilisation sont les suivants : compatibilité élevée avec de nombreux groupements fonctionnels, par exemple; phosphates, acides carboxyliques, amines, amides et hydroxyles (i), relativement facile à synthétiser et le couplage avec la molécule à cager est efficace (ii), sensibilité extrême du dérivé nitrobenzyle à la photolyse et la cinétique de relargage est rapide (0,001 à 100 msec) (iii) et la région spectrale de photolyse étant généralement comprise entre 300 et 360 nm, ceci permet de manipuler les dérivés à la lumière ambiante et n'entraîne que très peu d'effets néfastes sur les cellules et tissus biologiques étudiés (iv) (Adams et Tsien, 1993).

Le composé de base non substitué des dérivés nitrobenzyle, soit le groupement 2-nitrobenzyle (NB, # 1, Figure 2) possède une longueur d'onde optimale de photolyse à 265 nm (Adams et Tsien, 1993). De ce fait, cette propriété spectrale de ce composé ne permet pas son utilisation efficace dans des systèmes d'études biologiques sensibles à l'irradiation au rayonnement UV. De plus, le sous-produit de la réaction de photolyse du groupement chimique 2-nitrobenzyle, soit le dérivé 2-nitrobenzaldéhyde peut réagir avec la biomolécule relâchée ou avec d'autres composantes moléculaires du milieu d'expérimentation par le biais, par exemple, de la formation d'une base de Schiff (Adams et Tsien, 1993). L'incorporation d'un groupement méthyle au niveau du carbone α reliant la biomolécule au composé cage permet d'obtenir, après irradiation, le composé (2-nitrophényle)éthyle (NPE, # 2, Figure 2), un sous-produit de réaction moins réactif. Néanmoins, tout comme pour le groupe photolabile NB, le dérivé NPE n'absorbe que très faiblement à des longueurs d'onde supérieures à 340 nm, ce qui limite considérablement l'efficacité de la photolyse dans la plage de longueurs d'onde optimales de 300 à 400 nm et ainsi rend son utilisation dans des systèmes biologiques peu recommandable.

Afin d'assurer une libération efficace de la biomolécule masquée à des longueurs d'onde plus élevées, deux groupements de type méthoxy ont été incorporés aux positions 4 et 5 du noyau aromatique du composé NB, formant ainsi la molécule du 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle (DMNB, # 3, Figure 2) (Adams et Tsien, 1993). Ces deux groupes chimiques donneurs d'électrons à la fonction phénolique, par le phénomène de résonance, abaissent le niveau d'énergie nécessaire pour la photolyse et conséquemment la sensibilité envers les longues ondes UV est augmentée considérablement. Par exemple, il a été démontré avec les AMPc et GMPc cagés avec le composé DMNB que la cinétique de libération de la biomolécule est plus rapide que lorsque le dérivé NPE est utilisé comme groupement protecteur (Adams et Tsien, 1993). De plus, il semble que le sous-produit de photolyse provenant du clivage du groupe DMNB soit moins réactif que le dérivé 2-nitrobenzaldéhyde libéré par le composé NB. Dans un effort de raffinement de la stratégie, un composé cage qui combine à la fois la faible réactivité du sous-produit de photolyse du groupement NPE ainsi que la forte susceptibilité du dérivé DMNB vis-à-vis

les rayonnements UV a donc été développé. Toutefois, le composé (4,5-diméthoxy-2-nitrophényle)éthyle (DMNPE, # 4, Figure 2), ne s'est pas avéré adéquat puisqu'il a montré une cinétique de libération très faible (Adams et Tsien, 1993).

Les groupements cages NPE et DMNPE sont des molécules chirales et de ce fait lorsqu'elles sont couplées à des biomolécules elle aussi chirales il y a formation de diastéréoisomères. Ces composés ainsi formés possèdent des propriétés physiques, chimiques et biologiques différentes. De nombreux dérivés photosensibles de type nitrobenzyle plus complexes chimiquement ont également été développés afin d'améliorer certaines caractéristiques spécifiques du complexe biomolécule-cage. Bien que ceux-ci aient permis une avancée importante dans certains domaines d'étude particuliers, ils ne sont pas d'usage très courant. De nos jours, et ce malgré quelques inconvénients, le groupement photolabile NB semble toujours être celui qui est le plus couramment utilisé.

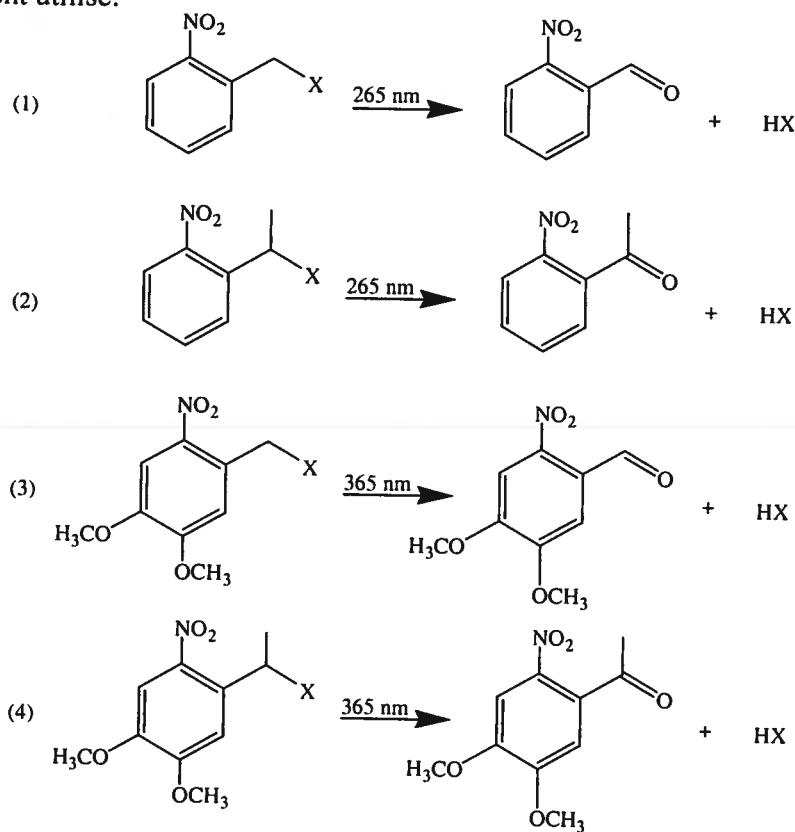


Figure 2 : Dérivés cages de type nitrobenzyle : (1) 2-nitrobenzyle; (2) (2-nitrophényle)éthyle; (3) 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle; (4) (4,5-diméthoxy-2-nitrophényle)éthyle. X étant la biomolécule. La longueur d'onde indiquée correspond à celle où la réaction de la photolyse est la plus rapide. (Adams et Tsien, 1993)

Pour décrire le mécanisme de photofragmentation des dérivés cages de la famille des nitrobenzyles, le composé 2-nitrobenzyle non substitué a été utilisé comme molécule de base. Le mécanisme de réaction postulé par McCray et Trentham (1989) est décrit à la Figure 3. Ce mécanisme a été établi à l'aide de l'ATP cagée et sert de référence à l'ensemble des réactions utilisant les dérivés *o*-nitrobenzyles. De façon générale, la réaction de photolyse concernant ce type de composé est très rapide, soit du domaine de la μ s. L'étape initiale est la formation du composé intermédiaire aci-nitro dont la formation a été démontré spectroscopiquement. Sa forte absorbance caractéristique et transitoire vers 410 nm a été utilisée pour établir la cinétique globale de cette réaction.

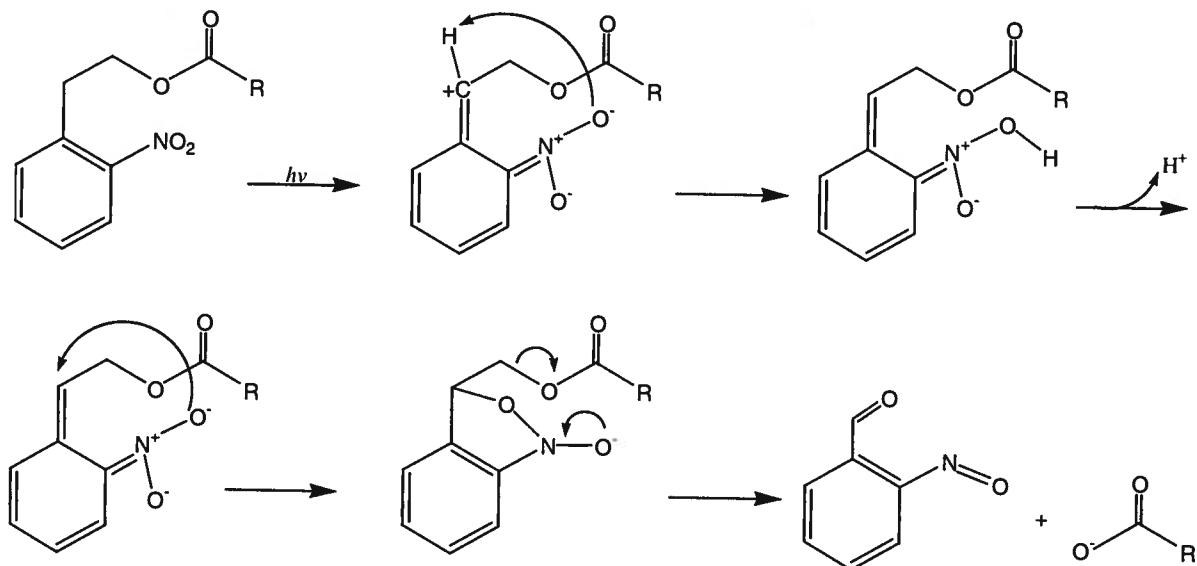


Figure 3 : Mécanisme de photolyse simplifié des dérivés cages *ortho*-nitrobenzyles (McCray et Trentham, 1989).

1.2.2 Groupements dérivés du *p*-hydroxyphénacyle

Les groupements dérivés de la fonction *p*-hydroxyphénacyle constituent probablement une avenue fort prometteuse dans l'élaboration de nouveaux composés cages. Le premier composé de cette famille à avoir été utilisé dans l'élaboration de biomolécule cagée, le dérivé 4-méthoxyphénacyle (# 1, Figure 4), a été introduit comme un groupement photosensible bloqueur des fonctions carboxyliques (Adams et Tsien, 1993). Par contre, ce composé, tout comme la fonction 4-hydroxyphénacyle (# 2, Figure

4), possède une longueur d'onde maximale de photolyse variant entre 260 et 300 nm, ce qui peut entraîner certains dommages à des préparations biologiques (Givens *et al.*, 1998; Adams et Tsien, 1993). Dans le cas du composé cage *p*-hydroxyphénacyle, diverses substitutions, notamment en position *ortho* de la fonction hydroxyle, ont permis de déplacer le λ_{max} vers de plus grandes longueurs d'onde. Par exemple, l'incorporation d'un groupement carboxylique a permis d'obtenir une réaction photolytique optimale pour des longueurs d'ondes de près de 350 nm (Givens *et al.*, 1998). Le principal avantage relié à l'utilisation des composés cagés portant des groupements hydroxyphénacyle plutôt que nitrobenzyle repose sur le sous-produit de photolyse qui est chimiquement inerte et qui absorbe très peu les rayons UV. Cette faible absorbance dans les longueurs d'onde requises pour la photolyse diminue l'interférence avec l'évolution de la réaction photochimique en cours. Par contre, ces divers groupements protecteurs possèdent une faible stabilité dans certains milieux tamponnés (Givens *et al.*, 1998).

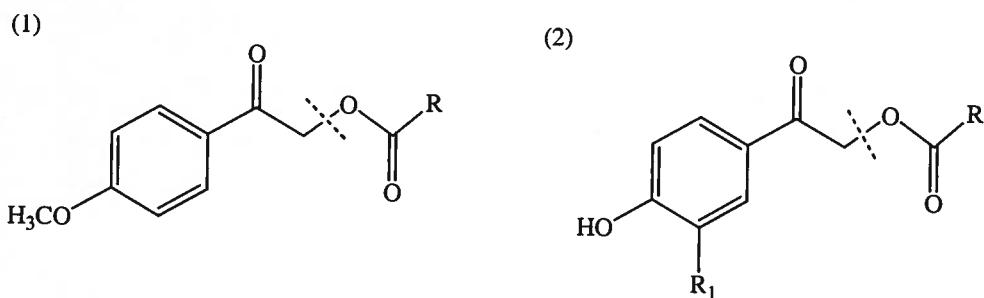


Figure 4 : Groupements cages dérivés du *p*-hydroxyphénacyle. La ligne pointillée représente la liaison covalente qui est rompue lors de la réaction photolytique. R = corps de la biomolécule. R₁ = H, OH, CO₂H, OCH₃.

Les dérivés *p*-hydroxyphénacyles sont principalement utilisés dans le masquage de fonctions carboxyliques. Conséquemment, le mécanisme de photofragmentation décrit ici sera celui qui a été établi lors du blocage d'un groupement carboxylate (Givens *et al.*, 1998). Bien que l'intermédiaire diènedione n'a pas été détecté spectroscopiquement et que certains détails de ce mécanisme restent à être déterminés, de nombreux indices tendent vers le processus photochimique décrit à la Figure 5.

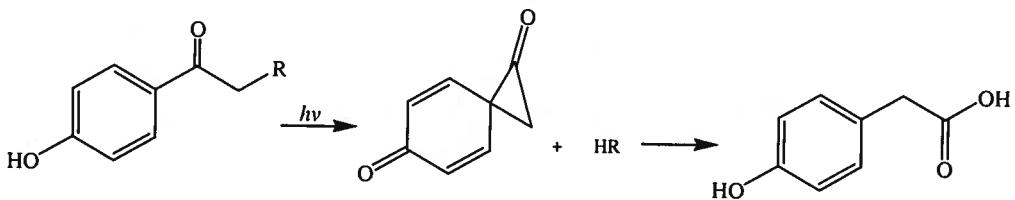


Figure 5 : Schéma de l'intermédiaire de photolyse des groupements *p*-hydroxyphénacyles (Givens *et al.*, 1998).

1.2.3 Dérivés de coumarine

Les dérivés de coumarine connaissent également une série de développements intéressants concernant leur utilisation comme groupement protecteur photolabile de composés biologiques. Généralement, leur utilisation est focalisée sur la protection de différents nucléotides via la formation d'esters phosphoriques (Furuta et Iwamura, 1998). Le groupement coumarine (Figure 6) étant chimiquement imposant et relativement hydrophobe, celui-ci peu cependant induire chez certaines biomolécules cagees des problèmes reliés à la solubilisation en milieu aqueux. Pour contourner cette difficulté, Hagen *et al.* (2001) ont incorporé un groupement carbométhoxy en position 7 ce qui assure à ces composés une solubilité en milieu aqueux suffisante pour des expériences biologiques sans en altérer les propriétés photochimiques. Bien que ce type de composé cage soit considéré comme étant fort prometteur, peu d'informations précises sont actuellement disponibles dans la littérature concernant leur mécanisme de photolyse ainsi que leur longueur d'onde optimale de libération.

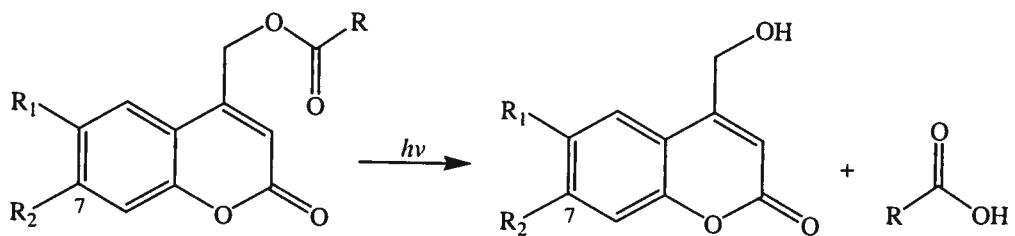


Figure 6 : Dérivé de coumarine et photolyse subséquente. R = corps de la biomolécule. R₁ = H, OH, OCH₃. R₂ = H, OH, OCH₃, OCH₂CO₂H.

1.4 Exemples et applications de biomolécules cagées

Le principe des biomolécules cagées a été introduit lorsque Kaplan *et al.* (1978) ont couplé l'ATP, molécule ubiquitaire des organismes vivants, avec un groupement *ortho*-nitrobenzyle. L'incorporation de ce groupement cage sur le phosphate γ de l'ATP conduit au blocage du transport ionique catalysé par la Na^+K^+ ATPase et permet, suite à l'exposition aux rayonnements UV, une libération d'ATP biologiquement actif. Une autre cible très convoitée par les biologistes a été l'ion Ca^{2+} qui, par sa fonction de second messager, régule un nombre important de processus biologiques complexes. Le développement d'une forme photoactivable du Ca^{2+} a nécessité une approche inhabituelle dû au fait qu'il est impossible de mettre en place une liaison covalente photosensible directement sur le ligand. Par conséquent, des chélateurs cagés du Ca^{2+} ont été développés. Ces molécules se devaient d'être sélectives pour le Ca^{2+} et de plus elles devaient assurer une décomplexation rapide et efficace par photolyse. Les premiers composés photolabiles utilisés sur des chélateurs de type EDTA ont été des groupements *o*-nitrobenzyles (Kaplan et Ellis-Davies, 1988). Ainsi, les formes d'ATP et de Ca^{2+} photoactivables ont permis l'étude dynamique de la contraction musculaire régulée par ces deux agents (Shirakawa *et al.*, 2000). Une quantité considérable de petites biomolécules ont été développées sous forme cagée et ont permis l'étude de divers phénomènes biologiques. Le Tableau I dresse une liste partielle de ces molécules ainsi que le contexte de leur utilisation en système biologique.

Tableau I : Exemples de biomolécules cagées (Shigeri *et al.*, 2001).

| Composé | Système d'étude |
|----------------|---|
| AMP | Mouvement de la myosine. |
| ADP | Translocateur mitochondrial ADP/ATP. |
| GDP | Hydrolyse du GTP par la protéine <i>Ras</i> . |
| Glutamate | Récepteur du glutamate au niveau de l'hippocampe. |
| Carbachol | Récepteur nicotinique de l'acétylcholine. |
| Oxyde nitrique | Agrégation plaquettaire induite par la thrombine. |
| ARN | Clivage de l'ARN par le ribosome. |
| Taxol | Assemblage de la tubuline. |
| Phénylephrine | Récepteur adrénnergique. |
| Glycine | Sous-unité du récepteur de la glycine humain. |

2. Peptides et protéines cagés

2.1 Introduction

En comparaison avec le nombre important de publications rapportant la synthèse et/ou l'utilisation de composés cagés de faible poids moléculaire, relativement peu d'études ont portées sur la préparation, la caractérisation et l'utilisation de protéines ou de peptides photoactivables. Ceci est le reflet de la difficulté de développer et de synthétiser une forme cagée efficace de ce type de macromolécules. Différents obstacles expliquent cette difficulté. Tout d'abord, les protéines sont beaucoup plus difficiles à manipuler que les composés de faible poids moléculaire. Usuellement, les peptides et les protéines contiennent de nombreux sites nucléophiles et de ce fait, la modification covalente spécifique qui permet l'introduction du composé cage est généralement peu ciblée. De plus, la région importante pour le maintien de l'activité biologique ou site actif n'est pas toujours préalablement bien caractérisée. Il est également possible que chez certaines protéines et peptides ce site actif ne comporte aucun groupement fonctionnel pouvant incorporer un composé protecteur photolabile. Finalement, contrairement à la majorité des biomolécules de faible poids moléculaire, les membranes sont généralement peu perméables aux protéines et aux peptides, ce qui rend leurs utilisations dans des systèmes d'études intra-cellulaires plus complexes. Par contre, des solutions face à ces divers problèmes ont été explorées depuis quelques années.

2.2 Synthèse de peptides et de protéines cagés

Dans les années 70, les composés de type photolabile ont été fréquemment utilisés pour protéger sélectivement certaines fonctions (amine, acide carboxylique, phénol, amide) des acides aminés pour permettre une synthèse chimique efficace de peptides (Pillai, 1980). Depuis la fin des années 80, ces réactifs photosensibles sont plutôt couramment employés en chimie combinatoire dans l'élaboration de librairies de peptides utilisées pour identifier de nouvelles interactions protéine/protéine et/ou de nouveaux composés biologiquement actifs (Fodor *et al.*, 1991). Ce n'est que dans les années 90 que

ces composés photolabiles ont été utilisés dans le développement de formes photoactivables de peptides et de protéines. De façon générale, il existe trois méthodes de synthèse pour obtenir des peptides ou des protéines cagés; via modification chimique directe de la protéine, via la synthèse peptidique en phase solide et via la technique de mutagenèse dirigée à l'aide d'acides aminés non-naturels cagés (suppression des codons faux-sens) (Shigeri *et al.*, 2001).

