

Université du Québec  
INRS Santé

Evaluation de méthodes synthétiques pour l'élaboration d'analogues de  
l'endothéline-1 comportant un lien amide intramoléculaire.

Par  
Annie Bergeron  
Baccalauréat en Biochimie

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

Dr Gaétan Guillemette  
Département de pharmacologie  
Université de Sherbrooke

Examineur interne

Dr Jacques Bernier  
INRS Santé

Directeur de recherche

Dr Alain Fournier  
INRS Santé

(5 mars, 1999)

© droits réservés de Annie Bergeron, 1999



## Résumé

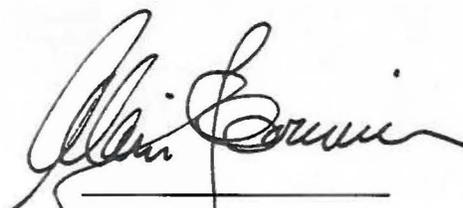
L'endothéline-1 (ET-1), le plus puissant vasoconstricteur d'origine peptidique connu à ce jour, est composé de 21 acides aminés et possède deux ponts disulfures dans sa structure. Au plan pharmacologique, l'ET-1 possède une grande variété d'actions, notamment une constriction soutenue et des actions mitotiques sur le muscle lisse vasculaire, une constriction de la trachée, une libération d'ANP (atrial natriuretic peptide) au niveau du cœur, une diminution du flux sanguin rénal, etc. Etant donné cette grande gamme d'effets biologiques, l'ET-1 se retrouve également associée à certaines physiopathologies humaines tels, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance rénale, l'athérosclérose, l'asthme, etc. Les effets de l'ET sont en fait médiés par le biais de récepteurs qui se présentent sous différents sous-types au sein de l'organisme et qui sont nommés : ET<sub>A</sub>, ET<sub>B1</sub>, ET<sub>B2</sub> et ET<sub>C</sub>. Plusieurs études menées dans le passé ont permis d'identifier certains pharmacophores de cette molécule. L'identification de ces derniers peut mener à l'élaboration d'analogues de l'ET qui pourraient s'avérer être des agonistes ou des antagonistes de la molécule. Il est connu que les antagonistes peuvent apporter des informations importantes sur les rôles de la molécule au niveau de la physiologie cardiovasculaire ainsi que sur ses implications pathologiques. Différents analogues de l'ET-1 ont donc été élaborés par synthèse peptidique en phase solide. Les dérivés peptidiques obtenus comportent un lien amide substitué à un des deux ponts disulfures de la molécule native, par l'introduction d'un résidu acide (acide aspartique ou acide glutamique) et d'un résidu basique (lysine ou ornithine), remplaçant les deux résidus cystéines normalement rencontrés. Certains comportent également un espaceur glycine au niveau de ce même lien amide, pour accentuer sa longueur. Trois séries de synthèse peptidique ont été expérimentées afin de tenter de mettre au point une méthode efficace pour la réalisation de ces divers analogues peptidiques.

Finalement, nous sommes arrivés à la conclusion que c'est la méthode de synthèse peptidique en phase solide utilisant la chimie Fmoc qui est la plus appropriée. Une réduction catalytique au palladium, en présence de N-méthylmorpholine comme nucléophile, permet l'élimination sélective des groupements protégeant les chaînes latérales des résidus d'acide aminé impliqués dans la formation du lien amide. Quant au

lien amide, il est pour sa part formé à l'aide du N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Nos résultats montrent que les dérivés peptidiques obtenus par cette méthode sont d'une bonne pureté, lorsqu'ils sont analysés par HPLC. L'analyse par spectrométrie de masse démontre par contre que les produits obtenus, malgré leur pureté acceptable, ne sont pas ceux désirés. Il semble qu'il y a eu terminaison de chaîne en cours de synthèse pour un des analogues, alors que pour les autres dérivés, la méthode d'élimination des groupements protégeant les chaînes latérales des résidus impliqués dans le lien amide n'est pas appropriée. En fait, cette méthode serait à l'origine d'une réaction secondaire via l'action de la N-méthylmorpholine sur les résidus d'acide aspartique. Ceux-ci sont au nombre de deux à l'intérieur de la séquence des dérivés de l'ET synthétisés.



Annie Bergeron  
Etudiante



Alain Fournier  
Directeur de recherche

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance au directeur de mon projet de maîtrise, le Dr Alain Fournier, qui m'a très bien encadrée tout au long de la réalisation de mes recherches.

Je remercie également :

les membres du laboratoire de l'INRS-Santé, plus particulièrement M. Patrick Sabourin, M. Philippe Roby et Mme Myriam Létourneau,

Mme Diane Lacoste et M. Gilbert Leblanc de l'INRS-Santé pour leur support au niveau de la réalisation et de la recherche de documents,

l'INRS-Santé pour son support financier.

## Table des matières

Résumé .....	iii
Remerciements .....	v
Liste des Figures .....	x
Liste des Tableaux .....	xii
Introduction .....	1
Matériel et méthodes .....	18
1. Synthèse et purification des analogues de l'ET-1 .....	18
1.1 Réactifs et solvants utilisés .....	18
1.2 Choix de la résine et des groupements protégeant les chaînes latérales des acides aminés .....	19
1.3 Méthode de synthèse de Boc-Glu( $\gamma$ -OFm) .....	21
1.4 Méthode de synthèse des dérivés .....	22
1.4.1 Protocole de couplage des résidus .....	22
1.4.2 Cas spécifique des analogues avec l'espaceur glycine .....	24
1.4.3 Déprotection sélective et formation du pont lactame .....	27
1.5 Clivage et déprotection au HF .....	28
1.6 Traitement basique des peptides bruts .....	29
1.7 Purification des dérivés peptidiques .....	29
1.8 Bicyclisation et purification des dérivés .....	31
2. Caractérisation des dérivés de l'ET-1 .....	32
2.1 HPLC analytique .....	32
3. Synthèse de nouveaux analogues de l'ET-1 .....	32
3.1 Réactifs et solvants utilisés .....	32
3.2 Choix de la résine et des groupements protecteurs des résidus .....	33
3.3 Fixation du premier acide aminé à la résine .....	33
3.3.1 Test pour déterminer la substitution de la résine .....	35
3.3.2 Test à l'acide picrique .....	38

3.4 Méthode de synthèse des peptides .....	39
3.4.1 Protocole de couplage des acides aminés .....	39
3.4.2 Cas spécifique du couplage de Fmoc-Cys(Trt) .....	42
3.4.3 Déprotection sélective et formation du lien amide .....	45
3.5 Clivage et déprotection au TFA .....	46
4. Synthèse d'autres dérivés de l'ET-1 .....	47
4.1 Réactifs et solvants utilisés .....	47
4.2 Déprotection sélective suivie de la formation du lien amide .....	47
4.3 Clivage au TFA .....	48
4.4 Traitement de réduction au niveau des peptides .....	49
4.5 Purification des peptides bruts .....	49
4.6 Bicyclisation et purification des analogues de l'ET-1 .....	51
5. Caractérisation des dérivés de l'ET-1 .....	51
5.1 HPLC analytique .....	51
5.2 Electrophorèse capillaire .....	52
5.3 Spectrométrie de masse .....	52
6. Vérification de l'efficacité du clivage au TFA utilisant le 2-méthylindole ainsi que le m-crésol comme capteurs de carbocations .....	52
6.1 Synthèse de trois pentapeptides .....	52
6.1.1 Réactifs et solvants utilisés .....	53
6.2 Clivage des pentapeptides .....	53
Résultats .....	54
7. Synthèse, purification et caractérisation des dérivés de l'ET-1 .....	54
7.1 Synthèse et clivage des peptides .....	54
7.2 Purification, bicyclisation et caractérisation des analogues .....	54
8. Synthèse et clivage d'autres dérivés de l'ET-1 .....	57
9. Synthèse, purification et caractérisation de nouveaux analogues de l'ET-1 .....	61
9.1 Synthèse et clivage des dérivés peptidiques .....	61

9.2 Purification et bicyclisation des dérivés peptidiques .....	63
9.3 Caractérisation des dérivés de l'ET-1 .....	68
10. Synthèse et clivage de trois pentapeptides permettant de vérifier l'efficacité du clivage au TFA utilisant une combinaison de 2-méthylindole et de m-crésol comme capteurs de carbocations .....	68
10.1 Synthèse des pentapeptides .....	68
10.2 Clivage des pentapeptides .....	72
Discussion .....	74
11. Formation de dérivés de l'ET-1 par la méthode de synthèse peptidique en phase solide .....	74
11.1 Elaboration des peptides et choix des groupements protecteurs .....	74
11.2 Evaluation de la synthèse de la première série d'analogues de l'ET-1 .....	77
11.3 Caractérisation de la première série de dérivés de l'ET-1 .....	79
12. Elaboration d'une nouvelle série de dérivés de l'ET-1 .....	80
12.1 Conception de la deuxième série de peptides et choix des groupements protecteurs .....	80
12.2 Evaluation de la synthèse de la deuxième série d'analogues de l'ET-1 .....	81
13. Mise au point d'une troisième série d'analogues de de l'ET-1 .....	83
13.1 Conception de la nouvelle série de dérivés de l'ET-1 et choix des groupements protecteurs .....	83
13.2 Evaluation de la synthèse de la troisième série d'analogues de l'ET-1 .....	83
13.3 Evaluation de la pureté et de l'identité des dérivés de l'ET-1 .....	85
14. Efficacité du clivage utilisant le 2-méthylindole et le m-crésol comme capteurs de carbocations .....	88
Conclusion .....	91
Appendices .....	93
Appendice A .....	93
Appendice B .....	94

Liste des références ..... 96

## Listes des Figures

Figure 1 : Les peptides de la famille des endothélines .....	2
Figure 2 : Biosynthèse de l'endothéline .....	4
Figure 3 : Le récepteur ET <sub>A</sub> humain .....	6
Figure 4 : Modèle proposé de l'interaction ET-récepteur .....	15
Figure 5 : Réaction de déprotection de la fonction amine en alpha des acides aminés, en chimie Boc .....	25
Figure 6 : Réaction de couplage d'un Boc-acide aminé, utilisant la chimie Boc .....	26
Figure 7 : Déplacement N vers O de la sérine .....	30
Figure 8 : Fixation du premier acide aminé à la résine .....	36
Figure 9 : Recouvrement des sites hydroxyméthylés libres .....	37
Figure 10 : Réaction de déprotection de la fonction amine- $\alpha$ des résidus, en chimie Fmoc .....	41
Figure 11 : Réaction de couplage en chimie Fmoc .....	43
Figure 12 : Formation d'anhydrides symétriques pour le couplage du résidu cystéine .....	44
Figure 13 : Profil HPLC analytique de l'analogue (Glu <sup>1</sup> Lys <sup>15</sup> )ET-1 monocyclique post-clivage .....	55
Figure 14 : Profils HPLC analytique de l'analogue (Glu <sup>3</sup> Orn <sup>11</sup> )ET-1 monocyclique (A) avant et (B) après traitement au NH <sub>4</sub> OH .....	56
Figure 15 : Profils HPLC analytique du dérivé (A) (Glu <sup>1</sup> Lys <sup>15</sup> )ET-1 monocyclique et (B) (Glu <sup>1</sup> Lys <sup>15</sup> )ET-1 bicyclique .....	58
Figure 16 : Profil HPLC analytique de l'analogue (Glu <sup>1</sup> Lys <sup>15</sup> )ET-1 bicyclique .....	59
Figure 17 : Profils HPLC analytique du dérivé (Orn <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1 linéaire (A) après trois traitements au palladium et (B) après quatre traitements au palladium .....	60
Figure 18 : Profils HPLC analytique du dérivé (A) (Lys <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1 linéaire et (B) (Lys <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1 linéaire .....	62
Figure 19 : Profils HPLC analytique de (A) (Lys <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1 monocyclique brut et (B) (Lys <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1 monocyclique brut .....	64

Figure 20 : Profil HPLC analytique de (Lys <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1 monocyclique brut ayant subi deux clivages au TFA .....	65
Figure 21 : Profils HPLC analytique de l'analogue (Lys <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1 monocyclique (A) avant et (B) après traitement au NaBH <sub>4</sub> .....	66
Figure 22 : Profils HPLC analytique de (A) (Lys <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1 monocyclique et (B) (Lys <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1 bicyclique .....	67
Figure 23 : Profils HPLC analytique de (A) (Lys <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1 bicyclique après purification et (B) (Lys <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1 bicyclique après purification .....	69
Figure 24 : Profils HPLC analytique de NH <sub>2</sub> -Ile-Ala-Ala-Asn-Trp-COOH clivé au TFA (A) à l'aide du SHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SH et du phénol comme capteurs de carbocations et (B) avec le 2-méthyl-indole et le m-crésol comme capteurs de carbocations .....	73
Figure 25 : Action de la N-méthylmorpholine sur les résidus d'acide aspartique .....	89

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Actions pharmacologiques de l'endothéline .....	10
Tableau 2 : Structure chimique des groupements protégeant les chaînes latérales des acides aminés .....	20
Tableau 3 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Boc .....	23
Tableau 4 : Structure chimique des groupements protecteurs des chaînes latérales des résidus sensibles .....	34
Tableau 5 : Cycle de couplage d'un acide aminé utilisant la chimie Fmoc .....	40
Tableau 6 : Caractérisation par HPLC analytique et par électrophorèse capillaire des dérivés de l'ET-1 .....	70
Tableau 7 : Pureté des dérivés de l'ET-1 d'après les mesures par HPLC analytique .....	71

## Introduction

En 1980, Furchgott et Zawadski ont découvert l'EDRF (endothelium-derived relaxing factor), ce qui les a alors menés au concept que l'endothélium devait jouer un rôle important au niveau de la régulation de la vasoconstriction et de la vasodilatation (Masaki et Yanagisawa 1992). Quatre ans plus tard, O'Brien et McMurtry (1984) ont démontré que les cellules endothéliales en culture étaient capables de libérer une ou plusieurs substances qui pouvaient contracter des préparations d'artères isolées. On donna alors le nom d'EDCF (endothelium-derived constrictor factor) à ce facteur. Par la suite, Gillespie et son équipe, en 1986, ont montré que la trypsine, une protéase, était capable d'inhiber l'effet vasoconstricteur de l'EDCF, ce qui suggérait alors que l'EDCF était un peptide.

