

Université du Québec
INRS–Institut Armand-Frappier

Synthèse et activité biologique d’analogues de l’endothéline-1 :
une étude de la portion 12 à 16 de la molécule

Par
Chantal Langlois

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

Jury d’évaluation :

| | |
|------------------------|---|
| Évaluateur externe : | Dr Pierette Gaudreau Centre de recherche de l’hôpital Notre-Dame |
| Évaluateur interne : | Dr Jacques Bernier INRS–Institut Armand-Frappier |
| Directeur de recherche | Dr Alain Fournier INRS–Institut Armand-Frappier |

Août 2000

© droit réservés de Chantal Langlois, 2000

Résumé

L'endothéline (ET) fait partie d'une famille de peptides vasoactifs constitués d'une chaîne de 21 acides aminés. Cette chaîne est repliée par deux ponts disulfures et ses extrémités N- et C-terminales sont libres. Il existe trois isoformes de l'ET soit ET-1, ET-2 et ET-3, qui diffèrent entre elles par leur structure ainsi que par leur activité biologique. En effet, ET-1 et ET-2 semblent posséder une activité vasoconstrictrice alors que ET-3 engendrerait plutôt une vasodilatation. L'activité biologique des ETs s'exerce, chez les mammifères, via deux types de récepteurs : ET_A et ET_B. Le premier se retrouve principalement sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et il possède une affinité plus grande pour ET-1 et ET-2 que pour ET-3. Sa stimulation entraîne une vasoconstriction puissante et soutenue. Le récepteur ET_B possède une plus vaste distribution dans l'organisme et ne présente aucune spécificité envers l'une ou l'autre des isoformes de l'ET. Il existe deux sous-types de ce récepteur : ET_{B1} et ET_{B2} dont la stimulation, dans le système vasculaire, entraîne respectivement une rapide vasodilatation et une vasoconstriction.

Les études de structure-fonction visent à identifier et caractériser les éléments d'une molécule essentiels à l'activation et/ou à la discrimination de récepteurs. Ainsi, des travaux menés dans notre laboratoire ont, entre autres, permis d'identifier des analogues de l'ET-1 qui, bien que dix fois moins puissants que la molécule native, sont spécifiques pour le récepteur ET_B. Plusieurs molécules présentent cette caractéristique de spécificité. Néanmoins, la structure de nos analogues constituait un élément nouveau puisque malgré une structure primaire réduite et une modification chimique du résidu tryptophane en C-terminal, les dérivés ont conservé une activité biologique significative. Ainsi, l'analogue le plus puissant de cette série, le [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1, possède une extrémité N-terminale où les résidus en position 1 et 2 sont absents. Il porte également des groupements acétamidométhyles (Acm) sur ses cystéines 3 et 11 et un groupe chimique formyle sur le noyau indole du tryptophane-21. De plus, une chaîne aliphatique mobile (acide aminocaproïque, Aca) remplace les acides aminés 12 à 16 du segment médian de cet analogue. La présente étude porte une attention particulière sur le rôle de cette portion de la molécule d'endothéline qui jouerait un rôle dans la liaison du ligand au récepteur. Nous avons donc développé une série de peptides de structure

similaire possédant cependant une chaîne aliphatique plus courte précédée ou suivie par des acides aminés aux caractéristiques physico-chimiques variées. Ainsi, la leucine, la lysine, la valine, la sérine, la tyrosine et l'alanine ont été insérés en association avec la chaîne aliphatique.

Ces analogues de l'ET-1 ont été synthétisés en phase solide au moyen de la chimie t-Boc. Ils ont été purifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) préparative sur phase inverse. Chaque analogue a été par la suite caractérisé par CLHP analytique sur phase inverse et par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

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

Tous les analogues se sont avérés inactifs sur l'aorte de rat. Par contre les tests effectués sur le parenchyme pulmonaire ont montré que les analogues dans lesquels la lysine avait été insérée avant ou après l'espaceur ont conservé une activité biologique équivalente à celle de l'analogue original. La sérine et la tyrosine placées avant la chaîne aliphatique ont donné des dérivés exprimant aussi une activité biologique semblable alors qu'en position 16, soit juste après, nous avons observé une forte baisse de l'effet contractile. L'incorporation de résidus aliphatiques a produit des analogues avec une activité très faible alors qu'un effet médian a été observé après l'insertion d'une leucine, et ce, quelle que soit sa position. Nous avons donc postulé que la lysine, la sérine et la tyrosine auraient la capacité d'interragir avec le segment C-terminal de façon à stabiliser une structure secondaire en coude- β . Cette dernière serait importante pour l'activation du récepteur

Remerciements

Je voudrais adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Alain Fournier, pour les précieux conseils et le support qu'il m'a donnés tout au long de mes recherches. Je tiens également à souligner l'aide que j'ai reçue de tous les membres du laboratoire, et plus particulièrement de Sophie Tessier, Alexandre Brkovic, Myriam Létourneau et Luc Tessier.

Je remercie également le Conseil de recherche médicale du Canada et l'Institut national de la recherche scientifique pour les soutiens financiers accordés.

Table des matières

| | |
|---|------|
| Résumé..... | iii |
| Remerciements..... | v |
| Liste des figures..... | ix |
| Liste des tableaux..... | xi |
| Liste des schémas..... | xii |
| Listes des abréviations..... | xiii |
| Introduction..... | 1 |
| 1.1. Découverte, structure et rôle biologique de l'endothéline..... | 1 |
| 1.2. Biosynthèse de l'endothéline..... | 4 |
| 1.3. Les récepteurs de l'endothéline..... | 7 |
| 1.4. Les pharmacophores de l'endothéline..... | 8 |
| 1.5. Les structures secondaires et tertiaires de l'endothéline..... | 10 |
| 1.6. Synthèse chimique de la sarafotoxine 6c..... | 14 |
| Matériel et méthodologies..... | 16 |
| 2. Synthèse des analogues de l'endothéline-1..... | 16 |
| 2.1. Réactifs et solvants utilisés..... | 16 |
| 2.2. Protocole de synthèse peptidique en chimie t-Boc..... | 17 |
| 2.2.1. Fixation sur la résine de l'acide aminé en C-terminal..... | 17 |
| 2.2.2. Test à l'acide picrique..... | 17 |
| 2.2.3. Cycle de couplage en chimie t-Boc..... | 18 |
| 2.2.3.1. Déprotection de l'amine terminale..... | 18 |
| 2.2.3.2. Neutralisation de la résine..... | 20 |
| 2.2.3.3. Couplage des t-Boc-acides aminés..... | 20 |
| 2.3. Clivage du peptide de la résine..... | 23 |
| 3. Purification des analogues..... | 24 |
| 4. Caractérisation des analogues..... | 25 |
| 4.1. CLHP analytique..... | 25 |

| | | |
|----------|---|----|
| 4.2. | Spectrométrie de masse..... | 25 |
| 5. | Évaluation pharmacologique des analogues de l'endothéline-1..... | 26 |
| 5.1. | Animaux et produits utilisés..... | 26 |
| 5.2. | Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET _A | 26 |
| 5.3. | Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET _B | 27 |
| 6. | Synthèse de la sarafotoxine 6c..... | 29 |
| 6.1. | Réactifs utilisés..... | 29 |
| 6.2. | Protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc..... | 30 |
| 6.2.1. | Fixation sur la résine de l'acide aminé en C-terminal..... | 30 |
| 6.2.2. | Vérification du degré de la substitution de la résine..... | 32 |
| 6.2.3. | Cycle de couplage en chimie Fmoc..... | 32 |
| 6.2.3.1. | Déprotection de l'amine terminale..... | 32 |
| 6.2.3.2. | Couplage des Fmoc-acides aminés..... | 35 |
| 6.2.3.3. | Couplage de Fmoc-Cys(Trt)OH..... | 37 |
| 6.3. | Clivage du peptide de la résine..... | 37 |
| 6.4. | Traitement de la sarafotoxine 6c au AgBF ₄ | 39 |
| 6.5. | Cyclisation et purification de la sarafotoxine 6c..... | 39 |
| 7. | Caractérisation de la sarafotoxine 6c..... | 40 |
| 7.1. | Spectrométrie de masse..... | 40 |
| 7.2. | CLHP analytique..... | 40 |
| 7.3. | Évaluation pharmacologique..... | 40 |
| | Résultats..... | 41 |
| 8. | Synthèse des analogues de l'endothéline-1..... | 41 |
| 8.1. | Synthèse 1..... | 41 |
| 8.2. | Synthèse 2..... | 45 |
| 8.3. | Synthèse 3..... | 46 |
| 9. | Évaluation pharmacologique..... | 49 |
| 9.1. | Bioessais menés sur l'aorte de rat..... | 49 |
| 9.2. | Bioessais menés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye..... | 49 |

| | |
|--|----|
| 10. Synthèse de la sarafotoxine 6c..... | 56 |
| 10.1. Traitement au AgBF ₄ | 56 |
| Discussion..... | 60 |
| 11. Analogues de l'endothéline-1..... | 60 |
| 11.1. Choix de la stratégie de synthèse..... | 60 |
| 11.2. Résultats de synthèse..... | 62 |
| 11.3. Caractérisation des analogues de l'endothéline-1..... | 65 |
| 11.4. Évaluation pharmacologique..... | 66 |
| 11.4.1. Choix des préparations tissulaires..... | 66 |
| 11.4.2. Bioessais menés sur l'aorte de rat..... | 66 |
| 11.4.3. Bioessais menés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.... | 67 |
| 12. Sarafotoxine 6c..... | 70 |
| 12.1. Choix de la stratégie de synthèse..... | 71 |
| 12.2. Résultats de synthèse..... | 72 |
| Conclusions..... | 74 |
| Appendices..... | 76 |
| Appendice A..... | 76 |
| Appendice B..... | 77 |
| Appendice C..... | 78 |
| Appendice D..... | 79 |
| Appendice E..... | 80 |
| Références..... | 81 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Structure des membres de la famille des endothélines..... | 3 |
| Figure 2 : Biosynthèse de l'endothéline-1..... | 5 |
| Figure 3 : Structure de l' <i>endothélin-converting enzyme</i> (ECE)..... | 6 |
| Figure 4 : Structure du récepteur ET _A humain..... | 7 |
| Figure 5 : Montage des tissus pour les essais pharmacologiques..... | 28 |
| Figure 6 : Profil CLHP analytique de l'analogue brut [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹](3-11)-Val- Abu-(17-21)ET-1..... | 42 |
| Figure 7 : Profil CLHP analytique (A et B) et spectre de masse (C et D) des deux produits isolés de la purification du peptide [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹](3-11)- Val-Abu-(17-21)ET-1..... | 43 |
| Figure 8 : Analyses par CLHP (A) et par spectrométrie de masse (B) du peptide [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹](3-11)-Phe-Abu-(17-21)ET-1..... | 44 |
| Figure 9 : Analyses par CLHP (A) et par spectrométrie de masse (B) de l'analogue [Cys(Acm) ^{3,11} -Trp(For) ²¹](3-11)-Trp-Abu-(17-21)ET-1..... | 44 |
| Figure 10 : Profil CLHP analytique [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹](3-11)-Lys-Abu-(17-21)ET- 1..... | 45 |
| Figure 11 : Coupes du parenchyme pulmonaire de cobaye utilisées lors des essais pharmacologiques..... | 49 |
| Figure 12 : Courbes concentration-réponse de la SRTX 6c et du peptide [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1 obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye..... | 51 |
| Figure 13 : Courbes concentration-réponse de l'analogue [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹](3-11)- Aca-(17-21)ET-1 et des analogues contenant une lysine placée avant ou après la chaîne aliphatique, obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye..... | 52 |

| | |
|---|----|
| Figure 14 : Courbes concentration-réponse de l'analogue [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1 et des analogues contenant une sérine ou une tyrosine placée avant la chaîne aliphatique, obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye..... | 53 |
| Figure 15 : Courbes concentration-réponse de l'analogue [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1et des analogues contenant une leucine placée avant ou après la chaîne aliphatique, obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye..... | 54 |
| Figure 16 : CLHP analytique de la sarafotoxine 6c après son clivage de la résine..... | 56 |
| Figure 17 : Analyse par spectrométrie de masse de la sarafotoxine 6c avant et après le traitement au AgBF ₄ | 57 |
| Figure 18 : Caractérisations par CLHP analytique et par spectrométrie de masse de la sarafotoxine 6c..... | 58 |
| Figure 19 : Courbes concentration-réponse de la sarafotoxine 6c synthétisée et de la sarafotoxine 6c de source commerciale, obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye..... | 59 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Actions de l'endothéline sur les tissus vasculaires et non vasculaires | 2 |
| Tableau 2 : Liste des analogues synthétiques de l'endothéline-1..... | 13 |
| Tableau 3 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie t-Boc..... | 21 |
| Tableau 4 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc | 33 |
| Tableau 5 : Caractérisation par CLHP analytique des analogues de l'endothéline-1..... | 47 |
| Tableau 6 : Caractérisation par spectrométrie de . masse des analogues de l'endothéline-1..... | 48 |
| Tableau 7 : Activité biologique des analogues de l'endothéline-1..... | 55 |

Liste des schémas

| | |
|---|----|
| Schéma 1 : Déprotection de l'amine- α en chimie t-Boc..... | 19 |
| Schéma 2 : Couplage d'un acide aminé en chimie t-Boc..... | 22 |
| Schéma 3 : Couplage de l'acide aminé en C-terminal à la résine de Wang..... | 31 |
| Schéma 4 : Déprotection de l'amine- α en chimie Fmoc..... | 34 |
| Schéma 5 : Couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc..... | 36 |
| Schéma 6 : Couplage de Fmoc-Cys-Trt..... | 38 |

Liste des abréviations

| | |
|--------|---|
| Abu | Acide aminobutyrique |
| Aca | Acide aminocaproïque |
| Acm | Acétamidométhyle |
| ACN | Acétonitrile |
| A.C.S. | <i>American Chemical Standard</i> |
| t-Boc | t-Butyloxycarbonyle |
| BOP | Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-diméthylamino-phosphonium |
| Bzl | Benzyle |
| CGRP | <i>Calcitonin gene related peptide</i> |
| cHex | Cyclohexyle |
| CLHP | Chromatographie en phase liquide à haute performance |
| 2-ClZ | 2-Chlorobenzoyloxycarbonyle |
| Da | Dalton |
| DAG | Diacylglycérol |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimide |
| DCM | Dichlorométhane |
| DIEA | Diisopropyléthylamine |
| DMF | N,N-diméthylformamide |
| DMS | Diméthylsulfure |
| ECE | Enzyme de conversion de l'endothéline |
| EDT | Éthanedithiol |
| ET | Endothéline |
| Eq | Équivalent |
| Fmoc | 9-Fluorénylméthoxyloxycarbonyle |
| For | Formyle |

| | |
|-----------------|--|
| HBTU | Hexafluorophosphate de 2-(1-Hydroxy-benzotriazol-1yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium |
| HOBT | 1-Hydroxybenzotriazole monohydraté |
| IP ₃ | Inositol-triphosphate |
| NEP | <i>Neutral endopeptidase</i> |
| NPY | Neuropeptide Y |
| OtBu | Ester de t-Butyle |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| SRTX 6c | Sarafotoxine 6c |
| tBu | t-Butyle |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| Trt | Triphénylméthyle |
| VIC | <i>Vasoactive intestinal contractor</i> |
| VIP | <i>Vasoactive intestinal peptide</i> |

Introduction

Pendant longtemps, on a cru que le seul rôle de l'endothélium était la protection du muscle vasculaire sous-jacent. Toutefois, des études menées au début des années 1980 ont démontré que cette monocouche cellulaire joue également un rôle actif dans le maintien de l'homéostasie du tonus vasculaire. Ainsi, plusieurs substances telles que la prostacycline et l'EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) sont libérées par l'endothélium et agissent sur le lit vasculaire par des mécanismes paracrines et endocrines (Igarro *et al.*, 1987, D'Orléans-Juste *et al.*, 1996).

1.1. Découverte, structure et rôle biologique de l'endothéline

En 1984, O'Brien et McMurtry ont découvert que l'endothélium libère une substance vasoconstrictrice : l'EDCF (*endothelium-derived constricting factor*). Deux ans plus tard, Gillespie et son équipe ont montré qu'il s'agissait d'un facteur de nature peptidique puisqu'un traitement à la trypsine inhibait son activité. Ce n'est qu'en 1988 que Yanagisawa et son équipe ont réussi à extraire le peptide à partir de surnageants de cellules endothéliales d'aorte porcine. Ce peptide était constitué d'une chaîne de 21 acides aminés repliée par deux ponts disulfure en positions 1-15 et 3-11 et dont les extrémités N- et C-terminales étaient libres (Masaki et Yanagisawa, 1992). Ce peptide n'appartenait à aucune famille connue et ils le nommèrent endothéline (ET).

L'ET engendre une vaste gamme d'effets biologiques autant aux niveaux vasculaires que non vasculaires. Elle agit notamment sur le cœur, le foie, les poumons, les reins et le cerveau (tableau 1). Cependant l'effet le plus marqué se situe au niveau du système cardiovasculaire, où elle cause d'abord une vasodilatation transitoire, rapidement suivie d'une vasoconstriction puissante et soutenue. Cette constriction est accompagnée de plusieurs phénomènes physiologiques tels qu'une augmentation du débit cardiaque et de la perméabilité cellulaire. L'ET favorise également la prolifération des fibroblastes, des

Tableau 1 : Actions de l'endothéline sur les tissus vasculaires et non vasculaires.

| Tissus / Organes | Effets |
|-----------------------------|--|
| Muscles vasculaires | <ul style="list-style-type: none"> - Vasodilatation transitoire causée principalement par le relâchement du NO - Vasoconstriction prolongée et soutenue - Action mitogène - Diminution de l'aggrégation plaquettaire |
| Poumons, utérus et intestin | - Contraction des muscles lisses non vasculaires |
| Cœur | <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la contractilité et du rythme cardiaque - Stimulation de la libération d'ANF |
| Reins | <ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la libération de rénine - Diminution du flux sanguin rénal, du rythme de la filtration glomérulaire et de l'excrétion de Na⁺ et K⁺ |
| Tissu nerveux | - Augmentation de la libération de neurotransmetteurs |

(Tiré de Gray et Webb, 1996)

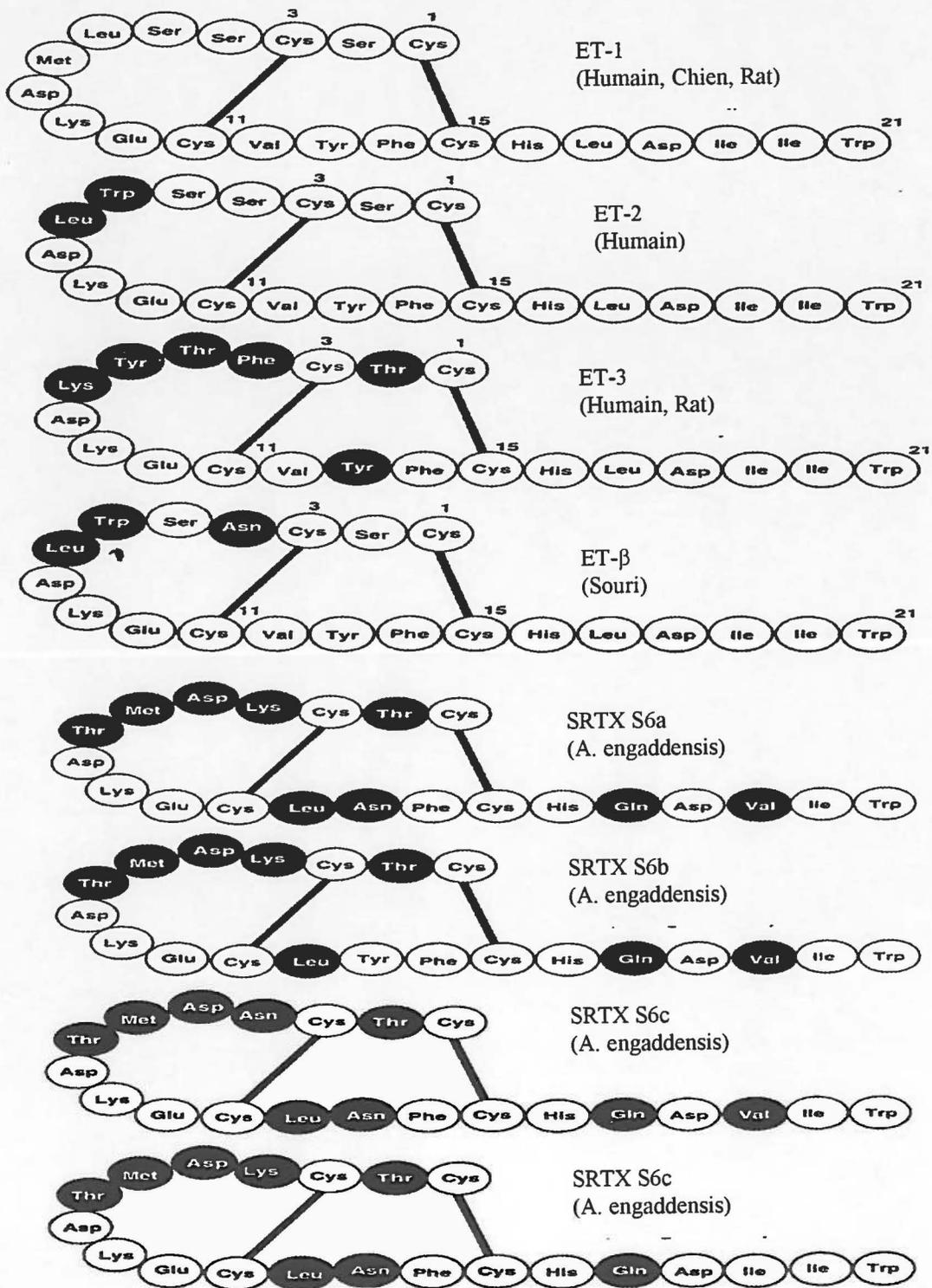


Figure 1 : Structure des membres de la famille des endothélines. (Tiré de Doherty *et al.*, 1992)

cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Mais elle est surtout connue comme étant l'un des plus puissants agents vasoconstricteurs endogènes, dont le rôle principal consiste à maintenir la résistance vasculaire systémique basale (Doherty, 1992; Haynes et Webb, 1993).

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

Les sarafotoxines (SRTXs) et la bibrotoxine, des cardiotoxines isolées du venin des vipères égyptiennes *Atractaspis engaddensis* et *Atractaspis bibroni*, présentent une étonnante homologie de structure avec les endothélines (Kloog *et al.*, 1988 ; Becker *et al.*, 1993). De plus, le VIC (*vasoactive intestinal contractor*), un peptide présent dans l'intestin de souris, ne diffère de l'ET-1 que par trois acides aminés (Saida *et al.*, 1989) (figure 1). Cette similarité structurale entre les endothélines et des peptides présents chez les reptiles suggère une même origine évolutive.