2.2.1 Modification chimique du peptide ou de la protéine

La façon la plus simple de synthétiser des protéines et des peptides cagés est par le biais d'une modification chimique, ciblée ou non, au niveau de la chaîne latérale d'un ou de plusieurs résidus ou aux extrémités du corps polypeptidique. Généralement, ces modifications chimiques sont directes et relativement faciles à utiliser. Par contre, le principal désavantage provient de l'incapacité de contrôler efficacement la position et le nombre de sites modifiés puisque les protéines et les peptides possèdent habituellement de multiples fonctions chimiques réactives. Selon le groupement chimique ciblé, soit une fonction amine (lysine, arginine et N-terminal), une fonction acide (acide aspartique, acide glutamique et C-terminal) ou une fonction thiol (cystéine), différentes méthodes et des réactifs variés peuvent être utilisés. En ce qui concerne la fonction alcool, présente au niveau des chaînes latérales des résidus sérine, thréonine ou tyrosine, un groupement cage peut également y être incorporé sur celle-ci. Par contre, il est très difficile de cibler adéquatement cette fonction dû à sa faible réactivité par rapport à d'autres groupes chimiques retrouvés généralement chez les protéines.

Les groupements amines des peptides et protéines peuvent être modifiés à l'aide d'un composé cage activé au moyen d'une fonction chloroformate (Figure 7). Le nouveau lien de type uréthane (ester carbamique) formé entre la fonction amine et le groupement photosensible peut être clivé via une irradiation aux rayons UV et de ce fait, régénérer la molécule native. En effet, Marriott (1994) a utilisé ce type de réactif pour introduire un groupement cage au niveau de la lysine-61 de l'actine-G. Puisque ce résidu est essentiel pour la polymérisation de l'actine, l'introduction de ce composé sur la chaîne

latérale de la lysine-61 a permis de contrôler photochimiquement ce phénomène biologique. Par contre, il est probable que d'autres groupements fonctionnels puissent être affectés ou modifiés par le réactif utilisé. Conséquemment, l'inhibition de la polymérisation de l'actine décrite dans la littérature pourrait provenir d'une synergie de l'incorporation des groupements cagés non seulement sur la fonction amine de la lysine en position 61 mais également sur plusieurs autres amines, ainsi que sur des fonctions de type thiol par exemple.

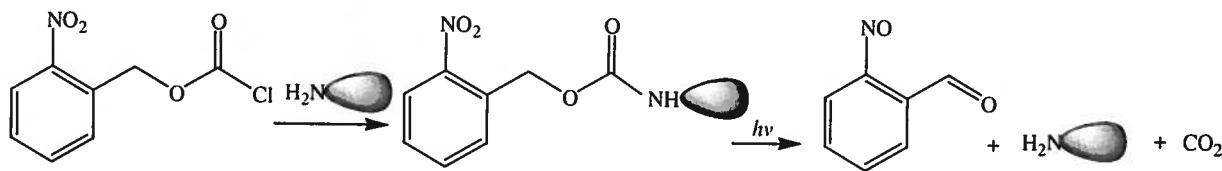


Figure 7 : Incorporation d'un groupement nitrobenzyle au niveau d'une fonction amine ainsi que sa photolyse subséquente.

L'introduction d'un composé nitrobenzyle au niveau d'un groupement thiol est généralement effectué à l'aide d'un dérivé bromure (Figure 8). Par exemple, la protéine kinase AMP_c dépendante a été développée sous forme cagée, à l'aide de ce type de dérivé, via l'incorporation ciblée sur la chaîne latérale d'un résidu cystéine. Pour ce faire, Chang *et al.* (1998) ont conjugué des techniques de biologie moléculaire et de chimie organique. En effet, cette enzyme possède seulement deux résidus cystéines; une située en périphérie du site actif (Cys199) et l'autre qui est très éloignée de ce même site (Cys343). Une perte majeure d'activité est observée lorsque Cys199 est modifiée avec un réactif spécifique au groupement thiol. Par contre, cette même modification au niveau de Cys343 n'entraîne aucune diminution de l'activité kinasique. Par la suite, ce groupe a remplacé Cys343 par un résidu sérine au moyen de la technique de mutagenèse dirigée. Cette transmutation, qui s'avéra sans effet sur l'activité enzymatique, a permis de cibler l'incorporation du composé nitrobenzyle au niveau de Cys199. Cette forme cagée de la kinase AMP_c dépendante a montré une perte importante de son activité avec toutefois un recouvrement complet de celle-ci suite à l'irradiation aux rayons UV.

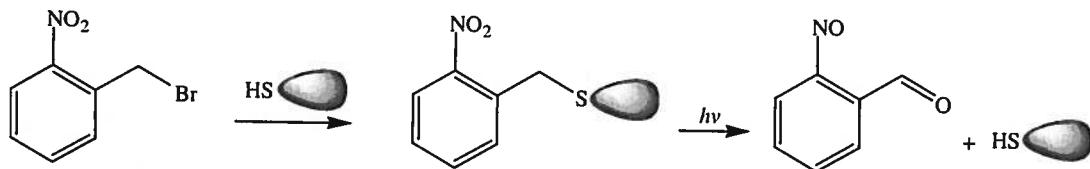


Figure 8 : Incorporation d'un groupement nitrobenzyle au niveau d'une fonction thiol ainsi que sa photolyse subséquente.

Un substrat peptidique de cette protéine kinase, le C-kemptide, a également été cagé à l'aide de ce type de dérivé bromé du composé nitrobenzyle (Pan et Bayley, 1997). Ce peptide de 14 acides aminés possède un seul résidu cystéine (Cys-5) et de ce fait, l'incorporation du composé cage a nécessairement été spécifique. Une forme thiophosphorylée du C-kemptide, dans laquelle la sérine en position 12 a été modifiée par de l'ATP- γ -S à l'aide de la protéine kinase AMP_c dépendante, a également été cagée sélectivement au moyen du bromo-2-nitrobenzyle au niveau de Ser(γ -S)12. L'incorporation ciblée du groupement photolabile sur la position 12 thiophosphorylée s'est effectuée dans un milieu réactionnel tamponné à pH 4. Ce milieu acide empêche l'incorporation du groupement protecteur sur le groupe thiol de Cys-5, dont le pKa se situe autour de 8,5.

Les groupements carboxyliques des peptides et des protéines peuvent être quant à eux modifiés à l'aide d'un dérivé diazo-éthane (Figure 9) (Shigeri *et al.*, 2001). Ce dérivé très instable doit être préparé peu de temps avant son utilisation. Celui-ci a par exemple été utilisé pour la synthèse de l'acide phosphatidique cagé (Williger *et al.*, 1995) ainsi que d'une forme d'ADN plasmidique dont la réplication et la transcription pouvaient alors être photorégulées (Monroe *et al.*, 1999). Selon la littérature, on note toutefois qu'aucun peptide ou protéine ne semble avoir été cagé à l'aide de ce réactif. Ainsi d'autres modes de masquage ont été favorisés et à titre d'exemple soulignons le nonapeptide bradykinine qui a été cagé au niveau de sa fonction C-terminale à l'aide d'un dérivé activé du composé *p*-hydroxyphénacyle (Givens *et al.*, 2000). D'autre part, pour conduire à une incorporation ciblée sur l'acide carboxylique terminal, une élégante méthode basée sur la libération du peptide protégé sur ces différentes chaînes latérales a

été utilisée par Givens et al. En effet, l'équipe a préalablement synthétisé la bradykinine, au moyen de la méthodologie dite sur phase solide. Le peptide était relié à son support polymérique de type super-acide labile par le biais de son extrémité C-terminal. Le complexe peptide-résine a ensuite été traité avec une solution diluée d'acide acétique. Ainsi, une forme complètement protégée de la bradykinine avec sa fonction C-terminale libre a été obtenue suite au clivage en milieu faiblement acide. L'incorporation du groupement *p*-hydroxyphénacyle a pu alors être effectuée sélectivement à l'aide d'un dérivé activé de type bromure avant de traiter le peptide avec une solution concentrée en acide trifluoroacétique afin d'enlever les groupements protecteurs des chaînes latérales. De la bradykinine cagée en C-terminal a ainsi été obtenue.

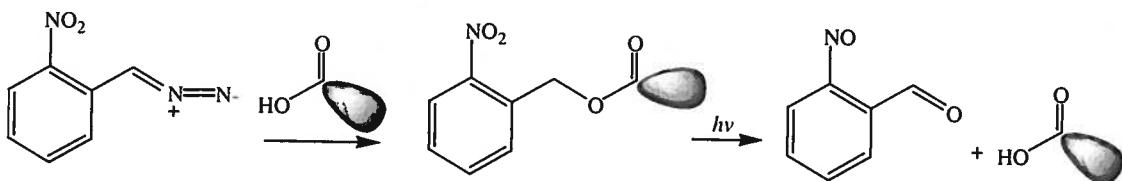


Figure 9 : Incorporation d'un groupement nitrobenzyle au niveau d'un groupement carboxylique ainsi que sa photolyse subséquente.

La synthèse de protéines et de peptides cagés peut se faire par l'introduction aléatoire de groupements photolabiles via des modifications chimiques sur des chaînes latérales réactives de certains résidus, cette méthode étant cependant peu prédictible et reproductible. D'autre part, différentes méthodologies peuvent être utilisées afin d'obtenir une introduction ciblée de groupements photosensibles sur des protéines multifonctionnelles. Aucune règle générale ne peut définir la voie de synthèse sélective de peptides et protéines cagés par modification chimique. En effet, chaque cas doit être évalué individuellement et la démarche expérimentale développée pour la synthèse est directement reliée à la fonction, à la structure ainsi qu'à la composition chimique propre de cette cible protéique. Finalement, pour certains peptides et protéines, il est possible qu'aucune démarche par modification chimique ne puisse mener au développement d'une forme sélectivement cagée. Donc, l'utilisation de procédés reposant sur la synthèse peptidique en phase solide ou sur la technique de suppression de codons de type faux-sens peut s'avérer incontournable pour cibler efficacement l'incorporation du composé cage.

2.2.2 Synthèse peptidique en phase solide

La synthèse peptidique en phase solide (SPPS) est une procédure efficace qui permet l'obtention d'une quantité de peptide pouvant varier du mg au kg. Le succès des synthèses est en bonne partie assuré par l'utilisation de dérivés d'acides aminés protégés par un groupement de type Fmoc ou Boc sur leur fonction α -amine. Par contre, cette méthode ne peut s'appliquer à la synthèse de protéines, puisque la SPPS ne permet pas la synthèse avec un rendement satisfaisant de chaînes polypeptidiques de plus de 100 acides aminés. De nombreuses équipes ont utilisé cette méthode pour produire des peptides photoactivables. Le principal avantage de celle-ci est que l'introduction du groupement cage est relativement bien ciblée sur une chaîne latérale spécifique du peptide. La Figure 10 schématise la synthèse de peptides cagés en utilisant la technique de SPPS. Tout d'abord, des dérivés Fmoc ou Boc d'acides aminés couplés à un groupement photosensible sont synthétisés par chimie en solution. Les réactifs décrits à la section précédente sont généralement utilisés pour dériver les acides aminés. Ceux-ci sont ensuite incorporés de façon ciblée lors de l'elongation peptidique. Après le clivage du peptide de la résine et sa purification, une quantité souvent appréciable de matériel pur sélectivement cagé est obtenue.

Cette méthode a été rapportée dans la littérature pour la première fois en 1996 (Tatsu *et al.*, 1996) lors de l'assemblage d'une forme photoactivable du neuropeptide Y à l'aide d'un dérivé Fmoc-Tyr cagé avec le groupement NB. Des analogues masqués des acides aminés lysine, sérine et cystéine ont également été synthétisés pour être incorporés en SPPS utilisant la chimie Fmoc (Tatsu *et al.*, 1999, Shigeri *et al.*, 2001). Plus récemment, Rothman *et al.* (2003) ont préparé des dérivés d'acides aminés (sériste, tyrosine et thréonine) phosphorylés et cagés avec un composé nitrobenzyle. Ceux-ci étaient dérivés avec un groupement protecteur de type Fmoc sur l'amine- α . Finalement, le peptide *speract* (sperm-activating; SAP-1) sous forme cagée a également été synthétisé via la SPPS (Tatsu *et al.*, 2002). Pour ce faire, le groupement photosensible NB a directement été incorporé sur le corps peptidique, c'est-à-dire sur l'atome d'azote du lien

peptidique amide. En fait, un dérivé de la glycine, le composé N- α -Fmoc-N- α -(2-nitrobenzyl)Gly-OH a été incorporé lors de l'élargissement du peptide SAP-1 en SPPS.

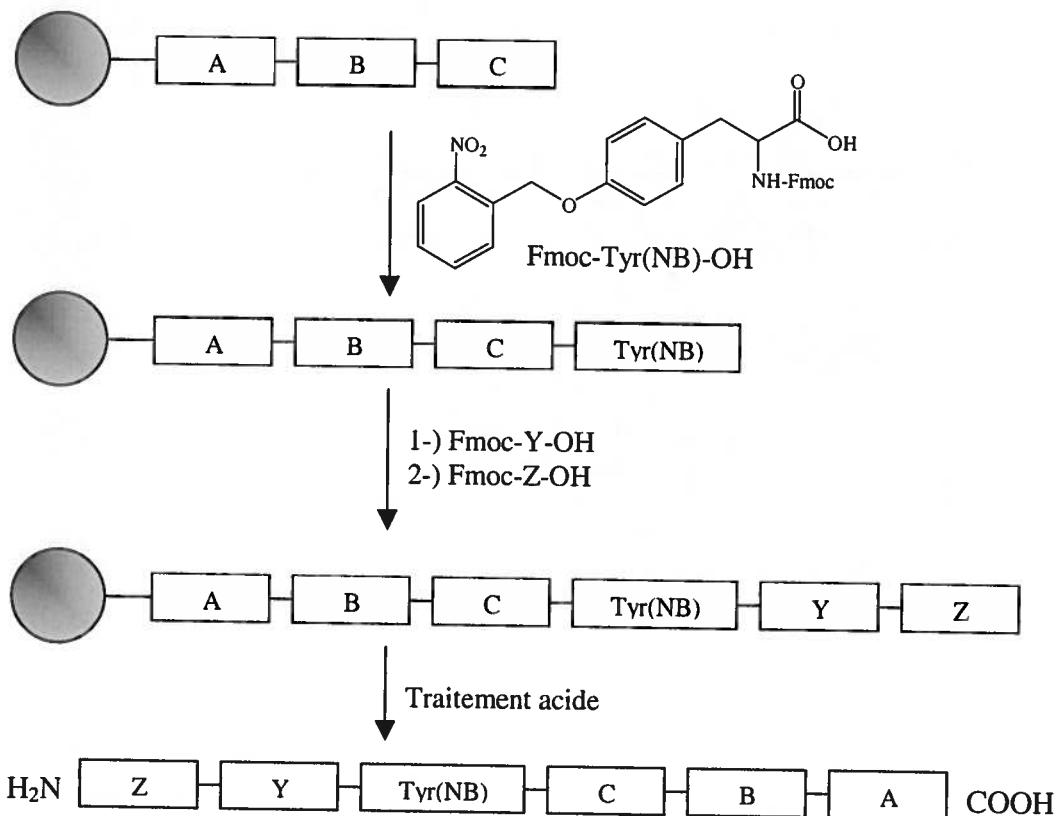


Figure 10 : Schéma montrant l'approche de la synthèse de peptides cagés en utilisant la SPPS. Dans cet exemple, le groupement photolabile se retrouve sur la chaîne latérale d'un résidu tyrosine.

2.2.3 Mutagenèse dirigée à l'aide d'acides aminés non naturels

Une méthode de synthèse de protéines cagées combinant génétique et chimie a été développée au début des années 90. La suppression des codons faux-sens est la technique la plus sophistiquée pour préparer des protéines photoactivables. Ainsi, en 1991, Ellman *et al.* ont remplacé au moyen de la mutagenèse dirigée le résidu Asp-20 du lysozyme T4, situé au niveau du site actif, par un résidu aspartate cagé. Pour ce faire, le gène codant

pour la protéine T4 lysozyme a été modifié au niveau du codon de l'acide aminé en position 20 par un codon faux-sens. Après transcription, ce triplet non-sens est ensuite reconnu par un ARNt suppresseur synthétique couplé à un Asp dérivé par un composé nitrobenzyle. Donc, en utilisant un système d'expression protéique *in vitro*, il a été possible de produire une forme de la protéine lysozyme T4 dérivée de façon ciblée avec un groupement photolabile. Cette forme cagée du lysozyme T4 ne possède aucune activité catalytique tant qu'elle n'est pas soumise à une exposition aux rayons UV.

Cette méthode a également été appliquée à des systèmes d'expression protéique de type *in vivo*. En effet, Miller *et al.* (1998) ont induit l'expression de formes cagées du récepteur nicotinique de l'acétylcholine via l'introduction d'un ARNc muté dans des oocytes de *Xenopus*. Des mutations dirigées ainsi que des ARNt tronqués ont permis d'incorporer des résidus Tyr dérivés avec un groupement photolabile au niveau des positions 93, 127 et 198 de la sous-unité α . Les résidus Tyr-93 et Tyr-198 sont identifiés comme étant directement impliqués dans la liaison à l'acétylcholine. Ensuite, les récepteurs mutés exprimés ont été testés pour leur fonction de canal ionique suite à une stimulation à l'acétylcholine. Le récepteur muté en position α -198 a montré une perte significative de sa capacité à induire un flux ionique en présence d'agonistes en comparaison avec le type sauvage. Un accroissement rapide du flux ionique se produit lorsque ce même système d'expérimentation est exposé aux rayons UV.

Cette méthode de synthèse de protéines photoactivables qui repose sur des techniques de biologie moléculaire est certainement le meilleure moyen de produire des protéines cagées de façon non aléatoire, au niveau de résidus ciblés. Par contre, puisque celle-ci requiert des méthodes expérimentales longues et laborieuses, elle n'est utilisée que lorsque les deux méthodes décrites précédemment ne peuvent être employées; comme par exemple, pour des chaînes polypeptidiques de plus de 100 acides aminés et lorsque la protéine contient plusieurs sites réactionnels.

2.3 Applications des protéines et peptides photoactivables

Malgré un nombre non négligeable de travaux portant sur la synthèse et la caractérisation de peptides cagés, dont plusieurs ont été décrits précédemment, peu d'études décrites dans la littérature font référence à leur usage dans l'élucidation de processus biologiques complexes. Nonobstant le grand potentiel que ce type de macromolécules photoactivables possède pour l'exploration des mécanismes moléculaires, le principal défi pour les années à venir, repose sur leur utilisation efficace. Une avenue prometteuse est certainement l'utilisation de ceux-ci dans des systèmes d'études portant sur les mécanismes de transduction intracellulaire. En effet, les peptides cagés permettent un contrôle de la cinétique d'action et de la compartmentalisation cellulaire lors de l'étude de l'activation de voies de transduction de signaux intracellulaires. De plus, puisqu'un nombre important de voies de signalisation sont régulées par des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation, les peptides cagés au niveau des résidus sérine, thréonine ou tyrosine sous forme phosphorylée (Rothman *et al.*, 2003) seront certainement des outils de premier plan pour étudier ces phénomènes.

Un autre domaine d'études dans lequel les peptides cagés pourront certainement être un outil d'exploration moléculaire efficace est celui-ci du mode d'action intracellulaire des hormones peptidiques. Cette hypothèse dite « intracrine » (Re, 2003) repose sur de nombreuses observations qui indiquent une action directe d'hormones ou de facteurs de nature peptidique au niveau intracellulaire. L'utilisation de peptides cagés permettra de contourner les récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique et ainsi, via l'utilisation d'un mécanisme permettant l'introduction intracellulaire de peptides, de provoquer l'activation du peptide de façon ciblée dans le temps. Cette approche expérimentale ainsi que les principes à la base de l'hypothèse intracrine seront approfondies dans la sous-section suivante.

2.3.1 Exploration de l'hypothèse d'une action intracrine via l'utilisation de peptides cagés

Le terme intracrine renvoie à toute action biologique d'une hormone au niveau intracellulaire et ce, suite à son internalisation dans une cellule ciblée ou à l'intérieur même de la cellule de synthèse. Pour être défini comme étant intracrine, un peptide doit répondre à certains critères bien définis (Re, 2003). Tout d'abord, ce peptide doit être retrouvé dans le milieu extra-cellulaire et l'exposition d'une cellule spécifiquement ciblée à ce facteur peptidique doit résulter en un certain effet biologique. Conséquemment, selon cette première prémissse, l'hormone peptidique doit avoir le potentiel d'agir de façon autocrine, paracrine ou endocrine. Généralement, cet effet biologique est permis suite à la liaison d'un récepteur membranaire spécifique. Deuxièmement, ce facteur potentiellement intracrine doit être retrouvé en association avec une ou plusieurs organelles, qui elles ne doivent pas être impliquées dans les processus de dégradation ou de sécrétion. Finalement, ce facteur doit être nécessairement de nature peptidique. En appliquant le modèle de définition des hormones intracrines établi par Re (2003), de nombreux peptides peuvent être inclus dans cette catégorie. L'angiotensine II, l'insuline, l'hormone de croissance (GH), le VIP (vasoactive intestinal polypeptide) ainsi que la somatostatine ne sont que quelques exemples de peptides qui semblent agir de façon intracrine.