En 1988, Yanagisawa et ses collaborateurs ont isolé, séquencé et caractérisé un puissant vasoconstricteur d'origine peptidique, à partir du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc en culture. N'appartenant à aucune famille peptidique connue, ce peptide fût alors nommé endothéline (ET). Ce peptide s'avère être le plus puissant vasoconstricteur connu à ce jour, au niveau des mammifères (Masaki et Yanagisawa 1992). L'ET est d'ailleurs environ dix fois plus puissante que l'angiotensine II, également un vasoconstricteur (Doherty 1992). En cherchant l'existence d'autres peptides appartenant à la famille de l'ET, au niveau de l'ADN, Inoue et ses collègues (1989) ont découvert trois gènes humains distincts codant pour des précurseurs de l'ET. Les trois peptides engendrés par ces gènes étaient légèrement différents entre eux et leur activité pharmacologique était également différente, au niveau d'artères isolées de rat et chez des rats anesthésiés. Ainsi, on donna le nom d'endothéline-1 (ET-1) à la séquence découverte par Yanagisawa et son équipe (1988) et les noms d'endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3) aux deux autres séquences découvertes par Inoue et ses collègues (1989) (Figure 1). En fait, l'ET-2 ne diffère de l'ET-1 qu'au niveau de deux acides aminés (positions 6 et 7) et l'ET-3 n'en diffère qu'au niveau de six acides aminés (positions 2, 4, 5, 6, 7 et 14) ; toutes ces différences étant surtout situées dans la région N-terminale des peptides. Les trois iso-peptides présentent une homologie de séquence avec un peptide présent dans l'intestin de souris, le VIC (vasoactive intestinal contractor) qui ne

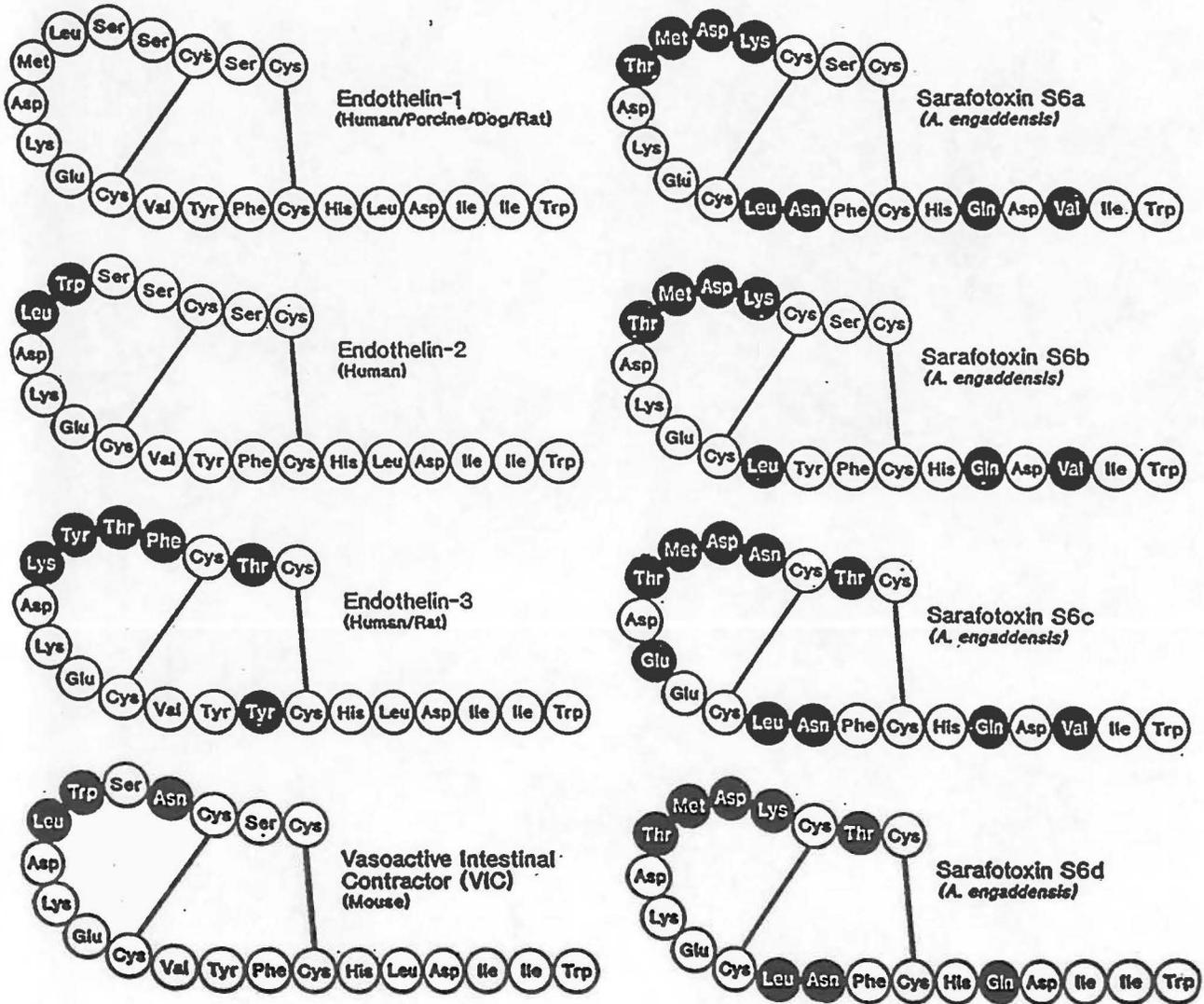


Figure 1 : Les peptides de la famille des endothélines (Doherty 1992).

diffère de l'ET-1 qu'au niveau de trois résidus (Saida, Mitsui et Ishida 1989). Ils possèdent également une homologie de séquence avec des peptides cardiotoxiques, soit les sarafotoxines (SRTXs) (Kloog et al 1988) et la bibrotoxine (Becker et al 1993), tous deux extraits respectivement du venin des serpents *Atractaspis engaddensis* et *Atractaspis bibroni*. Ainsi, l'existence de gènes reliés à l'ET au niveau de reptiles peut suggérer une ancienne et commune origine d'évolution et démontre par le fait même l'importance physiologique du système de l'ET (Yanagisawa et Masaki 1989 ; Doherty 1992).

Tous ces peptides sont composés de 21 acides aminés et la présence dans ceux-ci de 4 cystéines aux positions 1, 3, 11 et 15 amène la formation des deux ponts disulfures 1-15 et 3-11, un arrangement unique parmi les peptides bioactifs retrouvés chez les mammifères. De plus, leurs extrémités N- et C-terminales sont libres (Masaki et Yanagisawa 1992).

Les trois isoformes connues de l'ET dérivent donc chacune d'un gène qui leur est distinct mais par contre, le processus enzymatique qui les engendre est identique. Plus particulièrement, l'ET-1 dérive d'un précurseur de 212 acides aminés, nommé la prépro ET-1. Une fois sécrétée au niveau du cytoplasme, cette molécule est alors clivée par une convertase de type subtilisine, qui pourrait en fait être la furine, et qui est spécifique pour les paires de résidus dibasiques (Lys-Arg). Ceci donne alors lieu à la formation de la pro-ET, connue également sous le nom de big-ET, qui est pour sa part composée de 38 acides aminés chez l'humain et de 39 acides aminés au niveau du porc. Finalement, la big-ET est ensuite convertie, par un processus unique, en ET active par le biais d'une enzyme appelée l'enzyme de conversion de l'ET (ECE), qui effectue un clivage entre le Trp<sup>21</sup> et la Val<sup>22</sup> (Lerman et al 1990 ; Ahn et al 1992 ; Doherty et al 1992 ; D'orléans-Juste et al 1996 ; Gray et Webb 1996) (Figure 2). Il est maintenant accepté que l'ECE est une métalloprotéase liée aux membranes (Ahn et al 1992), active à pH neutre et inhibée par le phosphoramidon, un inhibiteur de métalloprotéase, mais non par le thiorphan, un inhibiteur des endopeptidases neutres (NEP), ce qui la distingue alors de la NEP 24-11 (D'orléans-Juste et al 1996). Des études ont de plus démontré que l'ECE possède également la propriété de lier le zinc (Ahn et al 1992 ; Shimada et al 1994). La plus grande expression

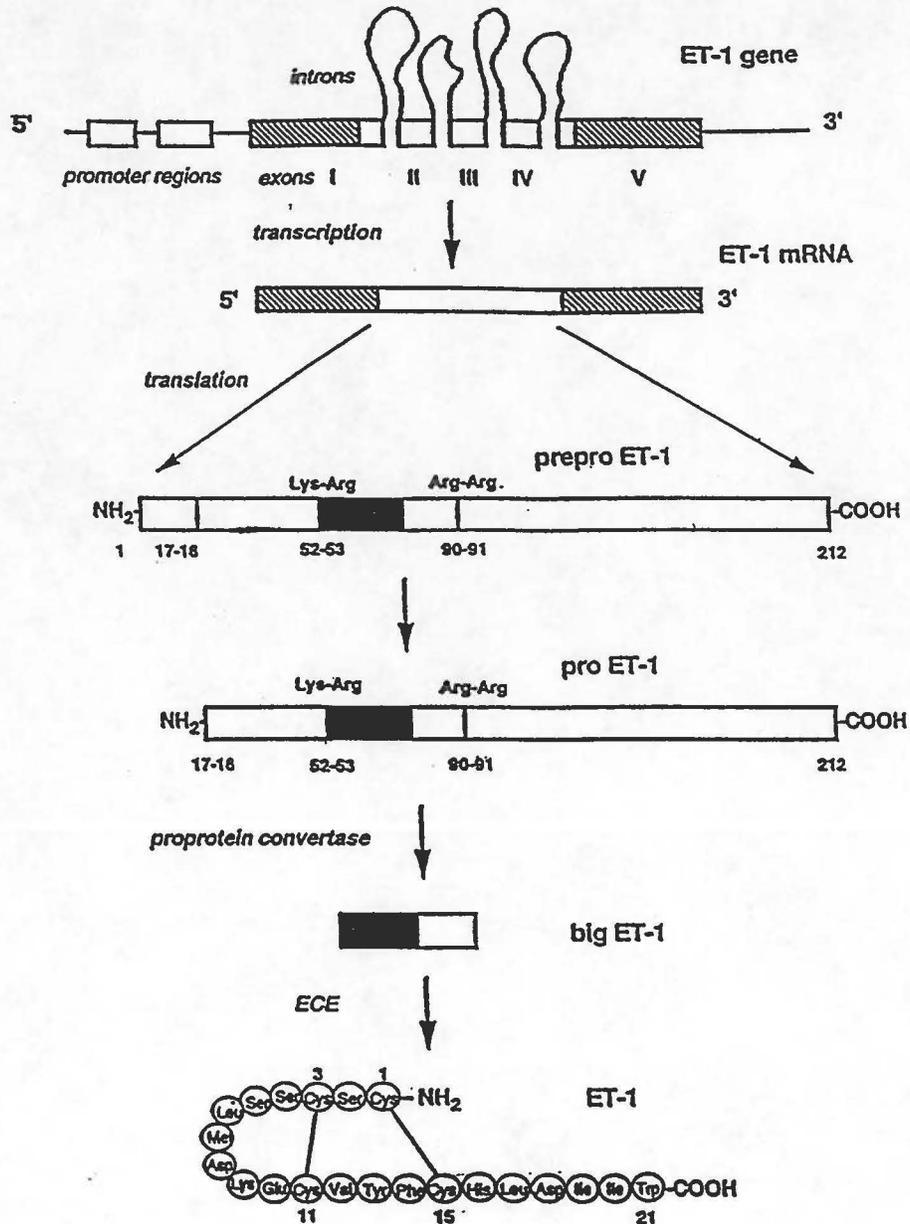


Figure 2 : Biosynthèse de l'endothéline (Gray et Webb 1996).

de l'ECE est observée au niveau de l'endothélium, des ovaires, des testicules et de la médulla surrénale (Ohlstein et al 1996). L'activité biologique de la big-ET est de 250 à 1000 fois moins puissante que l'ET-1, comme agent constricteur de vaisseaux isolés, suggérant alors un rôle clé pour l'ECE dans la biosynthèse des ETs (Battistini, D'orléans-Juste et Sirois 1992 ; D'orléans-Juste et al 1996). Finalement, certaines études ont même suggéré qu'il existerait plus d'un sous-type d'ECE (Ahn et al 1992 ; Shimada et al 1994 ; Patt et al 1997).

Deux ans après la découverte de l'ET, les gènes codant pour les récepteurs médiant ses actions ont été clonés et caractérisés. Le récepteur ET<sub>A</sub> a d'abord été cloné au niveau de bibliothèques d'ADN<sub>C</sub> de poumon de bœuf et de rat, alors que le récepteur ET<sub>B</sub> a pour sa part d'abord été cloné dans des bibliothèques d'ADN<sub>C</sub> de poumon et de cervelet de rat et en plus, dans le génome bovin (Arai et al 1990 ; Sakurai et al 1990 ; Lin et al 1991) (Figure 3). Le récepteur ET<sub>A</sub>, composé de 427 acides aminés chez l'homme, est surtout retrouvé au niveau des cellules musculaires lisses, médiant ainsi les actions vasoconstrictrices de l'ET. Ce récepteur possède une affinité subnanomolaire pour l'ET-1 et l'ET-2 et une affinité de 70 à 100 fois plus faible envers l'ET-3 (D'orléans-Juste et al 1996 ; Gray et Webb 1996). Certains ont même suggéré l'existence de deux sous-types de récepteurs ET<sub>A</sub>, le récepteur ET<sub>A1</sub> qui serait sensible à l'inhibition par le BQ-123, un antagoniste connu de ce sous-type de récepteur et le récepteur ET<sub>A2</sub> qui serait insensible au BQ-123 (Ohlstein et al 1996). Quant au récepteur ET<sub>B</sub>, composé chez l'homme de 442 acides aminés, on le retrouve au niveau de l'endothélium où il produit le relâchement d'oxyde nitrique (NO) et de prostacycline afin qu'il y ait vasodilatation. Il est également retrouvé dans le muscle lisse vasculaire où il est responsable de la vasoconstriction. On a donné le nom de ET<sub>B1</sub> au récepteur retrouvé au niveau de l'endothélium et le nom de ET<sub>B2</sub> à celui retrouvé dans le muscle lisse vasculaire. Ainsi, il existerait donc également deux sous-types de récepteur de type B (Lüscher 1991 ; Ohlstein et al 1996). Ce type de récepteur possède pour sa part une affinité de l'ordre du picomolaire qui est égale envers les trois isoformes de l'ET (Gray et Webb 1996). Le criblage de bibliothèques d'ADN<sub>C</sub>, chez les amphibiens, a permis de découvrir l'existence de deux autres types de récepteur des ETs. Aucun de ces récepteurs n'a par contre encore été cloné dans le génome des mammifères. Le premier, appelé ET<sub>C</sub>, a été cloné au niveau des mélanophores de la peau