1.2. Biosynthèse de l'endothéline

Bien que les trois isoformes de l'endothéline soient issues de trois gènes distincts, leur biosynthèse implique le même processus enzymatique (Inoue *et al.*, 1989). La synthèse endogène de l'ET-1 débute par la production d'une protéine d'environ 200 acides aminés : la prépro ET-1. Plusieurs facteurs stimulent la production de ce précurseur comme la thrombine, l'angiotensine II, la vasopressine, l'insuline, l'adrénaline, le TNF- α (*tumour necrosis*

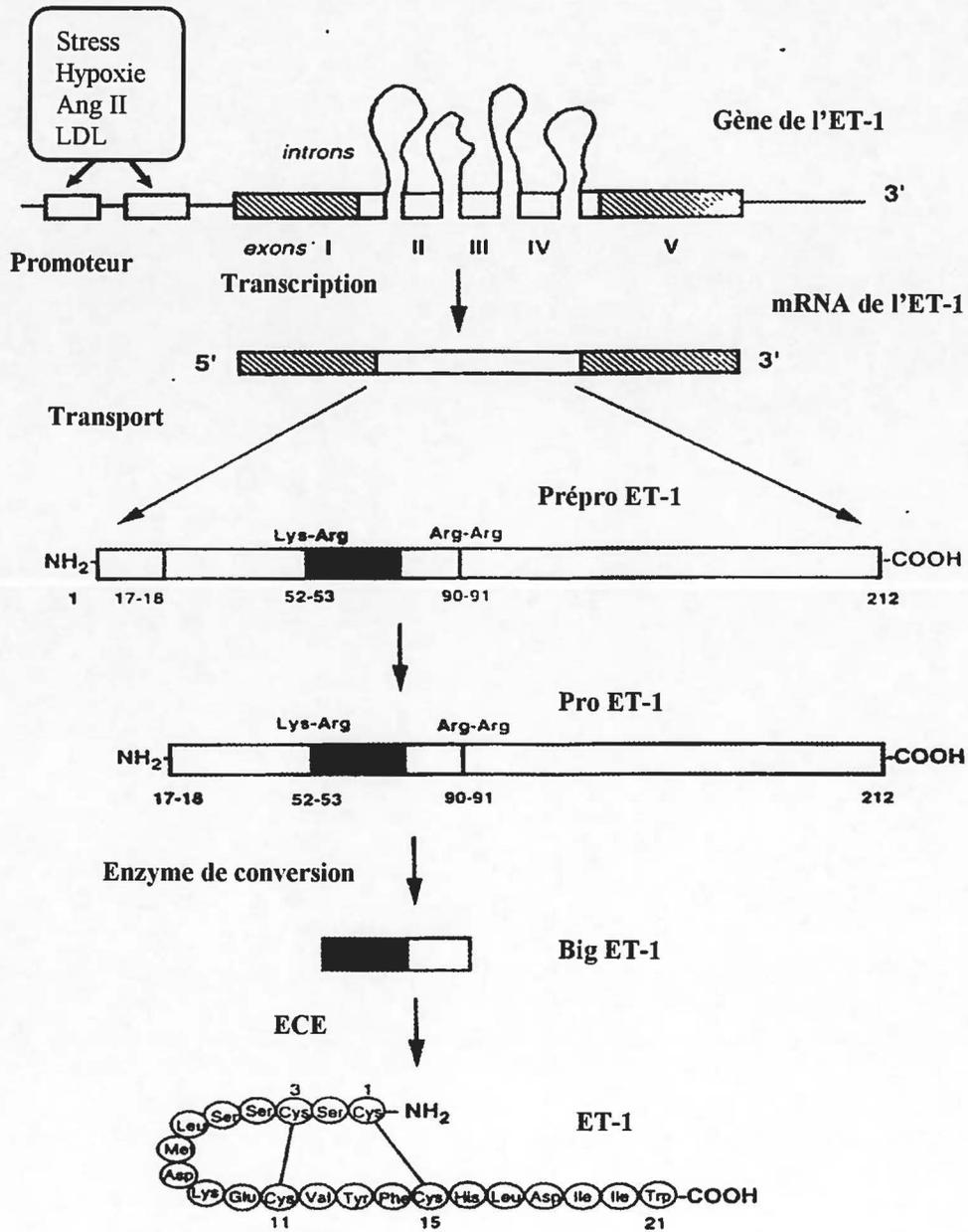


Figure 2 : Biosynthèse de l'endothéline-1. (Tiré de Gray et Webb, 1996)

factor) et certains facteurs de croissance, en plus des facteurs physiques et l'ET-1 elle-même (Masaki et Yanagisawa, 1992).

La prépro ET-1 est clivée par la furine, une endopeptidase de type subtilisine spécifique pour les résidus dibasiques : Lys-Arg. La pro ET-1 (big-ET-1) ainsi obtenue est constituée chez l'humain de 38 acides aminés (big ET-2 et big ET-3 sont constituées respectivement de 37 et 41 acides aminés) (Doherty *et al.*, 1992; Gray *et al.*, 1996).

La dernière étape de maturation est effectuée par une enzyme qui coupe le peptide entre Trp²¹ et Val²² (ou Ile²² pour ET-3). L'ECE (*endothelin converting enzyme*) est une métalloendopeptidase membranaire fortement glycosylée. Elle existerait sous la forme d'un dimère retenu par un lien disulfure (figure 3). Elle est sensible au phosphoramidon, un inhibiteur de métalloprotéase, mais non au thiorphan, un inhibiteur des endopeptidases neutres (NEP) (Doherty *et al.*, 1992; Masaki et Yanagisawa, 1992; Okada *et al.*, 1990). Il existerait trois isoformes de l'ECE : l'ECE-1a, l'ECE-1b et l'ECE-2. Elles se différencieraient par leur structure moléculaire, leur distribution et par leur affinité pour les différentes formes de la big-ET (Gray *et al.*, 1996; Mateo et De Artinano, 1997; Okada *et al.*, 1990).

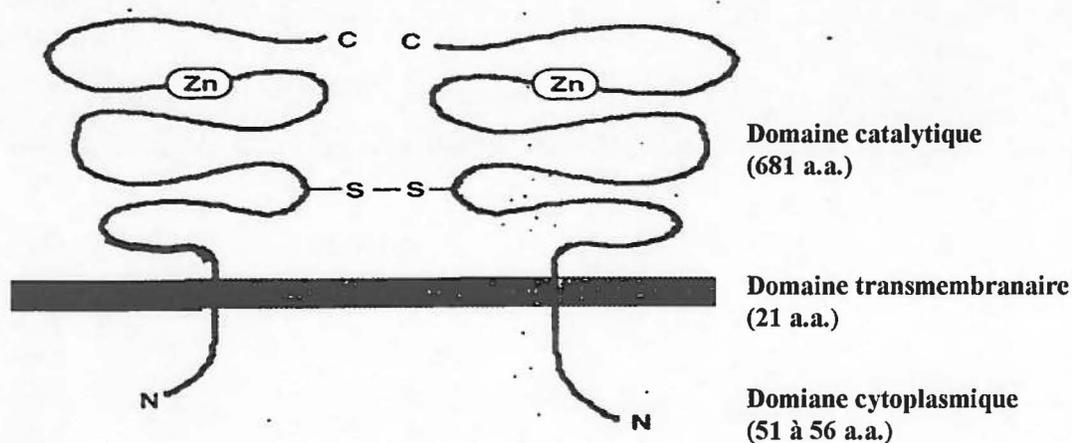


Figure 3 : Structure de l'*endothelin-converting enzyme* (ECE). (Tiré de Gray et Webb, 1996).

1.3. Les récepteurs de l'endothéline

Deux types de récepteurs pour l'endothéline ont été clonés chez les mammifères : soit les récepteurs ET_A et ET_B. Ces deux récepteurs sont différents autant au niveau de leur structure, de leur distribution, mais aussi de leur affinité pour les trois isoformes de l'endothéline. En effet, le récepteur ET_A se retrouve surtout sur les cellules musculaires lisses du système vasculaire. Il présente une affinité plus grande pour l'ET-1 et l'ET-2 que pour l'ET-3. La stimulation de ce récepteur entraîne une puissante vasoconstriction. Le récepteur ET_B possède, quant à lui, une plus vaste distribution dans l'organisme, il ne présente aucune spécificité pour l'une ou l'autre des isoformes de l'endothéline et son activité biologique dépendrait de sa localisation et du sous type en présence. En effet, on distingue deux récepteurs ET_B : soit les récepteurs ET_{B1} et ET_{B2}. Le premier est retrouvé, dans le système vasculaire, au niveau des cellules endothéliales. Sa stimulation engendre une rapide vasodilatation par le biais d'un relâchement de plusieurs facteurs notamment le NO. Le second récepteur posséderait une activité biologique et une distribution semblable au récepteur ET_A (Doherty, 1992; Masaki et Yanagisawa, 1992; D'Orléans-Juste *et al.*,

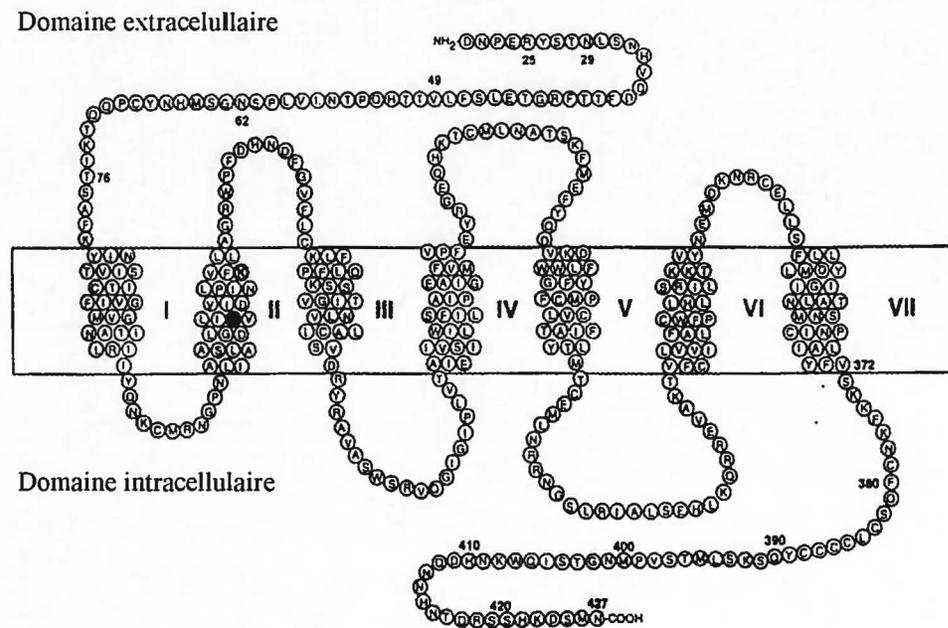


Figure 4 : Structure du récepteur ET_A humain. (Tiré de Gray et Webb, 1996)

1996). Il existerait un troisième récepteur de l'ET : ET_C. Ce récepteur semble posséder une affinité plus grande pour l'ET-3 que pour les deux autres isoformes. Celui-ci n'a cependant été cloné que chez la grenouille africaine *Xenopus laevis*. (Karne *et al.*, 1993).

Les récepteurs de l'endothéline sont constitués d'une chaîne, variant de 420 à 450 acides aminés, repliée de façon à former sept domaines transmembranaires. Ils sont couplés à une protéine G, plus précisément G_{q/11}, ils font donc partie de la superfamille des rhodopsines (Bockaert, 1996) (figure 4). Lorsqu'ils sont stimulés, ces récepteurs activent à leur tour une phospholipase C. Cette dernière enzyme produit deux seconds messagers : l'inositol-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ est responsable de la mobilisation du calcium alors que le DAG active une protéine kinase C. Cette cascade aboutit finalement à la production des effets physiologiques de l'endothéline (Doherty, 1992; D'Orléans-Juste *et al.*, 1996). Il a été proposé que les récepteurs ET_A et ET_B puissent être séparés en 2 domaines: le domaine de liaison du ligand composé des domaines transmembranaires I, II, III et VII, et le domaine de spécificité incluant les passages IV, V et VI (Sakamoto *et al.*, 1993).

1.4. Les pharmacophores de l'endothéline

Les pharmacophores sont les éléments du ligand essentiels à la liaison et à l'activation des mécanismes de réponses par les récepteurs. Mais l'arrangement tridimensionnel des pharmacophores est aussi très important : le ligand doit correspondre parfaitement à la topographie du récepteur.

L'étude des pharmacophores d'une molécule peptidique débute généralement par l'exploration détaillée de la structure primaire. La contribution de chaque acide aminé à l'activité biologique peut être évaluée à l'aide d'analogues, contenant un ou plusieurs acides aminés différents de la molécule native, et/ou de fragments de celle-ci. Ainsi plusieurs caractères physico-chimiques responsables des interactions avec le récepteur, tel

que l'aromaticité, l'hydrophobicité, la chiralité, l'encombrement stérique et la charge électrique, peuvent ainsi être évalués. Ces études de structure-activité ont permis de déterminer les pharmacophores de plusieurs peptides tels que la substance P (Fournier *et al.*, 1982), le VIP (Fournier *et al.*, 1984), le NPY (Forest *et al.*, 1990), le CGRP (Mimeault *et al.*, 1992), etc.

De la même façon, plusieurs études ont évalué certains des les pharmacophores de la molécule d'endothéline. Il apparaît que ceux-ci sont différents pour chacun des deux types de récepteurs. En effet, les deux ponts disulfure ne semblent pas importants pour l'activation du récepteur ET_B. Des analogues linéaires, où des alanines remplacent les quatre cystéines, ont un pouvoir vasoconstricteur égal à l'ET-1 sur une préparation d'artère pulmonaire de lapin (tissu riche en récepteur ET_B) (Pelton et Miller, 1991). Par contre, les deux ponts disulfure semblent essentiels pour le récepteur ET_A, puisque ce même analogue linéaire est inactif sur ce dernier récepteur. (Pelton et Miller, 1991; Aumelas *et al.*, 1991; Cody *et al.*, 1991; Dalgarno *et al.*, 1992; Forget *et al.*, 1996). Spinella et son équipe (1991) suggèrent même qu'une cystéine libre sur le récepteur ET_A interagirait avec l'une des cystéines de l'endothéline.

Il semble important pour les deux types de récepteurs que l'extrémité N-terminale soit libre. En effet l'acylation de cette extrémité mène à une molécule complètement inactive (Nakajima *et al.*, 1989). Par contre, notre équipe a montré que la formylation du Trp²¹ ne diminue en rien l'activité vasoconstrictrice produite par l'ET-1 (Germain *et al.*, 1993). Cet analogue est cependant incapable de produire l'activité hypotensive transitoire qui précède normalement la constriction produite par l'ET-1. Pour expliquer le phénomène, il a été proposé que la présence du groupement formyle permettrait de discriminer entre le récepteur ET_{B1} et ET_{B2} (Cardell *et al.*, 1992; Filep *et al.*, 1992; Forget *et al.*, 1996).

Le segment 2 à 7 de l'endothéline, est la portion la plus variable entre les différentes isoformes de l'ET et des sarafotoxines. Ce segment pourrait être responsable de la discrimination entre les deux types de récepteurs. Le segment 8 à 10 chargé négativement

est, quant à lui conservé chez tous ces isopeptides. Son importance a été démontrée en bloquant Asp⁸ et Glu¹⁰ par des fonctions amides : on observe alors une diminution importante de l'activité biologique sur des préparations d'artères pulmonaires de rat (Nakajima *et al.*, 1989). De plus, la nécessité d'incorporer une fonction acide dans la structure des antagonistes des différents récepteurs démontre également le rôle essentiel occupé par ce segment (Opgenorth, 1995; Jae *et al.*, 1997).

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

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

1.5. Les structures secondaires et tertiaires de l'endothéine

L'activité biologique des endothélines et leur affinité pour leurs récepteurs dépend de la présence des pharmacophores. Toutefois c'est l'orientation spatiale de ceux-ci qui leur permet d'interagir correctement avec les sites de liaison et d'activation des récepteurs. Plusieurs méthodes théoriques et spectroscopiques, tels que la cristallographie, la résonance magnétique nucléaire (RMN), le dichroïsme circulaire et la modélisation moléculaire selon l'énergie minimale, permettent l'étude de la structure tridimensionnelle

de protéines et de peptides. Un grand nombre d'études ont tenté de déterminer l'arrangement spatial de l'endothéline. Il n'y a cependant pas consensus sur les structures secondaires et tertiaires qui composent la molécule, surtout au niveau du segment C-terminal.

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

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

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

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

Une étude précédente de notre groupe a conduit à l'identification d'analogues à structure réduite de l'ET-1 possédant une activité agoniste significative sur le récepteur ET_B (Forget *et al.*, 1996). Le plus puissant de cette série, le peptide, [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1, est tronqué de ses acides aminés 1 et 2, et son segment 12 à 16 est remplacé par une chaîne aliphatique flexible, l'acide aminocaproïque (Aca). De plus, il porte des groupements acétamidométhyles (Acm) sur ses cystéines 3 et 11 ainsi qu'un groupement formyle (For) sur la chaîne latérale de Trp²¹. Cet analogue est cependant 10 fois moins puissant que l'ET-1 et montre des caractéristiques d'agoniste partiel. Parmi nos avenues d'exploration, nous avons ciblé l'évaluation du rôle pour l'activité biologique de la portion médiane de la molécule d'ET-1 et plus précisément de l'espaceur aliphatique (Aca) de nos analogues tronqués. Pour ce faire, nous avons remplacé l'acide aminocaproïque par une chaîne plus courte, l'acide aminobutyrique (Abu), précédée ou suivie par différents acides aminés de façon à modifier les propriétés physico-chimiques du segment 12 à 16 de la molécule.

Ainsi, des résidus de lysine, leucine, valine, alanine, sérine, phénylalanine, tryptophane et tyrosine ont été incorporés dans les peptides [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Xxx-Abu-(17-21)ET-1 et [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Abu-Xxx-(17-21)ET-1 où Xxx

Tableau 2 : Liste des analogues synthétiques de l'endothéline-1.

| Analogue |
|---|
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Trp-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Phe-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Lys-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Lys-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ser-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ser-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Val-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Val-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ala-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ala-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Tyr-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Tyr-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Leu-Abu-(17-21) ET-1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Leu-(17-21) ET-1 |

représente l'acide aminé introduit (tableau 2). Ces peptides ont été synthétisés sur phase solide au moyen de la chimie t-Boc. L'activité biologique des différents analogues a été vérifiée sur chacun des deux types de récepteurs. Les muscles lisses vasculaires de l'aorte de rat ont été utilisés pour l'évaluation pharmacologique du récepteur ET_A. Une fois l'aorte dénudée de son endothélium, ce récepteur est retrouvé de façon quasi exclusive. Par contre, le parenchyme pulmonaire de cobaye, utilisé comme modèle pour l'évaluation biologique du récepteur ET_B, contient les deux types de récepteurs. Le récepteur ET_B y est cependant retrouvé en plus forte proportion (Uchida *et al.*, 1996). De façon à discriminer l'effet des récepteurs, la sarafotoxine 6c (SRTX 6c), un agoniste spécifique de récepteur ET_B, a été utilisée comme témoin.

1.6. Synthèse chimique de la sarafotoxine 6c

Le protocole de synthèse traditionnel pour des peptides bicycliques tels que les endothélines et les sarafotoxines prévoit la formation sélective des deux ponts disulfure. En effet, l'utilisation d'un plan de protection orthogonale approprié permet l'obtention d'un peptide brut ayant ses cystéines 1 et 15 protégées par des groupements acétamidométhyles (Acm), alors que les deux autres cystéines sont libres. Des conditions oxydantes permettent la formation du premier pont disulfure de façon sélective. Par la suite, les groupements Acm sont retirés et le deuxième pont est formé. L'iode est utilisé lors de cette deuxième étape, engendrant toutefois des risques de réactions secondaires. Certaines sont réversibles comme l'oxydation de la méthionine, qui se transforme alors en un sulfoxyde. Toutefois d'autres réactions sont malheureusement irréversibles, comme par exemple l'oxydation du tryptophane-21.

Aumelas et son équipe ont démontré que lors de la cyclisation simultanée des deux ponts disulfure de la molécule d'ET-1, la formation des ponts dans leur configuration dite «naturelle» est favorisée. En effet, cet arrangement, entre les cystéines 1-15 et 3-11, a été produit dans une proportion de 75% environ. La conformation croisée 1-11 et 3-15 n'a

alors représenté que 25%, tandis que la formation de liens entre les cystéines 1-3 et 11-15 n'a pas été observée (Aumelas et al., 1998; Aumelas et al., 1999).

Nous avons donc revu le protocole de synthèse de la SRTX 6c, un outil pharmacologique indispensable pour nos travaux, de façon à le simplifier et à diminuer les pertes de matériel dues aux réactions secondaires. Ainsi, nous avons tenté d'enlever les groupements AcM, portés par les cystéines 1 et 15, avec un sel d'argent plutôt qu'avec l'iode, et de former ensuite simultanément les deux ponts disulfure.

En résumé, ce projet a visé dans un premier temps à synthétiser une série d'analogues de l'endothéline-1 dans lesquels le segment 12 à 16 de ces peptides a été remplacé par une chaîne aliphatique (Abu) précédée ou suivie par différents acides aminés. Ainsi, les acides aminés valine, leucine, alanine, sérine, tyrosine, lysine, tryptophane et phénylalanine ont été insérés de façon à modifier les caractéristiques physico-chimiques de la portion médiane de la molécule ; ceci dans le but d'évaluer le rôle de cette portion dans la stabilité de la conformation adoptée par l'analogue et dans l'activité biologique de celui-ci. Lors de l'évaluation pharmacologique des analogues, la SRTX 6c a été utilisée comme témoin. Au cours de cette recherche, nous avons donc aussi revu le protocole de synthèse de ce peptide, indispensable pour nos travaux, de façon à le simplifier et à en améliorer le rendement.

Matériel et Méthodes

2. Synthèse des analogues de endothéline-1

2.1. Réactifs et solvants utilisés

Les dérivés Trp(For), Leu, Cys(Acm) et Ser(Bzl) ont été achetés de la compagnie Chem Impex International (Wood Dale, IL), Ile et Met provenaient de Propeptide (Vert-le-Petit, FR) tandis que Lys(2-ClZ), Glu(O-Bzl) et Boc-Aca ont, quant à eux, été obtenus de Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC). Finalement, Asp(cHex) a été acheté de Peninsula (Belmont, CA) et l'acide aminobutyrique (Abu) de chez Advanced Chemtech (Louisville, KY). La fonction α -aminé de ces dérivés d'acides aminés était protégée par le groupe t-Boc.