L'utilisation d'une forme cagée d'un peptide agissant potentiellement de façon intracrine pourrait permettre d'étudier cette hypothèse. Ce peptide étant photoactivable, celui-ci permettra d'éliminer la possibilité d'une action avec le récepteur membranaire et pourrait être délivré directement à l'intérieur de la cellule à l'étude. Cette introduction peut se faire par une méthode de micro-injection, via l'utilisation de liposomes ou de toxines inductrices de pores ou via le couplage du peptide cagé avec des peptides dits *membrano-perméables*. Suite à l'introduction du peptide cagé, l'activation pourra être contrôlée en terme de temps et de localisation cellulaire. De plus, l'emploi de cette forme photoactivable permettra de prévenir une manifestation biologique lente et relativement faible produite par les effets d'une entrée progressive dans les cellules résultant des délais de diffusion lors de la pénétration membranaire.

3. Urotensine II

3.1 Historique et généralités du système U-II/UT

À la fin des années 60, Bern et Lederis (1969) ont isolé différentes substances biologiquement actives à partir de l'urophyse de poisson. Cette famille de substances alors nommée urotensine, était composée de quatre membres possédant des actions biologiques distinctes (urotensine I, II, III et IV). Ce n'est qu'en 1980 que l'urotensine II (U-II) a été isolée et caractérisée à partir de l'urophyse d'un poisson téléostéen, soit le *Gillichthys mirabilis*, mieux connu sous le nom de goby (Pearson *et al.*, 1980). L'urotensine II de goby (gU-II) s'est avérée comme étant un peptide cyclique de 12 acides aminés. L'isolation subséquente de U-II à partir de différentes espèces animales a permis de démontrer une similitude marquée au niveau de la structure primaire de ce peptide à travers les divers niveaux évolutifs. En effet, tel que montré au Tableau II, le motif de l'hexapeptide cyclique a été totalement conservé sur un large spectre d'espèces animales (Douglas et Ohlstein, 2000). De plus, ce corps cyclique est précédé du côté N-terminal par un résidu acide (Asp ou Glu) et est suivi par un résidu hydrophobe aliphatique (Val ou Ile) localisé en C-terminal.

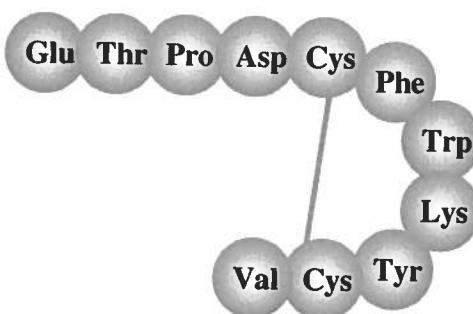


Figure 11 : Structure primaire de l'urotensine II humaine.

En ce qui concerne les autres membres de la famille des urotensines, seul l'urotensine I (U-I) a été isolée et caractérisée et ce, seulement chez certaines espèces de poissons. Par exemple, l'U-I chez la truite est un peptide de 31 acides aminés et son

action prépondérante est la vasorelaxation des muscles lisses (Mimassi *et al.*, 2000). Les actions biologiques des substances U-III et U-IV semblent provenir d'une certaine contamination de ces extraits urophysaires puisqu'aucune isolation et caractérisation n'ont été répertoriées jusqu'à présent dans la littérature.

Tableau II: Structure primaire de l'urotensine II provenant de différentes espèces animales (Douglas et Ohlstein, 2000).

| Espèces | Nombre de résidus | Séquence |
|------------|-------------------|---|
| Humain | 11 | Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Souris | 14 | Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile |
| Rat | 14 | Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile |
| Porc - A | 12 | Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Porc - B | 12 | Gly-Pro-Pro-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Goby | 12 | Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Grenouille | 13 | Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Truite | 12 | Gly-Gly-Asn-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Esturgeon | 12 | Gly-Ser-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Flet | 12 | Ala-Gly-Thr-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |

En 1998, l'ARN_m permettant la biosynthèse de l'urotensine II humaine (hU-II) a été isolée à partir de la moelle épinière par hybridation *in situ* (Coulouarn *et al.*, 1998). Par cette étude, ces auteurs ont ainsi montré que l'hU-II est composée de 11 acides aminés et qu'elle possède un pont disulfure entre les résidus cystéines en position 5 et 10, comme décrit à la Figure 11. La structure primaire du précurseur de l'hU-II déduite à partir de la séquence d'ADN nouvellement clonée est composée de 124 acides aminés. La prépro hU-II possède des sites de clivage potentiel par les prohormone-convertases, région riche en résidus basiques, un peptide signal (PS) ainsi que la séquence de l'hU-II située en C-terminal. La Figure 12 schématisé les précurseurs de U-II chez l'homme, la carpe et la grenouille (Vaudry *et al.*, 1999) et illustre la grande similitude entre ces différentes espèces.

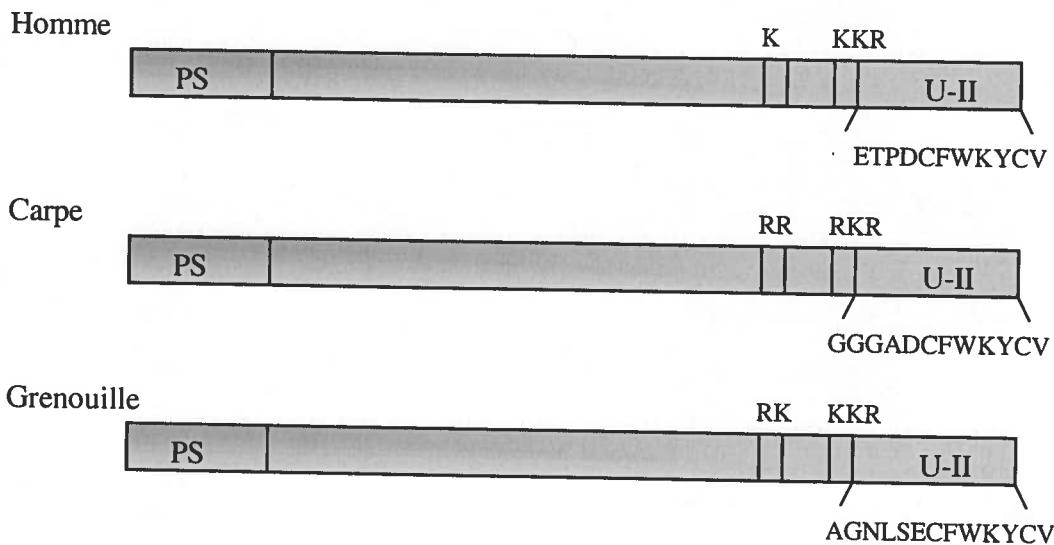


Figure 12 : Précurseurs de l'urotensine II chez l'homme, la carpe et la grenouille (Vaudry *et al.*, 1999).

Un an après la découverte de l'hU-II, une approche de criblage à grande échelle de type « pharmacologie inversée » a permis d'identifier le récepteur de l'hU-II, soit le GPR14 ou SENR (Ames *et al.*, 1999). GPR14 est un récepteur à sept domaines transmembranaires et il fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ce récepteur, préalablement orphelin, avait été défini lors du séquençage du génome humain par le groupe de Tal *et al.* (1995). Ce récepteur, nouvellement nommé UT, est composé de 389 acides aminés et possède certaines caractéristiques typiques des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), telles que des sites de N-glycosylation (Asn-29 et Asn-33), un pont disulfure entre deux segments extracellulaires (Cys-123 et Cys-199), des sites de phosphorylation au niveau des boucles intracellulaires 2 et 3 ainsi qu'un motif d'internalisation NPXXY situé entre les résidus 311 et 315. Finalement, les ARN_m codant pour ce récepteur sont principalement exprimés au niveau du cœur, du pancréas, du cerveau, de l'aorte, des cellules endothéliales et ainsi qu'au niveau des muscles lisses (Ames *et al.*, 1999).

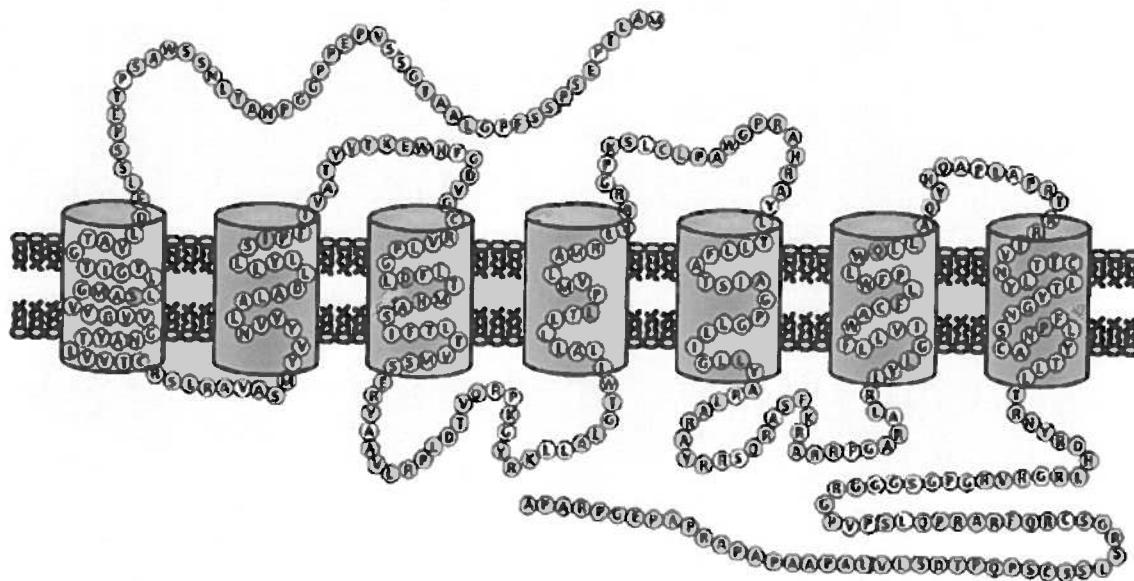


Figure 13 : Représentation schématique du récepteur de l'urotensine II humaine, UT. (Douglas et Ohlstein, 2000).

3.2 Effets biologiques chez les mammifères

Bien qu'il soit connu depuis le milieu des années 70 que l'U-II extraite de l'urophyse de poisson possède de puissants effets vasoconstricteurs chez le rat, l'intérêt envers les effets physiologiques chez l'humain n'est que très récent. En effet, le clonage de hU-II chez l'humain ainsi que l'identification de son récepteur ont entraîné un intense accroissement des recherches portant sur le potentiel patho-physiologique de hU-II. Les effets biologiques les plus importants de hU-II sont répertoriés au niveau du système cardio-vasculaire où il est considéré comme étant le plus puissant agent vasoconstricteur connu à ce jour (Douglas et Ohlstein, 2000). U-II semble directement influencer la pression sanguine chez les mammifères en exerçant des effets au niveau du cœur, des reins, des vaisseaux sanguins ainsi qu'au niveau du système nerveux central. De plus, certaines nouvelles études suggèrent des actions biologiques de U-II au niveau des systèmes pulmonaire, musculo-squelletique et endocrinien (Douglas *et al.*, 2004). Le Tableau III résume sommairement les principaux effets biologiques exercés par le système U-II/UT chez les mammifères.

Malgré ces effets marqués sur le système cardiovasculaire des mammifères, l'utilisation du système U-II/UT dans le traitement de certaines physio-pathologies semble être impossible pour l'instant. En effet, de nombreuses interrogations persistent toujours quant au mode d'action de U-II. De plus, de nombreuses contradictions sur les effets biologiques induits par U-II sont répertoriées dans la littérature. Ceux-ci sont généralement dépendants du tissu et de l'espèce animale à l'étude (Douglas, 2003). L'utilisation de nouveaux agonistes et antagonistes ainsi que de souris *knock-out* contribuera certainement à préciser les rôles physiologiques joués par le système U-II/UT chez l'humain.

Tableau III : Résumé des effets biologiques médiés par l'urotensine II chez les mammifères (Douglas *et al.*, 2004).

| Tissus, organes ou systèmes | Effets |
|----------------------------------|--|
| Système nerveux central | <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la libération d'adrénaline et de l'hormone adrénocorticotropique. - Augmentation de la pression sanguine et du rythme cardiaque (région paraventriculaire). - Diminution de la pression sanguine et du rythme cardiaque (moelle épinière). - Augmentation de la libération de l'hormone thyrotropine (TSH). |
| Cœur | <ul style="list-style-type: none"> - Tachycardie de réflexe. - Vasoconstriction coronarienne. - Hypertrophie des cardiomyocytes. |
| Pancréas | <ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. |
| Rein | <ul style="list-style-type: none"> - Prolifération des cellules épithéliales. - Diminution du débit sanguin rénal. - Altération de l'excrétion de l'ion Na⁺. |
| Tissus vasculaires périphériques | <ul style="list-style-type: none"> - Vasoconstriction. - Vasodilatation médiaée par le NO, la prostacycline (PGI₂) et l'EDHF (<i>endothelial-derived hyperpolarization factor</i>). - Inflammation endothéliale. - Prolifération des cellules des muscles lisses. |
| Endocrinien | <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation des niveaux plasmatiques de prolactine. |
| Poumons | <ul style="list-style-type: none"> - Bronchoconstriction. |

3.3 Relation structure-activité

La comparaison des structures primaires de U-II chez diverses espèces animales (Tableau II) démontre que la partie hexapeptidique cyclique a été entièrement conservée. À l’opposé, la région N-terminale du peptide est fortement variable entre les différents niveaux d’évolution. Les pressions évolutives entraînent généralement la conservation de régions particulières de peptides ou de protéines importantes dans le maintien de leur activité biologique. Conséquemment, les données de type phylogénique semblent indiquer un rôle crucial des résidus 4 à 11 de hU-II pour son activité biologique. En ce sens, Itoh *et al.* (1987) ont démontré que le fragment tronqué 5-12 de gU-II possède un potentiel similaire à induire la contraction d’anneaux d’aorte de rat à celui de sa molécule-mère. Plus récemment, ce caractère essentiel de l’hexapeptide cyclique dans le maintien de l’affinité envers le récepteur UT a été déterminé pour l’U-II humaine (Coy *et al.*, 2002). En effet, ce groupe a montré un Ki de 1,20 nM pour hU-II (4-11) et de 1,68 nM pour hU-II lors de tests de liaison effectués sur des cellules exprimant le récepteur UT humain. De plus, l’analogue tronqué 4-11 a démontré une plus grande puissance que hU-II lors de tests d’activité biologique effectués à l’aide d’aortes de rat. En conséquence, le fragment 4-11 semble être un superagoniste de hU-II.

Une approche expérimentale de type *Ala-Scan* a permis de démontrer le caractère essentiel des résidus Trp-7, Lys-8 et Tyr-9 (Flohr *et al.*, 2002). De plus, cette même étude a confirmé l’importance du pont disulfure, puisque l’analogue linéaire [Ala⁵]hU-II possédait une très faible affinité envers son récepteur. Il semble donc que ce lien intramoléculaire entre les cystéines 5 et 10 permet l’adoption d’une conformation spécifique qui est requise pour assurer une activité et une liaison efficace au récepteur. Des études de RMN ont ainsi décrit le corps cyclique de U-II comme adoptant une conformation compacte et rigide, tel que montré à la Figure 14 (Bhaskaran *et al.*, 1994; Flohr *et al.*, 2002). Conséquemment, les résidus Trp-7, Lys-8 et Tyr-9 positionnés dans un arrangement spatial précis et maintenu rigidement par le pont disulfure semblent être les pharmacophores clés envers le récepteur UT.

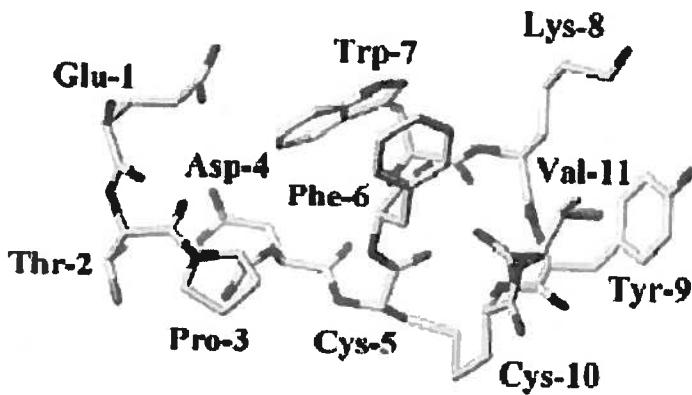


Figure 14 : Structure de l'urotensine II humaine obtenue par modélisation moléculaire après incorporation des contraintes de distance établi par RMN (Flohr *et al.*, 2002).

Plus particulièrement, le groupement ϵ -amine de la chaîne latérale de Lys-8 doit être positionné ainsi qu'éloigné des pôles aromatiques hydrophobes (Trp-7 et Tyr-9) de façon très précise. En effet, Brkovic *et al.* (2003) ont montré que le remplacement de Lys-8 par un résidu ornithine produisait un analogue inactif lors de tests de contraction d'aorte thoracique de rat. De plus, l'introduction d'une D-Lys en position 8 a entraîné l'inactivation de hU-II (Flohr *et al.*, 2002). Ces deux résultats démontrent bien l'importance de l'orientation et du positionnement du groupement ammonium dans l'activation du récepteur. En utilisant un modèle informatisé du récepteur hUT basé sur la structure de la rhodopsine, Kinney *et al.* (2002) ont émis comme hypothèse que l'amine interagirait directement avec le carboxylate de l'acide aspartique du récepteur situé en position 130 au niveau du troisième segment transmembranaire (TM3). Ce type d'interaction est fréquemment rencontré chez les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Kinney *et al.*, 2002).

Cette hypothèse du lien de liaison de U-II au niveau du TM3 concorde avec les résultats du photomarquage obtenus à l'aide de la sonde photoactivable [Bpa^6]hU-II et ce, pour le récepteur UT de rat. En effet, Boucard *et al.* (2003) ont démontré que le Bpa se lie au niveau de la méthionine 184 ou 185 située du côté extra-cellulaire du quatrième domaine transmembranaire. Ce résultat suggère que U-II interagirait profondément dans le sillon créé entre les boucles extra-cellulaires 1 et 2.

Le modèle d'établissement des déterminants moléculaires du complexe U-II/UT développé par Kinney *et al.* (2002) a également identifié le caractère essentiel des groupements aromatiques hydrophobes. En effet, il semblerait que les chaînes latérales des résidus Trp-7 et Tyr-9 soient cruciales pour une introduction efficace du peptide dans la pochette de liaison du récepteur. Des interactions de type hydrophobe seraient donc la clé pour une entrée profonde du peptide dans le sillon du récepteur et ainsi permettre à l'amine de la lysine d'interagir avec l'acide aspartique du TM3.

4. Endothéline-1

4.1 Historique et généralités du système endothéline

Depuis près de 30 ans, une multitude d'études ont permis de mieux définir le rôle multifonctionnel de l'endothélium vasculaire. Considéré comme une simple barrière au début des années 70, ce tissu est maintenant défini comme un important joueur dans la régulation de l'homéostasie du système cardio-vasculaire. C'est en 1976 que la première substance vasoactive libérée par l'endothélium, la prostacycline, a été découverte (Moncada *et al.*, 1976). Durant les années 80, deux autres substances libérées par l'endothélium et agissant sur le tonus du muscle sous-jacent ont été découvertes, soit l'EDRF (endothelium-derived relaxing factor) et l'EDCF (endothelium-derived contracturant factor) (Furchtgott et Zawadzki, 1980; O'Brien et McMurtry, 1984). En 1988, Yanagisawa *et al.* ont isolé et caractérisé l'EDCF à partir d'un surnageant de cellules endothéliales aortiques de porc. Cette molécule de nature protéique et a été nommée endothéline et celle-ci est maintenant définie comme étant l'endothéline-1 (ET-1).

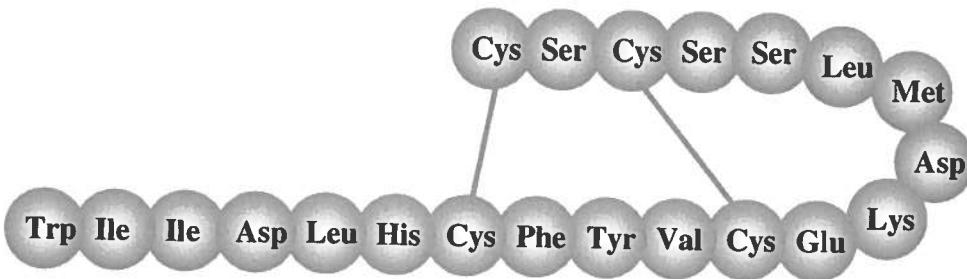


Figure 15 : Structure primaire de l'endothéline-1 humaine.