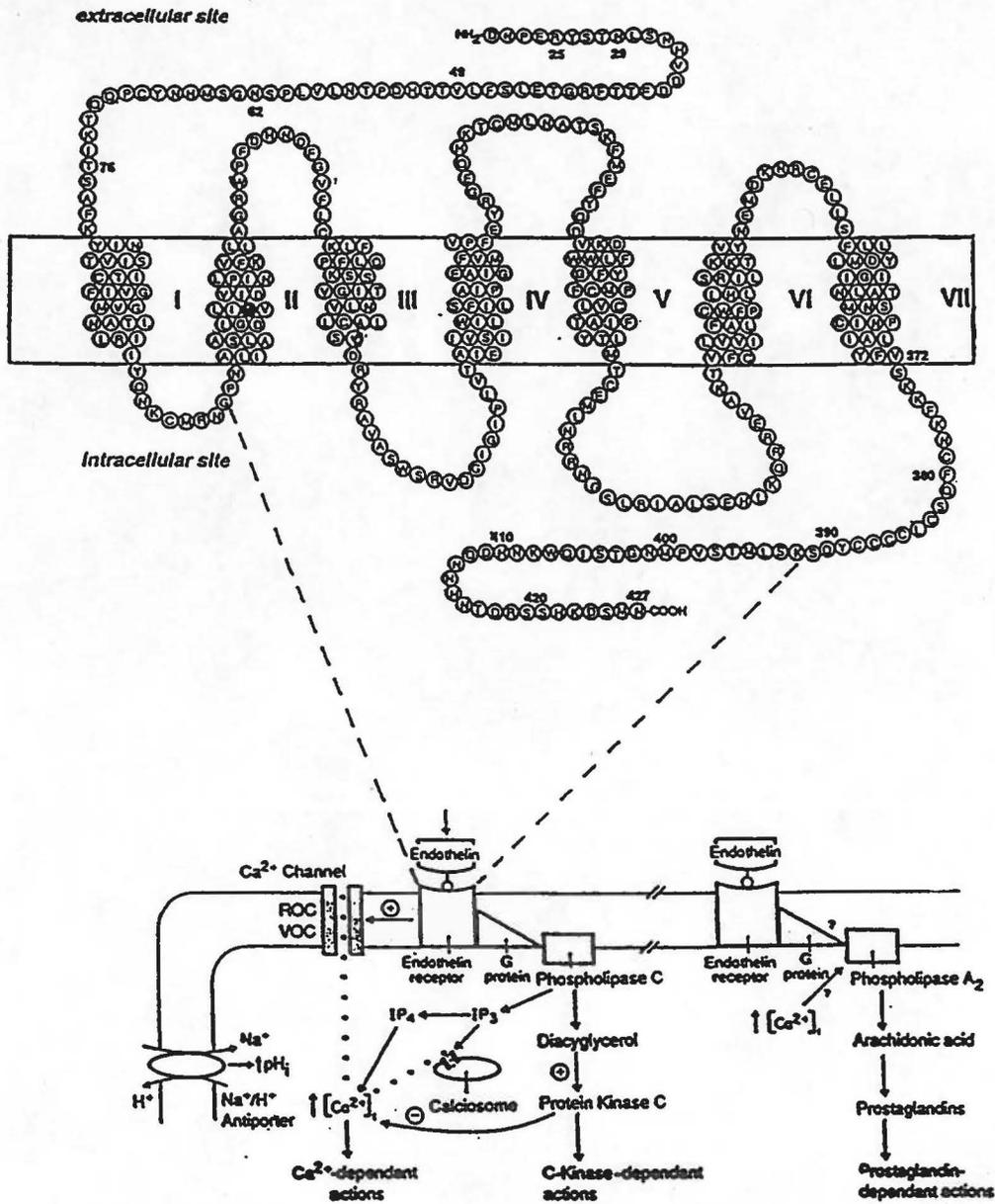


Figure 3 : Le récepteur ET<sub>A</sub> humain (Opgenorth 1995 ; Gray et Webb 1996 ).

de *Xenopus laevis*, une grenouille africaine. Ce récepteur semble plutôt sélectif envers l'ET-3 (Karne et al 1993). Le deuxième a été cloné dans le cœur de cette même grenouille. On l'a nommé ET<sub>AX</sub> puisqu'il présente une haute affinité envers l'ET-1, tout comme le récepteur ET<sub>A</sub> humain, mais par contre, il ne présente aucune affinité envers un antagoniste sélectif de ce même récepteur, le BQ-123 (Kumar et al 1994). Il semblerait alors que ce récepteur (ET<sub>AX</sub>) pourrait représenter une variante du récepteur ET<sub>A</sub> humain chez les amphibiens (Ohlstein et al 1996).

Tous ces récepteurs clonés appartiennent à la superfamille des récepteurs de la rhodopsine. Ce sont des protéines monomériques à sept domaines transmembranaires, comptant chacun de 20 à 27 acides aminés hydrophobes et possédant une structure en hélice alpha, constituant ainsi sept boucles typiques aux récepteurs couplés aux protéines G, et plus spécifiquement à la G<sub>q/11</sub> (Vollmar 1992 ; Bockaert 1996 ; D'orléans-Juste et al 1996). Par le biais des protéines G, les récepteurs activent alors la phospholipase C qui, elle-même, amène la production de deux seconds messagers, l'inositol-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub>, pour sa part, entraîne la libération du calcium intracellulaire emmagasiné au sein du réticulum endoplasmique et des calciosomes, alors que le DAG active les protéines kinases C. Ainsi, c'est par le biais de cette cascade d'événements intracellulaires qu'aboutissent les mécanismes contractiles (muscles) ou sécrétoires (cellules endothéliales) (D'orléans-Juste et al 1996). Des études ont suggéré que les récepteurs de l'ET pouvaient être séparés en deux parties distinctes, une incluant les domaines transmembranaires I, II, III et VII qui serait impliquée au niveau de la liaison du ligand avec son récepteur, et une autre partie comprenant les domaines transmembranaires IV, V et VI qui déterminerait la sélectivité des différents sous-types de récepteurs envers les différents isopeptides (Gray et Webb 1996). Des analyses ont également pu montrer que les caractéristiques du récepteur ET<sub>A</sub> sont différentes de celles du récepteur ET<sub>B</sub> en terme de liaison du ligand et de couplage avec les protéines G (Hashido et al 1993 ; Takasuka et al 1994).

Une fois liée à son récepteur, l'ET produit d'abord un léger effet dépresseur, qui serait dû à un relâchement de prostacycline, d'ANF (atrial natriuretic factor) et du NO au niveau de l'endothélium, pour ensuite produire une phase de constriction longue et

marquée (Lerman et al 1990 ; Vollmar 1992 ; Krämer et al 1994). L'ET-1 présente dans l'endothélium se lierait à ses récepteurs de manière irréversible, puisque l'élimination ou l'échange de ligand à partir du récepteur est en fait très lente aux conditions physiologiques. Ceci expliquerait alors pourquoi ses effets constricteurs possèdent une très longue durée d'action, de l'ordre de plus de soixante minutes (Takasuka et al 1994 ; Gray et Webb 1996).

Chez les mammifères, les récepteurs de l'ET sont largement distribués, non seulement au niveau du système vasculaire mais, ils sont également retrouvés dans d'autres tissus, tels les reins, les poumons, le cœur, les glandes surrénales, le tractus gastrointestinal, le foie, la rate, l'utérus et les systèmes nerveux central et périphérique (Arai et al 1990 ; Lerman et al 1990 ; Masaki et Yanagisawa 1992 ; Vollmar 1992 ; Ishikawa et al 1994 ; Hélyuy et al 1995).

La production de l'ET quant à elle, est régulée au niveau de la transcription de son gène, au sein des cellules endothéliales et également dans les tissus non-vasculaires, tels les poumons, les intestins, les reins, les glandes surrénales, le pancréas, la rate, le cœur, les yeux, le placenta et le système nerveux central, démontrant ainsi l'implication de l'ET dans la régulation d'une variété d'organes et systèmes. Un fait important à noter est la distribution du peptide à l'intérieur de l'organisme qui est très similaire à celle de ses récepteurs, ce qui suggère alors fortement que l'ET est une hormone locale agissant donc de façon paracrine et peut-être même autocrine, plutôt qu'une hormone circulante (Masaki et Yanagisawa 1992 ; Corvol, Alhenc-Gelas et Soubrier 1993 ; Mallat et Lotersztajn 1996 ; Newby et Webb 1997). Il est également connu que dans les cellules endothéliales la transcription du gène de l'ET peut être modulée par divers facteurs, tels la thrombine, l'adrénaline, l'épinéphrine, l'interleukine-1, la noradrénaline, le NPY (neuropeptide-tyrosine), l'acide arachidonique, l'angiotensine II, l'arginine-vasopressine, le TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), le PDGF (platelet derived growth factor), le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), l'ionophore de calcium A23187, l'ionomycine et les esters de phorbol. Les stress mécaniques, tels une coupure, un étirement, une augmentation de la pression transmurale et l'hypoxie ont aussi le même effet. Son relâchement peut par

contre être inhibé par le NO et l'ANF (Yanagisawa et Masaki 1989 ; Lüscher 1991 ; Haynes et Webb 1993 ; Krämer et al 1994 ; Mallat et Lotersztajn 1996). Il semblerait de plus que la production de l'ET pourrait être effectuée principalement du côté basal plutôt que luminal des cellules endothéliales, ce qui pourrait ainsi expliquer les faibles niveaux sanguins mesurés, malgré la forte action vasoconstrictrice observée (Corvol, Alhenc-Gelas et Soubrier 1993). De ce fait, les concentrations plasmatiques du peptide ne donnent peut-être pas une image juste de la situation vasculaire locale (Moreau 1997).

Des études *in vivo* et *in vitro*, réalisées chez le rat et le cobaye, ont montré que l'ET, autant endogène qu'exogène, est rapidement éliminée au niveau de la circulation pulmonaire. On suggère que l'épithélium pulmonaire contiendrait des NEPs qui seraient responsables de la dégradation du peptide (Battistini, D'orléans-Juste et Sirois 1992). Plus récemment, une équipe a suggéré que l'ET ne serait pas seulement métabolisée au sein des poumons mais également au niveau du foie et d'autres organes, tels les reins, par un processus qui serait partiellement dépendant de l'internalisation par le récepteur ET<sub>B</sub>. (Mallat et Lotersztajn 1996 ; Gray et Webb 1996).

L'ET exerce une très grande variété d'effets biologiques, autant dans le système cardio-vasculaire qu'au niveau d'autres tissus ou systèmes (Tableau I). Etant donné toute cette série d'actions, nul doute que l'ET puisse être impliquée dans diverses physiopathologies. Des études ont à ce sujet démontré que les niveaux d'ET sont élevés lors de l'apparition de certaines maladies, tels l'infarctus du myocarde, l'hypertension essentielle et pulmonaire, l'insuffisance cardiaque congestive, l'insuffisance rénale et l'athérosclérose. D'ailleurs, au niveau de cette dernière pathologie, on suggère que le peptide jouerait un rôle dans le processus de resténose, étant donné ses puissantes propriétés mitotiques. On suggère également que l'ET serait impliquée dans le développement d'autres pathologies, tels la cholestase du foie, les vasospasmes cérébraux (maladie de Raynaud, hémorragie subarachnoïde), l'angine instable, le choc septique et le diabète (Mallat et Lotersztajn 1996 ; Ohlstein et al 1996 ; Pernow et al 1996 ; Sedo et Vanickova 1996 ; Newby et Webb 1997 ; Wilcox et al 1997).

Tableau 1 : Actions physiologiques de l'endothéline (Doherty 1992 ; Hutchison 1993).

<b>Tissu ou organe</b>	<b>Effet</b>
<b>Muscle lisse vasculaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Constriction puissante et soutenue</li> <li>-Actions mitotiques</li> <li>-Libération de NO</li> <li>-Vasoconstriction de l'artère coronaire et augmentation de la pression de perfusion</li> </ul>
<b>Muscle lisse non-vasculaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Constriction de l'intestin, de la trachée et du muscle utérin</li> </ul>
<b>Cœur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Augmentation de la contractilité et du rythme cardiaque</li> <li>-Effets positifs inotropes et chronotropes au niveau du myocarde</li> <li>-Libération d'ANP</li> </ul>
<b>Tissu nerveux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Modulation de la libération des neurotransmetteurs</li> </ul>
<b>Reins</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Inhibition de la libération de rénine</li> <li>-Diminution du flux sanguin rénal, du rythme de la filtration glomérulaire et de l'excrétion de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup></li> </ul>
<b>Glandes surrénales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Stimulation de la biosynthèse d'aldostérone</li> <li>-Libération des catécholamines</li> </ul>

Le large éventail des effets biologiques exercés par l'ET dépend en fait de son mode d'action à l'échelle moléculaire, soit la façon avec laquelle cette molécule interagit avec ses différentes sous-classes de récepteurs. Il est alors évident que la structure tridimensionnelle du peptide adoptée dans l'espace joue un rôle pour sa liaison avec les récepteurs et par conséquent au niveau de son activité biologique.

Une variété d'études réalisées par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par dichroïsme circulaire (DC), utilisant divers solvants, ont révélé que l'ET adopte une structure en hélice alpha entre les résidus 9-15 ou 9-16 (Perkins, Hider et Barlow 1990 ; Aumelas et al 1991 ; Kuroda, Yamazaki et Taga 1994 ; Tam et al 1994). Aumelas et ses collègues, en 1991, ont d'ailleurs suggéré, à l'aide de calculs de distance géométrique, que cette hélice est stabilisée par au moins trois liens hydrogène impliquant les résidus 12, 13 et 14. D'autres études en RMN démontrent également la présence d'un coude  $\beta$  de type I entre les résidus 5 et 8 (Perkins, Hider et Barlow 1990 ; Dalgarno et al 1992 ; Kuroda, Yamazaki et Taga 1994 ; Tam et al 1994). La région N-terminale est plutôt globulaire et rigide, dû à la présence des deux ponts disulfures (Kuroda, Yamazaki et Taga 1994). Quant à la région C-terminale hydrophobe (16-21), sa structure est plutôt indéterminée ou flexible, ne lui conférant alors aucune conformation définie (Kuroda, Yamazaki et Taga 1994 ; Tam et al 1994). Les études réalisées par cristallographie ne sont par contre pas concordantes avec celles réalisées par RMN. Ainsi, on suggère que la structure cristallographique du peptide serait plutôt composée d'une extrémité N-terminale contenant un feuillet  $\beta$  avec une protubérance entre les résidus 5 et 7, suivie d'une boucle liée par un lien hydrogène, qui pour sa part serait attachée à une longue hélice irrégulière située au niveau des résidus 9 à 21 (Wallace et Janes 1995 ; Peto et al 1996). Une simulation par la méthode Monte-Carlo a permis de démontrer qu'au niveau tridimensionnelle, la chaîne C-terminale hydrophobe serait étendue le long de l'hélice alpha, située au cœur de la région N-terminale, et que des liaisons hydrophobes seraient formés entre les chaînes latérales des extrémités C- et N-terminales. Les groupements fonctionnels des résidus clés pour l'activité biologique, situés dans la région N-terminale, ne seraient par contre pas recouverts par l'extrémité C-terminale, se trouvant donc exposés à la surface de la molécule (Kuroda, Yamazaki et Taga 1994).