La résine chlorométhylée (1,2 méq./g, 200 à 400 mesh) a été fournie par la compagnie BioRad (Richmond, CA) et l'agent de couplage, hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino)-phosphonium (BOP) a été obtenu de la compagnie Quantum (Montréal, QC). Les différents solvants de qualité A.C.S. utilisés lors des synthèses et des purifications, soit le dichlorométhane (DCM), le diméthylformamide (DMF), le méthanol, l'éthanol, l'éther éthylique, l'acétonitrile (ACN), et le toluène provenaient de Fisher Scientific (Nepean, ON). L'acide trifluoroacétique (TFA) a été acheté de Halocarbon Products Corporation (River Edge, NJ). La diisopropyléthylamine (DIEA), le *m*-crésol, le diméthylsulfure (DMS) et le bicarbonate de césium (CsHCO_3) ont été obtenus de Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI). Finalement, l'acide fluorhydrique (HF) provenait de Matheson Gas Products Inc. (Ottawa, ON).

2.2. Protocole de synthèse peptidique en chimie t-Boc

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

Le résidu en position C-terminale est fixé à la résine sous forme de sel d'acide aminé. Celui-ci est formé à partir de 3 éq. d'acide aminé (par rapport à la substitution de la résine) dissous dans une solution éthanol : H₂O (4 :1). Cette solution est titrée jusqu'à pH 7 à l'aide de bicarbonate de césium (2M CsHCO₃/H₂O). Le mélange est ensuite évaporé à sec. Le sel ainsi obtenu est dissous dans du DMF contenant la résine et 100 mg de KI par gramme de résine. Le mélange est agité pendant 24h à 50°C. La résine substituée est ensuite récupérée et lavée au DMF, au DCM et au méthanol (Gisin, 1973).

2.2.2. Test à l'acide picrique

La substitution réelle de la résine est déterminée en utilisant le protocole décrit par Gisin (1972). Un aliquot (20 mg) de résine-Trp est d'abord lavé trois fois avec du DCM, ce qui permet son gonflement. Le groupement Boc est ensuite retiré à l'aide d'une solution 40% TFA/DCM. Une première réaction d'une minute est exécutée suivie d'une autre, après drainage du premier volume (4mL). La réaction est poursuivie pendant 20 minutes dans un troisième volume de la même solution.

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

L'étape suivante consiste à former le complexe entre l'acide picrique et l'amine- α du résidu. La résine est lavée trois fois au DCM, puis une fois avec 4 mL d'une solution

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

$$\text{Substitution (mmol/g)} = \frac{\text{Absorbance mesurée} \times 10^5}{16250 \times \text{poids de résine (mg)}}$$

2.2.3 Cycle de couplage en chimie t-Boc

Le couplage de chaque acide aminé correspond à un cycle de quatre étapes : soit la déprotection de l'amine- α , la neutralisation de ce groupement, le couplage du nouvel acide aminé et finalement un test de Kaiser permettant de vérifier que le couplage est complet (tableau 3).

Un appareil semi-automatique comprenant six réacteurs manuels a été utilisé. La synthèse des quinze analogues a donc été accomplie en trois en trois séries.

2.2.3.1. Déprotection de l'amine terminale

La fonction α -aminé du résidu en position N-terminale a été déprotégée par deux traitements en conditions acides (40% TFA/DCM). Après un premier traitement de 5 minutes, puis la solution est drainée et la réaction est ensuite poursuivie dans les mêmes conditions pendant 20 minutes (schéma 1). Du DMS (1%) est ajouté à la solution de déprotection

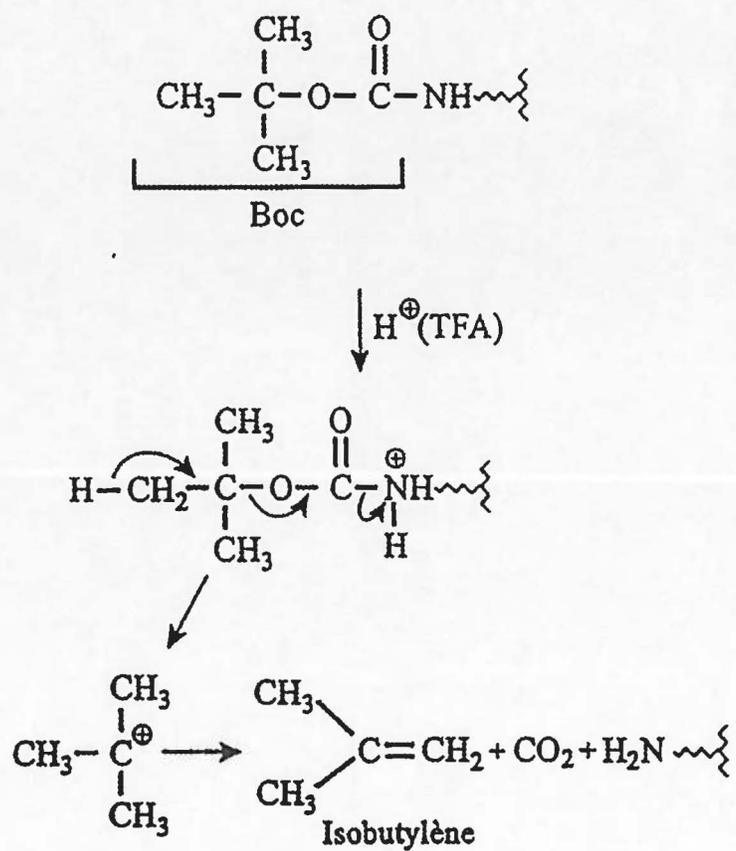


Schéma 1 : Déprotection de l'amine- α en chimie t-Boc.

afin de minimiser l'oxydation de la méthionine. La résine est ensuite lavée 2 fois au DCM, puis à l'éthanol, et encore au DCM pour permettre son regonflement.

2.2.3.2. Neutralisation de la résine

Puisque la déprotection de l'amine- α est effectuée en milieu acide, elle se retrouve sous sa forme ionisée. L'étape de neutralisation s'amorce par un traitement initial à l'aide d'une solution 1% DIEA/DMF pendant 2 min. La résine est ensuite lavée au DMF.

Lorsque le dernier acide aminé couplé est l'acide glutamique, cette étape d'amorce de neutralisation est remplacée par un simple lavage de la résine avec du DMF. En milieu basique la fonction α -aminée portée par l'acide glutamique pourrait réagir avec le carbonyle de l'ester résultant de la protection de la chaîne latérale de ce résidu et former un acide pyroglutamique.

2.2.3.3. Couplage des t-Boc-acides aminés

Pour le couplage des autres acides aminés, nous utilisons un protocole mis au point dans notre laboratoire (Forest et Fournier, 1990). Il prévoit l'utilisation de 3 éq. de Boc-acide aminé, 3 éq. de BOP (réactif de couplage) et 5 éq. de DIEA (une base tertiaire). Les réactifs sont dissous dans un volume minimal de DMF et ajoutés dans le réacteur contenant le peptide attaché à la résine (schéma 2).

Plusieurs lavages sont ensuite effectués afin d'éliminer l'excès de réactifs et les produits de la réaction. Ainsi deux premiers lavages sont effectués au DMF puis deux autres au DCM.

Tableau 3 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Boc.

| Étapes | Réactifs | Temps |
|-----------------------------------|---|------------|
| Déprotection de l'amine terminale | 40% (v/v) TFA, 1% (v/v) DMS/DCM | 1 x 5 min |
| | 40% (v/v) TFA, 1% (v/v) DMS/DCM | 1 x 20 min |
| Lavages | DCM | 2 x 2 min |
| | Éthanol | 1 x 2 min |
| | DCM | 1 x 2 min |
| Neutralisation (amorce) | 1% (v/v) DIEA/DMF | 1 x 2 min |
| | DMF | 1 x 2 min |
| Couplage | 3 équ. Boc-AA-OH 3 équ. BOP 5 équ. DIEA dans un minimum de DMF | 1 x 45 min |
| Lavages | DMF | 2 x 2 min |
| | DCM | 2 x 2 min |
| Test de Kaiser | Phénol Ninhydrine KCN | 5 min |

*Certains couplages ont excédé le temps de réaction de 45 min.

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

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

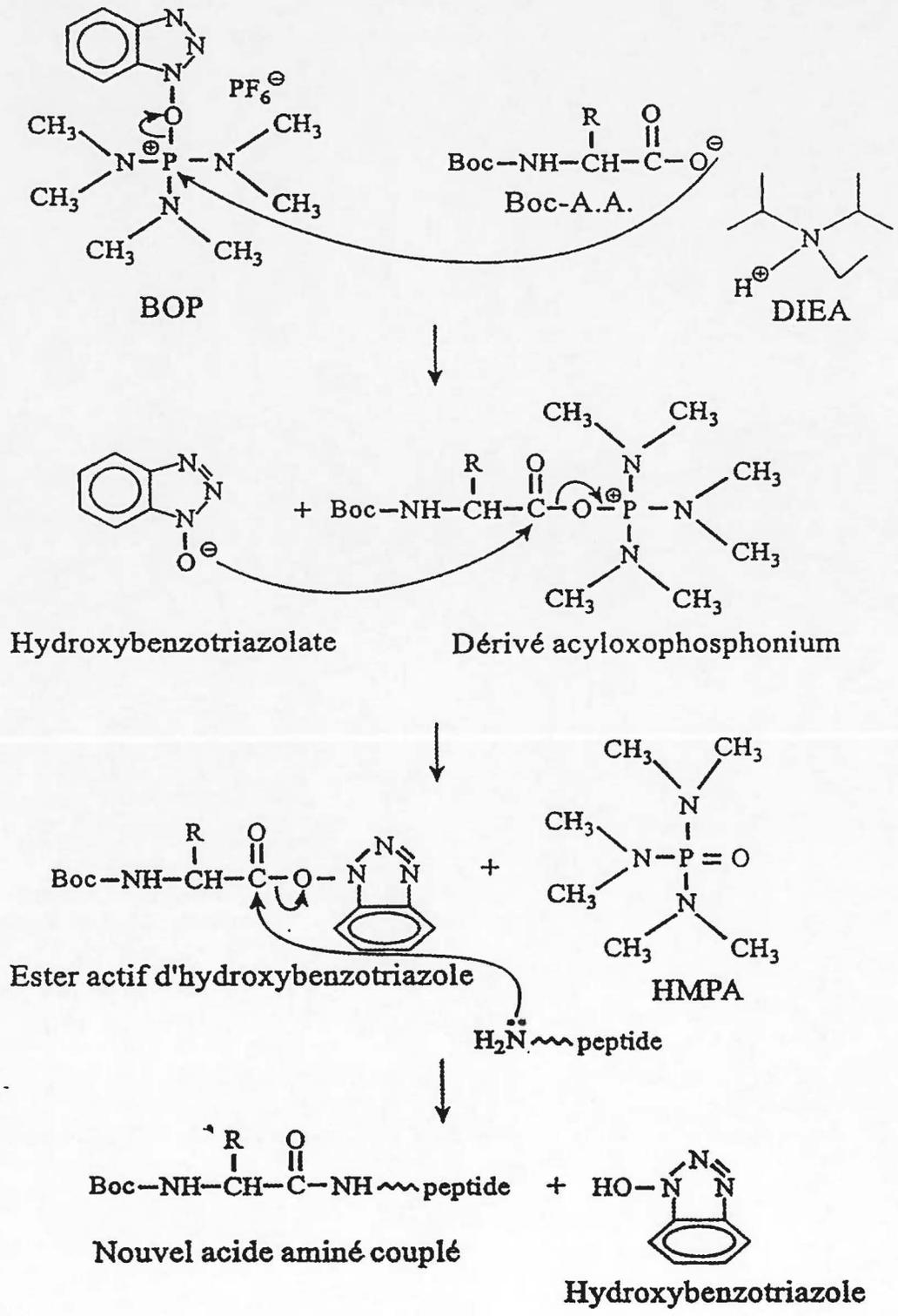


Schéma 2 : Couplage d'un acide aminé en chimie t-Boc.

Ce cycle de synthèse est repris autant de fois qu'il y a d'acides aminés à ajouter à la chaîne peptidique. Chacun de ces cycles est suivi d'un test de Kaiser. Ce test qualitatif permet de vérifier la complétion de la réaction de couplage. En effet, ce test utilise la ninhydrine qui, en présence d'amines libres, réagit pour former le complexe de Ruhemann de couleur bleue foncée (Kaiser *et al.*, 1970). Dans le cas où le test à la ninhydrine montre que la réaction de couplage n'est pas complète, le couplage est repris.

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

2.3. Clivage du peptide de la résine

Lors du clivage, le peptide-résine est placé dans un réacteur de Kel-F dans lequel on ajoute deux capteurs de carbocations : le *m*-crésol (1 mL/g) et l'éthanedithiol (1 mL/g). Ce dernier est aussi un anti-oxydant. Lors des séries de synthèses 2 et 3, l'éthanedithiol a été remplacé par le DMS (1 mL/g), lui aussi un anti-oxydant. Le réacteur est ensuite vissé au montage, mis sous vide puis refroidi à l'aide d'azote liquide. L'acide fluorhydrique est introduit dans le réacteur par condensation à raison de 10 mL/g de résine. La réaction est poursuivie pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Par la suite, l'acide fluorhydrique est évaporé rapidement.

La récupération du peptide est obtenue par précipitation à l'éther éthylique suivie de plusieurs lavages. Il est ensuite solubilisé dans un petit volume de TFA et séparé de la résine par filtration. Le TFA est évaporé sous vide et l'analogue est de nouveau précipité à l'éther éthylique. Les peptides sont séchés sous vide au dessiccateur et finalement gardés à -20°C jusqu'à leur purification.

3. Purification des analogues

Les différents analogues de l'endothéline-1 ont été purifiés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) préparative en phase inverse. Nous avons utilisé un système Waters, modèle Prep LC500A jumelé à une pompe modèle 590 et à un détecteur d'absorbance modèle 441 (230 nm) tous deux aussi de la compagnie Waters. Le matériel à purifier (400 mg) a d'abord été dissous dans un volume d'environ 2 mL de TFA pur, puis ajouté à une solution de 4 L 20% ACN/ H₂O. Cette solution a ensuite été injectée sur une colonne contenant une résine de C₁₈ (15 µm, 300Å) de dimension 4,7 x 30 cm et le débit a été ajusté à 40 mL/min. L'élution a été effectuée au moyen d'un gradient linéaire de 20 à 60% ACN / H₂O : 0,06% TFA en 2 heures.

La pureté des fractions recueillies a été évaluée par CLHP à l'aide d'un système analytique (Beckman) comprenant un échantillonneur automatisé de modèle Gold 507E couplé à un contrôleur de gradient de modèle 128 ainsi qu'à un détecteur U.V. de modèle 168 (230 nm). Une colonne analytique de la compagnie Vydac C₁₈ (10 µm, 300Å) a été utilisée pour l'analyse. L'élution a été obtenue au moyen d'un gradient linéaire de 20 min allant de 20 à 60% ACN dans de l'eau acidifiée avec 0,06% TFA. Le débit a été ajusté à 1,5 mL / min. Les fractions pures ont été regroupées, évaporées puis lyophilisées. Celles-ci ont été conservés à -20°C.

4. Caractérisation des analogues

4.1. CLHP analytique

La pureté des analogues obtenus a été évaluée par CLHP analytique comme décrit à la section 2. Cependant, ces analyses ont été réalisées à l'aide d'une colonne à haute résolution soit une Vydac C₁₈, 5µm, 300Å. Un gradient linéaire de 20 min allant de 20 à 60% ACN dans de l'eau acide (0,06% TFA) a permis d'éluer le peptide à un débit de 1 mL/min. La détection a été effectuée à 230 nm.

4.2. Spectrométrie de masse

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

5. Évaluation pharmacologique des analogues de l'endothéline-1

5.1. Animaux et produits utilisés

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

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

5.2. Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET_A

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

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

L'activité agoniste des analogues est évaluée par des injections cumulatives allant de 10^{-10} M à 10^{-6} M (dans l'eau). Si le peptide ne possède aucune activité agoniste, l'activité antagoniste est vérifiée en exposant le tissu à une forte concentration (10^{-6} M) de celui-ci pendant 10 min. Une courbe concentration-réponse de l'ET-1 est ensuite effectuée. Chaque analogue a été testé au minimum sur 5 animaux différents.

L'analyse par régression non linéaire pondérée des courbes concentration-réponse a été réalisée à l'aide du logiciel ALLFIT basé sur la formule générale de la loi d'action de masse (De Léan *et al.*, 1982).

5.3. Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET_B

Les cobayes sont d'abord anesthésiés avec une dose de 0,1 mg/g de Somnotol. Ils sont par la suite saignés par rupture de la veine cave. Après quoi le système pulmonaire est retiré de la cage thoracique et rapidement plongé dans une solution de tampon de Krebs (NaCl 120 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 5 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 2,4 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM). Les quatre lobes pulmonaires sont ensuite séparés et les extrémités

internes et externes sont disséqués en lanières (6) de 2 mm x 2 mm x 1,5 cm (figure 5). Ces lanières sont placées dans six bains à organe isolé de 5 mL remplis de tampon oxygéné (5% CO₂, 95% O₂) à 37 °C. Elles sont montées de la même manière que les anneaux d'aorte de rat, sous 1 g de tension. La contractilité des tissus est vérifiée avec l'addition d'histamine 10⁻⁶M, après une période de 60 min d'équilibration. L'activité agoniste et antagoniste des analogues est vérifiée de la même façon que sur les préparations d'aorte.

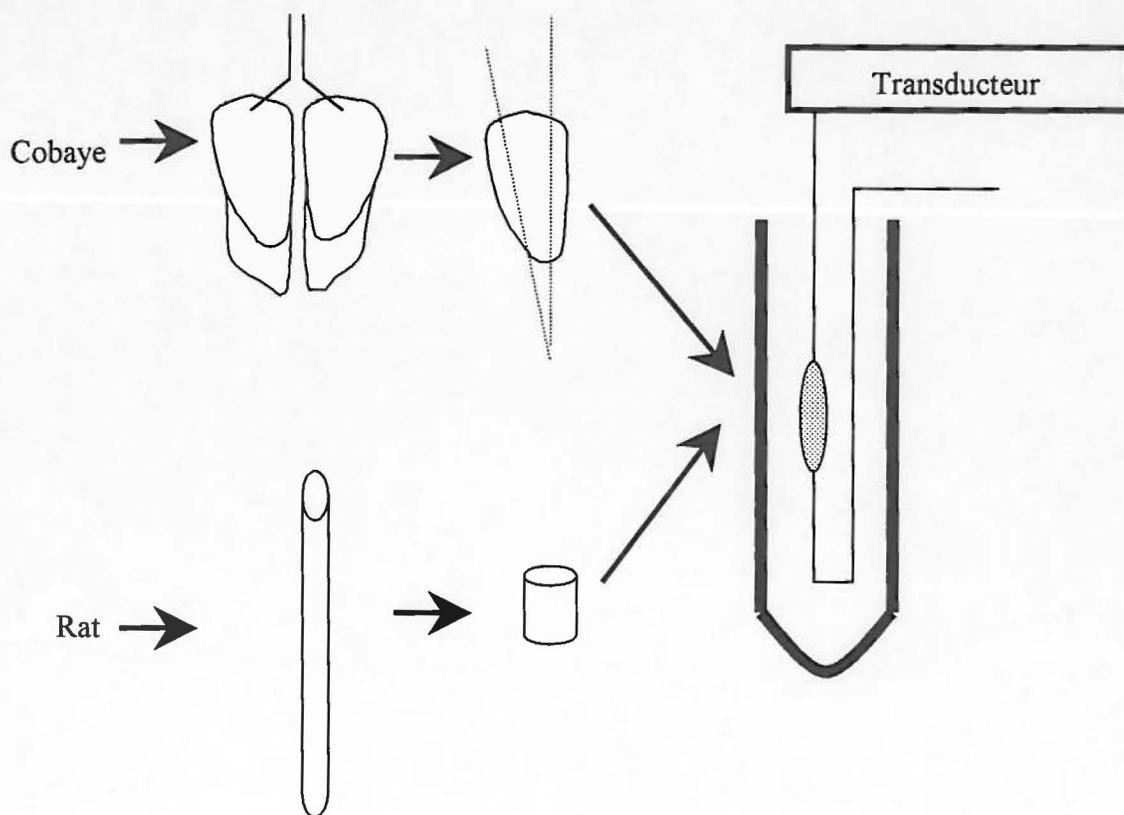


Figure 5 : Montage des tissus pour les essais pharmacologiques.

6. Synthèse de la sarafotoxine 6c

6.1. Réactifs utilisés

Tous les acides aminés étaient de configuration absolue L et portaient un groupement Fmoc sur leur amine- α . Les dérivés Trp(Boc), Thr(tBu) et Leu ont été obtenus de la compagnie Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC), Gln(Trt), Phe et Met ont été achetés chez Advanced Chemtech (Louisville, KY) et finalement, Asp(OtBu), His(Trt), Cys(Acm), Asn(Trt), Glu(OtBu), Ile et Cys(Trt) ont été fournis par la compagnie ChemImpex International (Wood Dale, IL).

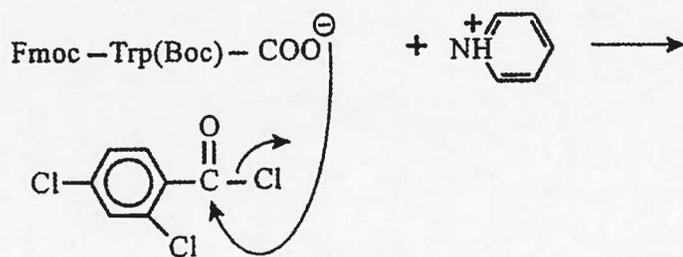
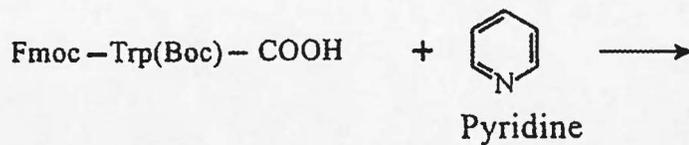
La résine de Wang (1,2 meq/g, 200 à 400 mesh) provenait de la compagnie ChemImpex International (Wood Dale, IL). Les réactifs utilisés pour le couplage de l'acide aminé en C-terminal, soit la pipéridine, la pyridine, le chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl et le chlorure de benzoyl ont été achetés chez Aldrich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

6.2. Protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc

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

La fixation du premier acide aminé à la matrice polymérique, soit celui en C-terminal, a été effectuée selon le protocole développé par l'équipe de Sieber (1987). Il a pour avantage de réduire la racémisation de l'acide aminé. Cette méthode utilise 2 éq d'acide aminé (Fmoc-Trp(Boc)-OH) qui sont dissous dans un volume minimal de DMF contenant la résine. Cette solution est agitée pendant 15 minutes puis 3,3 éq de pyridine et 2 éq de chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl sont ajoutés sous atmosphère d'argon. La réaction se poursuit pendant 20 heures à la température de la pièce sous agitation mécanique et sous argon (schéma 3).