La structure primaire de ET-1 est représentée à la Figure 15. Ce peptide de 21 acides aminés possède deux ponts disulfures entre les paires de cystéines 1-15 et 3-11, une partie C-terminale (résidus 16-21) relativement hydrophobe ainsi qu'une région hautement chargée comprenant les résidus Asp-8, Lys-9 et Glu-10. Des études au niveau

du génome humain ont démontré l'existence de deux autres isoformes de l'endothéline, soit ET-2 et ET-3 (Inoue *et al.*, 1989). Ces deux peptides possèdent une homologie de structure primaire élevée avec ET-1, comme montré au Tableau IV. Les séquences d'acides aminés des endothélines sont également très similaires à celles de la famille des sarafatoxines (SRTX). Ces toxines isolées du venin des vipères *Atractaspis egaddensis* sont capables d'activer certains récepteurs de l'endothéline (Ambar *et al.*, 1989). Cette homologie de structure primaire entre ces deux familles de peptides indique une origine évolutive concomitante.

Tableau IV : Structure primaire des peptides de la famille des endothélines (Ortega et Artinano, 1997).

| Peptides | Structure primaire |
|--------------------------|---|
| Endothéline-1 (ET-1) | Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp |
| Endothéline-2 (ET-2) | Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Trp-Leu-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp |
| Endothéline-3 (ET-3) | Cys-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Tyr-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp |
| Sarafotoxine 6a (S6a) | Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Asn-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp |
| Sarafotoxine 6b (S6b) | Cys-Ser-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Tyr-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp |
| Sarafotoxine 6c (S6c) | Cys-Thr-Cys-Asn-Asp-Met-Thr-Asp-Glu-Glu-Cys-Leu-Asn-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp |
| Sarafotoxine 6d (S6d) | Cys-Thr-Cys-Lys-Asp-Met-Thr-Asp-Lys-Glu-Cys-Leu-Tyr-Phe-Cys-His-Gln-Asp-Ile-Ile-Trp |

La biosynthèse de ET-1 au niveau des cellules endothéliales est régulée par de nombreux effecteurs, tels que l'adrénaline, la thrombine, la vasopressine, l'insuline, différentes cytokines, l'oxyde nitrique, la prostacycline, etc (Ortega et Artinano, 1997). La sécrétion de ET-1 par les cellules endothéliales est contrôlée directement au niveau de

la synthèse du peptide, puisque ces cellules ne possèdent pas de sites particuliers de stockage de ET-1 (Ortega et Artinano, 1997). La synthèse des endothélines se fait à partir de précurseurs, nommés prépro-ET, dont la longueur du segment varie entre 160 et 238 acides aminés. Ces larges précurseurs sont ensuite clivés par des endopeptidases pour former des précurseurs intermédiaires de 37 à 41 acides aminés, nommés pro-ET ou Big-ET. Finalement, ces derniers précurseurs sont clivés entre les résidus Trp-21 et Val-22 par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour former ainsi les différentes isoformes de l'endothéline (Ortega et Artinano, 1997). Ces étapes menant à la biosynthèse des endothélines sont schématisées à la Figure 16.

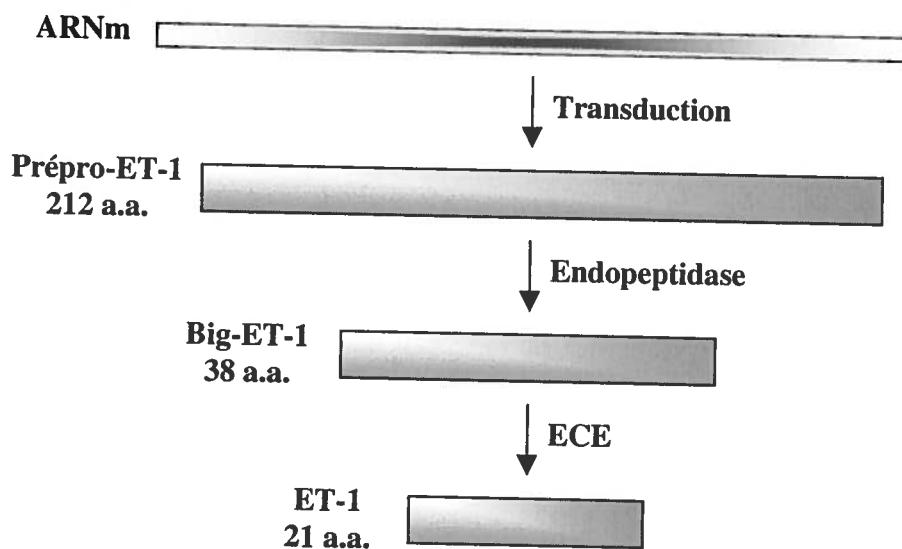


Figure 16 : Biosynthèse de l'endothéline-1 (Ortega et Artinano, 1997).

Les récepteurs des endothélines sont retrouvés dans une multitude d'organes et de tissus, mais principalement au niveau des muscles lisses vasculaires ainsi qu'au niveau de l'endothélium. Au début des années 90, deux récepteurs pour ET ont été isolés et clonés. Ceux-ci, nommés ET_A et ET_B , possèdent sept domaines transmembranaires et font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Contrairement à ET_B qui ne possède aucune sélectivité envers les différentes isoformes de ET, le récepteur ET_A présente une

affinité plus importante pour ET-1 que pour ET-2 et ET-3. Plus spécifiquement, il existe deux sous-types de récepteurs ET_B , soit ET_{B1} et ET_{B2} . Ceux-ci se distinguent par leur profil pharmacologique, leur distribution ainsi que par les effets biologiques que leur activation entraîne. De façon générale, ET_A et ET_{B2} sont situés au niveau du muscle lisse et leur activation entraîne la contraction musculaire. À l'opposé, l'activation des récepteurs ET_{B1} , situés au niveau des cellules de l'endothélium, entraîne un relâchement du muscle sous-jacent via la libération d'oxyde nitrique et de prostacycline par les cellules endothéliales. Ce mécanisme d'action du système endothéline sur le tonus vasculaire ainsi que les interactions avec les autres facteurs impliqués dans ce phénomène biologique sont illustrés à la Figure 17. (Gray et Webb, 1996)

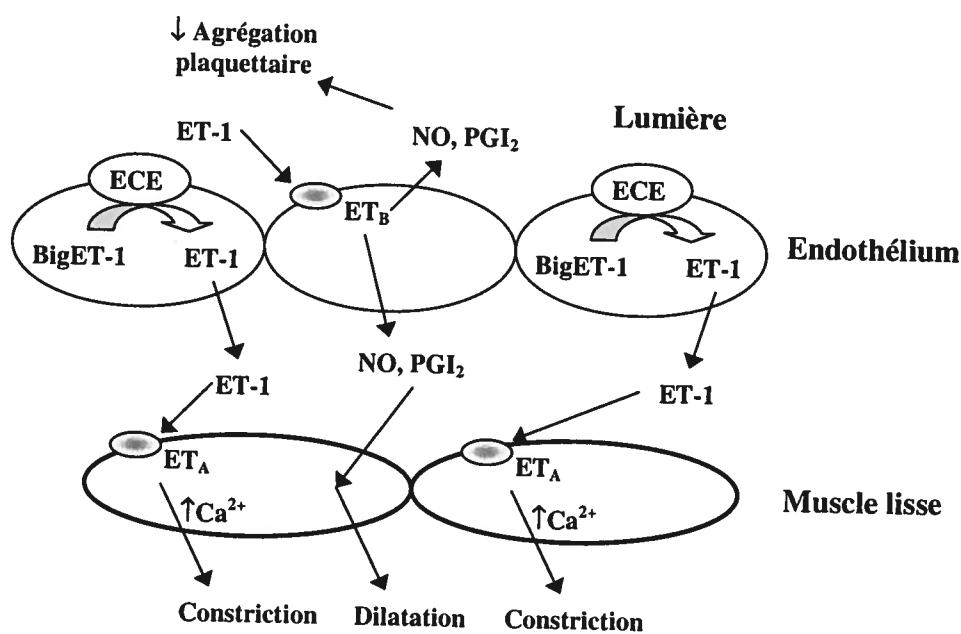


Figure 17: Mécanisme d'action de l'endothéline-1 au niveau des muscles lisses vasculaires (Ortega et Artinano, 1997).

4.2 Effets biologiques

Les principaux effets biologiques engendrés par ET se situent au niveau cardio-vasculaire. En effet, ET entraîne une certaine vasodilatation transitoire, suivie d'une vasoconstriction puissante et soutenue. De plus, une augmentation du débit cardiaque ainsi que de la perméabilité cellulaire accompagnent généralement l'effet vasoconstricteur de ET. Le système endothéline est également directement impliqué dans une multitude d'effets biologiques; ceux-ci étant décrits au Tableau V. Par contre, le principal rôle de ET se situe au niveau de l'homéostasie vasculaire où il agit comme un puissant agent vasoconstricteur. (Doherty, 1992)

Tableau V: Résumé des effets biologiques médiés par l'endothéline-1 chez les mammifères (Gray et Webb, 1996; Ortega et Artinano, 1997).

| Tissus, organes ou systèmes | Effets |
|---|--|
| Système nerveux | - Augmentation de la libération de neurotransmetteurs. |
| Cœur | - Augmentation du rythme cardiaque. - Stimulation de la libération du facteur auriculaire natriurétique (ANF). |
| Muscles lisses vasculaires | - Constriction puissante et soutenue. - Diminution de l'agrégation plaquettaire. - Libération d'oxyde nitrique. - Vasodilatation transitoire. |
| Muscle lisse non-vasculaires (poumons, intestin, utérus) | - Contraction. |
| Glandes surrénales | - Stimulation de la libération de catécholamines. |
| Reins | - Diminution de la filtration glomérulaire. - Diminution de l'excrétion d'ions Na^+ et K^+ . - Inhibition de la libération de rénine. - Diminution du flux sanguin rénal. |

4.3 Relation structure-activité

La structure secondaire de ET-1 a été définie à l'aide de certaines méthodes théoriques et spectroscopiques. Tout d'abord, une étude de cristallographie effectuée sur ET-1 a indiqué une structure de type hélice- α combinant les portions C-terminale et médiane du peptide, soit les résidus 9 à 21 (Janes *et al.*, 1994). Par contre, différentes structures ont été plutôt obtenues pour la portion C-terminale (16-21) et ceci en fonction de la technique employée. En effet, des structures de type aléatoire et flexible (Wallace et Janes, 1995) ou de type repliée (Forget *et al.*, 1996) ont été obtenues à l'aide d'études de cristallographie et de RMN, respectivement. La structure en hélice- α pour la partie médiane a été clairement démontrée par des études de RMN, de modélisation moléculaire et de dichroïsme circulaire (Perkins *et al.*, 1990; Aumelas *et al.*, 1991) tandis que des études de RMN ont indiqué la présence d'un coude β entre les résidus 5 à 8 ainsi qu'une structure compacte en N-terminal pour les résidus 1 à 4 (Kuroda *et al.*, 1994; Dalgarno *et al.*, 1992). La portion N-terminale du peptide apparaît quant à elle très peu flexible dû à la présence des deux ponts disulfures.

De nombreuses études de type structure-activité ont été réalisées pour ET-1 et contrairement à U-II, aucun consensus précis n'est encore atteint. Tout d'abord, en ce qui concerne les deux ponts disulfures, ceux-ci semblent être nécessaires pour permettre une interaction efficace avec le récepteur ET_A, puisque la forme linéaire de ET-1 ne peut activer efficacement ET_A (Pelton et Miller, 1991). À l'opposé cette même forme linéaire, [Ala¹, Ala³, Ala¹¹, Ala¹⁵]hET-1, possède un potentiel de vasoconstriction similaire à celui de la molécule-mère sur une préparation d'artère pulmonaire, un tissu reconnu comme étant riche en récepteur ET_B (Pelton et Miller, 1991). Donc, le récepteur ET_A semble privilégier une structure plus compacte de ET-1 contrairement à ET_B qui apparaît peu sélectif envers une forme allongée ou repliée de son ligand.

Une comparaison des séquences en acides aminés des trois isoformes de l'endotheline (Tableau IV) suggère une importance de premier plan pour le segment 8-21 dans le maintien de l'activité biologique. En effet, les pressions évolutives ont provoqué

des modifications du côté N-terminal (résidus 1 à 8) où une faible homologie de structure primaire est rencontrée entre les trois isoformes de l'endothéline. La seule divergence rencontrée au niveau de la portion médiane du peptide se situe en position 14 où le résidu Phe de ET-1 et de ET-2 est remplacé par une tyrosine dans la séquence de ET-3. Cette analyse concorde avec les résultats obtenus lors de l'*Ala-Scan* de ET-1, qui consiste en un remplacement successif des acides aminés par un résidu alanine. En effet, Tam *et al.* (1994) démontrent que l'activité de ET-1 n'était aucunement tolérante à la substitution des résidus Asp-8, Tyr-13, Phe-14, Leu-17 et Trp-21. De plus, la substitution de trois autres positions, Val-12, Asp-18 et Ile-20, a entraîné une activité agoniste partielle sur la veine cave de lapin.

L'importance des charges portées par les résidus 8 à 10 a également été étudiée. Nakajima *et al.* (1989) démontrent que le remplacement de Asp-8 ou de Glu-10 respectivement par un résidu Asn ou Gln, éliminait toute activité vasoconstrictrice sur des artères pulmonaires de rat. Par contre, ET-1 s'est montrée moins susceptible à une modification en position 9, puisque l'analogue [Leu⁹]ET-1 a été caractérisé comme un agoniste partiel. La région C-terminale semble également jouer un rôle crucial pour l'activité vasoconstrictrice de ET-1. En effet, l'analogue tronqué ET-1[1-16] est incapable d'induire la contraction d'artère coronarienne de porc tandis que ET-1[1-19] n'induit qu'une faible contraction à des concentrations très élevées (Kimura *et al.*, 1988). De plus, le simple retrait du résidu Trp en position 21 a résulté en un analogue 3 fois moins puissant sur ce même paradigme. Finalement, pour permettre une activation complète et efficace des deux types de récepteurs, il semble que les extrémités C- et N-terminales doivent être libres (Nakajima *et al.*, 1989).

Article A

Résumé en français de l'article A :

L'urotensine II (U-II), un peptide cyclique de 11 acides aminés, est principalement connu comme étant un puissant agent vasoconstricteur chez les mammifères. Pour leurs utilisations ultérieures comme sondes d'exploration de processus intracellulaires, des analogues masqués de U-II, qui ne deviennent biologiquement actifs que suite à l'exposition aux UV, ont été développés. Ceux-ci, également nommés composés cagés, sont dérivés de façon ciblée avec un groupement photolabile de type 4,5-diméthoxynitrobenzyle au niveau des chaînes latérales des résidus Lys-8 et Tyr-9. Ces dérivés peptidiques cagés ont démontré une importante réduction de leur affinité envers le récepteur UT. Suite à l'exposition aux UV, la molécule-mère biologiquement active est obtenue. Cette étude a permis de démontrer que l'activité vasoconstrictrice de U-II peut être contrôlée par des dérivations moléculaires ciblées ainsi que par l'irradiation aux UV subséquente.

Development and pharmacological characterization of “caged” urotensin II analogues.

Steve Bourgault, Myriam Létourneau, Alain Fournier*

Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides, Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire, Qc, Canada, H9R 1G6.

***Corresponding author**

Dr. Alain Fournier, Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides, Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, 245 boul. Hymus, Montréal, Qc, Canada, H9R 1G6. e-mail : alain.fournier@inrs-iaf.uquebec.ca

Telephone : 1-514-630-8816 Fax : 1-514-630-8850

Contribution personnelle :

Pour ce premier article, j'ai réalisé la totalité du travail en laboratoire et j'ai rédigé ce manuscrit. Myriam Létourneau a contribué au projet en procurant une aide précieuse lors de la réalisation des bioessais ainsi qu'un support technique considérable. Le Pr Alain Fournier a collaboré en émettant les bases de ce projet et il a également corrigé ce manuscrit. Cet article a été soumis à la revue scientifique *Peptides*.

Abstract

Urotensin II (U-II) is a cyclic 11-amino acid peptide known as a potent mammalian vasoconstrictor. For their eventual use as probes of intracellular actions, masked analogues of U-II, becoming biologically active only upon UV exposure, were developed. Those analogues described as “caged”, are derivatized with a photolabile 4,5-dimethoxynitrobenzyl group on the side chain of Lys-8 or Tyr-9. Both caged analogues of U-II showed a similar and major decrease of their affinity towards the UT receptor. After UV irradiation, native biologically active peptides were recovered. This study demonstrated that the vasoactivity of U-II could be controlled by targeted amino acid derivatization and by subsequent UV irradiation.

Keywords

Urotensin-II; caged; photolabile; dimethoxynitrobenzyl.

1. Introduction

Urotensin-II (U-II) was isolated 35 years ago from the urophysis, a caudal neurosecretory organ of *Gillichthys mirabilis* (goby), a teleost fish [14]. Even though it is known since the mid-70's that goby U-II possesses potent vasoconstrictor activity in fish, mammal and human, major interest towards this peptide is very recent. In fact, it is the detection of an intense expression of U-II gene in human motoneurons [5] and the identification of U-II as the endogenous ligand for the orphan receptor GPR-14 [2], now known as UT, that stimulated the interest in the physiological potential of U-II. Cloning of the cDNA encoding human U-II (hU-II) revealed that hU-II is a cyclic 11-amino acid peptide containing a disulfide bridge between Cys residues in position 5 and 10. Comparison of U-II primary structures from various species showed a remarkable similarity [7]. Hence, only the linear N-terminal region, consisting of four amino acids in hU-II (Glu-Thr-Pro-Asp), is known to be variable in animal species. On the other hand, the cyclic hexapeptide core, consisting of residues 5 to 10 in hU-II (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys), was entirely conserved throughout the evolution process. Moreover, the cyclic hexapeptide core is preceded by an acidic residue (Asp or Glu) and followed by a neutral residue (Val or Ile). Evolutionary pressures usually retain specific parts of proteins that are essential for biological recognition. Furthermore, structure-activity relationship studies clearly demonstrated the essential role of the cyclic hexapeptide region for the preservation of the affinity and activity towards UT receptors [4,9,11,12]. More specifically, the Trp-Lys-Tyr motif appears to be the key determinant for receptor binding and activation.

Some of the most striking effects of hU-II on human physiology are seen in the cardiovascular system in which hU-II acts as the most potent vasoconstrictor identified so far [8]. The U-II/UT system influences the blood pressure by direct actions on the heart, the peripheral vascular system and the kidney, or by indirect effects on the central nervous system [7]. However, these cardiovascular effects seem to be species and tissues-dependent, and occasionally, ambiguous results are reported [6]. Moreover, hU-II affects other important systems by modulating for instance pulmonary, musculoskeletal and endocrine functions [7]. In order to elucidate the physiological roles of hU-II, pharmacological and biochemical research tools were recently developed. Hence, a few agonists and antagonists [9,10] as well as knockout mice [3] were described in the literature. Nonetheless, the development of other experimental tools useful to explore at the molecular level the mechanisms driving the biological phenomenon is essential in order to clarify some remaining interrogations related to the U-II/UT system. Therefore, we focused in the development of photoactivable hU-II analogues, also known as “caged” compounds, useful as probes of intracellular processing and actions.

These caged derivatives are synthetic molecules that their biological activities are masked by the introduction of a photolabile group. Because their photoactivation can be controlled in terms of timing, location and amplitude, these compounds can be powerful tools to elucidate complex biological processes [1]. Photoactivable peptides are usually prepared by introducing a chemical modification directly in the peptide chain or by selecting an appropriate building block during the solid-phase peptide synthesis [16]. The most prevalent photocleavable protecting groups used in caged peptides are the 2-

nitrobenzyl substituents. To provide a caging effect, the photoremovable group needs to be incorporated exactly into the active core and/or to induce a conformational change that will reduce or inhibit the biological activity of the peptide. Consequently, the development of a peptide under an efficient caged form requires a large set of structure-activity relationship studies (SAR) data.

In order to develop efficient caged forms of hU-II, we used SAR results [4,9,12] and targeted the side chain of Lys-8 and Tyr-9 for a derivatization using the photocleavable group dimethoxynitrobenzyl (DMNB). Pharmacological characterization revealed that these two caged analogues of hU-II showed a very significant reduction of their biological activity. Furthermore, we demonstrated that the contraction of rat thoracic aorta could be controlled by UV irradiation and that the technology of caged compounds is compatible with an experimental system using animal tissues.

2. Materials and methods

2.1 Reagents and solvents

The following Fmoc-protected amino acids and the Wang resin were obtained from ChemImpex International (Wood Dale, IL): Asp(OtBu), Cys(Trt), Glu(OtBu), Lys(Boc), Phe, Pro, Thr(tBu), Tyr(tBu), Trp(Boc) and Val. Fmoc-Lys-OH and H-Tyr-OtBu were purchased from Novabiochem (San Diego, CA). Biograde trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Halocarbon (River Edge, NJ). Benzotriazol-1-yl-oxy-*tris*(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP) and diisopropylethylamine (DIPEA) were purchased from Albatross Chemical (Montreal, QC). Acetonitrile (ACN), diethylether, N,N-dimethylformamide (DMF) and dichloromethane (DCM) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI).