Des études de structure-activité ont montré que certaines caractéristiques retrouvées dans la molécule d'ET jouent un rôle important au niveau de son activité biologique. Il est connu que les extrémités N- et C-terminales doivent être libres (Nakajima et al 1989). La structure bicyclique unique de l'ET, étant donné la présence des deux ponts disulfures, est également très importante pour les actions médiées par les récepteurs ET<sub>A</sub>, puisque l'ouverture de ces liens provoque une très grande diminution de l'activité de l'ET. Il semble par contre que le pont disulfure situé en position 1-15 serait plus important au niveau de l'expression de l'effet biologique de l'ET, puisque l'élimination de ce dernier produit un analogue dix fois moins puissant que celui obtenu après la destruction du pont disulfure situé en position 3-11 (Nakajima et al 1989 ; Aumelas et al 1991 ; Cody et al 1991 ; Hunt et al 1991 ; Masaki et al 1991 ; Dalgarno et al 1992 ; Germain et al 1993 ; Kuroda, Yamazaki et Taga 1994). Il est également à noter que la présence des ponts disulfures, requise pour la liaison au récepteur ET<sub>A</sub> et pour son activation, ne serait pas essentielle au niveau de la liaison et de l'activation du récepteur ET<sub>B</sub> (Ergul, Tackett et Puett 1995 ; Forget et al 1996). Karne et son équipe, en 1993, ont d'ailleurs émis l'hypothèse que le récepteur ET<sub>A</sub> se lierait de façon spécifique au niveau de la région cyclique de l'ET-1. Pour ce qui est du récepteur ET<sub>B</sub>, il semblerait que ce soit la région C-terminale hydrophobe, hautement conservée parmi les isoformes de l'ET, qui serait essentielle à sa liaison et à son activation (Karne et al 1993 ; Forget et al 1996). L'élimination du Trp<sup>21</sup> ou sa substitution par le résidu de conformation absolue D diminue extrêmement l'activité vasoconstrictrice de l'ET alors que l'oxydation de la Met<sup>7</sup> ou sa substitution par la norleucine n'affecte aucunement son activité (Nakajima et al 1989 ; Yanagisawa et Masaki 1989 ; Perkins, Hider et Barlow 1990 ; Aumelas et al 1991 ; Hunt et al 1991 ; Masaki et al 1991 ; Germain et al 1993 ; Kuroda, Yamazaki et Taga 1994). La région chargée de la molécule, soit Asp<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Glu<sup>10</sup>, une autre région hautement conservée parmi les isoformes de l'ET, semble également essentielle pour son activité biologique (Yanagisawa et Masaki 1989 ; Masaki et al 1991 ; Germain et al 1993). Plus spécifiquement, une analyse par balayage au moyen de résidus alanine a démontré que les résidus Asp<sup>8</sup>, Tyr<sup>13</sup>, Phe<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup> et Trp<sup>21</sup> sont majoritairement importants au niveau de l'affinité envers une préparation pharmacologique contenant des récepteurs de type A. On suggère d'ailleurs que les résidus 13, 14 et 21 seraient importants afin que le peptide se lie à son récepteur et que les résidus 8 et 17 seraient plutôt essentiels au niveau de la

transduction du signal, une fois le peptide lié à son récepteur (Tam et al 1994). Hunt et ses collaborateurs, en 1991, ont également suggéré que plusieurs résidus situés entre les positions 8 et 21, tout comme l'extrémité N-terminale libre, contribueraient au niveau de la liaison du peptide avec le récepteur ET<sub>A</sub>. Des analogues à structure réduite de l'ET-1 ont été synthétisés dans notre laboratoire, notamment [Cys(Acm)<sup>3,11</sup>, Trp(For)<sup>21</sup>]- (3-11)-Aca-(17-21)ET, qui s'est avéré être un agoniste partiel au niveau du parenchyme pulmonaire de cobaye, une préparation très majoritairement ET<sub>B</sub>. Malgré l'absence de certaines régions de la molécule entière, le peptide obtenu est tout de même actif, avec par contre une activité diminuée (Forget et al 1996). Bref, plusieurs résultats démontrent alors l'importance de la molécule d'ET entière, avec ses deux ponts disulfures et ses deux extrémités N- et C-terminales libres pour la détermination de sa conformation active (Nakajima et al 1989).

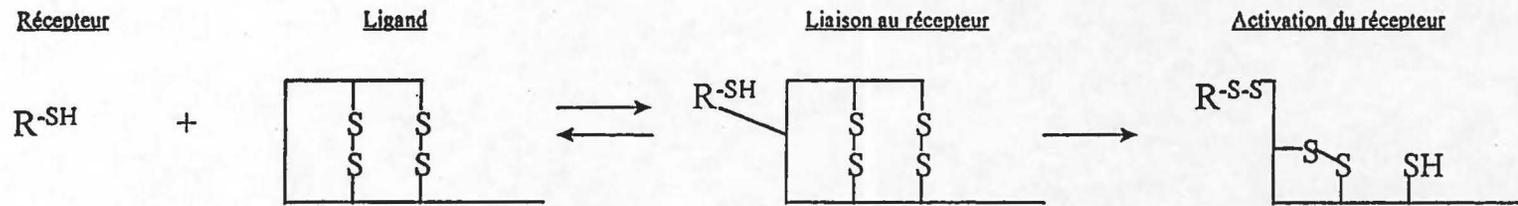
C'est donc par le biais d'études de structure-activité que peut surgir le développement d'analogues de l'ET qui peuvent s'avérer être des agonistes ou des antagonistes de la molécule native. L'utilisation des antagonistes peut donner accès à des informations importantes sur les rôles physiologiques et l'implication de l'ET au niveau de diverses pathologies. De plus, c'est entre autres à partir des antagonistes que d'une façon ultime de nouveaux agents thérapeutiques peuvent être mis au point (Battistini, D'Orléans-Juste et Sirois 1992).

En 1991, Spinella et ses collaborateurs ont vérifié l'importance du pont disulfure externe (1-15) de l'ET en le remplaçant par un lien amide. Plus précisément, ils ont synthétisé le (Dpr<sup>1</sup>, Asp<sup>15</sup>)ET-1 (où Dpr représente l'acide diaminopropionique) qui comportait les deux différences majeures suivantes, comparativement à l'ET-1 : (1) le nombre d'atomes impliqués dans le pont passait de 4 à 3 et (2) il y avait insertion d'un groupement -CH<sub>2</sub>- entre la fonction amine située en N-terminal et le carbone alpha de l'acide aminé N-terminal. De plus, la charge positive en N-terminal (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) était conservée, une caractéristique qui semble importante pour maintenir l'activité biologique de l'ET-1. Cet analogue ne possède aucune activité agoniste au niveau de la vasoconstriction pulmonaire et de la bronchoconstriction chez le cobaye. De plus, le dérivé possède la capacité de se lier aux récepteurs présents dans les cellules musculaires

lisses d'artères pulmonaires de rat en culture, une préparation ET<sub>A</sub>, bien qu'avec une affinité plus faible que la molécule mère ( $EC_{50}$  ET-1 =  $5 \times 10^{-10}$ M,  $EC_{50}$  (Dpr<sup>1</sup>, Asp<sup>15</sup>)ET-1 =  $2 \times 10^{-9}$ M). Ce même analogue monocyclique (lien amide non formé) possède par contre une faible activité vasoconstrictrice au niveau pulmonaire, de l'ordre de 300 à 500 fois plus faible que l'ET-1, mais ne possède pas d'activité antagoniste. Ce dernier peut également se lier aux récepteurs de l'ET-1, situés dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires de rat en culture, avec cependant une affinité encore plus faible que l'analogue bicyclique ( $EC_{50} = 7 \times 10^{-9}$ M).

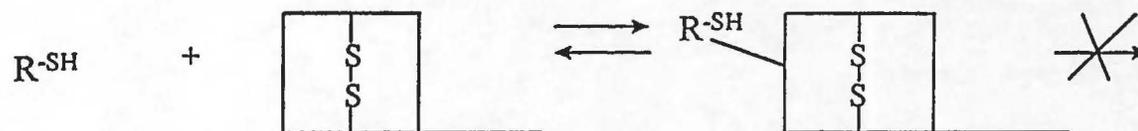
Les récepteurs de l'ET possèdent 19 cystéines au total dans leur séquence. Par conséquent, selon Spinella et ses collaborateurs, il devrait alors y avoir au moins un groupement sulfhydryle pouvant interagir avec un des deux ponts disulfures de l'ET-1, amenant la formation d'un complexe covalent irréversible. Un lien amide remplaçant un des deux ponts disulfures pourrait alors ne pas permettre la formation d'un complexe covalent, ce qui expliquerait ainsi la baisse d'activité pharmacologique observée. D'ailleurs, la présence d'un groupement sulfhydryle accessible au niveau du récepteur a déjà été démontrée par l'observation que ce dernier est sensible à un agent alkylant, l'acide p-chloromercuriphenylsulfonique. De plus, il a également été démontré que la liaison de l'ET-1 à son récepteur est inhibée par le cadmium, suggérant ainsi l'implication d'un lien disulfure entre le récepteur et son ligand. À la lumière de ces études, Spinella et son équipe ont donc proposé un modèle pour l'interaction de l'ET avec son récepteur (Figure 4). Ils ont ainsi suggéré l'existence de deux conformations du peptide, l'une permettant la liaison au récepteur, et l'autre permettant l'activation du récepteur. Selon eux, l'analogue synthétisé serait bloqué à la conformation permettant la liaison au récepteur, incapable de se convertir en l'autre conformation permettant son activation, étant donné l'absence du pont disulfure 1-15. Le fait que l'analogue monocyclique peut provoquer une action vasoconstrictrice au niveau pulmonaire serait, selon eux, dû à une plus grande flexibilité de la molécule une fois liée au récepteur, lui permettant alors de se convertir en la conformation provoquant son activation.

Afin de renforcer davantage les études mentionnées précédemment, ils ont également démontré qu'en présence d'un agent alkylant, le N-éthylmaléimide, la liaison de



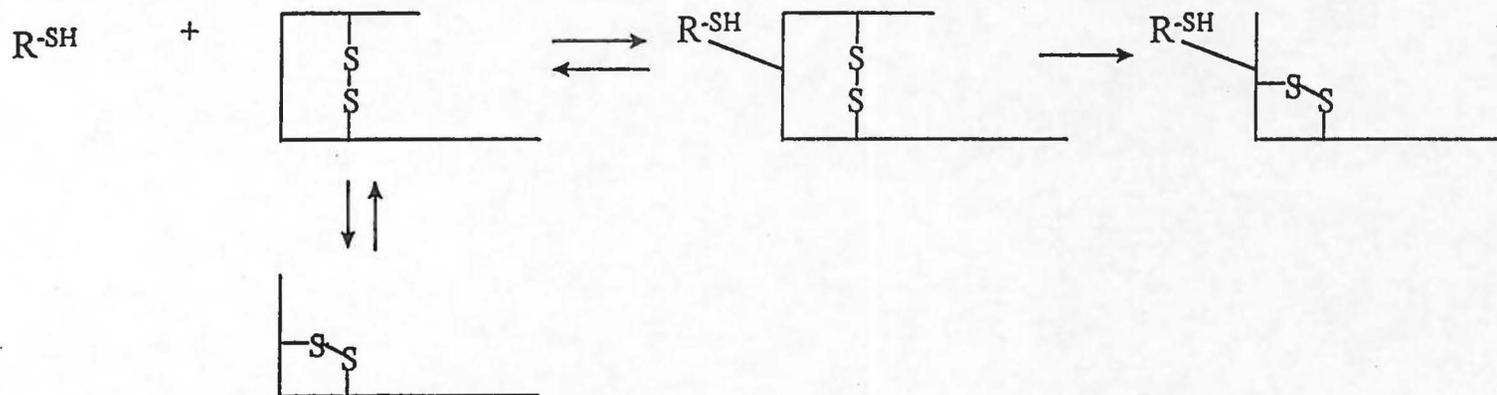
Endothéline native

---



(Dpr<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1

---



Peptide monocyclique

Figure 4 : Modèle proposé de l'interaction ET-récepteur (Spinella et al 1993).

l'ET-1 au récepteur est diminuée, suggérant alors qu'il existe bien un échange de lien disulfure entre les deux. Finalement, selon Spinella et ses collègues, ce ne serait pas le complexe S-S formé entre l'ET et son récepteur qui serait responsable de l'activation mais que cet échange serait une étape intermédiaire nécessaire pour que l'ET puisse activer son récepteur (Spinella et al 1993).

C'est entre autres cette étude qui nous a poussés à effectuer les analogues suivants de l'ET : (Glu<sup>1</sup>, Lys<sup>15</sup>)ET-1, (Glu<sup>1</sup>, Orn<sup>15</sup>)ET-1, (Glu<sup>3</sup>, Lys<sup>11</sup>)ET-1, (Glu<sup>3</sup>, Orn<sup>11</sup>)ET-1, (Glu<sup>1</sup>-Gly-Orn<sup>15</sup>)ET-1 et (Glu<sup>3</sup>-Gly-Orn<sup>11</sup>)ET-1. Nos analogues possèdent alors deux modifications majeures par rapport à l'ET-1 native, soit qu'un des deux ponts disulfures est remplacé par un lien amide et que la formation de ce dernier provoque alors une augmentation du nombre d'atomes formant le lien, d'ailleurs plus élevé que l'analogue formé par Spinella et son équipe, en 1991. L'évaluation des analogues avec l'espaceur glycine est effectuée dans le but de vérifier l'effet de la dimension du cycle sur l'activité biologique de l'ET-1 ainsi que sur son affinité envers ses différentes sous-classes de récepteurs. Une étude semblable a déjà été réalisée auparavant par Campbell, Bongers et Felix, en 1995. Ces derniers ont préparé différents homologues cycliques du GRF (growth hormone releasing factor) contenant de 18 à 24 atomes/cycle. Les analogues contenant de 21 à 24 atomes/cycle ont alors nécessité l'introduction d'un résidu glycine et leur étude a permis de démontrer que l'activité était reliée à la dimension du cycle et à la conformation de la molécule adoptée, lui permettant la liaison à son récepteur. Notamment, les analogues contenant 22 atomes/cycle étaient les plus actifs si on les comparait au GRF natif, dans leur capacité à provoquer la libération de GH (growth hormone) à partir de cellules hypophysaires de rat en culture (Campbell, Bongers et Felix 1995).