L'excès de réactifs est ensuite lavé avec du DMF. Les sites non substitués de la résine doivent être bloqués pour éviter la synthèse de nouvelles chaînes peptidiques pendant le couplage des acides aminés subséquents. Cette réaction utilise un excès (40 éq.) de chlorure de benzoyl et de pyridine, qui sont ajoutés à un volume minimal de DMF. La réaction est poursuivie pendant 2 heures à température ambiante, sous agitation. La résine est finalement lavée trois fois avec chacun des quatre solvants suivants : DMF, éthanol, DCM et méthanol, puis séchée au dessiccateur.



Chlorure de 2,6- dichlorobenzoyle

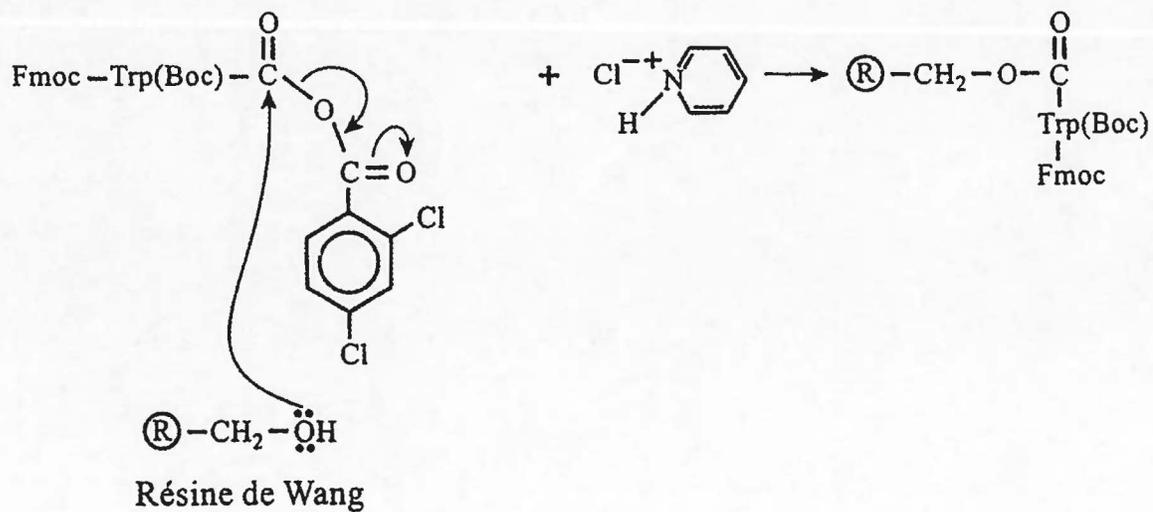


Schéma 3 : Couplage de l'acide aminé en C-terminal à la résine de Wang.

6.2.2. Vérification du degré de substitution de la résine

Pour mesurer le rendement de la réaction de substitution, 10 mg de résine séchée sont prélevés et agités fortement pendant 3 min dans une solution de 3 mL contenant 20% pipéridine / DMF. L'absorbance du surnageant est mesurée à 290 nm.. Le calcul suivant permet de déterminer le taux de substitution de la résine :

$$\text{Substitution (mmol/g)} = \frac{\text{absorbance (D.O.}_{290 \text{ nm}})}{16705} \times 1000$$

16705

6.2.3. Cycle de couplage en chimie Fmoc

Comme en chimie Boc, l'insertion de chaque acide aminé composant la chaîne peptidique débute par la déprotection de l'amine terminale. Après plusieurs lavages, un nouvel acide aminé est couplé. Finalement, les sous-produits et l'excès de réactifs sont lavés et un test de Kaiser permet de s'assurer que la réaction de couplage est complète (tableau 4).

6.2.3.1 Déprotection de l'amine terminale

Le groupement Fmoc porté par l'amine- α du résidu en bout de chaîne est labile en milieu basique. Une solution 20% pipéridine / DMF est utilisée. Cette réaction est menée en deux étapes : on laisse d'abord réagir 2 min, les produits sont drainés et la réaction est

Tableau 4 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc.

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

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

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

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

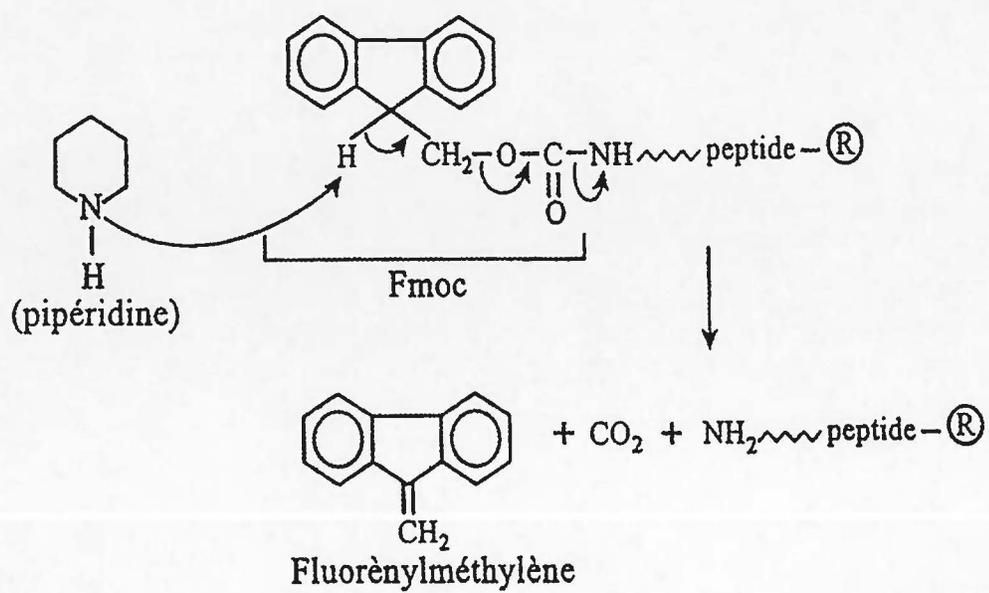


Schéma 4 : Déprotection de l'amine- α en chimie Fmoc.

poursuivie pendant 15 min (schéma 4). Le peptide-résine est ensuite lavé plusieurs fois : 2 fois au DMF, 1 fois à l'éthanol et finalement 2 fois au DMF.

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

6.2.3.2. Couplage des Fmoc-acides aminés

Le couplage d'un acide aminé à la chaîne peptidique est effectué en utilisant un excès de réactifs. Ainsi, 3 éq de Fmoc-acide aminé, 3 éq HBTU, 1 éq HOBT et 3 éq DIEA sont dissous dans un minimum de DMF (schéma 5). La réaction est poursuivie pendant 30 min sous atmosphère d'azote. Ensuite l'excès de réactifs est lavé successivement au DMF et au DCM. Après quoi, un test de Kaiser est réalisé. Si le test montre la présence d'amines libres sur la résine, la réaction de couplage est alors reprise.

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

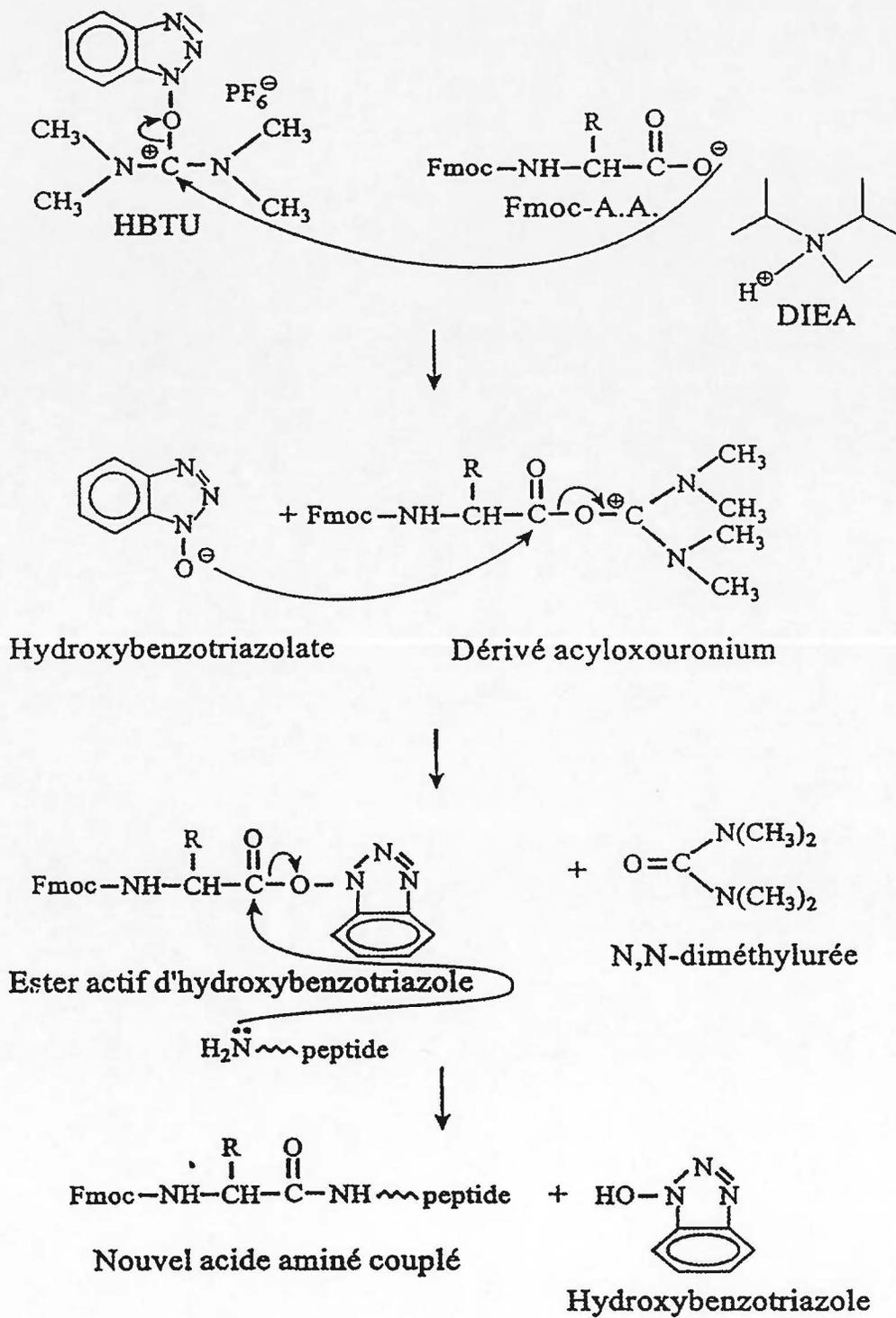


Schéma 5 : Couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc.

6.2.3.3. Couplage de Fmoc-Cys(Trt)OH

L'insertion de Fmoc-Cys(Trt)-OH en utilisant le protocole usuel de chimie Fmoc entraîne un fort taux de racémisation due à l'utilisation du DIEA (une amine tertiaire) (Kaiser *et al.*, 1996). Cette réaction secondaire est facilement défavorisée si le couplage est obtenu au moyen de l'anhydride symétrique de l'acide aminé. Celui-ci peut réagir directement avec l'amine terminale de la chaîne peptidique.

L'anhydride est formé en utilisant 2 éq DCC (dicyclohexylcarbodiimide) et 4 éq Fmoc-Cys(Trt)OH dissous dans un minimum de DCM (schéma 6). La réaction est poursuivie dans un bain de glace, sous atmosphère d'azote avec agitation pendant 5 min. Le dérivé dicyclohexyluréé produit est éliminé par filtration. Le filtrat contenant l'anhydride est additionné d'un volume égal de DMF. Après 30 min de réaction, les réactifs sont drainés et la résine est lavées au DMF et au DCM avant qu'un test de Kaiser ne soit effectué.

6.3. Clivage du peptide de la résine

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

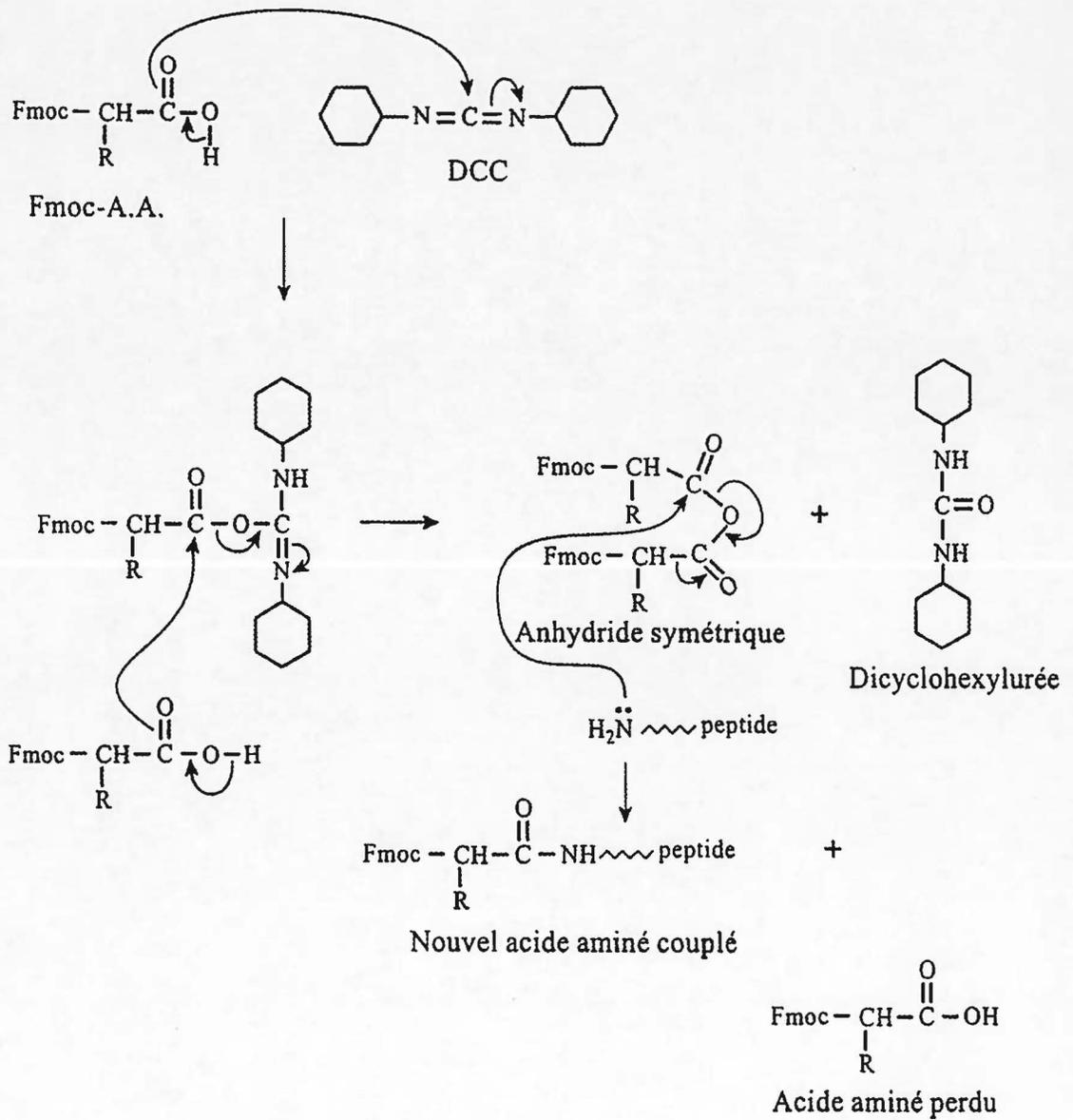


Schéma 6 : Couplage de Fmoc-Cys-Trt.

Le réactif K (King *et al.*, 1990) a été utilisé pour le clivage de la SRTX 6c de sa résine. Ce réactif est constitué de 92% TFA avec 2,5% d'éthanedithiol, 2,5% H₂O et 3% de phénol. La réaction est poursuivie pendant 2h avec agitation et sous atmosphère d'argon. La solution de clivage est filtrée et le TFA est évaporé sous vide. Après quoi le peptide est finalement précipité à l'éther éthylique et filtré de nouveau. Le peptide obtenu est séché et gardé à -20°C jusqu'à sa purification.

6.4. Traitement de la sarafotoxine 6c au AgBF₄

Un aliquot de 400 mg de peptide brut a été dissous dans un volume minimal de TFA contenant 20 éq/Acm de AgBF₄ et 10 éq/Acm d'anisole. La solution a été agitée sous atmosphère d'argon et des prélèvements ont été exécutés à 1, 2, 6 et 12 heures. Le peptide a ensuite été précipité à l'éther éthylique puis centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. Cette première étape a permis de retirer les groupements Acm portés par les deux cystéines en positions 1 et 15 (Yoshida *et al.*, 1990).

Le peptide a ensuite été traité avec 20 éq/Acm de dithiothréitol dans une solution 1 M acide acétique/H₂O pendant 2,5 heures. Finalement, le peptide a été récupéré par précipitation à l'éther éthylique et centrifugé à nouveau. Ce dernier traitement vise à réduire la fonction thiol des cystéines et ainsi libérer l'ion Ag²⁺.

6.5. Cyclisation et purification de la sarafotoxine 6c.

Le peptide, ayant ses quatre cystéines libres, a été cyclisé en conditions oxydantes douces. Le peptide a donc été ajouté (0,05 mg/mL) à une solution 10% ACN/H₂O contenant 20 éq de K₃Fe(CN)₆ et dont le pH avait été ajusté à 9 avec du NH₄OH. Après 1,5 h, la solution a été acidifiée à pH 4 et injectée sur le système de CLHP préparative en phase inverse (voir la section 3.1 pour la description de l'appareillage). L'élution a été obtenue au moyen d'un gradient allant de 10 à 60% ACN/H₂O : TFA 0,06% en 2,5 h.

7. Caractérisation de la sarafotoxine 6c

7.1. Spectrométrie de masse

Des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF (voir section 3.2) nous ont permis de vérifier le retrait des groupements Acn après chaque traitement du peptide aux sels d'argent. Ce type d'analyse nous a également permis de suivre la réaction de cyclisation de la SRTX 6c.

7.2. CLHP analytique.

Des analyses par CLHP (Section 3.1) nous a permis de suivre la réaction de cyclisation et de vérifier la pureté du produit. Ensuite, une vérification de co-élution du produit et d'un échantillon de SRTX 6c obtenu commercialement nous a permis de vérifier la nature du produit.

7.3. Essais pharmacologiques

L'évaluation pharmacologique des SRTX 6c a été réalisée comme décrit à la section 4.3.

Résultats

8. Synthèse des analogues de l'endothéline-1

Le système de synthèse semi-automatique utilisé dans notre laboratoire permet la synthèse de six dérivés peptidiques différents à la fois. La synthèse des quinze analogues de l'ET-1 s'est donc opérée sur trois préparations distinctes.

8.1. Synthèse 1

Lors du premier bloc de synthèse, la réaction de couplage du premier acide aminé (Boc-Trp-For) a permis de substituer la résine à un taux de 0,9 mmol/g. Nous avons donc introduit 2,5 g de résine par réacteur pour une échelle de synthèse de 2,2 mmol.

Les six peptides suivants ont alors été synthétisés :

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

Les analyses par CLHP des peptides bruts contenant la valine, l'alanine et la tyrosine ainsi que de l'analogue original ont révélé la présence de deux pics majeurs séparés par moins de 1 minute. Ce résultat est démontré avec l'analogue brut [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Val-Abu-(17-21) ET-1 (figure 6).

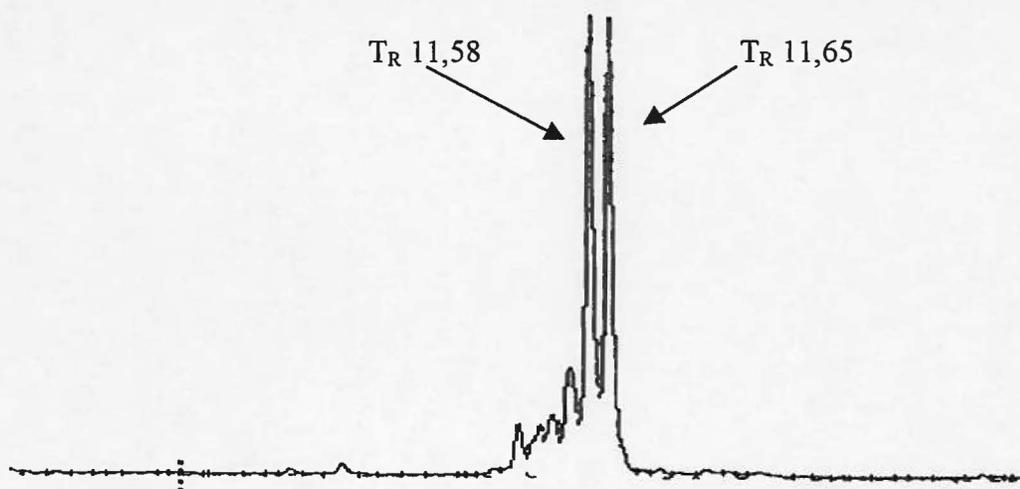


Figure 6 : Profil CLHP analytique de l'analogue brut $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,11}, \text{Trp}(\text{For})^{21}](3-11)\text{-Val-Abu-(17-21) ET-1}$

Chacun des deux produits a été isolé par CLHP préparative en phase inverse ce qui a permis leur caractérisation par spectrométrie de masse (figure 7). Cette analyse révèle une différence de 29 Da entre les deux peptides, ce qui semble indiquer qu'une partie du produit est déformylé. De façon à réduire la proportion de produit déformylé, nous avons revu les conditions de clivage. Ainsi, nous avons remplacé l'éthanedithiol, un excellent capteur de carbocations mais très nucléophile, par le DMS.

La réaction secondaire de déformylation était accentuée lors de la synthèse des analogues contenant la phénylalanine ou le tryptophane. En effet, la caractérisation de $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,11}, \text{Trp}(\text{For})^{21}](3-11)\text{-Phe-Abu-(17-21)ET-1}$ ne montre, après clivage, qu'un seul produit majoritaire dont la masse correspond au peptide déformylé (figure 8). D'un autre côté, $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,11}, \text{Trp}(\text{For})^{21}](3-11)\text{-Trp-Abu-(17-21) ET-1}$ a présenté un profil HPLC analytique contenant plusieurs produits dont les temps de rétention s'échelonnent sur 15 minutes (figure 9).