2.2 General procedure

Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analyses were performed on a C₁₈ Jupiter (5 µm, 300 Å, 250 x 4.6 mm) column (Phenomenex, Torrance, CA) connected to a Beckman 128 chromatograph module coupled to a Beckman 168 PDA detector. The flow rate was maintained at 1 ml/min and the elution was carried out with a linear gradient of ACN in TFA/H₂O (0.06%, v/v) from 20% to 90%. Preparative RP-HPLC was carried out using a C₁₈ (15 µm, 300 Å, 250 x 21.2 mm) column (Phenomenex, Torrance, CA) and a Waters PrepLC500A system equipped with an absorbance detector, model 441, monitored at 229 nm (no photolysis occurred). The

flow rate was maintained at 20 ml/min and the product was eluted with a linear gradient of ACN in TFA/H₂O (0.06%, v/v). Matrix-assisted laser desorption time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was performed on a Voyager DE system from Applied Biosystems. The nitrogen laser was set at 337 nm and α-cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as the matrix. Each mass spectrum was recorded in linear mode at an accelerating voltage of 25 kV.

2.3 Synthesis of caged amino acids

2.3.1 Synthesis of Fmoc-Lys(DMNB)-OH.

To N-α-Fmoc-L-lysine (Fmoc-Lys-OH, 1.90 g, 5.7 mmol) dissolved in 30 ml of tetrahydrofuran (THF) was added 1.57 g of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl chloroformate (DMNBC, 5.7 mmol) dissolved in 30 ml THF/DCM (5/1, v/v) and 2.0 ml of N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, 11.5 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h and the progression of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC. The solvents were evaporated and the resulting oil was extracted 3 times with EtOAc:H₂O. The organic phases were collected, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. A quantity of 3.03 g (88%) of the desired product (Fmoc-Lys(DMNB)-OH, 5.0 mmol) was obtained. RP-HPLC analysis revealed that the product was obtained with a high degree of purity (92%).

2.3.2 Synthesis of Fmoc-Tyr(DMNB)-OH.

- (i) To a solution of 3.00 g of L-tyrosine- α -*t*-butyl ester (H-Tyr-OtBu, 12.6 mmol) dissolved in 40 ml of dioxane/H₂O (5/1, v/v) were added 2.2 ml of DIPEA (12.6 mmol) and 3.2 ml of di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O, 13.9 mmol). The solution was stirred at room temperature and RP-HPLC analysis revealed a complete reaction within 2 h. The solvent was removed and the resulting solid was extracted 3 times with DCM:H₂O. After complete evaporation of the organic phase, 4.08 g of pure Boc-Tyr-OtBu was obtained (12.1 mmol, 96%).
- (ii) To 3.23 g of Boc-Tyr-OtBu (i) (9.6 mmol) dissolved in 30 ml of dry THF was added under nitrogen 1.18 g of potassium *tert*-butoxide (10.5 mmol). Finally, 2.90 g of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (DMNBB, 10.5 mmol) dissolved in 125 ml of dry THF were added and the reaction mixture was stirred overnight under nitrogen, at room temperature. Thin-layer chromatography (TLC) analysis (CHCl₃/MeOH/AcOH; 95/5/1) revealed that the reaction was complete. The solvent was removed in vacuo and the crude product was extracted 3 times with DCM/H₂O. The organic phase was isolated, dried and evaporated to give a dark-orange oil. The resulting oil (Boc-Tyr(DMNB)-OtBu) was dissolved in 100 ml of TFA/water (19/1, v/v) and the mixture was stirred at room temperature. After 2 h, RP-HPLC analysis revealed that the reaction was complete. The solvent was evaporated to a give a brown oil that was dissolved in 40% ACN/H₂O before being purified by preparative RP-HPLC using a linear gradient of 40% to 70% solvent B in which solvent A is aqueous TFA (0.06%) and solvent B is ACN. An amount of 2.81 g

(78%, 7.5 mmol) of the pure product (H-Tyr(DMNB)-OH) was obtained after lyophilization of the appropriate fractions.

(iii) To a solution of H-Tyr(DMNB)-OH (ii) (2.75 g, 7.3 mmol) in 100 ml of acetonitrile/water/triethylamine (5/2/0.2, v/v) was added N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu, 2.47 g, 7.3 mmol) dissolved in 100 ml of acetonitrile/water (5/2, v/v). The pH of the reaction mixture was maintained at 8.5 by dropwise addition of triethylamine. Analytical HPLC analysis revealed that the reaction was completed within 1 h. The solvent was evaporated and the resulting oil was extracted 3 times with EtOAc/H₂O. The organic phases were isolated, dried and evaporated. The reaction yielded 4.09 g of the final product (Fmoc-Tyr(DMNB)-OH) (93%, 6.8 mmol) with a high degree of purity (96%), as revealed by RP-HPLC analysis.

2.4 Peptide synthesis and cleavage

All peptides were assembled using a homemade manual multireactor synthesizer. hU-II and caged hU-II analogues were synthesized using a solid-phase procedure based on the Fmoc chemistry and a BOP coupling strategy. Wang resin was used as the solid support, and each coupling step was monitored using the ninhydrin test. Cleavage from the resin was achieved with a mixture of TFA/ethanedithiol/phenol/water (92/2.5/3/2.5) for 2 h. After TFA evaporation, the crude peptides were precipitated and washed with diethyl ether before to be dried in vacuo.

2.5 Peptide purification, cyclization and characterization

Crude peptides were purified by preparative RP-HPLC using a linear gradient. Collected fractions were analyzed using analytical RP-HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry. Fractions corresponding to the desired product were pooled and lyophilized. The disulfide bridge was obtained using a 1 h treatment with 20 eq of $K_3Fe(CN)_6$ dissolved in an aqueous solution of NH_4OH (0.05%), containing 3.0% urea. The peptide concentration was 0.5 mg/ml and the cyclization was stopped with the injection of the reaction mixture onto a preparative HPLC column. Pure peptides were characterized by analytical RP-HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry.

2.6 Kinetics of peptide photolysis

Caged peptides (200 μl , 10^{-4} M) in Krebs-Henseleit buffer were added to wells of a 96-well plate placed on ice. Irradiation was performed using a 100 W UV lamp (UVP, black-ray long wave, model B100AP), that was located 3.0 cm above the plate. Irradiated caged peptides were removed at various times and were analyzed using analytical RP-HPLC and characterized using MALDI-TOF mass spectrometry.

2.7 Biological activity study

hU-II and its caged analogues were tested pharmacologically using the rat thoracic aorta preparation. Male Sprague-Dawley rats (250-300 g) were anesthetized with pentobarbital (Somnotol) (CDMV, Saint-Hyacinthe, Qc), at a dose of 65 mg/kg, and the rat thoracic aorta was quickly removed. The endothelium was detached and the aorta was cleaned of connective tissues before being cut into 4 mm rings. Aorta sections were mounted under

an initial tension of 1 g in bioassay vessels containing Krebs-Henseleit buffer maintained at 37 °C. Tissues were allowed to equilibrate for 1 h. Contractions were recorded using a Grass 7E Polygraph equipped with force-displacement transducers. Concentrations of 10^{-10} to 10^{-5} M of peptides were used to establish the concentration-response curves. All results were normalized as a percentage of the contraction obtained with KCl (80 mM). Concentration-response curves were analyzed using a non linear least-square regression obtained with the Prism 3.0 software. Results are expressed as mean \pm s.e.m. and the number of replicates varied from n = 4 to 8 animals.

2.8 In situ photolysis

Rat thoracic aorta rings mounted in the system described above, were exposed for 10 minutes to 6×10^{-8} M of [Tyr(DMNB)⁹]hU-II or [Lys(DMNB)⁸]hU-II or hU-II before to be exposed to UV. Irradiation was carried out with a 30 W pen-ray UV lamp (UVP, 365 nm, model 90-0019-01) immersed into the bioassay vessel. After 20 minutes, the UV exposure was stopped and results were normalized as a percentage of the contraction obtained with KCl (80 mM).

3. Results

3.1 Synthesis of caged peptides.

The caged building block amino acids Fmoc-Lys(DMNB)-OH and Fmoc-Tyr(DMNB)-OH were synthesized in highly satisfactory yields. Analytical HPLC analysis of caged amino acids demonstrated that both were obtained with a high degree of purity. All purified photoactivable analogues of hU-II (>95% of purity) showed a similar MALDI-TOF mass spectrometry profile characterized by a major peak corresponding to the theoretical mass and two minor peaks (data not shown). These two minors peaks were laser induced and corresponded to the uncaged peptides and to the conversion of a nitro group to a nitroso group, two phenomena previously reported [13,18].

3.2 Photolysis of caged peptides.

Caged peptides were photolyzed in Krebs-Henseleit buffer and the kinetic of unmasking upon UV illumination was determined with analytical HPLC. The peptide containing the nitrobenzyl group on the tyrosine side chain showed a significant faster conversion into the native peptide (figure 1). The half-times for release of hU-II from [Lys(DMNB)⁸]hU-II and [Tyr(DMNB)⁹]hU-II were both under 5 min.

3.3 Biological activity

Caged peptides and hU-II were evaluated for their biological activity, using the rat thoracic aorta paradigm, a pharmacological preparation exhibiting a population of UT receptors. Figure 2 shows the concentration-response curves for the hU-II related peptides. Caged analogues of hU-II demonstrated an important reduction of their activity

towards UT receptors. In fact, [Lys(DMNB)⁸]hU-II and [Tyr(DMNB)⁹]hU-II were \pm 300 times less potent than hU-II with EC₅₀ values of 4.08×10^{-7} M and 2.86×10^{-7} M, respectively. An EC₅₀ of 1.37×10^{-9} M and a maximal contraction of 128 % were obtained for hU-II. Thus, no significant contractions were observed for hU-II caged analogues at the concentration where the maximum response is attained with hU-II.

3.4 In situ photolysis.

When rat thoracic aorta rings were exposed to 6×10^{-8} M of [Lys(DMNB)⁸]hU-II or [Tyr(DMNB)⁹]hU-II, no contraction was observed. However, upon UV irradiation produced by a pen-ray lamp, tissues constricted according to the kinetic illustrated in figure 3. The photolysis of [Tyr(DMNB)⁹]hU-II appeared to be faster than that with [Lys(DMNB)⁸]hU-II because the contraction increased more rapidly after UV irradiation. As a control, the aorta was exposed to UV light in absence of the caged hU-II analogues. Under this condition, a slight and transitional relaxation was recorded at the beginning of the irradiation. Finally, the maximal contraction, as well the EC₅₀ obtained with the parent molecule (hU-II), upon UV exposure, were not significantly different to those acquired without UV light.

4. Discussion

Photoactivable analogues of hU-II containing a DMNB photolabile group on the side chain of Lys-8 or Tyr-9 were synthesized, characterized for their photolysis properties and evaluated pharmacologically. Similar amino acid derivatizations, using 2-nitrobenzyl photocleavable groups, had already been employed for neuropeptide Y [18], the peptide domain of a protein kinase inhibitor [19], an inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II (AIP) [17] and a nuclear localization signal peptide [20]. The 2-nitrobenzyl caging compound possesses a maximal absorption at short UV wavelength, whereas the DMNB group shows a high absorption in the long UV spectrum. The DMNB protecting group was especially selected for this characteristic of long wavelength photolysis sensibility (365 nm) [1]. Consequently, the caged peptides can be used without causing any important damage to UV-sensitive biological preparations. Results obtained with the *in situ* photolysis pointed out this characteristic. As a matter of fact, the maximal contraction obtained after 20 minutes of UV irradiation, in presence of 6×10^{-8} M of caged hU-II, is similar to that acquired with an exposition of hU-II at the same concentration. Furthermore, in presence of [Lys(DMNB)⁸]hU-II or [Tyr(DMNB)⁹]hU-II, the rat thoracic aorta contracts rapidly only upon UV exposure. The kinetic of contraction was also in agreement with the kinetic of photolysis, which shows that the nitrobenzyl group was cleaved more rapidly from a Tyr residue than from Lys.

Results obtained with the pharmacological bioassays revealed that the introduction of a photolabile moiety on Lys-8 or Tyr-9 of hU-II drastically reduced its biological

activity. This result is in agreement with previous SAR studies, since these residues were of major importance for binding and activation of UT receptors [4,9,11]. As demonstrated, these two residues are located in the portion of the molecule that represents the key determinant for hU-II contractile activity. The incorporation of a DMNB group on the side chain of Lys-8 masked the amino chemical group, that was hypothesized to interact directly with the UT receptor. Thus, Kinney et al. [11], as well as Brkovic et al. [4], suggested that the essential Lys residue of hU-II might bind to Asp-130 localized in the transmembrane segment 3 (TM3) of UT, a phenomenon also seen in many other GPCRs. Consequently, the pronounced decrease in activity of [Lys(DMNB)⁸]hU-II comes most likely from the inhibition of this postulated ionic bond between hU-II and UT.

On the other hand, the decrease of biological activity observed with [Tyr(DMNB)⁹]hU-II comes probably from the incapacity of the ligand to penetrate efficiently in the binding pocket of UT. Through a combinatory approach using molecular modeling and traditional SAR studies, Kinney et al. [11] evaluated the primary importance of the Tyr position of the ligand in receptor interaction. In this study, analogues of a truncated form of hU-II ((Ac)-CFWKYC-NH₂) in which the Tyr residue was substituted, were developed and tested for their binding and biological activity. The analogue containing a 4-phenyl-L-phenylalanine (Bip) residue showed a similar potency compared to the truncated hU-II, whereas (Ac)-CFWK(Dpa)C-NH₂ (Dpa = 4-(2,6-dichlorobenzoyloxy)-L-phenylalanine) demonstrated a major reduction of its agonist activity and binding. These results revealed that this position has to be occupied by a

hydrophobic group in order to allow a successful ligand-receptor interaction. Although the truncated analogues containing a Bip residue showed some structural similarities with [Tyr(DMNB)⁹]hU-II, the steric hindrance introduced with the incorporation of a dimethoxynitrobenzyl group seems to be the main point explaining the reduction of the biological activation of this caged analogue. As such, this would also explain why the Dpa analogue was devoid of any affinity compared to the Bip derivative.

This study allowed the development of efficient caged forms of hU-II and showed that the vasoactivity of hU-II can be controlled by UV irradiation. The ulterior use of this photoactivated hU-II will certainly facilitate the molecular characterization of biological processes involving this vasoactive peptide. Moreover, in the context of the intracrine hypothesis [15], caged peptides could be used as tremendous tools to explore and validate this postulate.

Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). A.F. is a Chercheur National from the Fonds de la recherche en santé du Québec. S.B. received studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

References

- [1] Adams SR, Tsien RY, Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu Rev Physiol* 1993;55:755-84.
- [2] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD., Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ , Hay DW, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401:282-6.
- [3] Behm DJ, Harrison SM, Ao Z, Maniscalco K, Pickering SJ, Grau EV, Woods TN, Coatney RW, Doe CP, Willette RN, Johns DG, Douglas SA. Deletion of the UT receptor gene results in the selective loss of urotensin-II contractile activity in aortae isolated from UT receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 2003;139:464-72.
- [4] Brkovic A, Hattenberger A, Kostenis E, Klabunde T, Flohr S, Kurz M, Bourgault S, Fournier A. Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:1200-9.
- [5] Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15803-8.

- [6] Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:159-67.
- [7] Douglas SA, Dhanak D, Johns DG. From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:76-85
- [8] Douglas SA, Ohlstein EH. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:229-37.
- [9] Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T. Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J Med Chem* 2002;25:1799-805.
- [10] Grieco P, Carotenuto A, Campiglia P, Zampelli E, Patacchini R, Maggi CA, Novellino E, Rovero P. A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *J Med Chem* 2002;26:4391-4.
- [11] Kinney A, Almond HR, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Cho DS, Everson AM, Feinstein MA, Leung PA, Maryanoff BE.

Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002;41:2940-4.

- [12] Labarrere P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon MC, Dubessy C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Calas B, Pacaud P, Vaudry H. Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2003;18:77-88.
- [13] Pan P, Bayley H. Caged cysteine and thiophosphoryl peptides. *FEBS Lett* 1997;405: 81-5.
- [14] Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:5021-4.
- [15] Re R.N, The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action. *Bioessays* 2003;25: 401-9.
- [16] Shigeri Y, Tatsu Y, Yumoto N. Synthesis and application of caged peptides and proteins. *Pharmacol Ther* 2001;91:85-92.

- [17] Tatsu Y, Shigeri Y, Ishida A, Kameshita I, Fujisawa H, Yumoto N. Synthesis of caged peptides using caged lysine: application to the synthesis of caged AIP, a highly specific inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Bioorg. Med. Chem Lett* 1999;19:1093-6.
- [18] Tatsu Y, Shigeri Y, Sogabe S, Yumoto N, Yoshikawa S. Solid-phase synthesis of caged peptides using tyrosine modified with a photocleavable protecting group: application to the synthesis of caged neuropeptide Y. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:688-93.
- [19] Walker JW, Gilbert SH, Drummond RM, Yamada M, Sreekumar R, Carraway RE, Ikebe M, Fay FS. Signaling pathways underlying eosinophil cell motility revealed by using caged peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1568-73.
- [20] Watai Y, Sase I, Shiono H, Nakano Y. Regulation of nuclear import by light-induced activation of caged nuclear localization signal in living cells. *FEBS Lett.* 2001;488:39-44.

Legend

Figure 1: Photolysis kinetics of caged peptides obtained by analytical RP-HPLC analysis after irradiation with a 100 W UV lamp.

Figure 2: Concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of hU-II and its caged analogues.

Figure 3: Contraction of rat thoracic aorta rings obtained after the photoactivation of caged analogues of hU-II, at a concentration of 6×10^{-8} M, with U.V. irradiation produced by a 30 W pen-ray lamp.

Figure 1 :

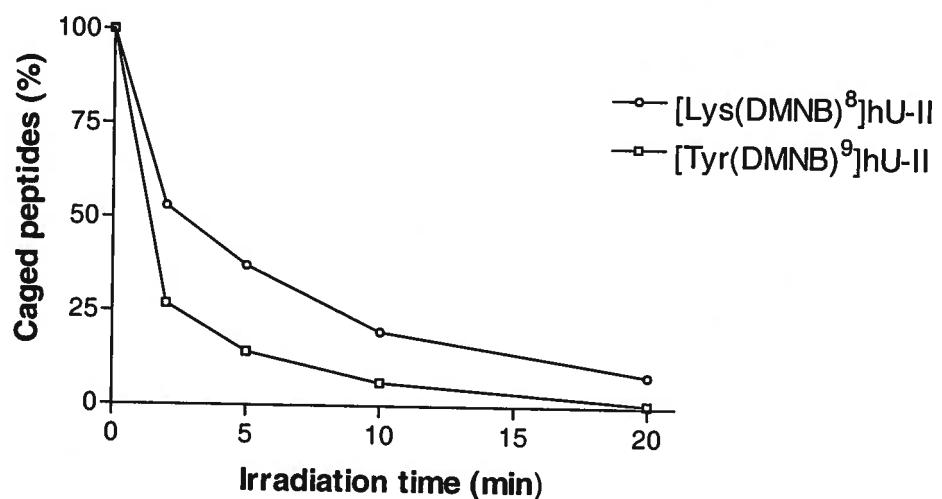


Figure 2 :

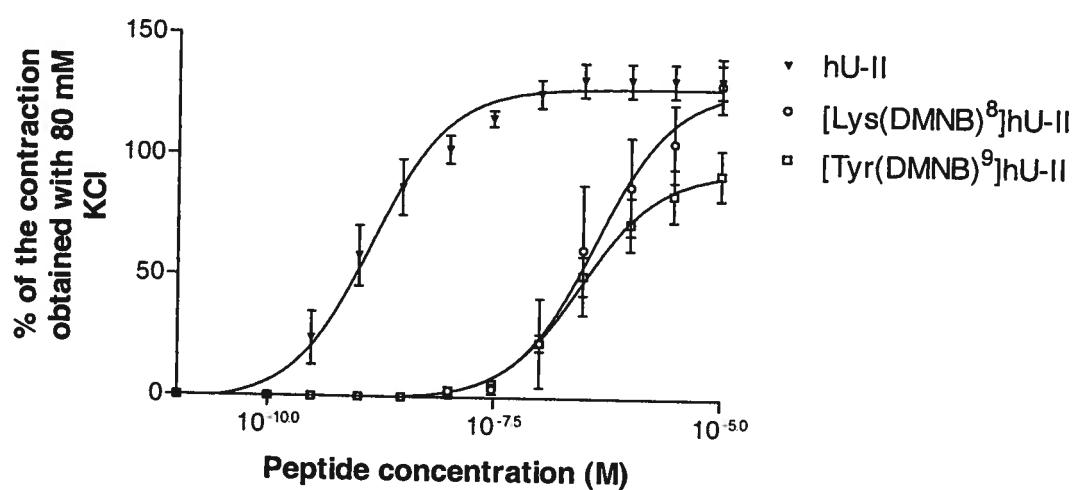
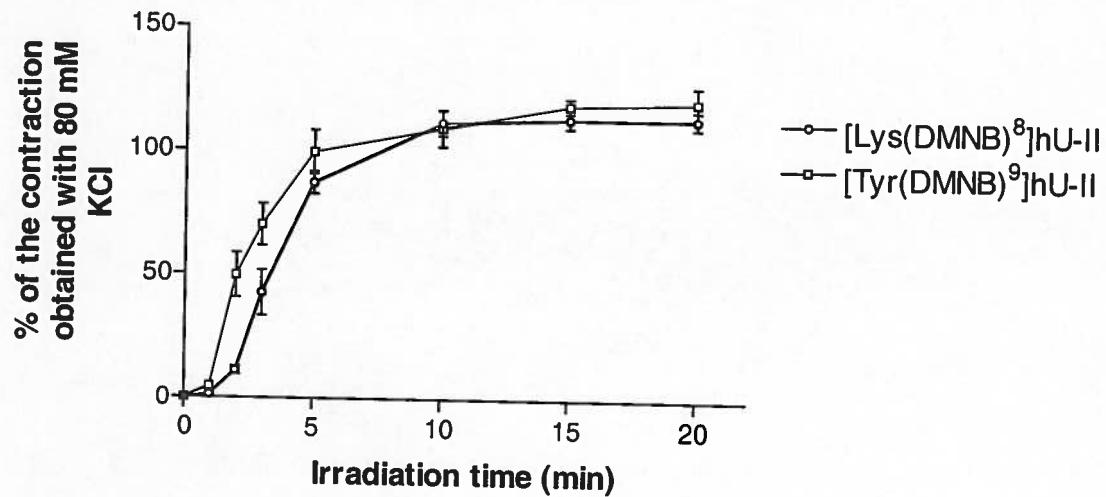