La synthèse peptidique et surtout la modification de la conformation native des peptides n'étant pas toujours chose facile, nous avons dû en cours de route réduire le nombre d'analogues de l'ET-1 à synthétiser, tout en optant pour une autre méthode de synthèse. Finalement, nous avons alors décidé de synthétiser les analogues de l'ET-1 suivants : (Lys<sup>1</sup>, Glu<sup>15</sup>)ET-1, (Orn<sup>1</sup>, Glu<sup>15</sup>)ET-1, (Lys<sup>1</sup>, Asp<sup>15</sup>)ET-1 et (Orn<sup>1</sup>, Asp<sup>15</sup>)ET-1, en s'attardant seulement au remplacement du pont disulfure externe ainsi qu'en

positionnant le résidu acide en position 15 et le résidu basique en position 1, un arrangement inverse par rapport aux analogues précédents. Ces nouveaux analogues possédaient alors un arrangement identique à l'analogue de l'équipe de Spinella (1991).

## Matériel et méthodes

### 1. Synthèse et purification des analogues de l'ET-1

#### 1.1 Réactifs et solvants utilisés

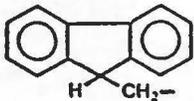
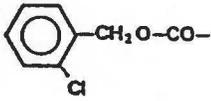
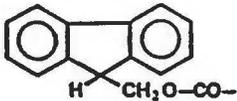
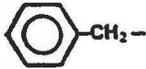
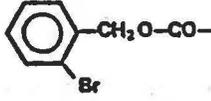
La synthèse des peptides a été effectuée sur une résine PAM (phénylacétamidométhyle pontée avec 1% de divinylbenzène) qui comportait déjà le premier acide aminé situé en position C-terminale des analogues, soit le Boc-Trp(For), à un taux de substitution de 0,58mmole/g (Richelieu Biotechnologies, Montréal, QC). Mis à part le résidu Gly qui possédait un groupement fluorénylméthoxycarbone (Fmoc) comme groupement protecteur de sa fonction amine en alpha, tous les autres acides aminés possédaient, à cette position, un groupement tert-butoxycarbone (Boc). Tous les acides aminés utilisés étaient de configuration absolue L. Tyr(BrZ) provenait de Advanced Chemtech (Louisville, KY). Glu(cHex), Leu, Lys(Fmoc), Orn(Fmoc), Ser(Bzl) et Val ont été achetés de Bachem (Torrance, CA). Asp(cHex) et Cys(4-MeBzl) ont pour leur part été obtenus de Peninsula (Belmont, CA). Ile, Met et Phe provenaient de Propeptide (Vert le Petit, FR). Gly, His(Tos) et Lys(2-ClZ) ont été obtenus de Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC). L'agent de couplage utilisé pendant la synthèse était l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino)-phosphonium (BOP) (Richelieu Biotechnologies, Montréal, QC). L'hexafluorophosphate de O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetraméthyluronium (HATU) et le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt), deux autres agents de couplage, ont été achetés de Applied Biosystems (Foster City, CA). L'hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetraméthyluronium (HBTU) et le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), également des agents utilisés lors des couplages, ont pour leur part été obtenus de Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC). La diisopropyléthylamine (DIEA), l'éthanthiol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$ ) et le m-crésol provenaient de Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI). Les solvants employés, soit le dichlorométhane (DCM), le diméthylformamide (DMF) de qualité A.C.S., l'éthanol dénaturé ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), l'acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) de qualité A.C.S. et de qualité HPLC ainsi que la pipéridine ont été obtenus de Anachemia Canada Inc. (Montréal, QC). L'acide trifluoroacétique (TFA) a été acheté pour sa part de

Halocarbon Products Corporation (River Edge, NJ). L'azote gazeux, nécessaire pour l'agitation des solutions réactionnelles, a été obtenu de Air Liquide (Montréal, QC). Pour terminer, l'acide fluorhydrique (HF) provenait de Matheson Gas Products Inc. (Ottawa, ON).

## 1.2 Choix de la résine et des groupements protégeant les chaînes latérales des acides aminés

En 1963, Bruce Merrifield a introduit la synthèse peptidique en phase solide. Il décida alors d'attacher l'acide aminé C-terminal du peptide à un polymère insoluble, pour ensuite amener la formation de la chaîne peptidique désirée vers l'extrémité N-terminale. A la fin de la synthèse, il est alors possible d'obtenir un peptide avec son extrémité N-terminale libre, suite à un traitement de déprotection et avec également son extrémité C-terminale libre, après un clivage du support polymérique. Un plan de protection orthogonale a été utilisé pour la synthèse de nos dérivés peptidiques, de sorte qu'il soit possible de retirer les groupements protégeant les acides aminés et de cliver le peptide à partir de la résine d'une manière sélective (Stewart et Young 1984). Le groupement Boc protégeant l'amine en alpha des résidus, mis à part le résidu Gly comme déjà mentionné, peut être éliminé en présence d'un acide, généralement le TFA, sans toutefois affecter, ou du moins d'une façon minime, les groupements protégeant la chaîne latérale des acides aminés sensibles. Ces derniers groupements sont pour leur part retirés en présence d'un acide plus fort, le HF, lors du clivage du peptide lié à la résine. Le groupement formyle (For) présent sur le noyau indole du Trp<sup>21</sup> est résistant au HF, de même que le groupement Fmoc protégeant les chaînes latérales des résidus Lys<sup>11, 15</sup>, Orn<sup>11, 15</sup> et l'amine alpha de l'espaceur Gly, tout comme le groupement OFm protégeant les chaînes latérales des résidus Glu<sup>1, 3</sup>. En fait, ces groupements protecteurs peuvent être retirés en présence d'une base, en général la pipéridine, évidemment sans affecter les groupements protégeant les chaînes latérales des autres acides aminés et le lien ester ancrant le peptide à la résine. De cette façon, les résidus impliqués dans la formation du pont lactame peuvent être déprotégés sélectivement et ce dernier peut ainsi être formé alors que le peptide est encore attaché au polymère insoluble. La résine PAM utilisée nous semblait la plus appropriée pour réaliser la synthèse des analogues, sachant que le lien ester ancrant cette dernière au

Tableau 2 : Structure chimique des groupements protégeant les chaînes latérales des acides aminés.

Acides aminés	Groupe protecteur	Abréviation	Structure chimique
Asp et Glu	ester de cyclohexyle	cHex	
Cys	4-méthylbenzyle	4-MeBzl	
Glu	Fluorénylméthyle	Ofm	
His	p-toluène sulfonyle	Tos	
Lys	2-chlorobenzyle-oxycarbonyle	2-ClZ	
Lys et Orn	Fluorénylméthoxy-carbonyle	Fmoc	
Ser	Benzyle	Bzl	
Trp	Formyle	For	HCO-
Tyr	Bromobenzyle-oxycarbonyle	BrZ	

résidu en position C-terminale est résistant autant au TFA qu'à la pipéridine.

### 1.3 Méthode de synthèse de Boc-Glu( $\gamma$ -OFm)

Le produit de départ était le Boc-Glu( $\alpha$ -OBzl). Afin de fixer le groupement OFm au niveau de la chaîne latérale du résidu, 25,7mmoles de ce produit et 24,5mmoles de 9-fluorénylméthanol ont été dissous dans 150mL de DCM, avec agitation. La solution obtenue a été refroidie dans un bain de glace et 0,24mmole de 4-(N, N-diméthylamino)-pyridine y ont été ajoutés. Par la suite, 25,7mmoles de N,N-dicyclohexylcarbodiimide ont été ajoutés par portions, sur une période de 10 min. La solution a ensuite été agitée pendant 1 h, toujours dans un bain de glace. Le précipité de N,N-dicyclohexylurée obtenu a été filtré et le filtrat a été dilué à l'aide de 300mL de DCM. La solution a ensuite été extraite avec 2 x 40mL d'acide citrique 10%, 1 x 40mL d'H<sub>2</sub>O, 2 x 40mL de NaHCO<sub>3</sub> 2.5% et 2 x 40mL d'H<sub>2</sub>O. Les fractions organiques obtenues ont été combinées et séchées à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées pour former un solide huileux. Finalement, une recristallisation à l'aide de méthanol et d'éther de pétrole 60-80 a permis l'obtention du produit désiré.

Nous disposions alors de Boc-Glu( $\alpha$ -OBzl,  $\gamma$ -OFm), un acide aminé n'ayant aucune fonction libre pour réagir. Puisqu'une réaction de couplage implique la liaison entre la fonction carboxyle du nouvel acide aminé à coupler et la fonction amine en alpha du dernier acide aminé assemblé, il fallait alors libérer la fonction carboxyle située en position alpha de ce résidu.

C'est par le biais d'une réaction d'hydrogénation catalytique à l'aide de palladium 10% sur carbone qu'il est possible d'éliminer le groupement benzyle ( $\alpha$ -OBzl). Le produit de départ (5,14g) a été dissous dans du méthanol et ajouté au réacteur contenant déjà le palladium, suspendu dans le méthanol, avec agitation et sous atmosphère d'azote. La réaction d'hydrogénation a ensuite été poursuivie pendant 90 min, à température de la pièce, avec un débit léger et constant de H<sub>2</sub>. Une filtration sur célite a éliminé le catalyseur. Le filtrat a ensuite été concentré par évaporation. Il a été dissous dans de

l'éther et extrait successivement avec 1 X 50mL de NaHCO<sub>3</sub> 2.5%, 1 X 50mL d'H<sub>2</sub>O, 1 X 50mL de NaHCO<sub>3</sub> 2.5% et 1 X 50mL d'H<sub>2</sub>O. Les phases aqueuses ont été mises en commun et le pH a été baissé à 2,0 à l'aide d'acide citrique 10%. Le précipité obtenu a ensuite été extrait à l'aide d'éther. Les fractions organiques ont été combinées et séchées à l'aide de MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées afin de les concentrer. Finalement, une recristallisation à l'aide de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH et d'éther de pétrole 60-80 a permis d'obtenir le produit désiré (4,5g), soit le Boc-Glu( $\gamma$ -OFm). Une chromatographie sur couche mince (TLC) utilisant un mélange de chloroforme : acide acétique : méthanol (98 : 1 : 1) a montré la réussite de la réaction d'hydrogénation.

#### 1.4 Méthode de synthèse des dérivés

Le principe fondamental de la synthèse peptidique en phase solide repose sur le fait que les acides aminés peuvent être assemblés, selon une séquence spécifique, un à la suite de l'autre après le retrait du groupement protégeant leur fonction amine en alpha et ce pendant que l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique est ancrée à une matrice insoluble (Stewart et Young 1984). Avant de commencer la synthèse du produit, il est alors essentiel de procéder à la fixation du premier acide aminé sur la résine. Ceci peut être effectué par le biais de diverses méthodes, selon le type de matrice utilisée. Par contre, la résine que nous avons utilisée possédait déjà le premier acide aminé fixé, puisqu'obtenue commercialement de cette façon, ce qui nous a alors permis de procéder directement au couplage des autres résidus.

##### 1.4.1 Protocole de couplage des résidus

La synthèse des analogues de l'ET-1 a été réalisée de façon manuelle à l'aide d'un appareillage maison, dans des réacteurs silanisés au préalable. La méthode générale avec le réactif BOP a été décrite précédemment par Forest et Fournier (1990). Comme mentionné auparavant, la fonction amine en alpha des acides aminés est protégée par un groupement Boc. Ce dernier peut être éliminé en deux étapes, en utilisant un mélange de TFA 40%, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SH 1%/DCM pendant 5 min, suivi d'un autre traitement de 20 min.

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

ÉTAPE	RÉACTIFS UTILISÉS <sup>a</sup>	TEMPS DE RÉACTION (MIN)
Déprotection	TFA 40%, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> SH 1%/DCM	1 x 5
Déprotection	TFA 40%, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> SH 1%/DCM	1 x 20
Lavage	DCM	2 x 2
Lavage	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	1 x 2
Lavage	DCM	1 x 2
Lavage <sup>b</sup>	DIEA 1%/DMF	1 x 2
Lavage	DMF	1 x 2
Couplage	3 éq de Boc-AA/DMF 3 éq de BOP/DMF 5 éq de DIEA	1 x 45 <sup>c</sup>
Lavage	DMF	2 x 2
Lavage	DCM <sup>d</sup>	2 x 2

<sup>a</sup> Le volume de solvant utilisé est approximativement de 10mL/g de résine.

<sup>b</sup> Le DIEA est omis lorsque le dernier résidu couplé est Glu, de même qu'après l'introduction des acides aminés dont la chaîne latérale est protégée par le Fmoc ou le OFm.

<sup>c</sup> Le temps de couplage a pu dépasser 45 min ; le contrôle des couplages est effectué à l'aide d'un test qualitatif à la ninhydrine.

<sup>d</sup> Les peptides-résines sont conservés dans le DCM entre les couplages.

On obtient une extrémité N-terminale libre chargée positivement, puisque nous sommes en condition acide. Lors de cette réaction, il y a également production d'isobutylène et de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), deux produits gazeux facilement éliminés (Figure 5). L'ajout d'éthanthiol au niveau du mélange de déprotection permet de protéger les résidus sensibles à l'oxydation, tel le tryptophane et la méthionine. Différents lavages utilisant le DCM, le CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH et le DMF permettent ensuite d'éliminer l'excédent de réactifs et les produits secondaires formés. Il est alors possible de procéder au couplage du prochain résidu. Pour s'assurer de l'efficacité de la réaction, les réactifs sont ajoutés en excès. Ainsi, 3 équivalents de Boc-acide aminé et 3 équivalents de BOP sont dissous dans un minimum de DMF et y sont ajoutés 5 équivalents de DIEA, permettant alors une étape concomitante de neutralisation et de couplage (Forest et Fournier 1990). La DIEA, utilisée dans cette étape de synthèse, permet de retirer le proton présent sur la fonction carboxyle du Boc-acide aminé à coupler. La charge négative ainsi obtenue sur l'oxygène de cette fonction carboxyle attaque alors l'ion phosphonium (P<sup>+</sup>) de l'agent de couplage BOP. Il y a formation d'hydroxybenzotriazolate, un sous-dérivé provenant du BOP, et d'un dérivé acyloxophosphonium, provenant de l'action du Boc-acide aminé sur le réactif BOP. Selon Castro et ses collaborateurs (1975), la charge négative présente sur l'oxygène de l'hydroxybenzotriazolate est en mesure d'attaquer la fonction carbonyle du dérivé acyloxophosphonium. Ceci provoque la formation d'un ester actif d'hydroxybenzotriazolate et de l'hexaméthyle phosphoramidate (HMPA). Finalement, la fonction amine déprotégée au préalable peut, par le biais de son doublet électronique, aller attaquer la fonction carbonyle de l'ester actif, ce qui amène alors la formation du lien peptidique (Figure 6). Nous procédons ensuite à divers lavages utilisant le DMF et le DCM, afin de s'assurer d'éliminer toutes traces de réactifs et les produits secondaires formés. La vérification du couplage est réalisée à l'aide d'un test qualitatif à la ninhydrine, lequel est en mesure de démontrer la présence d'amines libres (Stewart et Young 1984). Ce cycle de synthèse est répété le nombre de fois nécessaire à l'obtention de la chaîne peptidique désirée.