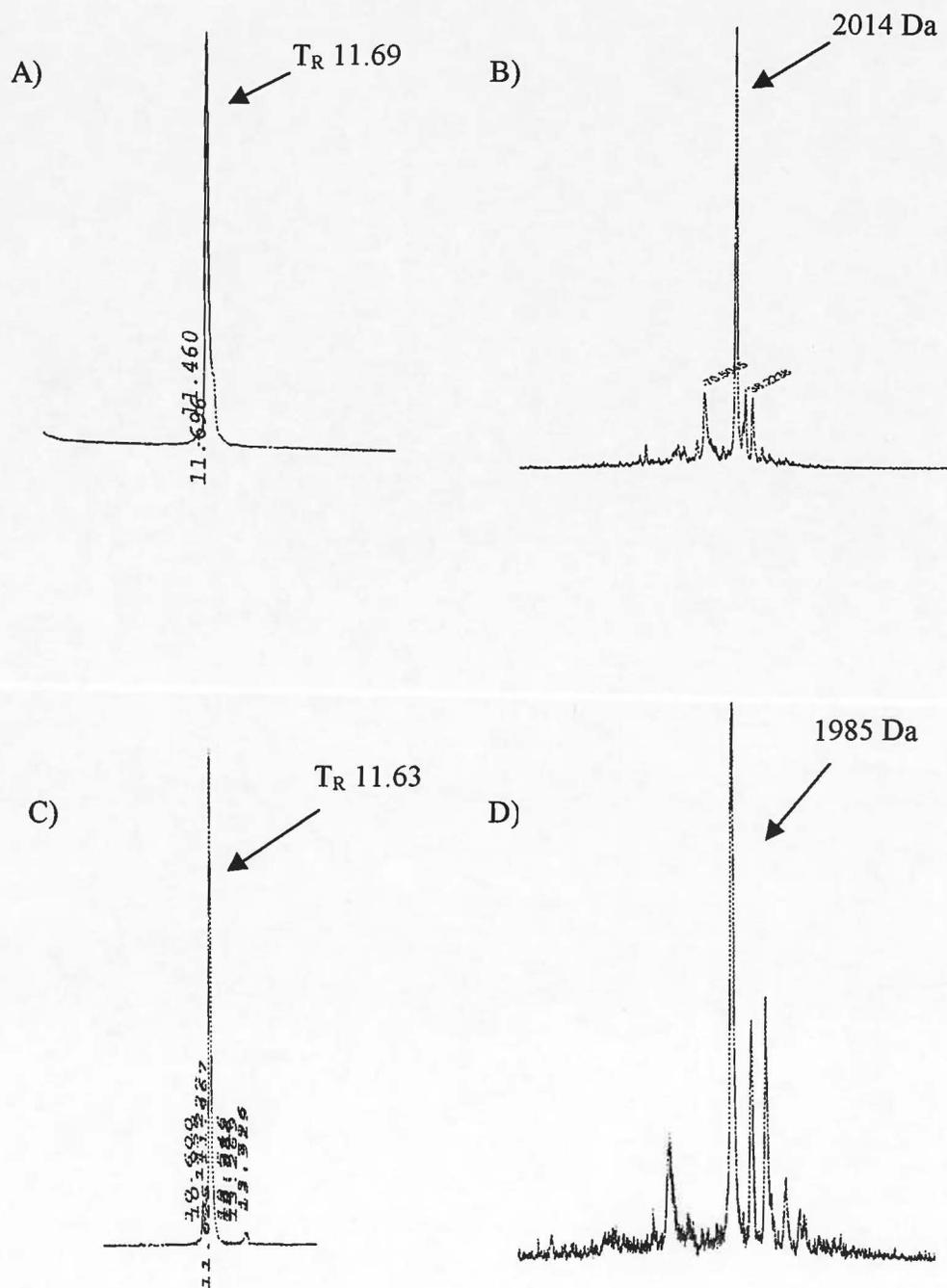


Figure 7 : Profil CLHP analytique (A et B) et spectre de masse (C et D) des deux produits isolés de la purification du peptide [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Val-Abu-(17-21) ET-1.

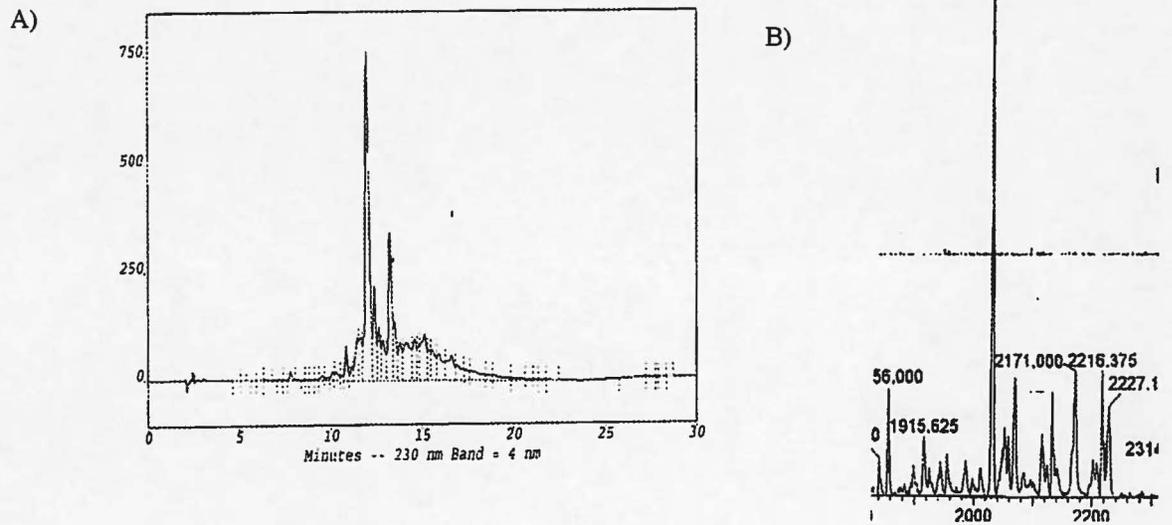


Figure 8 : Analyses par CLHP (A) et par spectrométrie de masse (B) du peptide [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Phe-Abu-(17-21) ET-1.

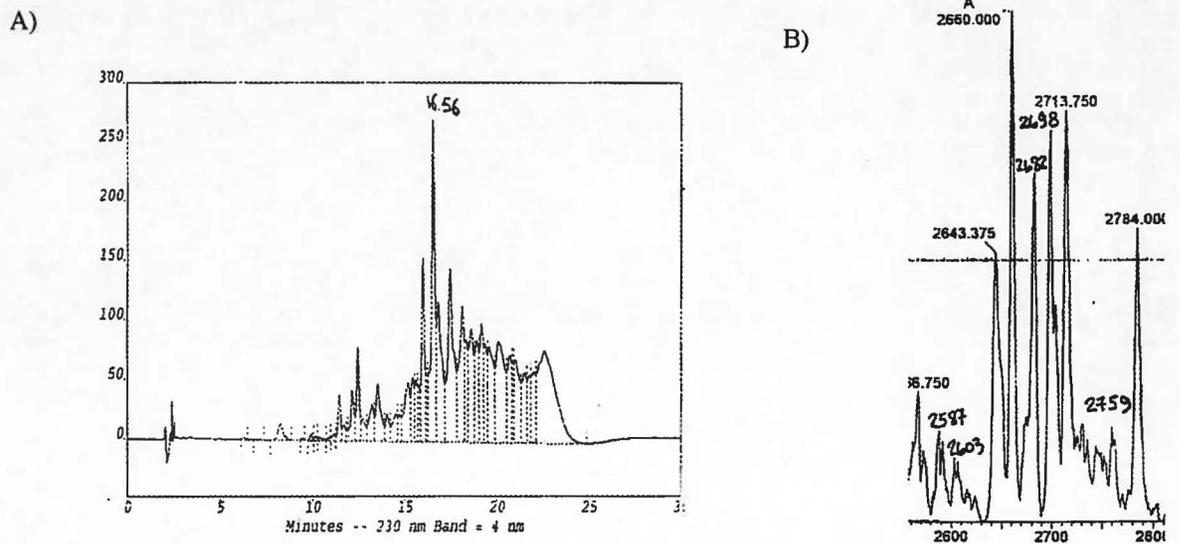


Figure 9 : Analyses par CLHP (A) et par spectrométrie de masse (B) de l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Trp-Abu-(17-21) ET-1.

Le tableau 5 montre les temps de rétention et la pureté relative des différents analogues obtenus par CLHP analytique en phase inverse. Le tableau 6 montre quant à lui les résultats des analyses par spectrométrie de masse

8.2. Synthèse 2

La deuxième série de peptides synthétisés comprenait les analogues suivants :

- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Abu-Lys-(17-21) ET-1
- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Lys-Abu-(17-21) ET-1
- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Abu-Ser-(17-21) ET-1
- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Ser-Abu-(17-21) ET-1
- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Abu-Leu-(17-21) ET-1
- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Leu-Abu-(17-21) ET-1

La réaction au sel de césium nous a permis d'obtenir un taux de substitution de 0,7 mmol/g de sorte que 2,5 g de résine ont été utilisés dans chacun des réacteurs. L'échelle de synthèse a donc été de 1,8 mmol.

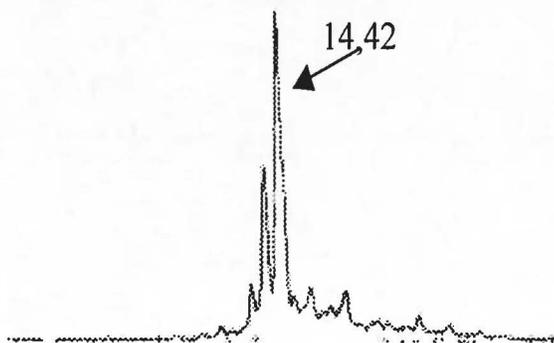


Figure 10 : Profil CLHP analytique de [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Lys-Abu-(17-21) ET-1

Les conditions de clivage nous ont permis de réduire le taux de déformylation (figure 10). Les profils analytiques obtenus après clivage montrent la présence d'un produit majeur facile à isoler. L'identité des produits purifiés a été vérifiée par CLHP analytique et par spectrométrie de masse (tableaux 5 et 6).

8.3. Synthèse 3

Les trois derniers peptides ont été synthétisés à une échelle de 1,4 mmol soit 2g de résine substituée à 0,7 mmol/g. Les analogues suivants ont donc été synthétisés :

- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Abu-Val-(17-21) ET-1
- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Abu-Ala-(17-21) ET-1
- [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Abu-Tyr-(17-21) ET-1

Leurs profils obtenus par CLHP analytique montrent l'obtention d'un produit brut comprenant un seul produit majeur. La purification des analogues a été facile et leur caractérisation subséquente a montré qu'il s'agissait des produits désirés.

Tableau 5 : Caractérisation par CLHP analytique des analogues de l'endothéline-1

| Analogue | CLHP (T_R min) | Pureté (%) |
|---|-------------------------------------|-----------------------|
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 | 11,32 | 82 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Trp-Abu-(17-21) ET-1 | ND | ND |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Phe-Abu-(17-21) ET-1 | 15,86 | ND |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Lys-Abu-(17-21) ET-1 | 13,11 | 87 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Lys-(17-21) ET-1 | 14,24 | 89 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ser-Abu-(17-21) ET-1 | 15,21 | 97 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ser-(17-21) ET-1 | 10,30 | 91 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Val-Abu-(17-21) ET-1 | 11,70 | 89 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Val-(17-21) ET-1 | 14,56 | 85 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ala-Abu-(17-21) ET-1 | 11,55 | 88 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ala-(17-21) ET-1 | 10,69 | 98 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Tyr-Abu-(17-21) ET-1 | 11,45 | 83 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Tyr-(17-21) ET-1 | 11,49 | 95 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Leu-Abu-(17-21) ET-1 | 18,18 | 82 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Leu-(17-21) ET-1 | 17,84 | 83 |

Tableau 6 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues de l'endothéline-1.

| Analogue | Masse attendue (Da) | Masse mesurée (Da) |
|--|----------------------------|---------------------------|
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 | 1940 | 1943 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Trp-Abu-(17-21) ET-1 | 2099 | 2660 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Phe-Abu-(17-21) ET-1 | 2060 | 2030 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Lys-Abu-(17-21) ET-1 | 2041 | 2042 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Lys-(17-21) ET-1 | 2041 | 2042 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ser-Abu-(17-21) ET-1 | 2000 | 2001 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ser-(17-21) ET-1 | 2000 | 2002 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Val-Abu-(17-21) ET-1 | 2012 | 2011 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Val-(17-21) ET-1 | 2012 | 2013 |
| [Cys(Acbm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ala-Abu-(17-21) ET-1 | 1984 | 1987 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ala-(17-21) ET-1 | 1984 | 1988 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Tyr-Abu-(17-21) ET-1 | 2076 | 2079 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Tyr-(17-21) ET-1 | 2076 | 2079 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Leu-Abu-(17-21) ET-1 | 2026 | 2027 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Leu-(17-21) ET-1 | 2026 | 2028 |

9. Essais pharmacologiques

9.1. Bioessais menés sur l'aorte de rat

L'analogue témoin, s'est avéré bien sûr inactif sur la préparation d'aorte de rat, et aucun analogue de notre étude n'a démontré d'activité agoniste ou antagoniste sur cette préparation.

9.2. Bioessais menés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye

Lors des essais pharmacologiques menés sur le parenchyme pulmonaire, plusieurs types de coupe ont été testés. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les lanières 1 et 4 lorsque le tissu a été coupé en lanières longitudinales.

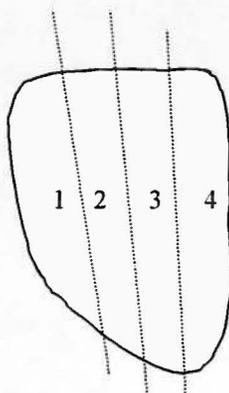


Figure 11 : Coupes du parenchyme pulmonaire de cobaye utilisées lors des essais pharmacologiques.

Les essais pharmacologiques menés sur le parenchyme pulmonaire ont permis de tracer les courbes concentration-réponse de l'analogue témoin, le [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 et de la SRTX 6c (figure 12). À partir de celles-ci, nous avons mesuré un EC₅₀ de 2,35 x 10⁻⁸M pour l'analogue et de 7,40 x 10⁻⁸ M pour la SRTX 6c.

Comme la contraction maximale n'a pas été atteinte à une concentration de 1x10⁻⁶ M d'analogue, et que la disponibilité du matériel peptidique était limitée, le EC₅₀ des analogues n'a pu être calculé. L'activité biologique de ces derniers a plutôt été exprimée en pourcentage de l'activité enregistrée avec le peptide [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 pour chacune des concentrations (tableau 7). Ainsi, nos résultats montrent que l'insertion d'une lysine avant ou après la chaîne aliphatique donne un agoniste ayant environ la même puissance que l'analogue témoin, [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 (figure 13). Par contre, les analogues, dans lesquels une sérine ou une tyrosine a été introduite, montrent une activité semblable au témoin seulement lorsque ces acides aminés sont insérés en position 12 (figure 14). Ces peptides sont pratiquement inactifs lorsque le résidu hydroxylé est placé après l'espaceur. Les analogues contenant une alanine ou une valine sont essentiellement inactifs quelle que soit leur position. Cependant, lorsque la chaîne latérale aliphatique est plus longue, comme avec une leucine, on obtient un effet intermédiaire (figure 15). De façon générale, l'introduction des acides aminés en position 16 conduit à des analogues montrant une diminution de l'activité biologique. Celle-ci varie de 9 à 92% par rapport aux analogues dont le résidu a été placé avant l'espaceur aliphatique.

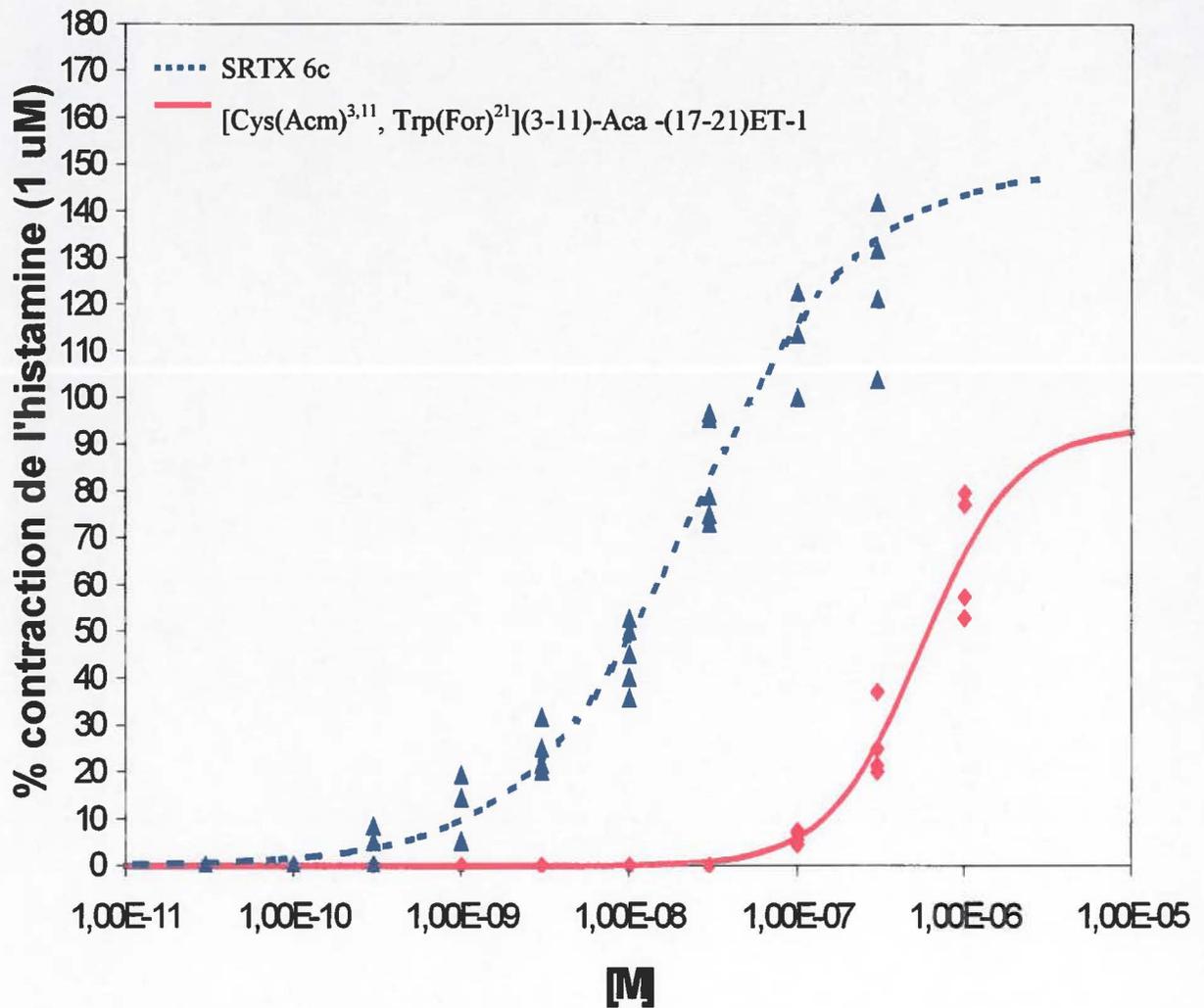


Figure 12 : Courbes concentration-réponse de la SRTX 6c et du peptide $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,11}, \text{Trp}(\text{For})^{21}](3-11)\text{-Aca}-(17-21)\text{ET-1}$ obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.

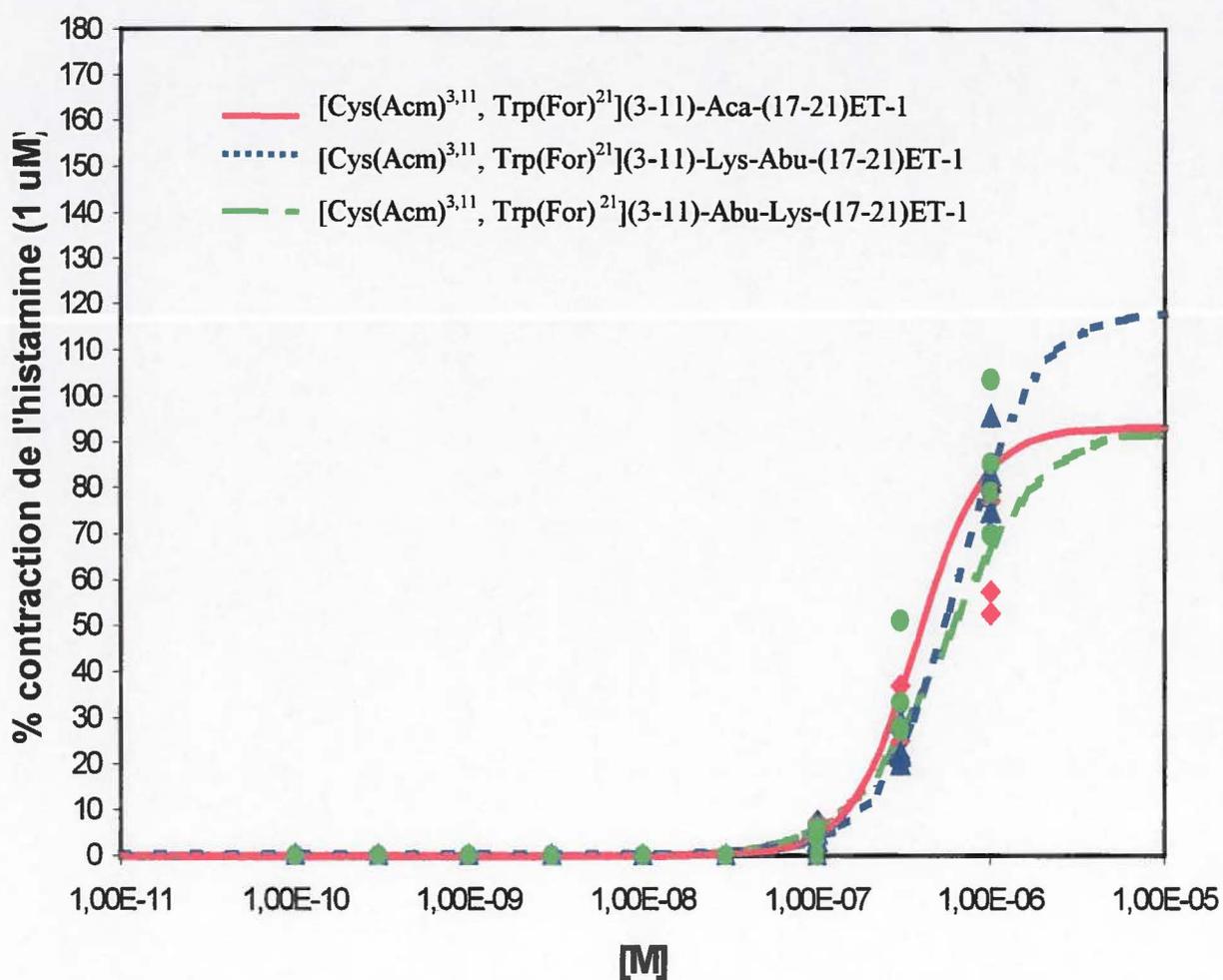


Figure 13 : Courbes concentration-réponse de l'analogue $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,11}, \text{Trp}(\text{For})^{21}](3-11)\text{-Aca-(17-21) ET-1}$ et des analogues contenant une lysine placée avant ou après la chaîne aliphatique, obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.