Figure 3 :



Article B

Résumé en français de l'article B :

Des analogues photoactivables, également connus sous le terme de composés cagés, du peptide vasoactif endothéline-1 (ET-1) ont été obtenus suite à leur dérivation à l'aide d'un composé photolabile de type 4,5-diméthoxynitrobenzyle (DMNB). Pour ce faire, nous avons produit des dérivés N- α -Fmoc cagés de Lys, Asp, Glu and Tyr. Ces acides aminés non-naturels ont été introduits lors des étapes de la synthèse peptidique en phase solide. De plus, la fonction carboxylique C-terminale a également été dérivée avec le DMNB. Lorsque les acides aminés N- α -Fmoc cagés de Asp et de Glu ont été utilisés, certaines difficultés ont été rencontrées. En effet, la cyclisation de Asp(β -DMNB), qui entraîne la formation d'un dérivé succinimide cyclique, est favorisée par le caractère électro-attracteur du groupement DMNB. D'autre part, nos résultats démontrent que Glu(γ -DMNB) est fortement susceptible à la formation de pyrrolidone lors de la synthèse peptidique utilisant la chimie de type Fmoc. Les analogues cagés de ET-1 ont été testés pharmacologiquement et des résultats variables ont été obtenus et ce, malgré que selon les études de structure-fonction, seulement les pharmacophores de ET-1 ont été ciblés pour l'incorporation du DMNB. Néanmoins, [Lys(DMNB)⁹]ET-1 et [Trp(α -DMNB)²¹]ET-1 peuvent être qualifiés de composés cagés envers les récepteurs ET_A, puisque leur concentration seuil de contraction est près de 100 fois plus élevée que le EC₅₀ de ET-1. Par contre, ces deux analogues ne peuvent être utilisés comme peptides cagés pour des préparation de ET_B. Aucun des autres dérivés photoactivables n'a démontré des caractéristiques cages satisfaisantes. De plus, l'incorporation d'un groupement DMNB au niveau des chaînes latérales des résidus en position 9 et 13 a conduit à un agoniste plus puissant que la sarafotoxine 6c, un ligand spécifique ET_B.

Title

Development of photolabile caged analogues of endothelin-1

S. Bourgault, M. Létourneau and A. Fournier.

Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides, INRS-Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, 245 Boul. Hymus, Pointe-Claire, Qc, Canada, H9R 1G6.

Contribution personnelle :

Tout comme le premier manuscrit, j'ai effectué la totalité du travail en laboratoire et j'ai rédigé cet article. Myriam Létourneau a contribué au projet en procurant son aide lors de la réalisation des bioessais. Le Pr Alain Fournier a collaboré en émettant les bases de ce projet ainsi que diverses hypothèses permettant de mieux cibler certains éléments clés des résultats obtenus. Il a également contribué à la rédaction du manuscrit. Cet article a été soumis à la revue scientifique *The Journal of Peptides Research*.

Abstract

Photoactivable analogues, also known as caged compounds, of the vasoactive peptide endothelin-1 (ET-1) were obtained after derivatization with the photolabile 4,5-dimethoxynitrobenzyl (DMNB) group. This was achieved by first producing N- α -Fmoc caged building blocks of Lys, Asp, Glu and Tyr. These compounds were selectively incorporated during the solid phase peptide synthesis step. Moreover, the C-terminal carboxylic function was also derivatized with DMNB. However, difficulties were encountered with the introduction of the Asp and Glu building blocks derivatized with the photoreactive group. In fact, the formation of an aminosuccinyl derivative, through cyclization of the Asp(β -DMNB) residue, was highly favored by the electronic properties of the photocleavable function. Similarly, the results also showed that Glu(γ -DMNB) is prone, during synthesis using Fmoc/piperidine chemistry, to the formation of a pyrrolidone. Caged ET-1 analogues were tested pharmacologically and showed varying caging characteristics even though, according to structure-activity studies, only crucial residues were targeted for the alteration. Nevertheless, it appeared that the derivative [Trp(α -DMNB)²¹]ET-1 and [Lys(ϵ -DMNB)⁹]ET-1 could be used in ET_A preparations as caged compounds because their threshold concentration for activity is about 100-fold higher than the EC₅₀ of ET-1. At the opposite, these two caged peptides could not be used with ET_B paradigms. None of the other photolabile ET-1 analogues were satisfactory for their caging properties. Nonetheless, interestingly, DMNB substitution at position 9 or 13 led to more potent agonists than sarafotoxine 6c, the specific ET_B standard ligand.

Keywords

Photoactivation; nitrobenzyl; ET_A receptor; ET_B receptor; side reactions.

Introduction

Caged compounds are synthetic derivatives of biomolecules characterized by a partial or total masking of their affinity toward a receptor, through the introduction of a photoremovable protecting group. The subsequent activation is generally carried out by a photochemical reaction induced by UV irradiation. Because this photoactivation can be controlled in terms of time, localization and amplitude, these compounds appear as useful tools to elucidate the molecular basis of several complex biological processes (1). Many peptides play key roles in biological phenomena and therefore the development of peptidic caged derivatives should facilitate their characterization. Photoactivable peptides are usually prepared by a targeted chemical modification directly on the peptide or by derivatization of selective building block amino acids prior to their incorporation during peptide synthesis (2). The most frequently used photocleavable protecting groups for caged peptides are 2-nitrobenzyl substituents. These compounds have been introduced onto the side chain of tyrosine (3,4), lysine (5,6), cysteine (7), serine (2), and phospho-derivatized amino acids (Tyr, Ser, Thr) (8), as well as onto the polyamide backbone (9) and the N-terminal group (10,11). So far, it seems that no peptides were caged with the introduction of a nitrobenzyl compound on a carboxylic acid moiety (C-terminal or the side chain of Asp and Glu). Because carboxylic acid groups are frequently found in the active site of a peptide, it is essential to develop a convenient strategy for caging the side chain of the Asp and Glu residues. To afford a caging effect, the photolabile group needs to be incorporated exactly onto a pharmacophore essential for the receptor recognition process and/or needs to induce a conformational change that will reduce or inhibit the

affinity of the targeted peptide towards its receptor. Consequently, the development of a peptide under an efficient caged form requires well-defined structure-activity relationship (SAR) information.

Endothelin-1 (ET-1) is a 21-amino acid bicyclic peptide displaying potent vasoconstrictor properties. ET-1 structure is characterized by a charged region (residues 8-10), two disulfide bridges (located between position 1-15 and 3-11) and a hydrophobic C-terminal tail (residues 16-21) (12). This peptide mostly mediates its biological activities through an interaction with two receptor subtypes: ET_A and ET_B. Since its discovery from cultured porcine aortic endothelial cells (13), a large set of SAR studies were achieved to point out the ET-1 pharmacophores. For instance, an alanine scan of ET-1 revealed that residues Asp⁸, Tyr¹³, Phe¹⁴, Leu¹⁷ and Trp²¹ were key amino acids for biological effects whereas the substitution of Val¹², Asp¹⁸ or Ile²⁰ led to a significant loss of either receptor affinity or agonist activity (14). Moreover, the free C-terminal carboxylic acid and N-terminal amine appeared as essential chemical features for biological activity in pulmonary tissues (15,16). Furthermore, the negative charges located on the side chain of Asp⁸ and Glu¹⁰ were shown to contribute significantly in the expression of the vasoconstricting properties because their respective substitution by Asn and Gln resulted in a complete loss of the biological activity (16).

Thus, to develop an effective caged form of ET-1, we used a rational approach based on the available SAR data. Accordingly, the side chain of Asp⁸, Lys⁹, Glu¹⁰, Tyr¹³ or Asp¹⁸, as well as the C-terminal moiety, was chemically modified with the photolabile compound 4,5-dimethoxynitrobenzyl (DMNB).

In the present paper, we describe the development of efficient protocols to generate caged building blocks useful in solid phase peptide synthesis. Moreover, we also designed an approach to introduce a DMNB group onto the C-terminal function of ET-1 and showed that the resulting nitrobenzyl ester was stable in acid treatment. On the other hand, side chain modification of Asp or Glu with DMNB gave rise to side reactions following their introduction in the peptide chain. Thus, we explored the nature of these side reactions and observed that Asp(β -DMNB)⁸ and Asp(β -DMNB)¹⁸ were prone to the formation of a succinimide derivative even if they are followed, in the ET-1 sequence, by the rather bulky residues, Lys and Ile, respectively. We also noticed that the DMNB group on the Glu¹⁰ side chain of ET-1 is a very good leaving group, thus favoring the formation of a pyrrolidone ring upon deprotection of the Fmoc-Glu(γ -DMNB) residue with piperidine. Although some significant residual activity was measured after caging key amino acids, we succeeded in developing two caged peptides, [Lys(α -DMNB)⁹]ET-1 and [Trp(α -DMNB)²¹]ET-1, showing caging characteristics adequate for biological systems.

Experimental procedure

Materials

The following Fmoc-protected amino acids and the Wang resin were obtained from ChemImpex International (Wood Dale, IL) and Albatross Chemical (Montreal, QC): Asp(OtBu), Cys(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Ile, Leu, Lys(Boc), Met, Phe, Ser(tBu), Tyr(tBu), Trp(Boc) and Val. Fmoc-MeIle-OH, Fmoc-Asp-OtBu, Fmoc-Glu-OtBu, Fmoc-Lys-OH and H-Tyr-OtBu were purchased from Novabiochem (San Diego, CA). Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP) and diisopropylethylamine (DIEA) were obtained from Albatross Chemical. Biograde trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Halocarbon (River Edge, NJ). Acetonitrile (ACN), diethylether, N,N- dimethylformamide (DMF) and dichloromethane (DCM) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON). Aminopeptidase was from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Whereas the sequazyme carboxypeptidase kit was from Perceptive Biosystems (Foster City, CA). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON).

General Procedure

Analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analyses were performed on a Jupiter C₁₈ (5 µm, 300 Å, 250 x 4.6 mm) column (Phenomenex, Torrance, CA) connected to a Beckman 128 pump module coupled to a Beckman 168 PDA detector. The flow rate was maintained at 1 ml/min and the elution was carried out with a linear gradient of ACN in TFA/H₂O (0.06%, v/v) from 20% to 90%. Preparative

RP-HPLC was performed using a C₁₈ (15 µm, 300 Å, 250 x 21.2 mm) column (Phenomenex) and a Waters PrepLC500A system equipped with an absorbance detector model 441 adjusted at 229 nm (no photolysis occurred). The flow rate was maintained at 20 ml/min and the product was eluted with a ACN in TFA/H₂O (0.06%, v/v) solvent system (linear gradient). Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was performed on a Voyager DE system from Applied Biosystems. The nitrogen laser was set at 337 nm and α-cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as the matrix. Each mass spectrum was recorded in linear mode at an accelerating voltage of 25 kV.

Synthesis of caged amino acid

Synthesis of Fmoc-Asp(DMNB)-OH and Fmoc-Glu(DMNB)-OH

To a solution of N-α-Fmoc-L-aspartic acid-α-t-butyl ester (1.94 g, 4.7 mmol) in 20 ml of DCM was added 1.00 g of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl alcohol (DMNBA, 4.7 mmol) dissolved in 50 ml of DCM and 29 mg of 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 0.2 mmol). This was followed by dropwise addition (over 2 min) of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 972 mg, 4.7 mmol) dissolved in 20 ml of DCM. The reaction mixture was stirred at room temperature and thin-layer chromatography (TLC) analyses (CHCl₃/MeOH/AcOH; 90/9/1) indicated that the reaction was completed within 2 h. After filtration, the crude product was washed 3 times with aqueous 2.5% NaHCO₃. The organic phase was separated and evaporated to give a yellow oil. Removal of the α-carboxyl protecting group (tBu) was accomplished by dissolving Fmoc-Asp(DMNB)-OtBu in 100 ml TFA/H₂O (19/1, v/v) and stirred for 90 min. The solvent was removed *in*

vacuo and the crude product was dissolved in DCM. Following an aqueous wash, the organic layer was isolated, and to give dried 2.51 g (94% yield) of pure Fmoc-Asp(DMNB)-OH. Synthesis of Fmoc-Glu(DMNB)-OH was carried out using the same method and an overall yield of 91% was obtained.

Synthesis of Fmoc-Lys(DMNB)-OH

To N- α -Fmoc-L-lysine (1.90 g, 5.7 mmol) dissolved in 30 ml of dry tetrahydrofuran (THF) were added 1.57 g of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl chloroformate (DMNBC, 5.7 mmol) dissolved in 30 ml THF/DCM (5/1, v/v) and 2.0 ml of N,N-diisopropylethylamine (DIEA, 11.5 mmol). The mixture was stirred at room temperature and the reaction was followed by analytical RP-HPLC. After 2 h, the solution was extracted 3 times with EtOAc-H₂O and the organic layer was isolated and evaporated to give 3.03 g (88% yield) of the desired product (Fmoc-Lys(DMNB)-OH, 5.0 mmol).

Synthesis of Fmoc-Tyr(DMNB)-OH

- (i) To a solution of 3.00 g of L-tyrosine- α -t-butyl ester (12.6 mmol) dissolved in 40 ml of dioxane/H₂O (5/1, v/v) was added 2.2 ml of DIEA (12.6 mmol) and 3.2 ml of di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O, 13.9 mmol). The solution was stirred at room temperature and RP-HPLC analysis revealed that the reaction was completed within 2 h. The solvent was removed *in vacuo* and the resulting solid was extracted 3 times with DCM/H₂O. After drying, 4.08 g of pure Boc-Tyr-OtBu was obtained (12.1 mmol, 96% yield).
- (ii) To 3.23 g of Boc-Tyr-OtBu (i) (9.6 mmol) dissolved in 30 ml of dry THF was added under nitrogen 1.18 g of potassium *tert*-butoxide (10.5 mmol) followed by 2.90 g of 4,5-

dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide (DMNBB, 10.5 mmol) dissolved in 125 ml of dry THF. The reaction mixture was stirred overnight under nitrogen, at room temperature. Thin-layer chromatography (TLC) analysis ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$; 95/4/1) showed that the reaction was completed. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was extracted 3 times with DCM/H₂O. The organic phase was isolated, dried and evaporated to give a dark-orange oil. The resulting oil (Boc-Tyr(DMNBB)-OtBu) was dissolved in 100 ml of TFA/H₂O (19/1, v/v) and the reaction mixture was stirred at room temperature. After 2 h, RP-HPLC analysis revealed that the reaction was over. The solvent was evaporated to a give a brown oil that was dissolved in ACN/H₂O (3/2, v/v) before being purified by preparative RP-HPLC using a linear gradient of 40% to 70% ACN in TFA/H₂O (0.06%, v/v). An amount of 2.81 g (78% yield, 7.5 mmol) of the pure product (H-Tyr(DMNBB)-OH) was obtained after evaporation of the corresponding fractions.

(iii) To a solution of H-Tyr(DMNBB)-OH (ii) (2.75 g, 7.3 mmol) in 100 ml of ACN/H₂O/triethylamine (5/2/0.2, v/v) was added N-(9-fluorenylmethoxy-carbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu, 2.47 g, 7.3 mmol) dissolved in 100 ml of ACN/H₂O (5/2, v/v). The pH of the reaction mixture was maintained at 8.5 by dropwise addition of triethylamine. Analytical HPLC analysis showed that the reaction was completed within 1 h. The solvent was evaporated and the resulting oil was extracted 3 times with EtOAc/H₂O. Organic phases were isolated, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The reaction yielded 4.09 g of the final product (Fmoc-Tyr(DMNBB)-OH) (93% yield, 6.8 mmol) with a high degree of purity (97%), as revealed by analytical RP-HPLC analysis.

Solid phase peptide synthesis and cleavage

All peptides were assembled using a home-designed semi-automatic multireactor synthesizer. ET-1 analogues were synthesized using a solid-phase procedure based on the Fmoc chemistry and the BOP coupling strategy (17,18). Wang resin was used as the solid support, except for [Trp- α -(DMNB)²¹]ET-1, and each coupling step was monitored using a ninhydrin test. For [Melle¹⁹]ET-1 and [MeIle¹⁹, Asp(DMNB)¹⁸]ET-1, the coupling of the amino acid in position 18 was monitored by quantification of the cleaved N- α -Fmoc amino protecting group of Asp¹⁸ or Asp(DMNB)¹⁸ using UV detection, a standard procedure for the determination of the loading of the resin (19). Cleavage from the resin was achieved with a mixture of TFA/ethanedithiol/phenol/H₂O (92/2/5/3/2.5) for 2 h. After evaporation, the crude peptides were precipitated and washed with diethyl ether before being dried.

Synthesis of [Trp- α -(DMNB)²¹]ET-1

- (i) The peptide was synthesized using the same general procedure described above except that the highly acid-sensitive 2-chlorotriyl chloride resin was used. After the last coupling, no deprotection of the amino-terminal protecting group (Fmoc) was performed. Cleavage of the protected peptide from the resin was achieved with a mixture of DCM/TFA/ethanedithiol (98/1/1, v/v) according to the method described by Barlos *et al.* (20). Therefore, a fully protected ET-1 peptide, except for the carboxy-terminal function, was obtained.

- (ii) To a solution of 1.5 g of protected ET-1 (0.33 mmol) in 100 ml of DCM was added 2.81 g of DMNBA (13.2 mmol) dissolved in 100 ml of DCM and 10 mg of DMAP (0.1 mmol). This was followed by the addition of DCC (1.36 g, 6.6 mmol) dissolved in 30 ml of DCM. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After filtration, the solvent was removed *in vacuo* and the resulting solid was extracted with H₂O/DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated.
- (iii) Protected caged-ET-1 was dissolved in 100 ml of DCM/piperidine (80/20, v/v) and stirred at room temperature for 20 min to remove the Fmoc amino protecting group. The solvent was evaporated and the crude peptide was precipitated and washed with a large excess of heptane before being dried. Finally, the side chain protecting groups were removed using the TFA cleavage method abovementioned.

Peptide purification, cyclization and characterization

Crude peptides were purified by preparative RP-HPLC using a linear gradient of 5% to 40% ACN in aqueous TFA (0.06%). Collected fractions were analyzed using RP-HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry. Fractions corresponding to the desired product were pooled and lyophilized. The disulfide bonds of ET-1 and its analogues were obtained through a 1 h treatment with 20 eq of K₃Fe(CN)₆ dissolved in an aqueous solution of NH₄OH (0.05%) containing 3.0% urea. The peptide concentration was adjusted to 0.5 mg/ml and the cyclization was stopped by the injection of the reaction mixture onto a preparative column. The pure peptides were characterized by analytical RP-HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry.

Kinetics of peptide photolysis

Caged peptides (200 µl, 10⁻⁴ M) in Krebs-Henseleit buffer were placed in microplate located on ice. Irradiation was performed using a 100 W UV lamp (UVP, black-ray long wave, model B100AP) which was located at 3.0 cm above the plate. Irradiated caged peptides were removed at various times and were analyzed using RP-HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry.