#### 1.4.2 Cas spécifique des analogues avec l'espaceur glycine

Pour les dérivés contenant l'espaceur Gly, la méthode de synthèse est légèrement modifiée. Notre méthode de synthèse s'est inspirée de l'étude réalisée par Campbell et son

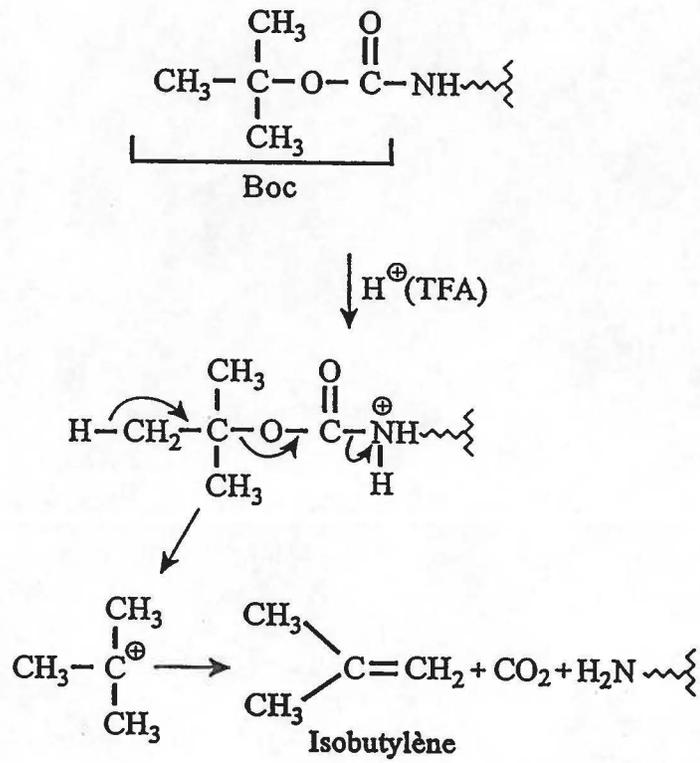


Figure 5 : Réaction de déprotection de la fonction amine en alpha des acides aminés, en chimie Boc.

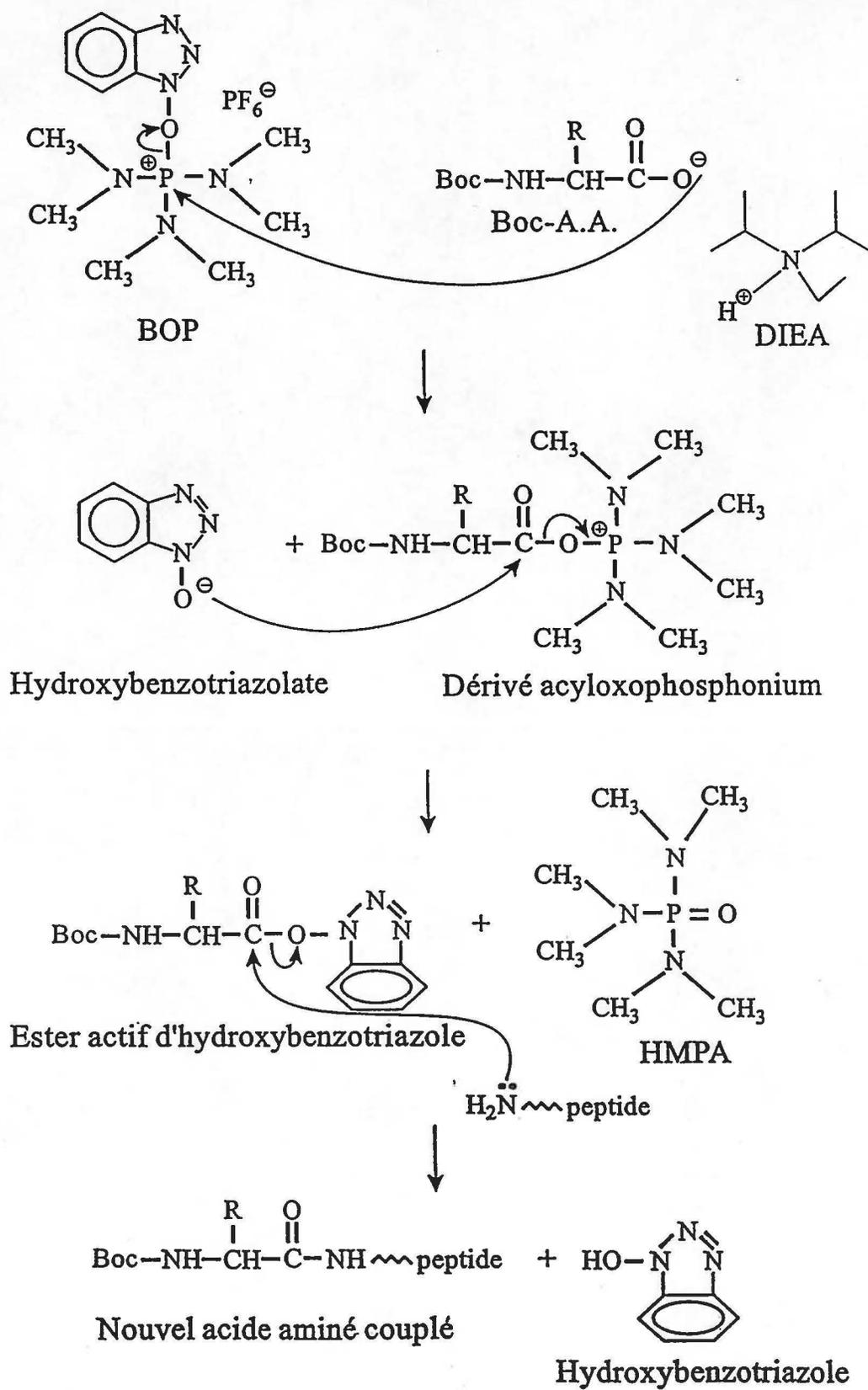


Figure 6 : Réaction de couplage d'un Boc-acide aminé, utilisant la chimie Boc.

équipe en 1995. Le couplage des résidus partant de l'extrémité C-terminale jusqu'au résidu Orn<sup>11</sup> ou Orn<sup>15</sup>, dépendamment de l'analogue, est réalisé selon la méthode décrite dans la section précédente. Une fois rendu à cette position, le groupement Fmoc protégeant la chaîne latérale de l'Orn est éliminé à l'aide de pipéridine 20%/DMF en deux étapes, soit pendant 5 min et 15 min. Ceci entraîne la formation de CO<sub>2</sub> et de fluorénylméthylène alors que la fonction amine présente au sein de la chaîne latérale de l'Orn est maintenant libre. Suite à des lavages utilisant le DMF, le DCM et le CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, il est alors possible de procéder au couplage du résidu Fmoc-Gly-COOH, selon la méthode usuelle. De cette façon, un lien amide est formé entre la fonction carboxyle du résidu Gly et la fonction amine présente au niveau de la chaîne latérale de l'Orn. Par la suite, la méthode de synthèse employée normalement est poursuivie.

#### 1.4.3 Déprotection sélective et formation du pont lactame

Ayant utilisé une protection spécifique au niveau des chaînes latérales des résidus impliqués dans la formation du lien amide, pouvant être éliminée en milieu basique, il est possible de procéder à la formation de ce lien, une fois la chaîne peptidique assemblée sur la matrice insoluble.

Des lavages utilisant le DCM et le DMF sont d'abord réalisés. Les groupements OFm et Fmoc sont ensuite éliminés à l'aide d'un traitement à la pipéridine 20%/DMF d'abord pendant 5 min et finalement pendant 15 min. D'autres lavages employant le DMF, le DCM et le CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH sont ensuite effectués. Un test à la ninhydrine permet de vérifier la réussite de la déprotection. Il est alors possible de procéder à la cyclisation. Le pont lactame étant comme le lien peptidique, une fonction amide, l'usage des agents de couplage usuels est approprié. Ainsi, nous avons tout d'abord utilisé 5 équivalents de BOP dissous dans le DMF, accompagnés de 5 équivalents de DIEA. Un test à la ninhydrine révélant que la cyclisation était incomplète, nous avons alors tenté d'optimiser la réaction en optant pour une combinaison de 0,75 équivalents de HATU et 2,9 équivalents de HOAt dissous dans le DMF, accompagnés de 4,6 équivalents de DIEA. Encore une fois, le test qualitatif à la ninhydrine révélait une cyclisation incomplète. Nous avons alors effectué un test à l'acide picrique (section 3.3.2) lequel permet de quantifier

les amines libres. Comme la première déprotection des chaînes latérales semblait plutôt partielle, nous avons alors répété l'étape de déprotection décrite plus haut. Finalement, l'usage d'autres agents de couplage, soit 10 équivalents de HBTU et 3 équivalents de HOBT dissous dans le DMF, accompagnés de 12 équivalents de DIEA ont permis de finaliser la cyclisation, le tout étant contrôlé par le biais d'un test à la ninhydrine.

Une fois la cyclisation complétée, une étape de déprotection finale, utilisant le TFA 40%,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$  1%/DCM, permet d'éliminer le groupement Boc présent au niveau de l'acide aminé situé en position N-terminale des analogues monocycliques synthétisés. Le peptide-résine est par la suite retiré du réacteur, rincé au DMF, au DCM et finalement au méthanol pour ensuite être séché sous vide. Les peptides-résines sont alors conservés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation ultérieure.

### 1.5 Clivage et déprotection au HF

Le traitement au HF, faisant appel à une réaction de type  $\text{S}_{\text{N}}1$ , permet de séparer les peptides des billes de résine, tout en éliminant les groupements protégeant les chaînes latérales des résidus (cHex, Bzl, Tos, 2-ClZ, 4-MeBzl et BrZ), à l'exception du groupement For protégeant l'indole du Trp<sup>21</sup> (Stewart et Young 1984). Par contre, ce groupement étant éliminé à l'aide d'une base, généralement la pipéridine, il est alors très possible qu'il ait été éliminé lors de l'étape de déprotection préliminaire à la formation du lien amide.

Le peptide-résine est introduit dans un réservoir de Kel-F en présence de m-crésol (1mL/g) et de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$  (0,1mL/g), deux capteurs de carbocations. Le réacteur est refroidi à  $-196^\circ\text{C}$  à l'aide d'azote liquide, afin de condenser le HF à raison de 10mL/g de peptide-résine. La réaction de clivage est alors effectuée, à  $4^\circ\text{C}$ , sous agitation, pendant environ 1 h. Le HF est par la suite évaporé complètement. Le peptide est précipité à l'aide d'éther, trituré avec ce même solvant dans un filtre avec verre fritté et filtré. Le produit est ensuite extrait à l'aide de TFA pur. Le filtrat recueilli, contenant le peptide, est par la suite évaporé et le matériel obtenu est précipité avec une généreuse

quantité d'éther. Le produit est ensuite filtré et lavé à l'aide d'éther et finalement séché sous vide. Le peptide brut est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'étape de purification.

### 1.6 Traitement basique des peptides bruts

Le HF, utilisé pour le clivage des chaînes peptidiques de leur support polymérique et pour éliminer les groupements protégeant les chaînes latérales des résidus, est susceptible de promouvoir un déplacement N vers O ou plutôt une migration acyle au niveau des résidus sérine et thréonine, lors du retrait du groupement Bzl protégeant leur chaîne latérale. Heureusement, cette réaction secondaire est réversible à l'aide d'un traitement basique (Figure 7) (Bodanszky et Martinez 1981). Les analogues de l'ET-1 synthétisés contiennent 3 résidus sérine et nous avons donc décidé d'effectuer un traitement basique sur des échantillons. Ceci nous a alors guidés à effectuer un tel traitement pour les dérivés bruts suivants :  $(\text{Glu}^3\text{Orn}^{11})\text{ET-1}$  monocyclique,  $(\text{Glu}^1\text{-Gly-Orn}^{15})\text{ET-1}$  monocyclique et  $(\text{Glu}^3\text{-Gly-Orn}^{11})\text{ET-1}$  monocyclique. Les peptides (250mg) ont d'abord été dissous dans 4mL de TFA pur et ajoutés goutte à goutte à 2L d' $\text{H}_2\text{O}$  qualité HPLC dégazée contenant 12,5% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  A.C.S. Le pH de la solution a été ajusté à 9,5 avec du  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentré. L'incubation s'est poursuivie sur une période de 30 min, à température de la pièce. Par la suite, le pH a été ajusté à 8,0 à l'aide de TFA pur et du mercaptoéthanol y a été ajouté à une concentration finale de 0,1%, afin de prévenir la formation aléatoire de ponts disulfures qui peut prendre place à un tel pH. La solution a été incubée pendant une autre période de 30 min. Finalement, le pH de la solution peptidique a été ajusté à environ 2,5 avec du TFA pur, avant de procéder à la purification.

### 1.7 Purification des dérivés peptidiques

C'est au moyen de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative en phase inverse, utilisant un système Prep LC500A de Waters auquel est reliée une pompe Waters modèle 590 et un détecteur d'absorbance Waters modèle 441, que nous avons purifié les analogues monocycliques bruts ou ayant subi un traitement basique. Le matériel à purifier (250mg) a d'abord été dissous selon la méthode décrite à la

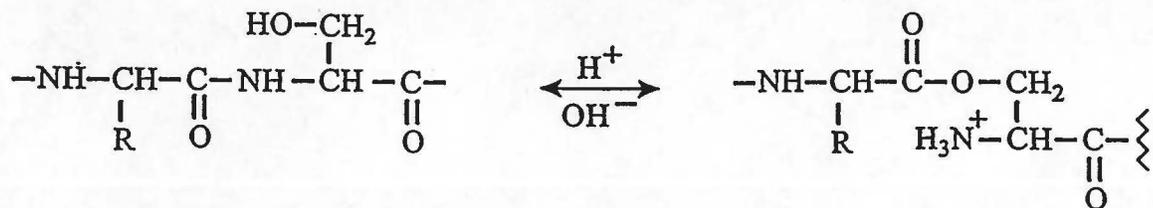


Figure 7 : Déplacement N vers O de la sérine (Bodanszky et Martinez 1981).

section 1.6. Selon l'analogie, la solution obtenue a été injectée sur une résine Waters C<sub>18</sub> (15µm ; 300Å) de 30 x 2,8cm, de 47mm x 30cm ou de 60 x 2,8cm. L'élution a été effectuée à l'aide d'un gradient linéaire de 0% à 100% de (B) en 1 h avec les solvants suivants : (A) H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN 35%/H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%) pour les dérivés (Glu<sup>1</sup>Lys<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique et (Glu<sup>1</sup>Orn<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique et (B) CH<sub>3</sub>CN 40%/H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%) pour les quatre autres dérivés monocycliques synthétisés. Le débit a été fixé à 40mL/min et la longueur d'onde du détecteur a été positionnée à 229nm. L'analyse des fractions recueillies a été effectuée à l'aide d'un système HPLC analytique de Waters, comportant un contrôleur automatisé de gradient et un détecteur Lambda Max modèle 481LC. Les échantillons ont été passés sur une colonne Vydac C<sub>18</sub> de phase inverse (10µm ; 300Å) de 25 x 0,45cm. L'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de 20 à 60% de (B) en 20 min, à un débit de 1,5mL/min, avec les solvants suivants : (A) H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN pur. La longueur d'onde du détecteur était réglée à 230nm. Les fractions correspondant au peptide monocyclique purifié ont été mises en commun, évaporées et lyophilisées. Elles ont ensuite été conservées à -20°C jusqu'à l'étape subséquente.