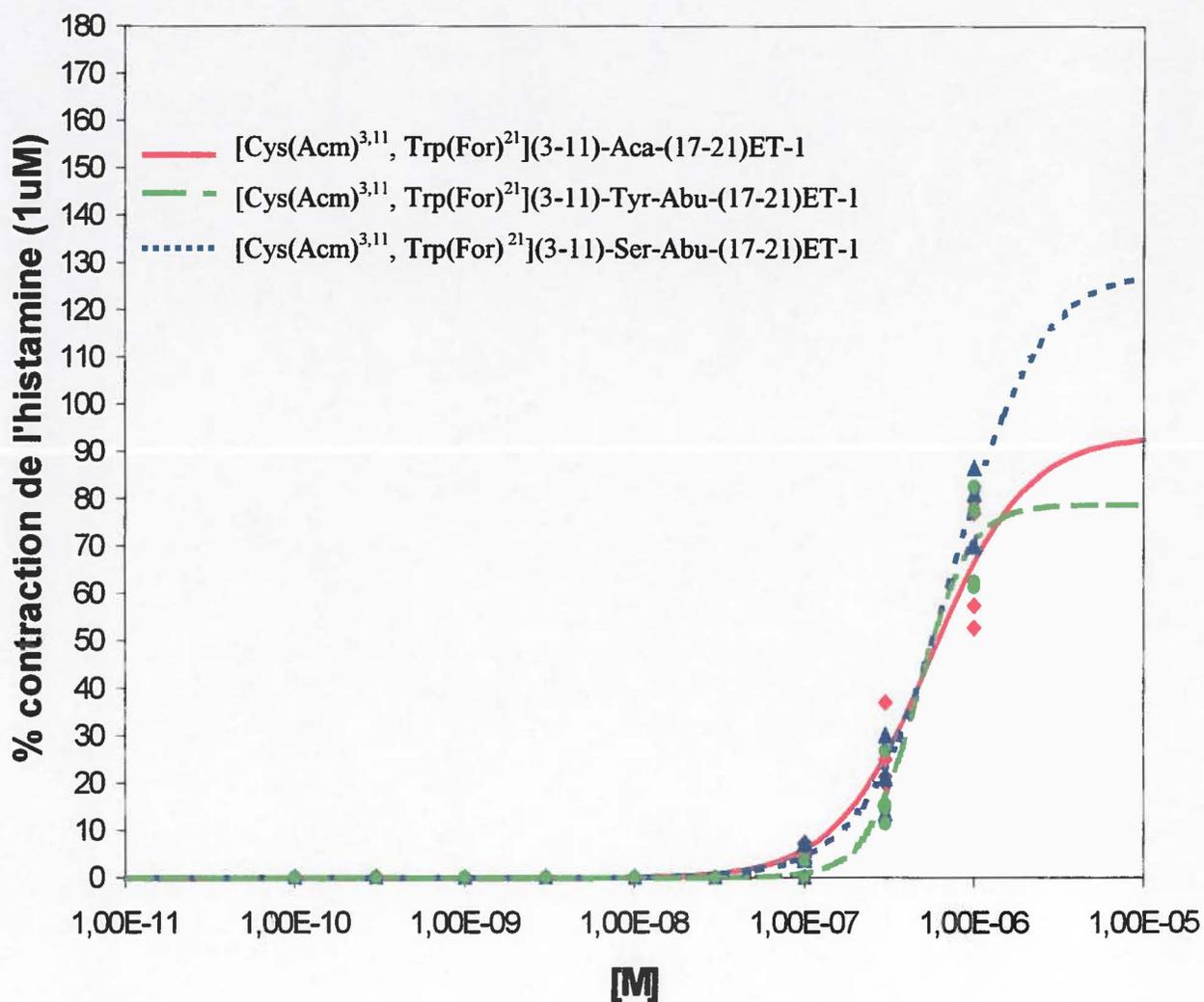


Figure 14 : Courbes concentration-réponse de l'analogue $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,11}, \text{Trp}(\text{For})^{21}](3-11)\text{-Aca-(17-21)ET-1}$ et des analogues contenant une sérine ou une tyrosine placée avant la chaîne aliphatique, obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.

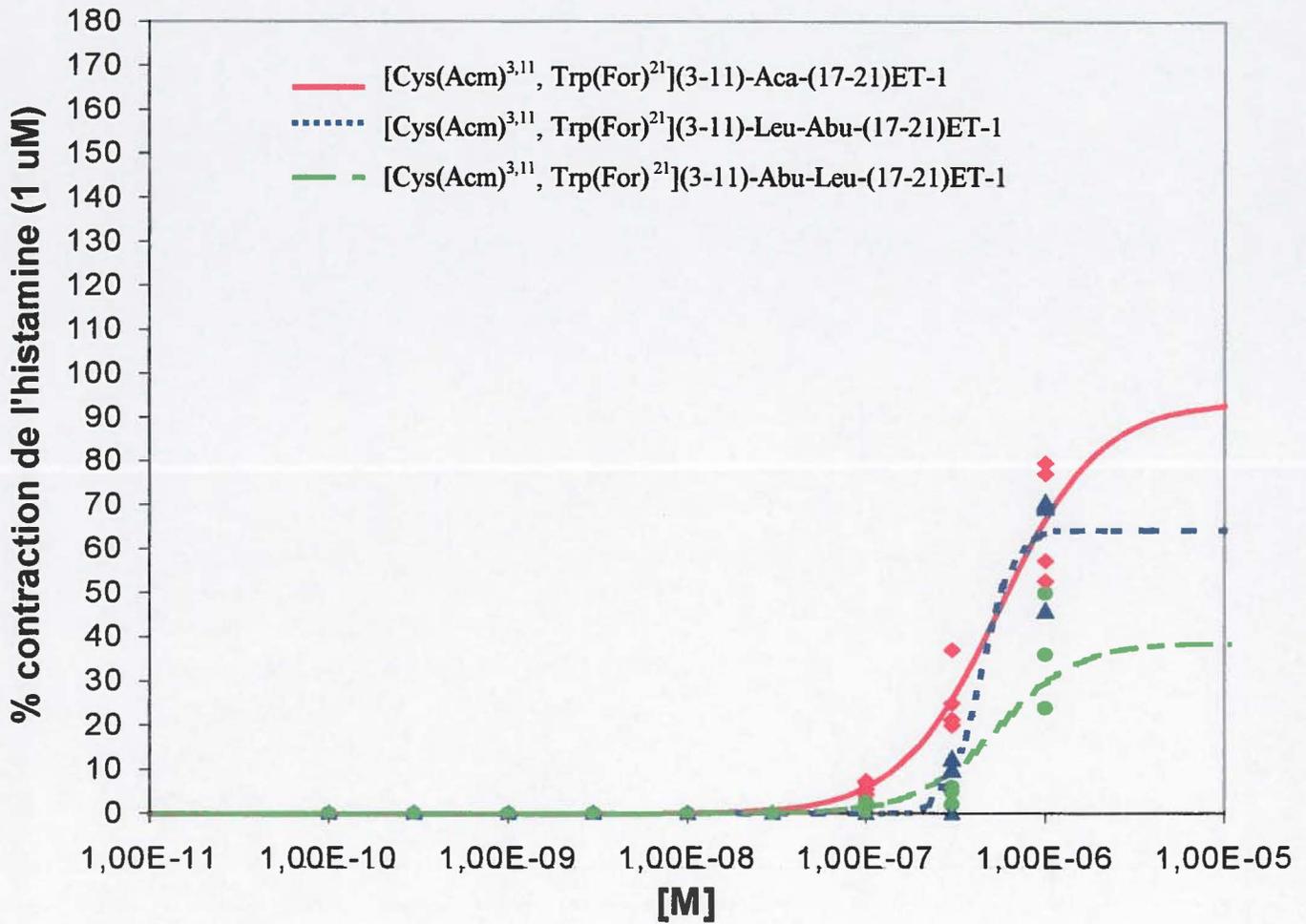


Figure 15 : Courbes concentration-réponse de l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 et des analogues contenant une leucine placée avant ou après la chaîne aliphatique, obtenues sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.

Tableau 7 : Activité biologique des analogues de l'endothéline-1.

| Analogue | % de l'activité de l'analogue témoin |
|---|---|
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 | 100 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Trp-Abu-(17-21) ET-1 | ND |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Phe-Abu-(17-21) ET-1 | ND |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Lys-Abu-(17-21) ET-1 | 101 ±21 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Lys-(17-21) ET-1 | 88 ±17 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ser-Abu-(17-21) ET-1 | 85 ±24 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ser-(17-21) ET-1 | 16 ±7 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Val-Abu-(17-21) ET-1 | 17 ±7 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Val-(17-21) ET-1 | 0 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Ala-Abu-(17-21) ET-1 | 16 ±7 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Ala-(17-21) ET-1 | 0 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Tyr-Abu-(17-21) ET-1 | 92 ±17 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Tyr-(17-21) ET-1 | 0 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Leu-Abu-(17-21) ET-1 | 65 ±14 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Abu-Leu-(17-21) ET-1 | 56 ±13 |

10. Synthèse de la sarafotoxine 6c.

La synthèse de la SRTX 6c a été accomplie avec une résine de Wang dont le taux de substitution mesuré était de 0,8 mmol/g. Nous avons utilisé 3g de résine pour une échelle de synthèse de 2,4 mmol. Le peptide obtenu après clivage avait un profil très satisfaisant, ne comprenant en fait qu'un seul produit majoritaire (figure 16).

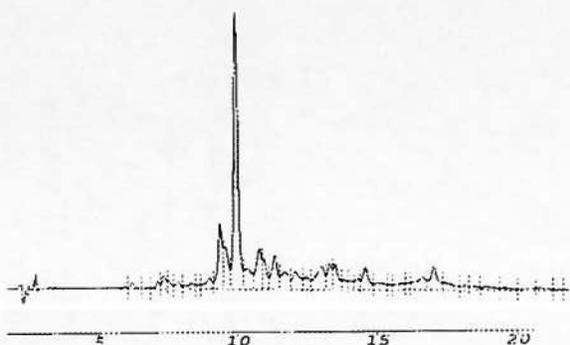


Figure 16 : CLHP analytique de la sarafotoxine 6c après son clivage de la résine.

10.1. Traitement au AgBF_4

Plusieurs essais ont été nécessaires pour développer une méthode adéquate afin de retirer les groupements AcM portés par les cystéines en positions 1 et 15. En effet, après 60 minutes de traitement au AgBF_4 , l'analyse par spectrométrie de masse du produit de la réaction indiquait une masse de 2590,62 Da correspondant à la masse de la SRTX 6c plus 72 Da soit la masse d'un groupement AcM. Des traitements de 2h et 6h ont donné le même profil. C'est seulement lorsque le traitement a été poursuivi pendant 12h que les deux groupements AcM ont été retirés, sans apparition de produits de dégradation (Figure 17). En effet, le rendement de cette étape était de 69%.

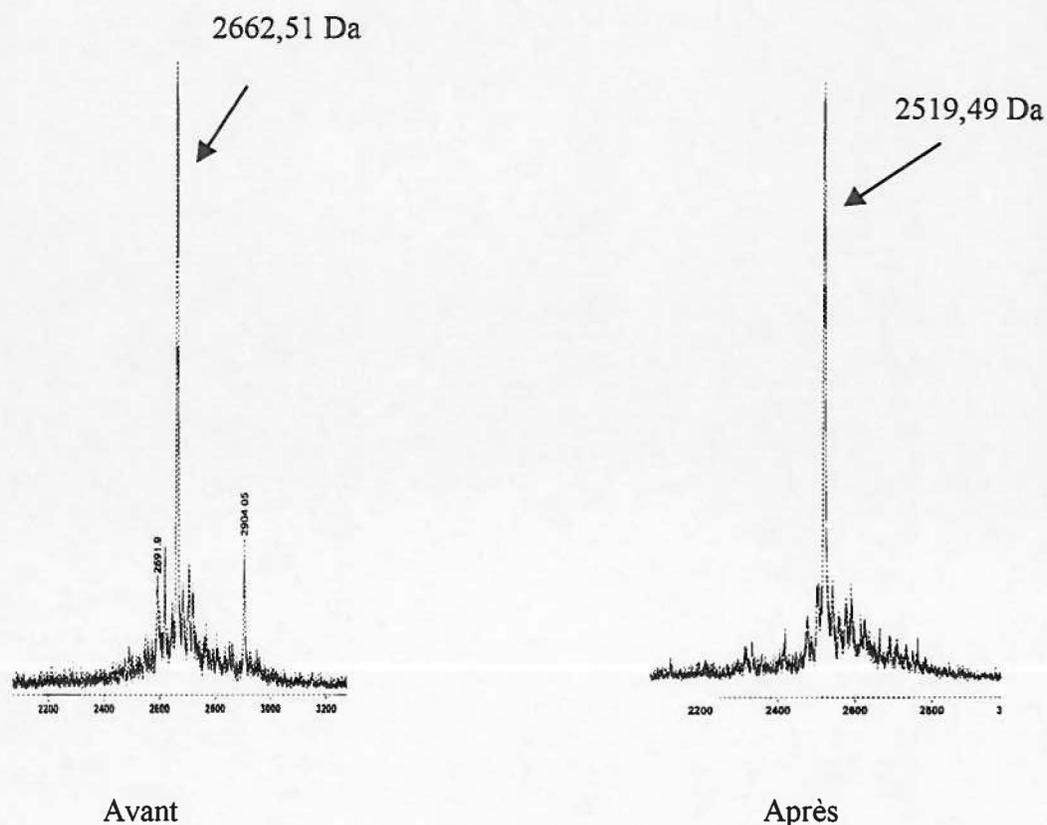


Figure 17 : Analyse par spectrométrie de masse de la sarafotoxine 6c avant et après le traitement au AgBF_4 .

La cyclisation simultanée des deux ponts disulfure de la SRTX 6c s'est avérée complète après 1,5 h en milieu aqueux basique contenant 20 éq. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Le profil d'éluion montre la présence de deux produits dont l'un est majoritaire et facilement isolable. Le rendement de la synthèse complète a été de 14%.

Pour s'assurer que le produit obtenu correspondait effectivement à la molécule désirée, nous avons fait une co-injection de la SRTX 6c synthétisée avec celle obtenue commercialement (Figure 18).

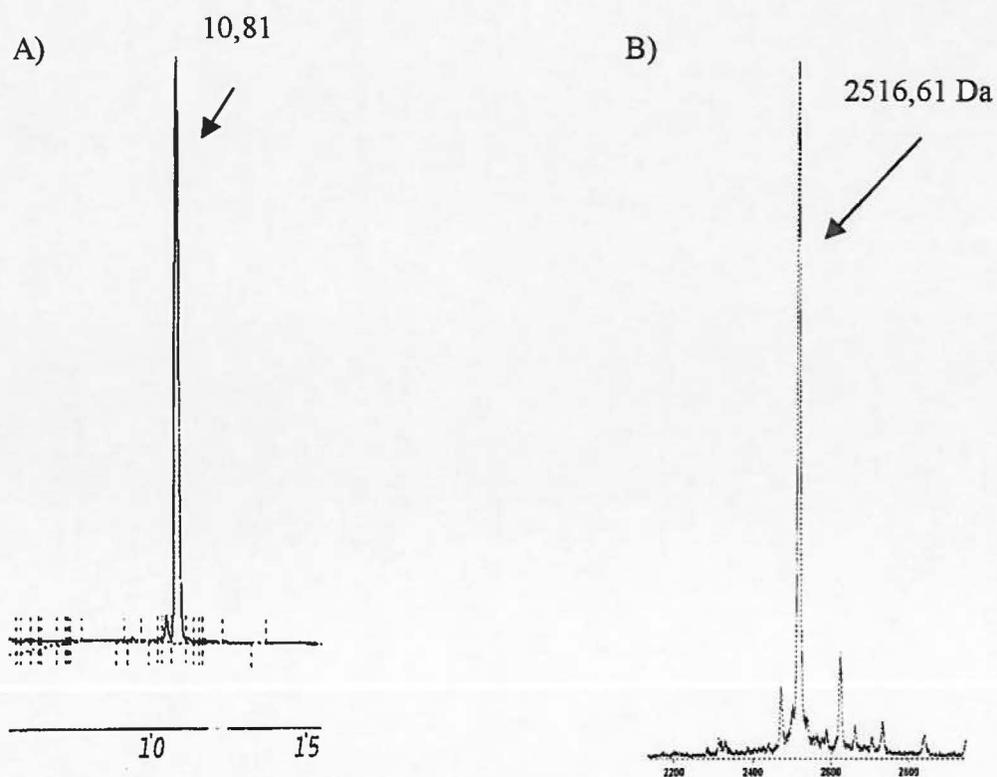


Figure 18 : Caractérisations par CLHP analytique et par spectrométrie de masse de la sarafotoxine 6c.

A) CLHP analytique du mélange de la SRTX 6c obtenue commercialement et synthétisée dans nos laboratoires.

B) Spectre de masse de la SRTX 6c synthétisée.

Puisque l'équipe de Aumelas a rapporté que la molécule ayant adopté la conformation non-native (ponts disulfure orientés 1-11, 3-15) est essentiellement inactive (Aumelas *et al.*, 1998; Aumelas *et al.*, 1999), nous avons comparé les courbes concentration-réponse de la SRTX 6c synthétisée avec la SRTX 6c de source commerciale sur une préparation riche en récepteur ET_B (Figure 19).

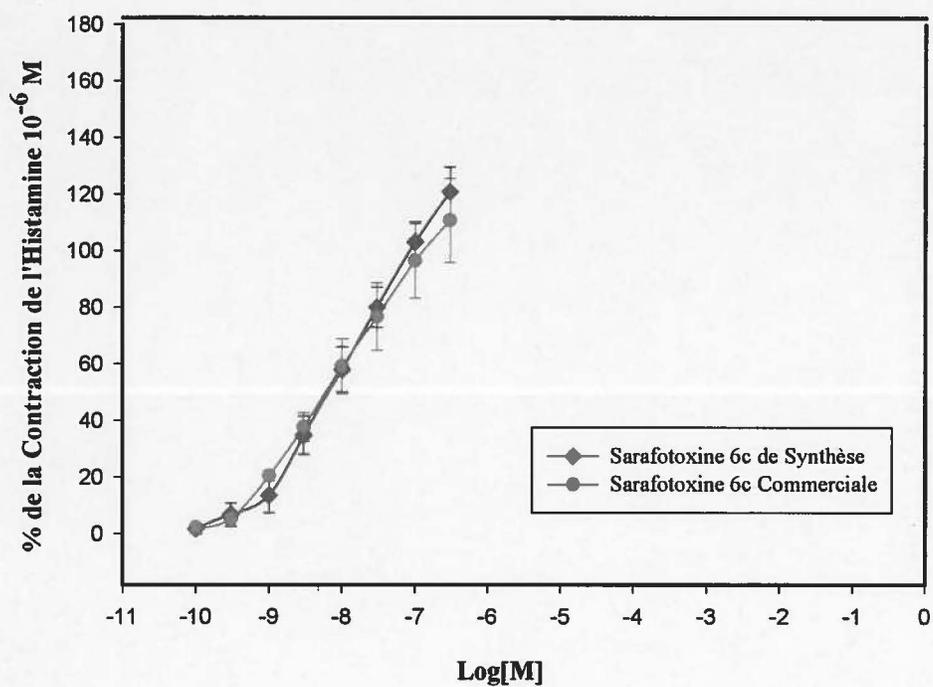


Figure 19 : Courbes concentration-réponse de la sarafotoxine 6c synthétisée et de la sarafotoxine 6c de source commerciale obtenues sur la parenchyme pulmonaire de cobaye.

Discussion

11. Synthèse des analogues de l'endothéline-1

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

11.1. Choix de la stratégie de synthèse

Le principe général de la synthèse peptidique sur phase solide est simple. Le premier acide aminé est fixé à une matrice polymérique insoluble, ensuite la chaîne est allongée par l'incorporation séquentielle et spécifique de chaque dérivé d'acide aminé jusqu'à l'extrémité N-terminale du peptide.

Dans le but de contrôler l'incorporation d'un seul acide aminé à la fois, l'amine- α de ces derniers doit être bloquée. À cette fin, deux groupements sont couramment utilisés : le t-Boc et le Fmoc. Le premier est labile en milieu acide, habituellement 40% acide trifluoroacétique (TFA). Son utilisation nécessite donc une résine relativement stable en milieu acide, ce qui entraîne l'utilisation d'un acide plus fort pour le clivage du peptide de la résine : l'acide fluorhydrique (HF)(Merrifield, 1986). Le groupement Fmoc est, pour sa

part, labile en milieu basique, généralement 20% pipéridine. Des résines plus labiles en milieu acide peuvent être utilisées pour ce type d'approche de sorte que le clivage du peptide de la résine peut se faire par exemple à l'aide du TFA (King *et al.*, 1990).

Puisque le groupement formyle porté par le Trp²¹ des analogues est labile en milieu basique, la stratégie décrite avec l'usage du groupement protecteur Boc a été utilisée pour produire nos analogues de l'ET-1.

Pendant le processus de synthèse, la chaîne peptidique en élongation peut être soit en solution ou rattachée à une matrice insoluble. L'utilisation d'une résine facilite le changement des solvants et l'isolation du peptide ce qui accélère le procédé.

En chimie Boc, la résine la plus fréquemment utilisée pour des peptides de petite taille est celle de Merrifield. Celle-ci est constituée d'un polymère de polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène auquel sont rattachés des groupements chlorométhyles. Ce support permet l'obtention d'un taux de substitution pouvant aller jusqu'à 1,2 mmol/g. Après le clivage et la déprotection finale, il laisse les extrémités amino et carboxy-terminales libres.

Certains acides aminés portent, en plus de leur groupe α -aminé, une deuxième fonction sur leur chaîne latérale (amine ou carboxylique de même qu'hydroxyle ou amide). Afin d'éviter que ces groupements ne réagissent avec les réactifs de synthèse, ces acides aminés doivent être protégés lors de leur insertion dans la chaîne peptidique. Ainsi, les chaînes latérales de l'acide aspartique et de l'acide glutamique sont protégées respectivement par des groupements cHex et O-Bzl. On évite ainsi la formation d'un aspartimide ou d'une lactame à partir de l'acide aspartique et d'un acide pyroglutamique avec l'acide glutamique. Le groupement Bzl est porté par les acides aminés hydroxylés, tels que la sérine et la thréonine. Ces groupements empêchent l'acylation latérale de ces résidus lors de l'étape du couplage. De façon similaire, la deuxième fonction amine portée par la chaîne latérale de la lysine pourrait concurrencer avec l'amine- α , cet acide aminé est protégé par un groupe 2-

ClZ. Tous ces groupements sont résistants aux conditions acides utilisées pour la déprotection de l'amine terminale (40% TFA). Ils sont cependant sensibles au HF anhydre utilisé pour le clivage du peptide de la résine.

Afin de conserver les analogues sous leur forme linéaire, la fonction thiol des cystéines est bloquée par des groupements Acm. Ces groupements résistent aux acides utilisés lors de la déprotection (TFA) mais aussi lors du clivage (HF). Le formyle, porté par le tryptophane-21, est également résistant à ces conditions. Le retrait sélectif des différents groupements protecteurs est ce que l'on appelle un plan de protection orthogonale.