Biological activity studies

The biological activity of the ET-1 analogues was measured in two different paradigms: rat thoracic aorta rings (21) and guinea pig lung parenchyma strips (22). Rat thoracic aorta rings and guinea pig parenchyma lung strips are two pharmacological preparations showing predominant populations of ET_A and ET_B receptors, respectively. Male Sprague-Dawley rats (250-300 g) were anesthetized with pentobarbital (Somnotol) (CDMV, Saint-Hyacinthe, Qc) and the rat thoracic aorta was quickly removed. The aorta was cleaned of connective tissues and the endothelium was detached by gentle rubbing before being cut into 4 mm rings. Aorta sections were mounted under an initial tension of 1 g in 5 ml bioassay vessels containing Krebs-Henseleit buffer maintained at 37 °C. Tissues were allowed to equilibrate for 1 h. Contractions were recorded using a Grass 7E Polygraph equipped with force-displacement transducers. Concentrations of 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵ M of peptides were used to obtain concentration-response curves. All results were normalized as a percentage of the contraction obtained with KCl (80 mM). Similarly, male Hartley guinea pigs (300-350 g) were anesthetized with Somnotol and the lungs

were removed. Parenchyma strips were mounted in the system described above. All results were normalized as a percentage of the contraction obtained with histamine (10^{-6} M). Concentration-response curves were analyzed using a nonlinear least-square regression obtained with the Prism 3.0 software. Results are expressed as mean \pm s.e.m. and the number of replicates varied from n = 4 to 8.

Results

Synthesis of caged peptides

Fmoc-Asp(DMNB)-OH, Fmoc-Glu(DMNB)-OH and Fmoc-Lys(DMNB)-OH caged amino acids were all synthesized in yields of approximately 90% while the resulting yield for the synthesis of Fmoc-Tyr(DMNB)-OH was 70%. Analytical RP-HPLC of the caged amino acids showed that they were all obtained with a high degree of purity. Purified photoactivable peptides analogues [Lys(DMNB)⁹]ET-1, [Tyr(DMNB)¹³]ET-1, [Asp(DMNB)¹⁸, MeIle¹⁹]ET-1 and [Trp(α -DMNB)²¹]ET-1 showed a similar MALDI-TOF mass spectrometry profile characterized by a major peak corresponding to the theoretical mass and two minor peaks.

Crude peptides [Asp(DMNB)⁸]ET-1 and [Asp(DMNB)¹⁸]ET-1, obtained after the acidic cleavage, gave a major product at 2479 Da and a minor compound at 2496 Da (Figure 1). Thus, molecular mass of the most abundant peptide, obtained by MALDI-TOF mass spectrometry, was 212 Da lower than the expected mass of this peptide (2691 Da). Moreover, after 15 min of aqueous treatment, the mass at 2496 Da, that is identical to the theoretical mass of non cyclized ET-1, became the major pick. This shift in the mass spectrometry profile was also confirmed by RP-HPLC analyses.

On the other hand, as suspected because of the negative ninhydrin test obtained after the piperidine deprotection of the [Glu(DMNB)¹⁰]ET-1-resin, the peptide obtained after the synthesis and cleavage was shown to have a mass of 1521 Da. (Figure 2). Sequencing through amino and carboxy-terminal enzymatic digestion, using the procedure

recommended by the supplier, was also performed on this peptide. As expected, digestion was accomplished by the carboxypeptidase and revealed the presence of the right amino acid composition for the C-terminal segment ($\text{Asp}^{18}\text{-Ile}^{19}\text{-Ile}^{20}\text{-Trp}^{21}$). However, no digestion was observed after treatment with the aminopeptidase, thus strongly suggesting a modification at the peptide N-terminus. Finally, $[\text{Asp(DMNB)}^8]\text{ET-1}$, $[\text{Glu(DMNB)}^{10}]\text{ET-1}$, and $[\text{Asp(DMNB)}^{18}]\text{ET-1}$, that were all obtained with a reduced mass, were not able to undergo a photochemical reaction, suggesting the absence of the 4,5-dimethoxynitrobenzyl photolabile group.

Photolysis of caged peptides

Caged peptides were photolyzed in Krebs-Henseleit buffer and the kinetic of unmasking upon UV exposure was determined with analytical HPLC analysis. Peptides containing a nitrobenzyl group on the tyrosine side chain showed a faster conversion to the native peptide (Figure 3). The half-lives for the photorelease of ET-1 were all under 5 min, except for $[\text{Asp(DMNB)}^{18}, \text{Melle}^{19}]\text{ET-1}$ that the photolysis was much slower.

Biological activity

Caged peptides were evaluated for their biological activity, using the rat thoracic aorta and the guinea pig lung parenchyma. Figures 4 and 5 illustrate the concentration-response curves for ET-1 related peptides obtained in the ET_A and ET_B paradigms, respectively. Surprisingly, although residues 9, 13 and 21 are known to be key ET_A pharmacophores, $[\text{Lys(DMNB)}^9]\text{ET-1}$, $[\text{Tyr(DMNB)}^{13}]\text{ET-1}$ and $[\text{Trp}(\alpha\text{-DMNB})^{21}]\text{ET-1}$ did not appear as inactive peptides for the ET_A receptor with EC_{50} values in the rat thoracic aorta paradigm

of 1.35×10^{-8} M, 2.33×10^{-9} M and 3.18×10^{-8} M, respectively. Furthermore, [*Tyr(DMNB)¹³*]ET-1, even if it behaves as partial agonist, showed 3 times more potency than the parent molecule, as illustrated in Figure 4. [*Lys(DMNB)⁹*]ET-1 and [*Trp(α-DMNB)²¹*]ET-1 also displayed partial agonism. However, their threshold concentration for inducing an aorta contraction is about 100-fold higher than the EC₅₀ of ET-1 (7.28×10^{-9} M). Therefore, both compounds could be used in ET_A preparations, as caged derivatives. Finally, [*Asp(DMNB)¹⁸, MeIle¹⁹*]ET-1 was an inadequate caged peptide because it was only 10 times less potent than [*MeIle¹⁹*]ET-1. Moreover, this molecule initially designed to avoid the Asp-succinimide side reaction, was a weak agonist in the ET_A bioassay.

In the ET_B paradigm, [*Lys(DMNB)⁹*]ET-1 and [*Tyr(DMNB)¹³*]ET-1 exhibited a rather high potency with EC₅₀ values of 2.45×10^{-8} M and 1.14×10^{-8} M, respectively, while [*Trp(α-DMNB)²¹*]ET-1 was 5 times less potent than sarafotoxin_{6c}, a potent selective ET_B agonist, and appeared as a partial agonist. The EC₅₀ of [*Asp(DMNB)¹⁸, MeIle¹⁹*]ET-1 was low (2.66×10^{-6} M), but the parent molecule was also a weak derivative. All caged peptides were also tested pharmacologically, as described above, after UV irradiation and their concentration-response curves were identical to those obtained with their respective parent molecule (data not shown).

Discussion

Syntheses of nitrobenzylated caged building blocks for peptide synthesis on solid phase were previously reported and used successfully for Tyr and Lys amino acids (3,4,5,6). Therefore, we applied these methodologies for the preparation of the Tyr and Lys building blocks required for the synthesis of the endothelin analogues. However, for the acidic functions found on the Asp and Glu side chains, as well as at the C-terminus, it appears that no protocols describing the synthesis and use of their related nitrobenzylated photoactivable counterparts were yet reported in the literature. Perhaps, this absence of data with nitrobenzyl substituted carboxylic functions comes from the known propensity of protected acidic groups to side reactions. Nevertheless, we designed a procedure for the production of Fmoc-Asp(DMNB)-OH and Fmoc-Glu(DMNB)-OH. This approach is in fact an effective alternative to the use of unstable diazo-derivatives suggested in the literature for the introduction of nitrobenzyl compounds and used for instance for the synthesis of phosphatidic acid (23). Moreover, the method can be applied to the derivatization of peptides. As a matter of fact, we succeeded in incorporating a DMNB group on the terminal carboxylic acid group of ET-1, using a strategy based on the release of the fully protected peptide from a highly acid-sensitive resin. The resulting nitrobenzyl ester was stable to the standard TFA deprotection cocktail employed to remove common side chain protecting groups. This strategy is similar to that of Givens *et al.* (24) who produced caged bradykinin with a *p*-hydroxyphenacyl group. As compared to DMNB that exhibits a maximal absorption in the near UV (365 nm), the *p*-hydroxyphenacyl caging moiety is cleaved by means of far UV irradiation (280 nm) (1).

Thus the choice of DMNB as a caging group was made by taking into account this characteristic of long wavelength photolysis sensitivity. In fact, this feature allows the use of caged peptides with UV-deprotection conditions harmless to sensitive biological preparations.

[Lys(DMNB)⁹]ET-1, [Tyr(DMNB)¹³]ET-1, [Asp(DMNB)¹⁸, Met¹⁹]ET-1 and [Trp(α -DMNB)²¹]ET-1 were obtained with satisfactory yields and all exhibited the expected mass. Their MALDI-TOF mass spectrometry spectra were characterized by the presence of two minor peaks. These two peaks were laser-induced and corresponded to the uncaged peptide and to the conversion of the nitro group into a nitroso moiety, two phenomena that were previously reported (3,7). The kinetic of photorelease of the DMNB group from the caged peptides was also characterized. All ET-1 analogues showed a relatively fast conversion into the native molecule. On the other hand, the attempt to synthesize caged ET-1 with the introduction of a DMNB photolabile group on the Asp or Glu side chain gave unexpected results. No major side reactions were observed during the solid-phase synthesis of ET-1 using the Fmoc-chemistry in combination with a conventional protection scheme. However, with the 4,5-dimethoxynitrobenzyl caging group linked to the Asp or Glu side chain, the major material obtained after the cleavage was not the desired caged ET-1 derivative. In fact, the main product observed after the synthesis of [Asp(DMNB)¹⁸]ET-1 and [Asp(DMNB)⁸]ET-1 exhibited a mass of 2479 Da. This mass could probably correspond to the cyclic aminosuccinyl derivative (expected mass of 2478 Da). This ring-closure reaction involving the Asp side-chain and the backbone nitrogen atom of the following residue was described a long time ago (25,26).

Hence, it was shown that aspartimide formation was particularly favored when Asp is followed by Asn or a non-bulky residue, such as Ala or Gly. The results were therefore unexpected because in ET-1, Asp⁸ is followed by Lys while Ile¹⁹ is next to Asp¹⁸. Moreover, photolabile DMNB contains the electron-donor methoxy groups and a potent electron-withdrawing nitro moiety that should confer a sufficient stability towards the base-catalyzed aspartimide formation occurring during the piperidine treatment used in Fmoc-based synthesis, or the acid-catalyzed cyclic imide production coming from the TFA treatment required for the peptide-resin cleavage and deprotection step. Thus, the use of DMNB in combination with piperidine and/or TFA treatments was not appropriate for caging the Asp⁸ or Asp¹⁸ side chain. To characterize the postulated aspartimide formation, the material was dissolved in water to check the ring opening caused by hydrolysis. As observed by analytical RP-HPLC and characterized by a shift on the mass spectrometry profile corresponding to the addition of a water molecule, the peptide was modified in such a way that the mass of endothelin was obtained. This new material was not characterized but probably corresponded to ET-1 containing a methylene group in its backbone, following the thermodynamically favored hydrolysis of the aspartimide via the α-carbonyl function. So far, the aminosuccinyl formation appeared as a major drawback when using DMNB as an Asp side chain protecting group. Perhaps, this side reaction could be avoided by using a different Fmoc deprotection procedure such as that suggested by Mergler *et al.* (27) and consisting in the use of a complex cocktail of hexamethylimine / N-methylpyrrolidine / HOBT / N-methylpyrrolidone / dimethylsulfoxide (4/50/4/71/71 – v/v/w/v/v). However, in attempt to circumvent the purported aspartimide formation, we produced an ET-1 analogue containing a N-methyl

Ile¹⁹ residue and derivatized with a DMNB group on the Asp¹⁸ side chain. The related analogue, [MeIle¹⁹, Asp(DMNB)¹⁸]ET-1 was isolated and exhibited the expected mass, a data that strongly supported the aminosuccinyl hypothesis.

Bioassays in the ET_A and ET_B paradigms revealed variable caging characteristics for the DMNB-containing ET-1 analogues. For instance, in the rat thoracic aorta ring preparation (ET_A), [Tyr(DMNB)¹³]ET-1, although it did not exhibit a full agonist activity, appeared slightly more potent than the parent molecule. Similarly, in the guinea pig lung parenchyma bioassay (ET_B) [Tyr(DMNB)¹³]ET-1 and [Lys(DMNB)⁹]ET-1 exhibited a more potent agonistic activity than sarafotoxin 6c (STX_{6c}), a standard reference compound for the ET_B receptor. The guinea pig lung parenchyma contains a small ET_A receptor population (10-20%) (28) and this might explain the difference in contraction potency between [Tyr(DMNB)¹³]ET-1, a potent ET_A agonist, and STX_{6c}, a pure ET_B agonist. Nevertheless, the Lys⁹ substitution with DMNB, even though it gave rise to a very potent ET_B agonist, exhibited, in the ET_A paradigm, a threshold concentration for inducing a biological effect, about 100-fold higher than the EC₅₀ of ET-1. Similarly, the threshold concentration of [Trp(α -DMNB)²¹]ET-1 is in the same range as that of [Lys(DMNB)⁹]ET-1. Therefore, although these two compounds are not “pure” caged derivatives with no activity at all in both ET_A and ET_B preparations, they could be used advantageously in ET_A receptor biological systems as photoactivatable probes, at concentrations around 10⁻⁸ M.

None of the other DMNB-derivatized peptides showed adequate caging properties while the DMNB-substituted ET-1 analogues assembled with DMNB-protected Asp or

Glu residues showed a tremendous propensity to side reactions. As described before, we tried for instance to avoid the aspartimide formation occurring with [Asp(DMNB)⁸]ET-1 and [Asp(DMNB)¹⁸]ET-1 by investigating the effect of a methyl group on the nitrogen atom of the residue located next to Asp. We thus synthesized [Asp(DMNB)¹⁸, MeIle¹⁹]ET-1 as well as the parent compound [MeIle¹⁹]ET-1, and verified their biological activity. As expected, no side reactions were obtained with the N-methylated-Ile¹⁹-Asp(DMNB)¹⁸ endothelin analogue. Moreover, upon UV irradiation, the parent compound [MeIle¹⁹]ET-1 was obtained. Unfortunately, this N-methylated analogue of ET-1 exhibited only poor contracting activities in both ETA and ETB receptor preparations, thus making its caged DMNB counterpart useless for biological characterizations of ET-1 systems. It is clear that N-methylation of the Ile¹⁹ residue is not tolerated, probably because this chemical modification alters the secondary structure of the C-terminal tetrapeptide, a segment forming, according to NMR studies (29), a key bend folding. As demonstrated with the successful synthesis of the [Asp(DMNB)¹⁸, MeIle¹⁹]ET-1 analogue, N-protection of the amide bond next to Asp is a convenient method to suppress the aspartimide formation in endothelin analogues. Therefore, ET-1 derivatives with caged aspartic acid might be obtained by carrying out the synthesis by incorporating next to the Asp(DMNB) residue (position Ile¹⁹ or Lys⁹) a N-hydroxymethoxybenzyl (Hmb) residue that would prevent, by masking the backbone amide bond, the Asp ring-closure during the synthesis steps. This new strategy is actually explored.

On the other hand, the apparent negative ninhydrin test observed after the deprotection of [Fmoc-Glu(DMNB)¹⁰]ET-1(10-21) with piperidine, as well as the reduced mass and the inability of aminopeptidase to cleave the peptide material after UV irradiation suggested that the analogue was truncated and chemically modified at the N-terminus. As a matter of fact, the mass of 1521 Da that was obtained corresponded to that of ET-1(10-21) fragment containing a cyclic pGlu residue at the N-terminus. Therefore, the DMNB function of the Glu¹⁰ side chain was shown to behave as a potent leaving group upon piperidine treatment. This reaction that gave rise to a chain termination through the formation of a pyrrolidone (30), showed the susceptibility of the DMNB ester to nucleophilic substitution. One possible approach to suppress the pyrrolidone formation could be the use of a N-Hmb-derivatized-Glu(DMNB) residue. Such a compound, because of steric hindrance, would be probably less prone to pGlu formation upon piperidine treatment. However, this derivative needs to be developed.

In conclusion, although bioassays in ET_A and ET_B pharmacological preparations revealed variable caging characteristics, we designed two photolabile ET-1 probes that can be used for studying ET_A receptor cellular systems. Of course, these results required first the development of synthesis strategy for the preparation of DMNB-derivatized amino acids. Among these, the Asp(DMNB) and Glu(DMNB) were synthesized successfully but their use in Fmoc chemistry will require further improvements to avoid some extensive side reactions such as the aspartimide and pGlu formation, respectively. Finally, a method for C-terminal DMNB-derivatization was developed for ET-1 and this synthetic approach can be easily applied to other peptides.

References

1. Adams S.R. & Tsien R.Y. (1993) Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 755-784.
2. Shigeri Y., Tatsu Y., Yumoto N. (2001) Synthesis and application of caged peptides and proteins. *Pharmacol. Ther.* **91**, 85-92.
3. Tatsu Y., Shigeri Y., Sogabe S., Yumoto N., Yoshikawa S. (1996) Solid-phase synthesis of caged peptides using tyrosine modified with a photocleavable protecting group: application to the synthesis of caged neuropeptide Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 688-693.
4. Walker J.W., Gilbert S.H., Drummond R.M., Yamada M., Sreekumar R., Carraway R.E., Ikebe M., Fay F.S. (1998) Signaling pathways underlying eosinophil cell motility revealed by using caged peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1568-1573.
5. Tatsu Y., Shigeri Y., Ishida A., Kameshita I., Fujisawa H., Yumoto N. (1999) Synthesis of caged peptides using caged lysine: application to the synthesis of caged AIP, a highly specific inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1093-1096.

6. Watai Y., Sase I., Shiono H., Nakano Y. (2001) Regulation of nuclear import by light-induced activation of caged nuclear localization signal in living cells. *FEBS Lett.* **488**, 39-44.
7. Pan P. & Bayley H. (1997) Caged cysteine and thiophosphoryl peptides. *FEBS Lett.* **405**, 81-85.
8. Rothman D.M., Vazquez M.E., Vogel E.M., Imperiali B. (2002) General method for the synthesis of caged phosphopeptides: tools for the exploration of signal transduction pathways. *Org. Lett.* **17**, 2865-2868.
9. Tatsu Y., Nishigaki T., Darszon A., Yumoto N. (2002) A caged sperm-activating peptide that has a photocleavable protecting group on the backbone amide. *FEBS Lett.* **525**, 20-24.
10. Odaka M., Furuta T., Kobayashi Y., Iwamura M. (1995) Synthesis of caged compounds of L-leucyl-L-leucine methyl ester, an apoptosis inducer, and their cytotoxic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 652-656.
11. Pirrung M.C., Drabik S.J., Ahamed J., Ali H. (2000) Caged chemotactic peptides. *Bioconjug. Chem.* **11**, 679-681.

12. Ortega Mateo A., de Artinano A.A. (1997) Highlights on endothelins: a review.
Pharmacol. Res. **36**, 339-351.
13. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T.A. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415.
14. Tam J.P., Liu W., Zhang J.W., Galantino M., Bertolero F., Cristiani C., Vaghi F., de Castiglione R. (1994) Alanine scan of endothelin: importance of aromatic residues. *Peptides* **15**, 703-708.
15. Rovero P., Patacchini R., Maggi C.A. (1990) Structure-activity studies on endothelin (16-21), the C-terminal hexapeptide of the endothelins, in the guinea-pig bronchus. *Br. J. Pharmacol.* **101**, 232-234.
16. Nakajima K., Kubo S., Kumagaye S., Nishio H., Tsunemi M., Inui T., Kuroda H., Chino N., Watanabe T.X., Kimura T. (1989) Structure-activity relationship of endothelin: importance of charged groups. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 424-429.
17. Castro B., Dormoy J.R., Evin G., Selve C. (1975) Réactifs de couplage peptidique I (1) – l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* **16**, 1219-1222

18. Fournier A., Wang C.T., Felix A.M. (1988) Applications of BOP reagent in solid phase synthesis. Advantages of BOP reagent for difficult couplings exemplified by a synthesis of [Ala 15]-GRF(1-29)-NH₂. *Int. J. Pept. Protein Res.* **31**, 86-97.
19. Gude M., Ryf J., White P.D. (2002) An accurate method for the quantification of Fmoc-derivatized solid phase supports. *Lett. Pept. Sci.* **9**, 203-206.
20. Barlos K., Chatzi O., Gatos D., Stavropoulos G. (1991) 2-Chlorotriyl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **37**, 513-520.
21. Nguyen P.V., Yang X.P., Li G., Deng L.Y., J.P. Fluckiger, Schiffrian E.L. (1993) Contractile responses and signal transduction of endothelin-1 in aorta and mesenteric vasculature of adult spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 473-483.
22. Wong W.S., Bloomquist S.L., Bendele A.M., Fleisch J.H. (1992) Pharmacological and histological examinations of regional differences of guinea-pig lung: a role of pleural surface smooth muscle in lung strip contraction. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 620-626.