### 1.8 Bicyclisation et purification des dérivés

La bicyclisation des dérivés permet de former le pont disulfure intramoléculaire entre les deux résidus Cys conservés. Pour ce faire, les peptides monocycliques purifiés ont d'abord été mis en solution, toujours selon la même méthode (section 1.6). Le pH de la solution a été ajusté à 8,0 avec du NH<sub>4</sub>OH concentré. Ensuite, 20 équivalents de ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) ont été ajoutés à cette solution très diluée. La réaction s'est poursuivie pendant 45 min. Le pH de la solution réactionnelle a par la suite été ajusté à environ 4,5-5,0 avec du TFA pur (Germain et al 1993). Cette solution a été injectée sur le système HPLC préparatif, utilisant la résine Waters C<sub>18</sub> de phase inverse (15µm ; 300Å) de 30 x 2,8cm. Un gradient linéaire de 0-100% de (B) en 2 h a été réalisé à l'aide des solvants suivants : (A) H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN 35%/H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%). Les fractions recueillies ont été analysées au moyen du système HPLC analytique, toujours selon le même gradient linéaire. Les

fractions contenant le produit bicyclique pur ont été regroupées, évaporées et lyophilisées. Le matériel a finalement été conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Caractérisation des dérivés de l'ET-1

Les étapes réalisées précédemment ont permis d'obtenir six analogues de l'ET-1 comportant un lien amide substitué à un des deux ponts disulfures normalement retrouvés dans sa structure native.

### 2.1 HPLC analytique

Afin de déterminer la pureté des dérivés obtenus, nous avons entre autres utilisé la HPLC analytique. Les produits ont été injectés sur une colonne Vydac  $\text{C}_{18}$  de phase inverse ( $5\mu\text{m}$  ;  $300\text{\AA}$ )  $25 \times 0,45\text{cm}$ , reliée à un système comportant un contrôleur automatisé de gradient et un spectrophotomètre Lambda modèle 481LC. L'élution, à un débit de  $1\text{mL}/\text{min}$ , a été réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de 20 à 60% de (B) en 20 min où (A) était composé de  $\text{H}_2\text{O}$  contenant du TFA (0,06%) et (B) était du  $\text{CH}_3\text{CN}$  pur. La longueur d'onde du détecteur était fixée à  $230\text{nm}$ .

## 3. Synthèse de nouveaux analogues de l'ET-1

### 3.1 Réactifs et solvants utilisés

Les peptides ont été synthétisés sur une résine de Wang (polystyrène contenant 1% de divinylbenzène, 100-200 mesh) qui comptait 1,12 mequiv. de groupes hydroxyméthyle par gramme (Chem-Impex International, Wood Dale, IL). Tous les acides aminés, de configuration absolue L, possédaient un groupement Fmoc protégeant leur fonction amine- $\alpha$ . Met, Phe et Val ont été obtenus de Advanced Chemtech (Louisville, KY). Asp(allyl), Glu(allyl), Lys(aloc) et Orn(aloc), provenaient de Neosystem (Strasbourg, FR). Asp(tBu), Cys(Trt), Glu(tBu), His(Trt), Leu, Lys(Boc), Ser(tBu), Trp(Boc) et Tyr(tBu) provenaient de Chem-Impex International (Wood Dale, IL). Il a

pour sa part été obtenu de Star Biochemicals Inc. (Torrance, CA). Le N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), l'éthanedithiol (SHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), le chlorure de bis(triphénylphosphine) palladium (II) (PdCl<sub>2</sub>[P(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>), l'hydruure de tributylétain (Bu<sub>3</sub>SnH) et le tétrahydrofurane (THF) provenaient de Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI). Le phénol a été obtenu de Anachemia Canada Inc. (Montréal, QC). Le tert-amyle alcool provenait de J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ) et l'acide acétique (CH<sub>3</sub>COOH) de Baxter Corporation (Toronto, ON). Finalement, l'argon a été obtenu de Alphagaz, division de Air Liquide (Montréal, QC).

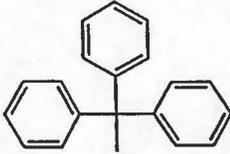
### 3.2 Choix de la résine et des groupements protecteurs des résidus

Encore une fois, une stratégie de protection orthogonale a été utilisée pour la synthèse de ces nouveaux dérivés peptidiques. Le groupement Fmoc protégeant l'amine- $\alpha$  des acides aminés peut être éliminé à l'aide d'une base, en général la pipéridine, sans pour autant affecter le lien ancrant le peptide au support polymérique de même que les groupements protégeant les chaînes latérales des résidus qui pour leur part sont éliminés à l'aide d'un acide, le TFA. Les groupements allyle et aloc, protégeant les chaînes latérales des résidus impliqués dans la formation du pont lactame, sont éliminés en milieu neutre, dans ce cas-ci en présence de palladium. Donc, tout comme dans le premier cas, il est possible de procéder, d'une façon sélective, à la formation du lien amide alors que le peptide est encore attaché à la résine et que les groupements protégeant les chaînes latérales des autres acides aminés sont présents. La résine de Wang répond aux besoins en chimie Fmoc et plus particulièrement à notre stratégie de synthèse.

### 3.3 Fixation du premier acide aminé à la résine

L'attachement du premier acide aminé à la résine de Wang était auparavant réalisé à l'aide d'une méthode utilisant le DCC/diméthylaminopyridine (DMAP). Par contre, on notait des problèmes de racémisation ainsi que la formation de dipeptides, dû au caractère basique du DMAP (Sieber 1987). Maintenant, on utilise une méthode mise au point par Sieber en 1987, employant le chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl comme réactif

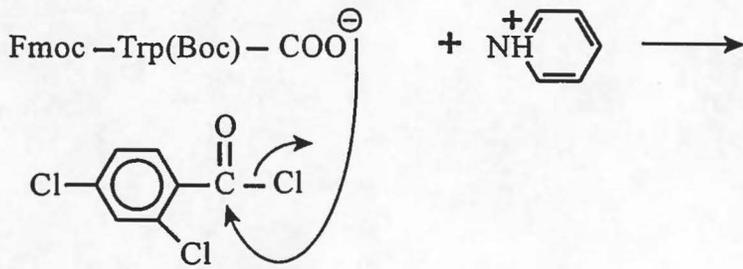
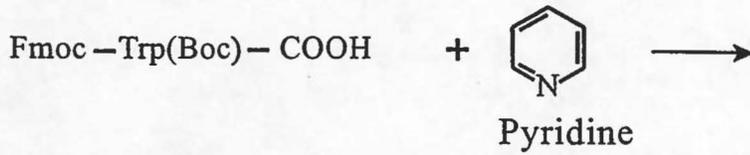
Tableau 4 : Structure chimique des groupements protecteurs des chaînes latérales des résidus sensibles.

Acides aminés	Groupement protecteur	Abréviation	Structure chimique
Asp, Glu, Ser et Tyr	t-butyle	tBu	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Asp et Glu	Allyle	allyl	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$
Cys et His	Trityle	Trt	
Lys et Orn	Allyloxycarbonyle	aloc	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2 \end{array}$
Lys et Trp	t-butoxycarbonyle	Boc	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{O} - \text{CO} - \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

d'estérfication. Cette méthode réduit grandement la racémisation tout en supprimant la formation de dipeptides. Afin de fixer le premier acide aminé à la résine, 2 équivalents d'acide aminé à fixer (Fmoc-Trp(Boc)-OH) ont d'abord été dissous dans 25mL de DMF et la résine y a ensuite été ajoutée (5g). Cette solution a été agitée pendant 15 min. Sous atmosphère d'azote, 3,3 équivalents de pyridine et 2 équivalents de chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl ont été ajoutés au mélange. La réaction a alors été poursuivie pendant 15 à 20 h. En fait, la pyridine utilisée permet d'aller chercher le proton présent au niveau de la fonction carboxyle de l'acide aminé à fixer. La charge négative ainsi obtenue, sur l'acide aminé, attaque la fonction carbonyle du chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl, provoquant alors le départ d'un ion chlorure, alors capté par la pyridine chargée positivement. Un des deux doublets électroniques présents sur l'oxygène des groupes hydroxyméthyle attachés au support polymérique va attaquer la fonction carbonyle du résidu d'acide aminé maintenant fixé au 2,6-dichlorobenzoyl pour amener la formation d'un lien ester entre le groupement hydroxyméthyle sur la résine et le résidu d'acide aminé (Figure 8). Des lavages utilisant le DMF ont ensuite été réalisés, permettant l'élimination de l'acide aminé et des réactifs. Afin de couvrir les sites hydroxyméthyle de la résine n'ayant pas réagi, une étape de recouvrement a été réalisée. La résine a été remise en suspension dans 40mL de DMF. Sous atmosphère d'azote, 2mL de pyridine ainsi que 2mL de chlorure de benzoyl y ont été ajoutés et la réaction s'est poursuivie pour 2 h. L'atome d'oxygène des groupes hydroxyméthyle va attaquer la fonction carbonyle du chlorure de benzoyl pour provoquer le départ d'un ion chlorure. Ceci permet alors la formation d'un lien ester entre les groupements hydroxyméthyles sur la résine et le benzoyl (Figure 9). Finalement, plusieurs lavages ont été réalisés au moyen du DMF, du méthanol et du DCM (Sieber 1987). La résine a ensuite été séchée sous vide.

### 3.3.1 Test pour déterminer la substitution de la résine

Ce test a été réalisé avec 10mg de résine sèche. La résine a été mise en suspension dans 3mL de pipéridine 20%/DMF et agitée fortement pendant 3 min. Ce traitement permet l'élimination du groupement Fmoc, présent au niveau de la fonction amine de l'acide aminé nouvellement fixé à la résine, qui passe ainsi en solution. La densité optique de la solution est alors mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, à 290nm,



Chlorure de 2,6- dichlorobenzoyle

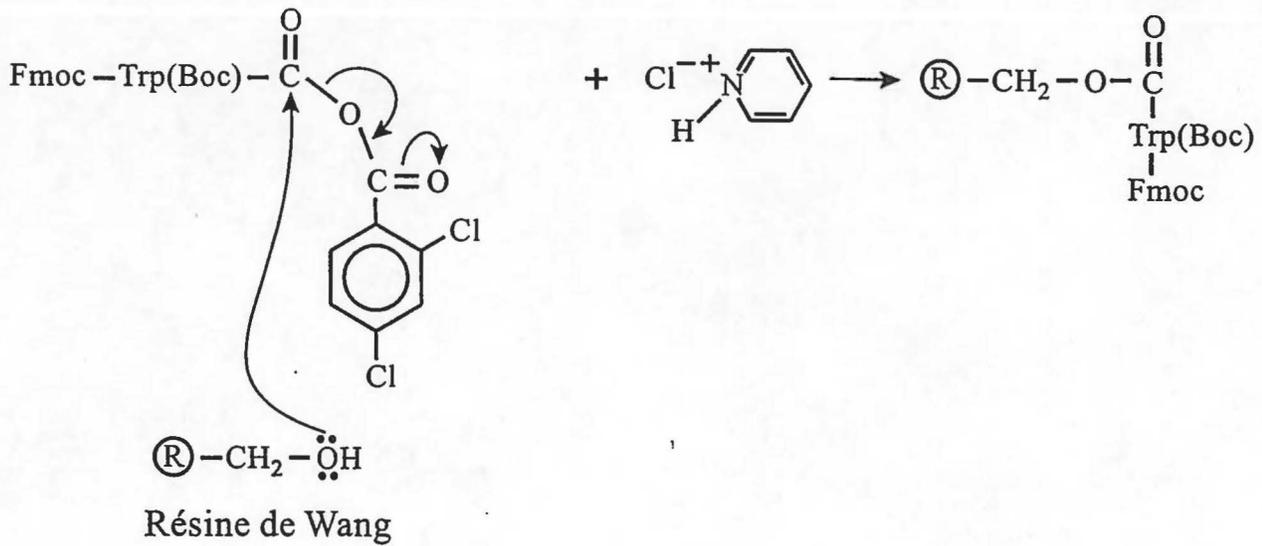


Figure 8 : Fixation du premier acide aminé à la résine.