Bien que la méthionine porte un groupement soufré sur sa chaîne latérale, ce résidu est introduit sans protection sur sa chaîne latérale. L'oxydation de cette fonction est facilement réversible par un traitement au NaBH_4 (Gailit, 1993).

11.2. Résultats de synthèse

Lors de la synthèse des analogues de l'ET-1, nous avons donc utilisé la résine développée par Merrifield (1963). Le peptide en élongation est rattaché à ce support *via* des groupements chlorométhyles (1,2 mmol/g). La réaction de couplage du premier acide aminé nous a permis lors des trois séries de synthèse de substituer la résine à un taux variant entre 0,7 et 0,9 mmol/g.

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

Un rendement supérieur à ceux obtenus lors de notre réaction aurait cependant pu être problématique. En effet lorsque la densité des chaînes peptidiques est trop élevée, des interactions peuvent alors s'établir entre elles et ainsi nuire au couplage des résidus subséquents. L'encombrement stérique causé par les chaînes latérales des acides aminés peut aussi nuire à la réaction de couplage.

La présence du groupement formyle porté par le tryptophane-21 des analogues a nécessité l'utilisation du protocole de chimie Boc. En effet, ce groupe est instable en milieu basique. Or en chimie Fmoc, des traitements en milieu basique sont nécessaires pour la déprotection de l'amine- α . Le protocole de chimie Fmoc utilise des conditions plus douces et la déprotection en milieu basique évite, comme rencontré en chimie Boc, l'exposition répétitive du peptide à un acide de force intermédiaire comme l'acide trifluoroacétique. Ces conditions sont connues pour catalyser plusieurs réactions secondaires telles que l'oxydation de la méthionine et du tryptophane et la formation d'aspartimides. L'expertise développée dans notre laboratoire a permis d'éviter ou de minimiser la formation de tels produits secondaires. Les analyses par HPLC analytique et par spectrométrie de masse montrent l'obtention de produits de bonne qualité, grâce à l'utilisation d'un plan de protection orthogonale approprié jumelé à un bon contrôle des conditions de réactions.

Plusieurs acides aminés dont la chaîne latérale porte une deuxième fonction acide, amide, hydroxyle ou amine ont été introduits dans la chaîne peptidique munis d'un groupement protecteur. Ces groupements ont permis de réduire considérablement la production de réactions indésirables. L'acylation des résidus lysine, sérine et tyrosine a pu être évitée de cette façon. De plus, la formation d'un acide pyroglutamique ou d'une lactame a pu être évitée ou minimisée grâce aux groupements protecteurs portés par l'acide aspartique et l'acide glutamique.

Certaines difficultés ont été identifiées lors de la synthèse des analogues de l'ET-1. Par exemple, lors du couplage de l'acide aminé suivant un acide glutamique, l'amorce de neutralisation du peptide-résine (pré-traitement avec 1% DIEA/DMF) a été omise de façon

à éviter la formation d'un acide pyroglutamique. L'utilisation du réactif de couplage BOP diminue souvent l'incidence des réactions secondaires par rapport à des agents usuels tels que le DCC (Fournier *et al.*, 1989) ou les agents de nouvelle génération comme le HBTU ou le TBTU (résultats du laboratoire non publiés).

Lors du clivage du peptide de la résine, à l'aide de l'acide fluorhydrique, le contrôle de la température (4°C) est primordial. En effet, l'incidence des réactions secondaires augmente rapidement avec une élévation de la température (Stewart et Young, 1984). De même, l'évaporation du HF à la fin du temps de réaction doit aussi se faire rapidement. Lors de cette étape, la plupart des groupements protecteurs portés par les acides aminés sont retirés, ce qui rend les résidus vulnérables à plusieurs réactions secondaires. L'oxydation ou l'alkylation des cystéines, méthionine et tyrosine sont des exemples de réaction qui peuvent alors survenir. Deux capteurs de carbocations sont ajoutés au milieu réactionnel de façon à minimiser ces réactions. Dans notre laboratoire, l'éthanedithiol et le *m*-crésol sont couramment utilisés à cette fin parce que le thiol possède aussi des propriétés anti-oxydantes.

L'équipe de Matsueda (1981) a toutefois démontré que le groupement formyle, stable en milieu acide, avait tout de même tendance à se retirer sous l'action nucléophile de l'éthanedithiol. Cette réaction de déformylation a été observée lors de la première série de synthèse. En effet, l'analyse par CLHP analytique montrait dans presque tous les cas la présence de deux produits majoritaires après le clivage de la résine. L'un des produits possédait la masse recherchée alors que l'autre avait une masse inférieure de 29 Da, correspondant à la perte du groupement formyle. L'utilisation du DMS comme capteur de carbocations a donc été privilégiée pour le clivage des autres analogues. Son ajout a considérablement réduit l'incidence de la réaction de déformylation. Cependant cette réaction n'a pu être complètement éliminée probablement parce que même le DMS possède un caractère nucléophile.

11.3. Caractérisation des analogues de l'endothéline-1

L'analyse de la pureté des différents analogues de l'ET-1 a été réalisée par CLHP analytique à l'aide d'une colonne en phase inverse de 5 µm. Ces différentes analyses ont montré que la pureté des échantillons variait entre 82% et 98% (tableau 5). Cette colonne, de même que celle utilisée lors de la purification, sépare principalement les produits selon leur hydrophobicité.

L'identité des produits a été par la suite vérifiée par spectrométrie de masse. Seuls les analogues contenant le tryptophane ou la phénylalanine ont montré une masse différente de celle attendue. L'analyse de l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Phe-Abu-(17-21)ET-1 par CLHP analytique après clivage n'a montré la présence que d'un seul produit majoritaire. La masse de ce produit était cependant inférieure de 29 Da à la masse recherchée. Ces résultats suggèrent que la majorité du matériel a perdu son groupement formyle. La synthèse de cet analogue pourrait être reprise. Cependant, lors du clivage, l'éthanedithiol devra être remplacée par du DMS.

L'analyse par CLHP analytique de l'analogue contenant un tryptophane a montré la présence de plusieurs produits. Ces résultats suggèrent que plusieurs réactions secondaires se sont produites lors de la synthèse et/ou du clivage. L'analyse par spectrométrie de masse a montré que la masse du produit majoritaire était supérieure de 558 Da à celle attendue. Probablement qu'une combinaison de plusieurs réactions secondaires est à l'origine de ces résultats. Nous n'avons pas toutefois étudié la nature de celles-ci.

11.4. Essais pharmacologiques

11.4.1. Choix des préparations tissulaires

Il existe deux types de récepteurs de l'ET : ET_A et ET_B, se distinguant par leur structure et leur distribution, mais aussi par leur affinité différente pour les isoformes de l'endothéline (Doherty, 1992). Des préparations d'aorte de rat (dénudée de leur endothélium), et de parenchyme pulmonaire de cobaye ont été utilisées pour l'évaluation pharmacologique des analogues en fonction de chacun des deux récepteurs.

11.4.2. Bioessais menés sur l'aorte de rat

Les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins expriment uniquement le récepteur ET_A. Les anneaux d'aorte de rat, dénudée de leur endothélium, sont couramment utilisés comme modèle *in vitro*.

Il a été montré que les deux ponts disulfure de même que les extrémités amino- et carboxy-terminales libres sont importantes pour l'activation du récepteur ET_A. En effet, Spinella *et al.* (1993) suggèrent même qu'un lien covalent de type pont disulfure se formerait entre l'endothéline et son récepteur. Il n'est donc pas surprenant que les analogues formylés et linéaires, ayant les deux résidus cystéine bloqués par des groupements acétamidométhyles, soient complètement inactifs sur les anneaux d'aorte.

Le remplacement dans les analogues de la portion médiane de l'ET par une chaîne aliphatique de même que l'absence de ponts disulfure entraînent une plus grande flexibilité globale de la molécule. À partir d'études spectroscopiques par RMN, notre équipe (Boulanger *et al.*, 1999) a suggéré que la portion N-terminale de l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1 adopterait une conformation relativement allongée ce

qui selon notre hypothèse, expliquerait que cette série d'analogues soient inactifs sur le récepteur ET_A.

11.4.3. Bioessais menés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye

Le parenchyme pulmonaire de cobaye est une préparation largement utilisée comme modèle *in vitro* des muscles lisses des voies pulmonaires périphériques. Des études histologiques menées par Wai-shiu et son équipe (1996) suggèrent que trois types cellulaires contractiles causent la constriction du parenchyme soit : les cellules contractiles pleurales, alvéolaires et interstitielles. Puisque la surface pleurale est supérieure sur les lanières 1 et 4, il n'est pas étonnant qu'elles montrent la meilleure contractilité. La contribution des cellules musculaires lisses des bronches, des bronchioles et des vaisseaux sanguins serait quant à elle marginale. De plus, Uchida et son équipe (1996) rapportent que les deux types de récepteurs de l'ET se retrouvent tout au long du système pulmonaire. Les voies respiratoires centrales exprimeraient majoritairement le récepteur ET_A, alors que dans les voies respiratoires périphériques, le rapport ET_A/ET_B serait inversé. Puisque tous les analogues étaient inactifs sur le récepteur ET_A, l'évaluation pharmacologique de ces derniers sur le récepteur ET_B n'a pas nécessité l'emploi d'un inhibiteur du récepteur ET_A. Toutefois, un agoniste spécifique du récepteur ET_B, la sarafotoxine 6c, a été utilisé comme témoin.

Une étude de notre laboratoire menée conjointement avec un autre groupe (Filep *et al.*, 1992) suggère que l'ajout d'un groupement formyle au tryptophane en position 21 permettrait de discriminer entre les sous-types ET_{B1} et ET_{B2}. En effet le peptide [Trp(For)²¹]ET-1 induit la constriction d'anneaux de trachée de cobaye mais il semble incapable de provoquer la vasodilatation d'une artère de rat. Selon le modèle actuel, [Trp(For)²¹]ET-1 se lierait aux récepteurs ET_{B2}, mais serait incapable de se lier au récepteur ET_{B1}. L'analogue témoin, [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1, de même que tous les analogues de cette étude seraient également sélectifs pour le récepteur ET_B.

Nos études par RMN (Forget *et al.*, 1996) ont mis en évidence la grande flexibilité de la portion C-terminale de l'ET. En effet le retrait d'un groupement aussi petit que le formyle (CHO) induit un repliement complet de la molécule sur elle-même, la rendant complètement inactive. La présence du formyle sur le tryptophane permettrait au peptide d'exposer davantage ses autres groupements fonctionnels qui, grâce à leur flexibilité, pourraient s'orienter de façon à s'adapter au site de liaison du récepteur ET_B (appendice D).

La même étude du peptide [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1 rapportait que l'orientation spatiale des chaînes latérales de la portion C-terminale était très similaire à celle de l'ET-1, telle que rapportée par James *et al.* (1994). En effet, cette équipe a suggéré que la molécule d'ET-1 adopterait, dans un cristal, une conformation en hélice- α s'étendant de la position 9 à 21. De plus, les chaînes latérales de l'acide aspartique-8 et de la leucine-17 seraient éloignées l'une de l'autre. Cette similarité de conformation pourrait expliquer l'activité agoniste ET_B enregistrée avec cet analogue de l'ET-1.

Le groupement formyle semble aussi jouer un rôle important pour l'activation du récepteur en induisant un repliement de la portion terminale de façon à ce que le noyau indole du tryptophane se retrouve près de la leucine-17. Ce repliement en coude- β semble jouer un rôle clé dans l'activation du récepteur ET_B (Boulangier *et al.*, 1998; Forget *et al.*, 1996). Cette conformation est aussi rapportée dans d'autres études (Saudek, Miller et Pelton, 1989; Mills *et al.*, 1992).

Dans la série d'analogues synthétisés au cours nos travaux, cet arrangement en coude- β semble être stabilisé par l'insertion d'une lysine avant ou après l'acide aminobutyrique. En effet, une interaction de type ionique pourrait s'établir entre cet acide aminé et la fonction carboxylique du tryptophane en position C-terminale. Ceci expliquerait que ces deux analogues montrent une activité biologique semblable à celle observée avec l'analogue témoin.

La sérine placée avant la chaîne aliphatique aurait aussi la possibilité de stabiliser le coude- β en établissant un pont hydrogène entre son groupement hydroxyle et la fonction carbonyle retrouvée sur le groupement formyle porté par le tryptophane ou la fonction carboxylique en C-terminale. Par contre, placé en position 16, la chaîne latérale de cet acide aminé serait trop courte pour établir ces interactions stabilisantes. Le groupement hydroxyle de la tyrosine agirait de la même façon. Cependant, l'encombrement stérique causé par le noyau aromatique en rotation libre empêcherait l'établissement du pont hydrogène lorsque cet acide aminé est inséré en position 12.

Les analogues dans lesquels des acides aminés aliphatiques tels que l'alanine et la valine ont été introduits sont à toutes fins utiles inactifs. Probablement que les chaînes latérales aliphatiques de ces résidus sont trop courtes pour former des interactions hydrophobes avec l'indole du tryptophane. Par contre, la leucine, ayant une chaîne aliphatique plus longue, pourrait passablement stabiliser la conformation en coude- β en établissant des interactions hydrophobes.

Les analogues, où la lysine, la sérine, la tyrosine ou la leucine a été insérée en position 12, possèdent une activité biologique environ 10 fois supérieure à celle de l'analogue où le même acide aminé a été introduit en position 16. Il est évidemment attendu que la structure tridimensionnelle des analogues soit plus rigide lors de l'insertion d'un acide aminé et de l'acide aminobutyrique que lors de l'ajout seul dans le peptide de l'acide aminocaproïque. Cette perte de mobilité rendrait plus difficile le repliement de la portion C-terminale vers le segment médian de la chaîne peptidique.

Une étude de la portion C-terminale de l'endothéline-1 menée par l'équipe de Cody *et al.* (1991) avec des octapeptides analogues du segment C-terminal a suggéré que la portion médiane de la molécule interagirait avec le récepteur, *via* une poche hydrophobe, puisque le retrait de la charge positive de His¹⁶ favorisait la liaison au récepteur. Huggins, Pelton et Miller (1993) ont d'ailleurs aussi suggéré l'existence de ce type d'interactions entre l'ET et

ses récepteurs pour expliquer la stabilité de la liaison. Les résultats de notre étude semblent être en opposition avec cette hypothèse. En effet, la lysine et la sérine sont des acides aminés très hydrophiles alors que l'alanine, la valine, la tyrosine et la leucine possèdent plutôt un caractère hydrophobe (Annexe C). Si le segment 12 à 16 de l'ET agissait sur le récepteur *via* des interactions hydrophobes, une relation serait attendue entre l'hydrophobicité de l'acide aminé, introduit en position 12 ou 16, et l'activité biologique de l'analogue. Or nos résultats montrent que les peptides contenant les résidus lysine de même que sérine et tyrosine (placé avant la chaîne aliphatique) possèdent une activité biologique approximativement égale au peptide original alors que l'insertion d'une valine et d'une alanine rend l'analogue complètement inactif. Nos résultats ne corroborent donc pas l'hypothèse d'une interaction hydrophobe puisque les résidus polaires, même de petite taille avec peu d'impact sur l'encombrement stérique, possèdent une activité biologique très significative. Le rôle de la portion 12 à 16 n'est donc probablement pas d'interagir directement avec une poche hydrophobe placée sur le récepteur.

12. Synthèse de la sarafotoxine 6c

La sarafotoxine 6c (SRTX 6c) est un peptide vasoactif de la famille de l'endothéline, qui possède seulement six acides aminés différents de l'ET-1. Elle est aussi puissante que cette dernière, mais elle est spécifique au récepteur ET_B. Puisque le parenchyme pulmonaire de cobaye exprime le récepteur ET_B, mais aussi le récepteur ET_A, la SRTX 6c a été utilisée comme témoin lors des tests pharmacologiques sur le récepteur ET_B.

Le protocole de synthèse usuel prévoit la cyclisation sélective des deux ponts disulfure. Le plan de protection orthogonal utilisé permet l'obtention d'un peptide ayant ses cystéines^{3,11} libres et les deux autres protégées par des groupements AcM. Le premier pont disulfure est d'abord formé dans des conditions oxydantes douces (K₃Fe(CN)₆). Ensuite les groupements AcM portés par les cystéines^{1,15} sont retirés à l'aide de l'iode et le deuxième pont est alors formé. Cependant, l'utilisation de l'iode initie la formation de plusieurs réactions secondaires dont certaines sont irréversibles. Des études menées par l'équipe de

Aumelas (1991) ont montré que lors de la cyclisation simultanée de la molécule d'ET-1, la conformation naturelle (1-15, 3-11) était formée à 75%, la conformation croisée (1-11, 3-15) à 25%, alors que les ponts 1-3 et 11-15 étaient inexistantes. Le protocole de synthèse de la STRX 6c a donc été révisé. Les groupements Acm ont été retirés du peptide après sa synthèse et son clivage à l'aide d'un traitement au AgBF_4 . Les deux ponts disulfure ont pu ensuite être formés simultanément en conditions oxydantes douces.

12.1. Choix de la stratégie de synthèse

La synthèse de la SRTX 6c a été exécutée en utilisant la stratégie Fmoc qui est, à maints égards, généralement supérieure à celle de la chimie Boc. Une résine insoluble de Wang (polystyrène ponté avec 1% de divinylbenzène, 100-200 mesh) a été utilisée. Cette matrice est fonctionnalisée avec des groupes hydroxyméthyles et elle permet l'obtention d'un peptide ayant son extrémité C-terminale libre après clivage. Elle est en outre la matrice la plus communément utilisée en chimie Fmoc.

Le plan de protection orthogonale utilisé lors de cette synthèse prévoyait le retrait lors du clivage de tous les groupements protecteurs. Seuls les groupements Acm portés par les cystéines 1 et 15 devaient résister à l'acide trifluoroacétique. D'autre part, l'indole du tryptophane a été protégé de l'oxydation et de l'acylation par un groupement Boc, la fonction hydroxyle de la thréonine a été protégée par le groupement t-Bu alors que l'acide aspartique et l'acide glutamique portaient un groupement : O-tBu. Les acides aminés histidine, asparagine, glutamine et cystéine^{3, 11} portaient, quant à eux, des groupements Trt. Enfin, la phénylalanine, méthionine, leucine et isoleucine ont été introduits sans protection autre que le groupement Fmoc sur l'amine- α .

12.2. Résultats de synthèse

La synthèse de la SRTX 6c a été effectuée en phase solide suivant le protocole de chimie Fmoc. Cette méthode utilise des conditions de déprotection et de clivage plus douces que le protocole de chimie Boc. En effet, le groupement Fmoc est labile en milieu basique. Le clivage du peptide de la résine peut donc se faire au TFA plutôt qu'à l'acide fluorhydrique. Ainsi on évite d'exposer le peptide de façon répétitive à des conditions acides, ce qui diminue la formation de produits secondaires. D'autre part, l'absence d'usage d'acide fluorhydrique, la source principale de sous-produits de réaction contribue généralement à améliorer la qualité de matériel peptidique produit.

Le plan de protection orthogonale que nous avons utilisé a permis l'obtention d'un matériel formé d'un seul produit largement majoritaire comme détecté par CLHP analytique. L'analyse par spectrométrie de masse correspondait à la SRTX 6c portant des groupements Acm sur ses cystéines en position 1 et 15.

L'usage de sels d'argent a permis la déprotection des cystéines-(Acm) après un traitement de 12 heures. En effet, l'analyse, par spectrométrie de masse des produits obtenus après 1, 2 et 6 heures de traitement, montrait qu'un groupement Acm était toujours en place. Malgré un temps de réaction prolongé, aucune formation de produits secondaires n'a été détectée.

La cyclisation de la SRTX 6c ayant ses quatre cystéines libres s'est effectuée rapidement. Deux produits ont été isolés par CLHP préparative. Comme souligné précédemment L'équipe de Aumelas (Aumelas *et al.*, 1998 ; Aumelas *et al.*, 1999) avait rapporté que lors de la formation simultanée des deux ponts disulfure de la molécule d'ET-1 ou de la SRTX S6b, on obtient environ 75% du produit sous sa forme native (1-15, 3-11). Une co-élution du produit majoritaire avec la SRTX 6c obtenue commercialement a évidemment suggéré que le peptide isolé était dans sa configuration naturelle. De façon à s'en assurer,

nous avons comparé la courbe concentration-réponse de la SRTX 6c que nous avons synthétisée avec celle obtenue d'une source commerciale. En effet, toujours selon Aumelas *et al.* (1998 , 1999) les peptides de la famille des ETs seraient inactifs lorsqu'ils sont dans leur conformation non-naturelle. Les deux courbes étaient à toutes fins utiles identiques, ce qui démontre que nous avons obtenu majoritairement la SRTX 6c dans sa conformation 1-15 et 3-11.

Cette nouvelle approche, utilisant les sels d'argent pour le retrait des groupements Acm, est efficace et donne de bons rendements (69%). Comparativement à l'iode, cette méthode permet d'éviter la production de réactions secondaires sur des peptides ayant un résidu tryptophane non protégé. Le rendement global de la synthèse de la SRTX 6c a été de 14%, ce qui est excellent pour un peptide de 21 acides aminés contenant des acides aminés sensibles tels que le tryptophane et la méthionine et comprenant deux ponts disulfure.

À l'avenir la STRX 6c de même que les autres peptides de la famille des ETs comportant deux ponts disulfure pourront être synthétisés de façon à obtenir un matériel brut ayant ses quatre cystéines libres. La formation des ponts disulfure pourra être simultanée ainsi le peptide sera obtenu plus simplement en évitant plusieurs réactions secondaires.

Conclusions

Cette étude visait à déterminer la contribution de la portion 12 à 16 à la stabilité conformationnelle de l'ET-1, mais aussi le rôle joué par ce segment dans l'interaction entre celle-ci et ses deux récepteurs. Pour ce faire, nous avons modifié le caractère physico-chimique de la partie médiane d'analogues à structure réduite en remplaçant cette section par une chaîne aliphatique souple (Abu) précédée ou suivie par différents acides aminés.

Les essais biologiques menés sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye (ET_B) ont montré que les analogues renfermant une lysine, une sérine et une tyrosine en position 12 possèdent une activité biologique équivalente à celle du peptide [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1. Ces résidus pourraient interagir avec la portion C-terminale *via* des liens ioniques ou hydrogène de façon à stabiliser une structure secondaire en coude-β. En effet, l'étude menée par RMN avec l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1 avait montré l'adoption, par la portion C-terminale, d'une conformation en coude-β (Boulangier *et al.*, 1999). Cette structure semble être importante pour l'orientation spatiale des pharmacophores de la molécule d'ET-1, de façon à ce que la molécule interagisse correctement avec le site de liaison situé sur le récepteur ET_B.