23. Williger B.T., Reich R., Neeman M., Bercovici T., Liscovitch M. (1995) Release of gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) induced by photolysis of caged phosphatidic acid in HT 1080 metastatic fibrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 29656-29659.
24. Givens R.S., Weber J.F., Conrad P.G., Orosz G., Donahue S.L., Thayer S.A. (2000) New phototriggers: p-hydroxyphenacyl as a C-terminal photoremovable protecting group for oligopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2687-2697.
25. Bodansky M. & Kwei J.Z. (1978) Side reactions in peptide synthesis. VII. Sequence dependance in the formation of aminosuccinyl derivatives from beta-benzyl-aspartyl peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* **12**, 69-74.
26. Bodansky M. & Natarajan S. (1975) Side reactions in peptide synthesis. II. Formation of succinimide derivatives from aspartyl residues. *J. Org. Chem.* **40**, 2495-2499.
27. Mergler M., Dick F., Sax B., Stahelin C., Vorherr T. (2003) The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part II. *J. Pept. Sci.* **9**, 518-526.
28. Battistini B., Warner T.D., Fournier A., Vane J.R. (1994) Characterization of ET_B receptors mediating contractions induced by endothelin-1 or IRL 1620 in guinea-pig isolated airways: effects of BQ-123, FR139317 or PD 145065. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 1009-1016.

29. Boulanger Y., Biron E., Khiat A., Fournier A. (1999) Conformational analysis of biologically active truncated linear analogs of endothelin-1 using NMR and molecular modeling. *J. Pept. Res.* **53**, 214-222.
30. Bodansky M. & Martinez J. (1981) Side reactions in peptide synthesis. *Synthesis* **1981**, 333-356.

Figures

Figure 1

Crude [Asp(DMNB)¹⁸]ET-1 analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry, before (A) and after (B) a 15 min aqueous treatment.

Figure 2

Crude [Glu(DMNB)¹⁰]ET-1 analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.

Figure 3

Photolysis kinetics of caged peptides obtained by analytical RP-HPLC analysis after irradiation with a 100 W UV lamp.

Figure 4

Concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of ET-1 and its analogues.

Figure 5

Concentration-response curves obtained with guinea pig lung parenchyma strips after adding cumulative concentrations of ET-1 and its analogues.

Figure 1 :

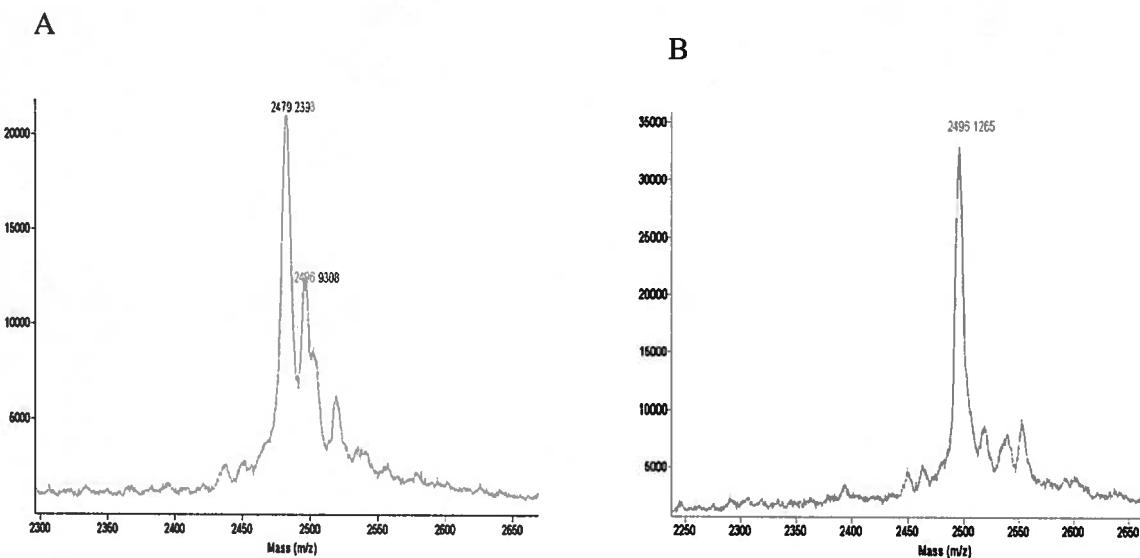


Figure 2 :

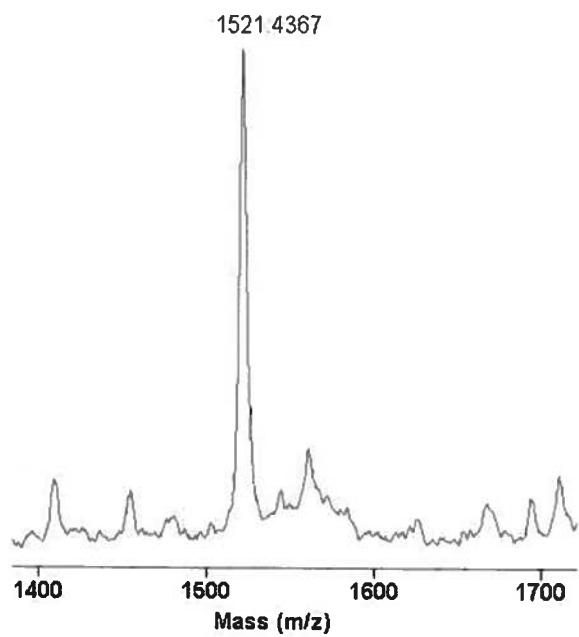


Figure 3 :

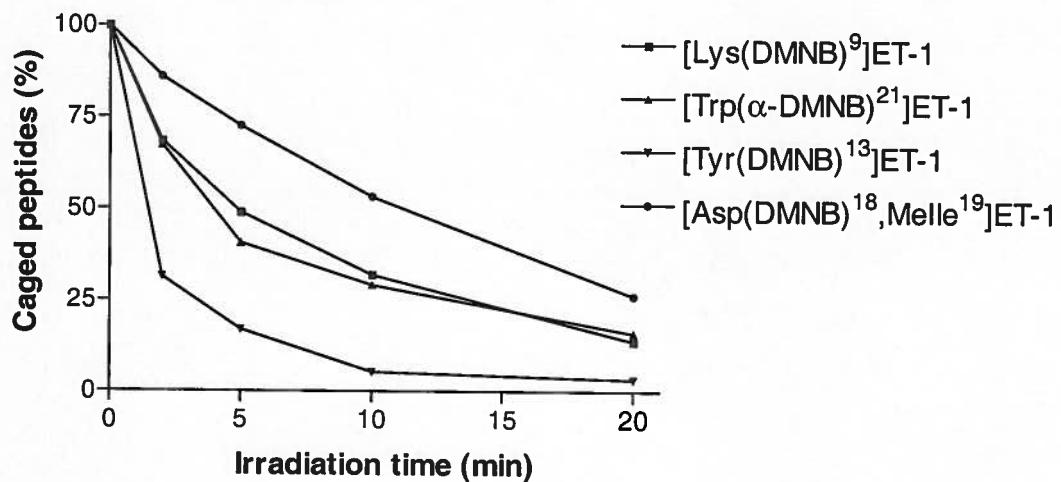


Figure 4 :

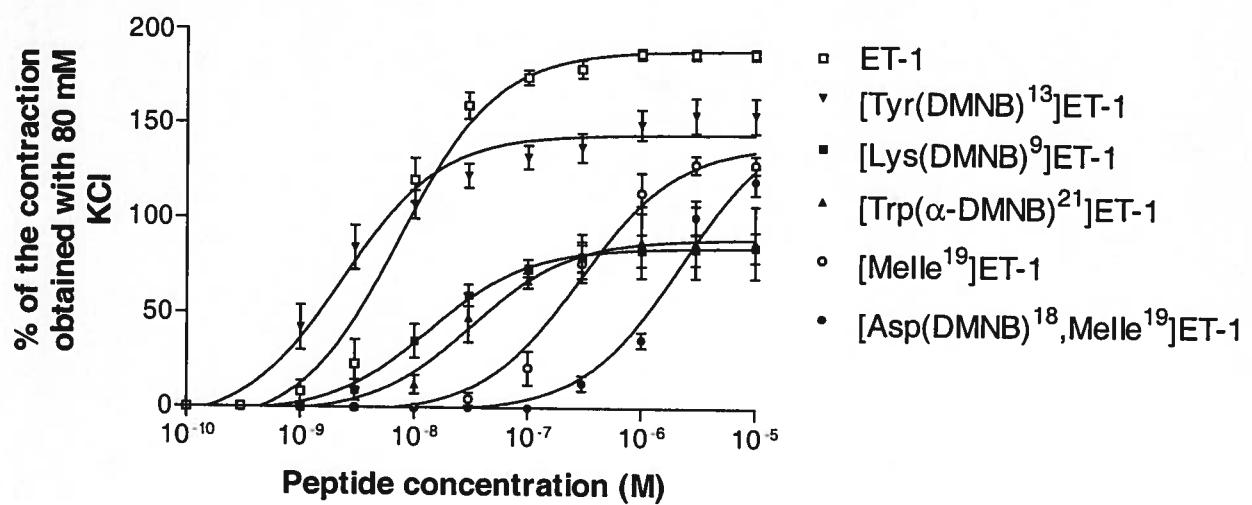
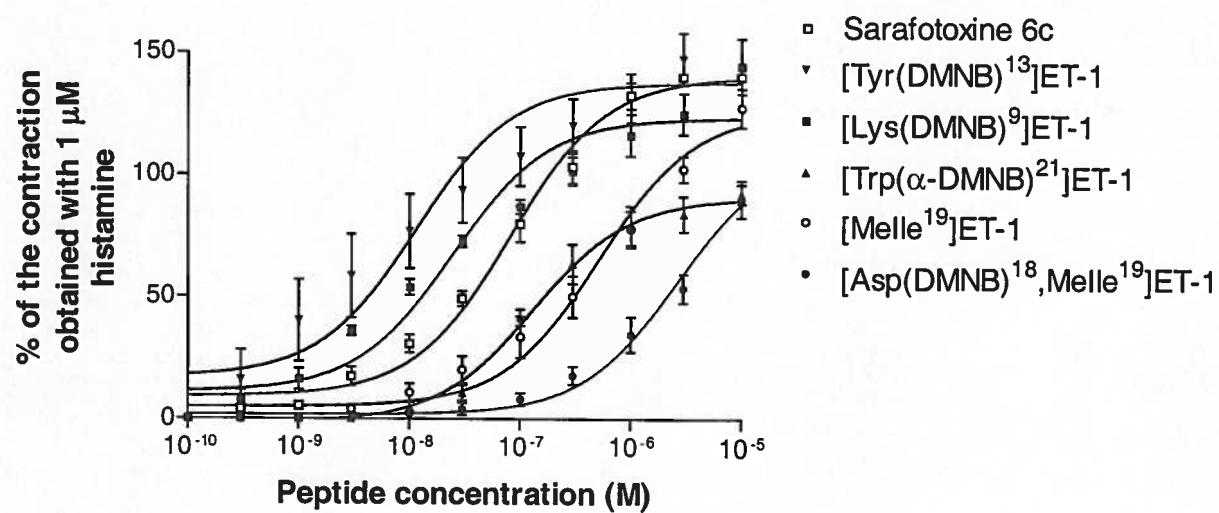


Figure 5 :



Références

- ADAMS S.R. et R.Y. Tsien. 1993. «Controlling cell chemistry with caged compounds». Annual Review of Physiology, vol. 55, p. 755-84.
- AMBAR I., Y. Kloog , I. Schwartz, E. Hazum et M. Sokolovsky. 1989. «Competitive interaction between endothelin and sarafotoxin: Binding and phosphoinositides hydrolysis in rat atria and brain». Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 158, p.195-201.
- AMES R.S., H.M. Sarau, J.K. Chambers, R.N. Willette, N.V. Aiyar, A.M. Romanic, C.S. Louden, J.J. Foley, C.F. Sauermelch, R.W. Coatney, Z. Ao, J. Disa, S.D. Holmes, J.M. Stadel, J.D. Martin, W.S. Liu, G.I. Glover, S. Wilson, D.E. McNulty, C.E. Ellis, N.A. Elshourbagy, U. Shabon, J.J. Trill, D.W.Hay et S.A. Douglas. 1999. «Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14». Nature, vol. 401, p. 282-286.
- AUMELAS A., L. Chiche, E. Mahe, D. Le-Nguyen, P. Sizun, P. Berthault et B. Perly. 1991. «Determination of the structure of [Nle7]-endothelin by ¹H NMR». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 37, p. 315-324.
- BERN H.A. et K. Lederis. 1969. «A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts». Journal of Endocrinology, vol. 45, p. 11-12.
- BHASIKARAN R., A.I. Arunkumar et C. Yu. 1994. «NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of urotensin II». Biochimica Biophysica Acta, vol. 1199, p. 115-122.

- BRKOVIC A., A. Hattenberger, E. Kostenis, T. Klabunde, S. Flohr, M. Kurz, S. Bourgault et A. Fournier. 2003. «Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay». The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 306, p.1200-1209.
- BOUCARD A.A., S.S. Sauve, G. Guillemette, E. Escher et R. Leduc. 2003. «Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain». Biochemistry Journal, vol. 370, p. 829-838.
- CHANG C., T. Fernandez, R. Panchal et H. Bayley. 1998. «Caged catalytic subunit of cAMP-dependant protein kinase». Journal of the American Chemical Society, vol. 120, p. 7661-7662.
- COULOUARN Y., I. Lihrmann, S. Jegou, Y. Anouar, H. Tostivint, J.C. Beauvillain, J.M. Conlon, H.A. Bern et H. Vaudry. 1998. «Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord». Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A., vol. 95, p. 15803-15808.
- COY D.H., W.J. Rossowski, B.L. Cheng et J.E. Taylor. 2002. «Structural requirements at the N-terminus of urotensin II octapeptides». Peptides, vol. 23, p. 2259-2264.
- DALGARNO D.C., L. Slater, S. Chackalamannil et M.M. Senior. 1992. «Solution conformation of endothelin and point mutants by nuclear magnetic resonance spectroscopy». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 40, p. 515-523.
- DOHERTY A.M. «Endothelin: a new challenge». 1992. Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 1493-1508
- DOUGLAS S.A. 2003. «Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'?». Current Opinion in Pharmacology, vol. 3, p.159-167.

DOUGLAS S.A., D. Dhanak et D.G. Johns. 2004. «From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function». Trends in Pharmacological Sciences, vol. 25, p. 76-85.

DOUGLAS S.A. et E.H.Ohlstein. 2000. «Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease». Trends in Cardiovascular Medicine, vol.10, p. 229-237.

ELLMAN J., D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C.J. Noren et P.G. Schultz. 1991. «Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins». Methods in Enzymology, vol. 202, p. 301-336.

FLOHR S., M. Kurz, E. Kostenis, A. Brkovich, A. Fournier et T. Klabunde. 2002. «Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 45, p. 1799-1805.

FODOR S.P., J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu et D. Solas. 1991. «Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis». Science, vol. 15, p. 767-773.

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

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

FURATA T. et M. Iwamura. 1998. «New caged groups: 7-substituted coumarinylmethyl phosphate esters». Methods in Enzymology, vol. 291, p. 50-63.

GIVENS R.S., J.F. Weber, A.H. Jung et C.H. Park. 1998. «New photoprotecting groups: desyl and p-hydroxyphenacyl phosphate and carboxylate esters». Methods in Enzymology, vol. 29, p. 1-29.

GIVENS R.S., J.F. Weber, P.G. Conrad, G. Orosz, S.L. Donahue et S.A. Thayer. 2000. «New phototriggers: p-hydroxyphenacyl as a C-terminal photoremovable protecting group for oligopeptides». Journal of the American Chemical Society, vol. 122, p. 2687-2697.

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

HAGEN V., J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter et U.B. Kaupp. 2001. «Highly Efficient and Ultrafast Phototriggers for cAMP and cGMP by Using Long-Wavelength UV/Vis-Activation.» Angewandte Chemie International Edition, vol. 40, p. 1045-1048.

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 of the U. S. A., vol. 86, p. 2863-2867.

ITOH H., Y. Itoh, J. Rivier et K. Lederis. 1987. «Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II». American Journal of Physiology, vol. 252, p. 361-366.

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

KAPLAN J.H. et G.C. Ellis-Davies. 1988. «Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations». Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A., vol. 85, p. 6571-6575.

KAPLAN J.H., B. Forbush et J.F. Hoffman. 1978. «Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts». Biochemistry, vol. 16, p. 1929-1935.

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

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

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

MARRIOTT G. 1994. «Caged protein conjugates and light-directed generation of protein activity: preparation, photoactivation, and spectroscopic characterization of caged G-actin conjugates». Biochemistry, vol. 33, p. 9092-9097.

MCCRAY J.A. et D.R. Trentham. 1989. «Properties and uses of photoreactive caged compounds». Annual of Review Biophysical and Biophysical Chemistry, vol. 18, p. 239-270.

MILLER J.C., S.K. Silverman, P.M. England, D.A. Dougherty et H.A. Lester. 1998. «Flash decaging of tyrosine sidechains in an ion channel». Neurones, vol. 20, p. 619-624.

MIMASSI N., F. Shahbazi, J. Jensen, D. Mabin, J.M. Conlon et J.C. Le Mevel. 2000. «Cardiovascular actions of centrally and peripherally administered trout urotensin-I in the trout». American Journal of Physiology – Regulation, Integrative and Comparative Physiology, vol. 279, p. 484-491.

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

MONROE W.T., M.M McQuain, M.S. Chang, J.S. Alexander et F.R. Haselton. 1999. «Targeting expression with light using caged DNA». Journal of Biology Chemistry. vol. 274, p. 20895-20900.

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

NERBONNE J.M. 1996. «Caged compounds: tools for illuminating neuronal responses and connections». Current Opinion in Neurobiology, vol. 6, p. 379-386.

O'BRIEN R.F. et I.F. McMurtry. 1984. «Endothelial cell supernantes contract bovine pulmonary artery rings». American Review of Respiratory Disease, vol. 129, p. 337.

ODAKA M., T. Furuta, Y. Kobayashi et M. Iwamura. 1995. «Synthesis of caged compounds of L-leucyl-L-leucine methyl ester, an apoptosis inducer, and their cytotoxic activity». Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 213, p. 652-656.

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

PAN P. et H. Bayley. 1997. «Caged cysteine and thiophosphoryl peptides». FEBS Letters, 405, p. 81-85.

PEARSON D., J.E. Shively, B.R. Clark, I.I Geschwind, M. Barkley, R.S Nishioka et H.A. Bern. 1980. «Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes». Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A., vol. 77, p. 5021-5024.

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

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

PILLAI V.N.R. 1980. «Photoremovable protecting groups in organic synthesis». Synthesis, vol. 26, p. 1-27.

RE R.N. 2003. «The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action». BioEssays, vol. 25, p. 401-409.

ROTHMAN D.M., M.E. Vazquez, E.M. Vogel et B.Imperiali. 2003. «Caged phospho-amino acid building blocks for solid-phase peptide synthesis». Journal of Organic Chemistry, vol. 68, p. 6795-6798.

SHIGERI Y., Y. Tatsu et N. Yumoto. 2001. «Synthesis and application of caged peptides and proteins». Pharmacology and Therapeutics, vol. 91, p. 85-92.

SHIRAKAWA I., S. Chaen, C.R. Bagshaw et H. Sugi. 2000. «Measurement of nucleotide exchange rate constants in single rabbit soleus myofibrils during shortening and lengthening using a fluorescent ATP analog». Biophysical Journal, vol. 78, p. 918-926.

TAL M., D.A. Ammar, M. Karpuj, V. Krizhanovsky, M. Naim et D.A. Thompson. «A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia». Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 209, p. 752-759.

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

TATSU Y., T. Nishigaki, A. Darszon et N. Yumoto. 2002. «A caged sperm-activating peptide that has a photocleavable protecting group on the backbone amide». FEBS Letters, vol. 525, p. 20-24.

TATSU Y., Y. Shigeri, A. Ishida, I. Kameshita, H. Fujisawa et N. Yumoto. 1999. «Synthesis of caged peptides using caged lysine: application to the synthesis of caged AIP, a highly specific inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II». Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, vol. 19, p. 1093-1096.

TATSU Y., Y. Shigeri, S. Sogabe, N. Yumoto et S. Yoshikawa. 1996. «Solid-phase synthesis of caged peptides using tyrosine modified with a photocleavable protecting group: application to the synthesis of caged neuropeptide Y». Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 227, p. 688-693.

VAUDRY H., Y. Coulouarn, I. Lihrmann, S. Jegou, Y. Anouar, H. Tostivint, J.C. Beauvillain, J.M. Conlon et H.A. Bern. 2002. «L'urotensine II : de l'urophyse des poissons aux motoneurones humains». Médecine-Science, vol. 15, p. 709-712.

WALLACE B.A. et R.W. Janes. 1995. «The crystal structure of human endothelin-1 and how it relates to receptor binding». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26, p. 250-253.

WILLIGER B.T., R. Reich, M. Neeman, T. Bercovici et M. Liscovitch. 1995. «Release of gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) induced by photolysis of caged phosphatidic acid in HT 1080 metastatic fibrosarcoma cells». Journal of Biology Chemistry, vol. 270, p. 29656-29659.

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.