Enfin, nos résultats semblent montrer que le segment médian n'interagirait pas directement avec une poche hydrophobe située sur le récepteur, comme suggéré par quelques auteurs (Cody *et al.*, 1994 ; Huggins, Pelton *et Miller*, 1993). En effet, aucune relation n'a pu être observée entre le caractère hydrophobe de l'acide aminé introduit en position 12 ou 16 et l'activité biologique des analogues.

D'autres analogues dans lesquels de nouveaux acides aminés tels que l'asparagine, la glutamine, l'isoleucine et la phénylalanine seront introduits de même que l'analogue amide de [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21) ET-1 viendront compléter cette

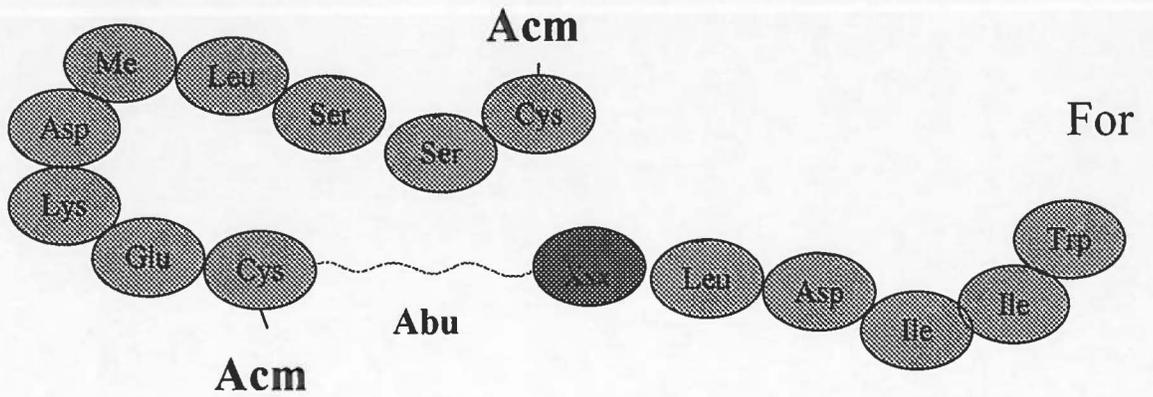
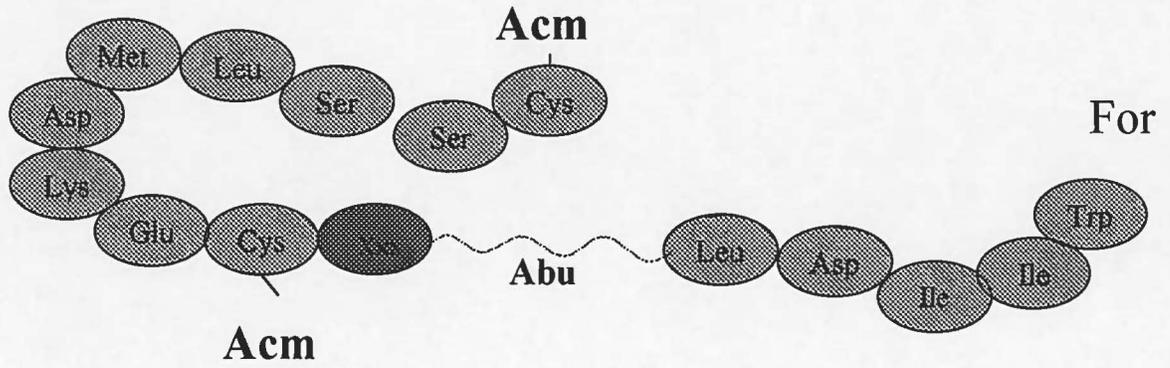
recherche. Enfin, une étude de modélisation moléculaire pourrait permettre de mieux définir les interactions qui régissent les mécanismes d'action de la molécule sur ses récepteurs.

Dans un deuxième temps, nous avons revu le protocole de synthèse de la SRTX 6c. Nous avons produit un matériel synthétique selon un plan de protection orthogonal dans lequel le peptide brut porte des groupements Acn sur ses cystéines en position 1 et 15. Dans le but de former simultanément les deux ponts disulfure, nous avons utilisé un sel d'argent pour retirer ces deux groupes protecteurs. Ce traitement s'est révélé efficace et, malgré la longue période de réaction, aucun produit secondaire n'a été observé même si plusieurs résidus sensibles tels que le tryptophane et la méthionine sont présents dans la molécule.

La cyclisation des quatre cystéines a été obtenue en conditions oxydantes douces et a donné majoritairement de la SRTX 6c dans sa configuration naturelle. Dans l'avenir, les peptides bicycliques tels que les ETs et les SRTX pourront être synthétisés avec quatre groupements labiles sur leurs cystéines. La formation des ponts pourra être réalisées directement sur le peptide brut et ce en une seule étape.

Appendice A**Abréviations à trois lettres des acides aminés**

| Acides aminés | Abréviations |
|----------------------|---------------------|
| Acide aspartique | Asp |
| Acide glutamique | Glu |
| Alanine | Ala |
| Arginine | Arg |
| Asparagine | Asn |
| Cystéine | Cys |
| Glutamine | Gln |
| Glycine | Gly |
| Histidine | His |
| Isoleucine | Ile |
| Leucine | Leu |
| Lysine | Lys |
| Méthionine | Met |
| Phénylalanine | Phe |
| Proline | Pro |
| Sérine | Ser |
| Thréonine | Thr |
| Tryptophane | Trp |
| Tyrosine | Tyr |
| Valine | Val |

Appendice B**Structures des analogues de l'ET-1**

Appendice C**Indice d'hydrophobicité des acides aminés**

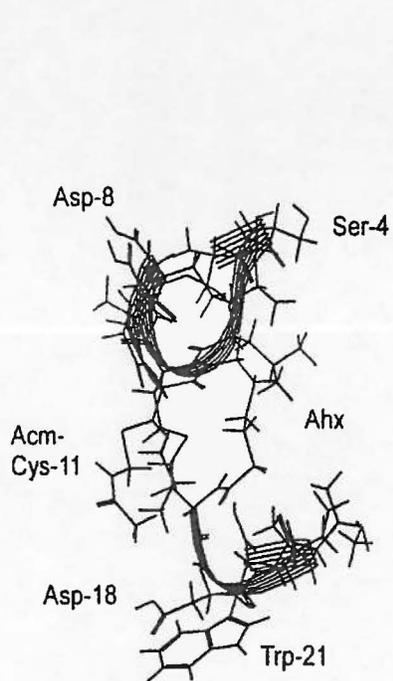
| Acides aminés | Hydrophobicité |
|----------------------|-----------------------|
| Acide aspartique | +10.0 |
| Acide glutamique | +10.0 |
| Alanine | -0.9 |
| Arginine | +10.0 |
| Asparagine | +1.3 |
| Cystéine | -2.5 |
| Glutamine | +1.3 |
| Glycine | +0.6 |
| Histidine | -0.9 |
| Isoleucine | -5.0 |
| Leucine | -5.0 |
| Lysine | +10.0 |
| Méthionine | -3.4 |
| Phénylalanine | -7.2 |
| Proline | +0.6 |
| Sérine | +1.5 |
| Thréonine | -0.6 |
| Tryptophane | -10.0 |
| Tyrosine | -6.6 |
| Valine | -4.1 |

(Tiré de Parker et al., 1986)

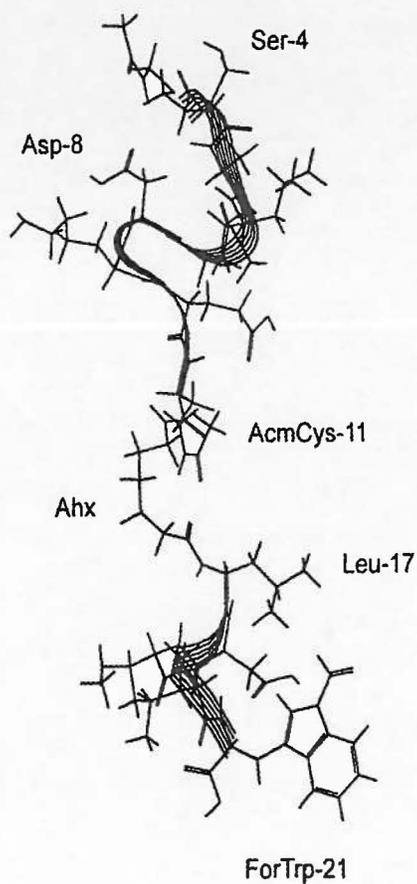
Appendice D

Étude de modélisation moléculaire des analogues

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



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



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

(Boulangier et al., 1999)

Appendice E

Calcul de rendement

Rendement d'une étape :

$$\frac{M_{pp} \text{ (mg)}}{M_{pu} \text{ (mg)}} \times 100$$

Où : M_{pp} = Masse de peptide produit

M_{pu} = Masse de peptide utilisé

Rendement global :

$$\frac{M_{pp} \text{ (mg)}}{(\text{É (mmol)} \times \text{P.M. (mg/mmol)}) - \text{Masse de peptide non utilisé (mg)}} \times 100$$

Où : É = Échelle de synthèse

P.M. = Poids moléculaire du peptide

Références

AUMELAS, A., L. Chiche, S. Kubo, N. Chino, T. Watanabe et Y. Kobayashi. 1999. «The Chimeric Peptide [Lys⁻²-Arg⁻¹]Sarafotoxin-S6b, Composed of the Endothelin Pro-sequence and Sarafotoxin, Retains the Salt-bridge Staple Endothelin. Implication of this Salt-bridge in the Contractile Activity and Oxydative Folding Reaction.» European Journal of Biochemistry, vol. 266, p.977-985.

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 H NMR.» International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 37, p. 315-324.

AUMELAS, A., S. Kubo, N. Chino, L. Chiche, E. Forest, C. Roumestand et Y. Kobayashi. 1998. «Formation of the Native Disulfide Bounds in Endothelin-1. Structural Evidences for the Involvement of a Highly Specific Salt-bridge between the Prosequence and the Endothelin-1 Sequence.» Biochemistry, vol. 37, p. 5220-5230.

BECKER, A., E. B. Dowdle, U. Hechler, K. Kauser, P. Donner et W.-D. Schleuning. 1993. «Bibrotoxin, a Novel Member of the Endothelin/Sarafotoxin Peptide Family, from the Venom of the Burrowing Asp *Atractapis bibrioni*». FEBS Letters, vol.315, p.100-103

BOCKAERT, J. 1996. «Recepteurs Couplé aux Protéines G : des Concepts à la Structure. » Médecine/Sciences, vol. 12, p. 79-85.

BORTMANN, P., J. Hoflack, J. T. Pelton et V. Saudek. 1991. «Solution Conformation of Endothelin-3 by ¹H NMR and Distance Geometry Calculations». Neurochemistry International, vol. 18, p. 491-496.

BOULANGER Y., E. Biron, A. Khiat et A. Fournier. 1998. «Conformational Analysis of Biologically Active Truncated Linear Analogs of Endothelin-1 Using NMR and Molecular Modeling.» International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 53, p. 214-222.

CARDELL, L., R. Uddman et L. Edvinsson. 1992. « Evidence for Multiple Endothelin Receptors in the Guinea-Pig Pulmonary Artery and Trachea. » British Journal of Pharmacology, vol. 105, p. 376-380.

CODY, W. L., A.M. Doherty, X. He, S.T. Rapundalo, G.P. Hingorami, R.L. Panek et T.C. Major. 1991. «Monocyclic Endothelins : Examination of the Importance of the Individual Disulfide Rings». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17, p. S62-S64.

CODY, W.L., J.X. He, P.L. DePue, S.T. Rapundalo, G.P. Hingorani, D.T. Dudley, K.E. Hill, E.E. Reynolds et A.M. Doherty. 1994. «Structure-Activity Relationships in a Series of Monocyclic Endothelin Analogues». Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 4, p. 567-572.

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.

DE LÉAN, A., A.A. Hancock et R.J. Lefkowitz. 1982. «Validation and Statistical Analysis of a Computer Modeling for Quantitative Analysis of Radioligand Binding Data for Mixture of Pharmacological Receptor Subtypes». Molecular Pharmacology, vol. 21, p. 5-16.

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

D'ORLÉANS-JUSTE, P., J.-P. Gratton, R. Leduc, G. Bkaily et A. Claing. 1996. «L'endothéline : pharmacologie cardio-vasculaire et considérations physiopathologiques». Médecine Sciences, vol. 12, p.563-574.

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

FILEP, J. G., A. Rousseau, A. Fournier et P. Sirois. 1992. «Structure-Activity Relationships of Analogues of Endothelin-1 : Dissociation of Hypotensive and Pressor Actions». European Journal of Pharmacology, vol. 220, p. 263-266.

FOREST, M. et A. Fournier. 1990. « BOP Reagent for the Coupling of pGlu and Boc-His(Tos) in Solid Phase Peptide Synthesis». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 35, p.89-94.

FOREST, M., J.C. Martel, S. St-Pierre, R. Quirion et A. Fournier, 1990. «Structure Study of the N-Terminal Segment of Neuropeptide Tyrosine». Journal of Medical Chemistry, vol. 33, p. 1615-1619.

FORGET, M-A., N. Lebel, P. Sirois, Y Boulanger et A. Fournier. 1996. «Biological and Molecular Analyses of Structurally Reduced Analogues of Endothelin-1». Molecular Pharmacology, vol.49, p. 1071-1079.

FOURNIER A., R. Couture, D. Regoli, M. Gendreau et S. St-Pierre, 1982. «Synthesis of Peptides by the Solid-Phase Method. 7 . Substance P and Analogues». Journal of Medical Chemistry, vol. 25, p. 64-68.

FOURNIER, A., W. Danho et A. M. Felix. 1989. «Applications of BOP Reagent in Solid Phase Peptide Synthesis». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 33, p. 133-139.

FOURNIER A., J.K. Saunders et S. St-Pierre, 1984. «Synthesis, Conformational Studies and Biological Activities of VIP and Related Fragments». Peptides, vol 5, p. 169-177

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

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

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

GISIN, B.F. 1972. «The Monitoring of Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis with Picric Acid». Analytica Chimica Acta, vol. 58, p.248-249.

GINSIN, B. F. 1973. «The Preparation of Merrifield-Resins throught Total Esterification with Cesium Salts». Helvetica Chimica Acta, vol.56 p. 1476-1482.

GRAY, G. A. et D. J. Webb. 1996. « The endothelin System and its Potential as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. » Pharmacology and Therapeutics, vol. 72, p. 109-148.

HAYNES, W. G. et D. J. Webb. 1993. «Endothelin : Progress in Pharmacology and Physiology». Trends in Pharmacological Sciences, vol. 14, p. 225-228

HUGGINS, J., J. Pelton et R. Miller. 1993. «The Structure and Specificity of Endothelin receptors. Their Importance in Pharmacology and Medecine.» 1993, vol. 59, p. 55-61.

IGNARRO, L., G. Buga, K. Wood, R. Byrns et G. Chaudhuri. 1987. «Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein appears to be nitric oxyde». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 84, p. 9265-9269.

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

JANES, R., D. Peapus et B. Wallace. 1994. «The Cristal Structure of Human Endothelin.» Nature Structural Biology. Vol. 1, p. 311-319.

JAE, H.-S., M. Winn, D. B. Dixon, K.C. Marsh, B. Nguyen, T.J. Opgenorth et T. W. Von Geldern. 1997. «Pyrrolidine-3-carboxylic Acids as Endothelin Antagonists. 2. Sulfonamide-Based ET_A/ET_B Mixed Antagonists. » Journal of Medicinal Chamistry, vol. 40, p. 3217-3227.

KAISER, E., R.L. Colescott, C.D. Bossinger et P.I. Cook. 1970 «Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups im the Solid Phase Synthesis of Peptides». Annals of Biochemistry, vol. 34, p. 595-598

KAISER, T., G. J. Nicholson, H. J. Hohlbau et W. Voelter. 1996. «Racemization Studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH During Stepwise Fmoc-solid Phase Peptide Sythesis». Tetrahedron Letters, vol. 37, p. 1187-1190.

KARNE, S., C.K. Jayawickreme et M.R. Lerner. 1993. «Cloning and Characterization of an Endothelin-3 Specific Receptor (ETc receptor) from *Xenopus laevis* Dermal Melanophores ». The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 199126-19133.

KIMURA, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinmi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto et T. Masaki. 1989. «Conversion of Big Endothelin-1 to 21-Residue Endothelin-1 is Essential for Expression of Full Vasoconstrictor Activity : Structure-Activity Relationships of Big Endothelin-1». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13, p. S5-S7.

KING, D.S., C.G. Fields et G.B. Fields. 1990. «A Cleavage Method wich Minimizes Side Reactions Following Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis». International Journal of Peptides Protein research, vol. 36, p. 255-266.

KLOOG, Y., I. Ambar, M. Sokolovsky, E. Kochva, Z. Wolberg et A. Bdolah. 1988. «Sarafotoxin, a Novel Vasoconstrictor Peptide : Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Heart ans Brain». Science, vol. 242, p. 268-270.

KURODA, M., K. Yamazaki et T. Taga. 1994. « Conformation of the C_Terminus of Endothelin-1 in Aqueous Solution Studies by Monte-Carlo Simulation. » FEBS Letters, vol. 355, p. 263-266.

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

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

MATSUEDA, G., E. Haber et M. Margolies. 1981. « Quantitative Solid-Phase Edman Degradation for Evaluation of Extended Solid-Phase Peptide Synthesis. » Biochemistry, vol. 20, p. 2471-2480.

MERRIFIELD, B. 1986. «Solid Phase Synthesis ». Science, vol. 232, p. 341-347.

MILLS, R. G., S. I. O'Donoghue, R. Smith et G.F. King. 1992. « Solution Structure of Endothelin-3 Determined Using NMR Spectroscopy ». Biochemistry, vol. 31, p. 5640-5645.

MIMEAULT, M., R. Quirion, Y. Dumont, S. St-Pierre et Fournier A, 1992. «Structure-Activity Study of hCGRP8-37, a Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist». Journal of Medical Chemistry, vol. 35, p. 2163-2168.

MUNRO, S., D. Craik, C. McConville, J. Hall, M. Searle, W. Bicknell, D. Scanlon et C. Chandler. 1991. « Solution Conformation of Endothelin, a Potent Vasoconstricting Bicyclic Peptide. A Combined Use of ¹H NMR Spectroscopy and Distance Geometry Calculations. » FEBS Letters, vol. 163, p. 424-429.

NAKAJIMA, K.S., Kubo, S.-I. Kumagaye, H. Nishio, M. Tsunemi, T. Inui, H. Kuroda, N. Chino, T.X. Watanabe, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989. «Structure-Activity Relationship of Endothelin : Importance of Charged Groups». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 163, p. 424-429.

O'BRIEN, R.F. et I.F. McMurtry. 1984. «Endothelial Cell (EC) Supernates Contract Bovine Pulmonary Artery (PA) Rings». American Review of Respiratory Disease, vol. 129, p. A337.

OKADA, K., Y. Miyazaki, J. Takada, K. Matsuyama, T. Yamaki et M. Yano 1990. «Conversion of Big Endothelin-1 by Membrane-Bound Metalloendoenzyme in Cultured Bovine Endothelial Cells». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 171, p. 1192-1198.

OPGENORTH, T. J. 1995. « Endothelin Receptor Antagonism. » Advances in Pharmacology, vol. 33, p. 1-65.

PANEK, R. L., T.C. Major, G.P. Hingorani, A.M. Doherty, D.G. Taylor et S.T. Rapundalo. 1992. «Endothelin and Structurally Related Analogs Distinguish between Endothelin Receptor Subtypes». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 183, p. 566-571.

PELTON, J. et R. Miller. 1991. «The Role of the Disulfide Bonds in Endothelin-1. Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 43, p. 43-48.

PERKINS, T.D.J.,R.C. Hider et D.J. Barlow. 1990. «Proposed Solution Structure of Endothelin». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 36, p. 128-133

SAEKI, T., M. Ihara, T. Fukuroda et M. Yano. 1992. « Structure-Activity Relationship for ET_B Agonism in Truncated Endothelin-1 Analogs. » Biochemistry International, vol. 28, p. 305-312.

SAIDA, K., Y. Mitsui et N. Ishida. 1989. «A Novel Peptide, Vasoactive Intestinal Contractor, of a New (Endothelin) Peptide Family». The Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 14 613- 14 616

SAKAMATO, A., M. Yanagisawa, T. Sawamura, T. Enoki, T. Ohtani, T. Sakurai, K. Nakoa, T. Toyo-oka et T. Masaki, 1993. « Distinct Subdomains of Human Endothelin Receptors Determine their Selectivity To Endothelin_A-Selective Antagonist and Endothelin_B-Selective Agonists. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 8547-8553.

SAUDEK, V., J. Hoflack et J. T. Pelton. 1989. «¹H-NMR Study of Endothelin, Sequence-Specific Assignment of the Spectrum and a Solution Structure». FEBS Letters, vol. 257, p. 145-148.

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

SPINELLA, M.J., A.B. Malik, J. Everitt et T.T. Andersen. 1991. «Design and Synthesis of a Specific Endothelin 1 Antagonist : Effects on Pulmonary Vasoconstriction». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, p. 7443-7446.

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

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

TAMAOKI, H., Y. Kobayashi, S. Nishimura, T. Ohkubo, Y. Kyogoku, K. Nakajima, S.I. Kumagaye, T. Kiruma et S. Sakakibara. 1991. « Solution Conformation of Endothelin Determined by Means of ¹H NMR Spectroscopy and Distance Geometry Calculations. » Protein Engineering, vol. 4, p. 509-518.

UCHIDA, Y., T. Jun, H. Ninomiya, H. Ohse, S. Hasegawa, A. Nomura, T. Sakamoto, M.S. Sardesai et F. Hirata. 1996. «Involvement of Endothelins in Immediate and Late Asthmatic Responses of Guinea Pigs». The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 277, p. 1622-1629.

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. S250-S253.

WATABE, T. X., Y. Itahara, K. Nakajima, S.-I. Kumagaye, T. Kiruma et S. Sakakibara. 1991. « The Biological Activity of Endothelin-1 Analogues in Three Different Assay Systems. » Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17, p. S5-S9.

WONG, W., S. Bloomquist, A. Bendele et J. Fleish. 1992. «Pharmacological and Histological Examination of Regional Differences of Guinea-pig Lung : A Role of Pleural Smooth Muscle in Lung Strip Contraction.» British Journal of Pharmacology, vol. 105, p. 620-626.

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

YANAGISAWA, M. et T. Masaki. 1989. «Endothelin, A Novel Endothelium-Derived Peptide». Biochemical Pharmacology, vol. 38, p. 1877-1883.

YOSHIDA, M., T. Tatsumi, Y. Fujiwara, S. Linuma, T. Kimura, K. Akaji et Y. Kiso. 1990. «Deprotection of the S-trimethylacetamidomethyl (Tcm) Group Using Silver Tetrafluoroborate : Application to the Synthesis of Porcine Brain Natriuretic Peptide-32 (pBNP-32)». Chem. Pharm. Bull., vol. 38, p. 1551-1557.