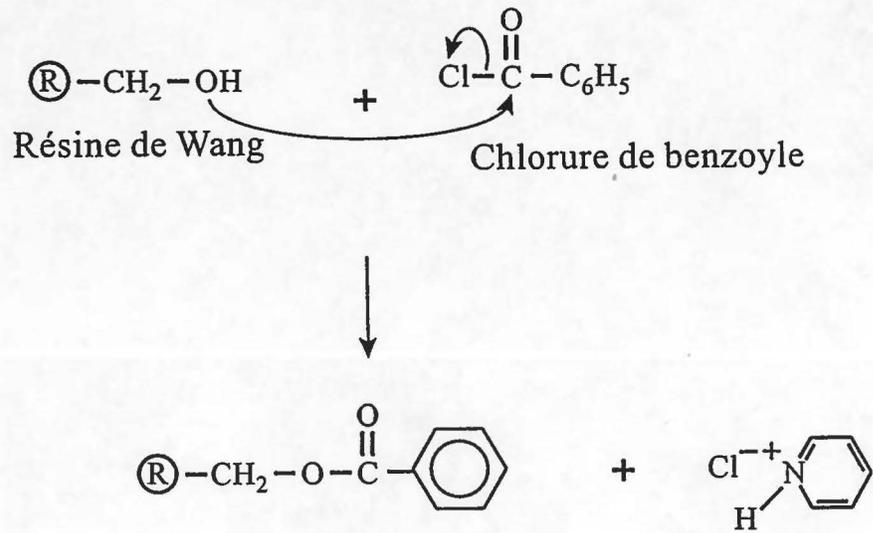


Figure 9 : Recouvrement des sites hydroxyméthyle n'ayant pas réagi.

une longueur d'onde où le groupement fluorénylméthylène, formé par le départ du Fmoc sous l'action de la pipéridine, absorbe. La substitution de la résine est déterminée à l'aide de la formule mathématique suivante :

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

### 3.3.2 Test à l'acide picrique

Afin de réaliser ce test, 20mg de résine sèche ont été pesés et introduits dans une colonne munie d'un robinet. Dans un premier temps, il faut procéder à la déprotection de l'amine- $\alpha$  du Fmoc-Trp(Boc). La méthode suivante est alors effectuée : lavage de la résine avec 3 x 4mL de DMF, suivi de 1 x 4mL de pipéridine 20%/DMF. Par la suite, 4mL de pipéridine 20% sont ajoutés dans la colonne et la réaction est poursuivie pour 20 min. La deuxième étape comporte des lavages et une préparation à la formation d'un complexe. Pour ce faire, le protocole suivant est appliqué : laver avec 1 x 4mL de pipéridine 20%, 5 x 3mL de DCM, 2 x 4mL de DCM : dioxane (1 :1), 4 x 3mL de DCM et 2 x 4mL de DIEA 5%/DCM. Par la suite, 4mL de DIEA 5% sont ajoutés à la colonne pour une période de 5 min. Il faut ensuite procéder à la formation d'un complexe entre l'acide picrique et l'amine- $\alpha$  du résidu, en rinçant avec 5 x 3mL de DCM, 1 x 4mL d'acide picrique 0,05M/DCM, pour finalement ajouter 4mL d'acide picrique 0,05M pour une période de 10 min. Il faut par la suite effectuer un lavage de l'excès d'acide avec 4 x 3mL de DCM, 4 x 3mL de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH absolu et encore 4 x 3mL de DCM. L'ajout de 10mL de DIEA 5% permet alors de décrocher l'acide picrique lié électrostatiquement à l'amine- $\alpha$  qui est recueilli dans une fiole jaugée de 100mL. La résine est ensuite lavée jusqu'à disparition de la couleur jaune à l'aide de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH absolu, également recueilli dans la fiole jaugée. Le volume est finalement complété à 100mL, toujours avec le même solvant. L'absorbance est alors lue à 358nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. La formule suivante permet de calculer le taux de substitution de la résine :

$$\text{substitution (mmole/g)} = \frac{\text{absorbance} \times 1000 \times 10 \times 10}{16250 \times \text{poids pesé (mg)}} \quad (\text{Gisin 1972}).$$

### 3.4 Méthode de synthèse des peptides

La stratégie de synthèse utilisant la chimie Fmoc repose sur le même principe de base que celle utilisant la chimie Boc. Les deux différences majeures retrouvées en chimie Fmoc par rapport à la chimie Boc sont que 1) l'amine- $\alpha$  des résidus est protégée par un groupe fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) qui est éliminé en milieu basique plutôt qu'en milieu acide comme dans le cas du t-butoxycarbonyle (Boc) et 2) le clivage du peptide des billes de résine, tout comme la déprotection des chaînes latérales des acides aminés sont réalisés à l'aide de l'acide trifluoroacétique (TFA), plutôt qu'avec l'acide fluorhydrique (HF).

#### 3.4.1 Protocole de couplage des acides aminés

L'acide aminé en position C-terminale ayant été fixé à la résine, il est alors possible d'effectuer le couplage des autres acides aminés. Comme dans le premier cas, la synthèse des analogues a été réalisée de façon manuelle dans des réacteurs silanisés au préalable, selon un protocole décrit par Atherton et Sheppard (1989).

Le groupement Fmoc protégeant l'amine- $\alpha$  des résidus est éliminé en deux étapes à l'aide de pipéridine 20%/DMF pour 2 min et pour 15 min. L'élimination de ce groupement permet d'obtenir une extrémité N-terminale libre sous forme neutre. Comme déjà mentionné auparavant, il y a également production de  $\text{CO}_2$  et de fluorénylméthylène, deux produits facilement éliminés (Figure 10). Par la suite, les divers lavages utilisant une combinaison de DMF et de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  permettent d'éliminer les réactifs utilisés ainsi que les produits secondaires formés. Arrive ensuite le couplage du prochain acide aminé qui est réalisé en ajoutant 3 équivalents de Fmoc- acide aminé, 3 équivalents de HBTU et 1 équivalent de HOBt tous dissous dans un minimum de DMF et accompagnés ensuite de 3 équivalents de DIEA. Comme dans le cas de la synthèse en chimie Boc, le DIEA permet d'obtenir une charge négative au niveau de la fonction carboxyle du Fmoc-acide aminé à coupler. Cette charge négative peut ensuite aller attaquer l'ion uronium ( $\text{C}^+$ ) du HBTU, ce qui amène la formation d'hydroxybenzotriazolate et d'un dérivé acyloxouronium. La

Tableau 5 : Cycle de couplage d'un acide aminé utilisant la chimie Fmoc.

ÉTAPE	RÉACTIFS UTILISÉS <sup>a</sup>	TEMPS DE RÉACTION (MIN)
Déprotection <sup>b</sup>	Pipéridine 20%/DMF	1 x 2
Déprotection	Pipéridine 20%/DMF	1 x 15
Lavage	DMF	2 x 2
Lavage	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	1 x 2
Lavage	DMF	2 x 2
Couplage	3 éq Fmoc-AA/DMF 3 éq HBTU/DMF 1 éq HOBT/DMF 3 éq DIEA	1 x 30 <sup>c</sup>
Lavage	DMF	2 x 2
Lavage	DCM	2 x 2
Lavage	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	2 x 2
Lavage	DCM	1 x 2
Lavage	DMF <sup>d</sup>	2 x 2

<sup>a</sup> Le volume de solvant utilisé est approximativement de 10mL/g de résine.

<sup>b</sup> Lorsque Glu est l'acide aminé précédemment couplé, la déprotection est plutôt effectuée à l'aide de pipéridine 50%/DMF, pour 10 min.

<sup>c</sup> Le temps de couplage a dépassé 30 min dans certains cas ; le contrôle des couplages est effectué à l'aide d'un test à la ninhydrine.

<sup>d</sup> Les peptides-résines sont par contre conservés dans le DCM, entre les différents couplages.

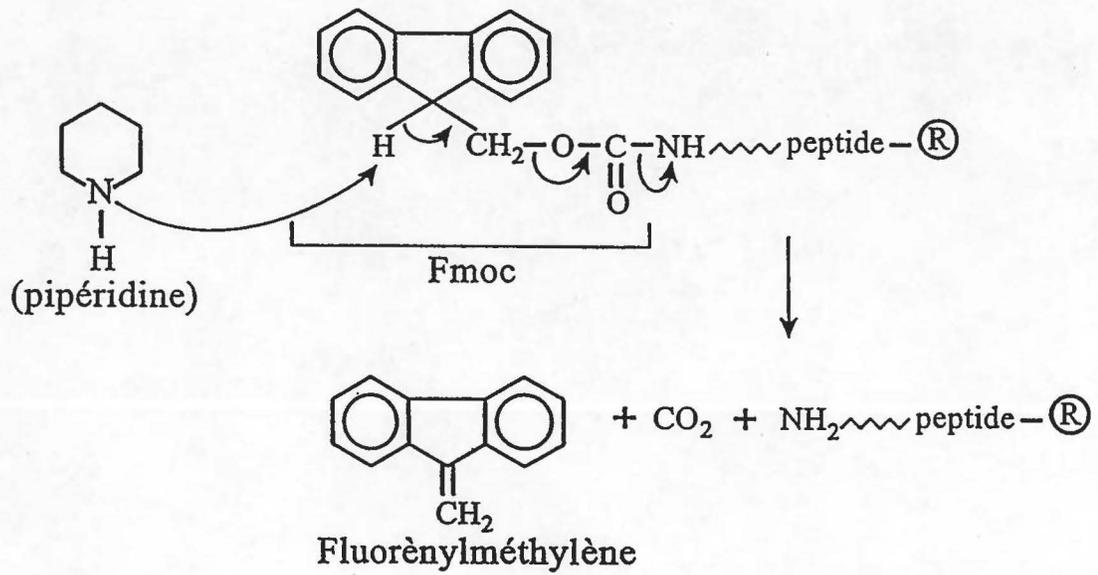


Figure 10 : Réaction de déprotection de la fonction amine- $\alpha$  des résidus, en chimie Fmoc.

charge négative de l'hydroxybenzotriazolate peut alors attaquer la fonction carbonyle du dérivé acyloxouronium afin de former un ester actif d'hydroxybenzotriazolate et du N,N-diméthylurée. L'ajout d'un équivalent de HOBt permet donc d'accélérer la réaction de couplage, soit la formation de l'ester actif. La fonction amine déprotégée auparavant peut attaquer la fonction carbonyle de l'ester actif pour finalement amener la formation du nouveau lien peptidique (Figure 11). Divers lavages utilisant du DMF, du DCM et du  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  permettent l'élimination de toute trace de réactif ainsi que les produits secondaires formés. Encore une fois, la réussite du couplage est contrôlée à l'aide d'un test qualitatif à la ninhydrine. Ce cycle de synthèse est alors répété le nombre de fois nécessaire à l'obtention de la chaîne peptidique désirée.

### 3.4.2 Cas spécifique du couplage de Fmoc-Cys(Trt)

Lors de la synthèse conventionnelle utilisant la chimie Fmoc, il est connu que le DIEA utilisé pendant la réaction de couplage provoque la racémisation de Fmoc-Cys(Trt) et ce en quantité considérable. Cette racémisation peut par contre être pratiquement éliminée en procédant à une méthode de couplage n'utilisant pas cette amine tertiaire (Kaiser et al 1996). Ainsi, la formation d'anhydrides symétriques permet de pallier à cette situation. Après l'étape de déprotection, on procède aux lavages usuels sauf qu'en dernier lieu, un lavage au DCM remplace le lavage au DMF. Il est alors possible de procéder au couplage du résidu Cys sous la forme d'un anhydride symétrique, réalisé selon le protocole suivant : 2 équivalents de DCC et 4 équivalents de Fmoc-Cys(Trt) sont ajoutés à 20mL de DCM. Le tout est alors placé dans un bain de glace, sous agitation et sous atmosphère d'azote, pour une période de 5 min. Un précipité de dicyclohexylurée est formé et donc ensuite filtré. Le filtrat, contenant l'anhydride symétrique, est utilisé pour la réaction de couplage. En fait, la fonction amine déprotégée au préalable peut aller attaquer une des fonctions carbonyles de l'anhydride symétrique pour amener la formation du lien peptidique (Figure 12). De ce fait, 1 équivalent de Fmoc-acide aminé est perdu lors de la formation du lien. Une fois la réaction complétée, des lavages utilisant le DCM et le  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  sont effectués. C'est toujours le test à la ninhydrine qui permet de vérifier la complétion de la réaction de couplage.

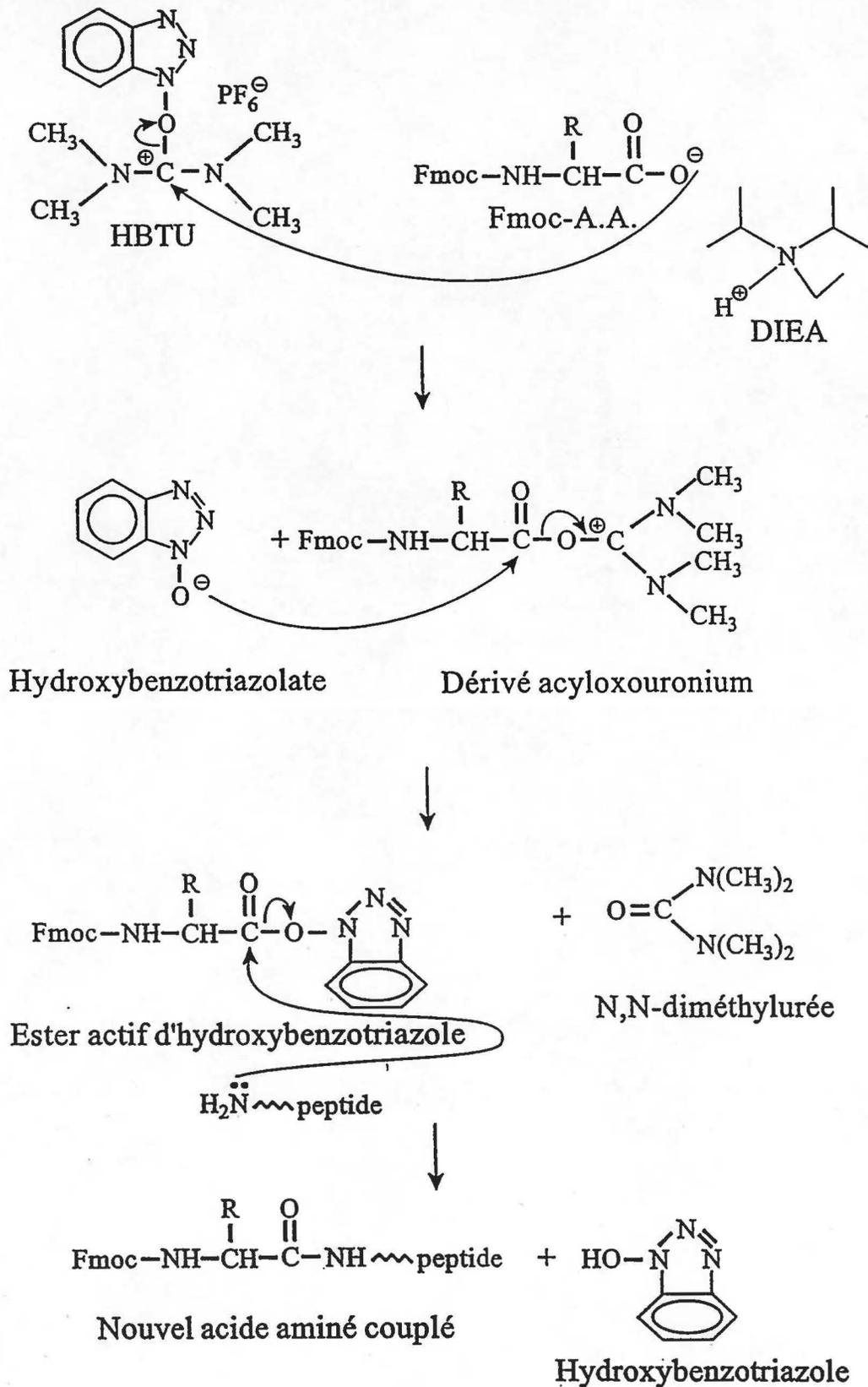


Figure 11 : Réaction de couplage en chimie Fmoc.

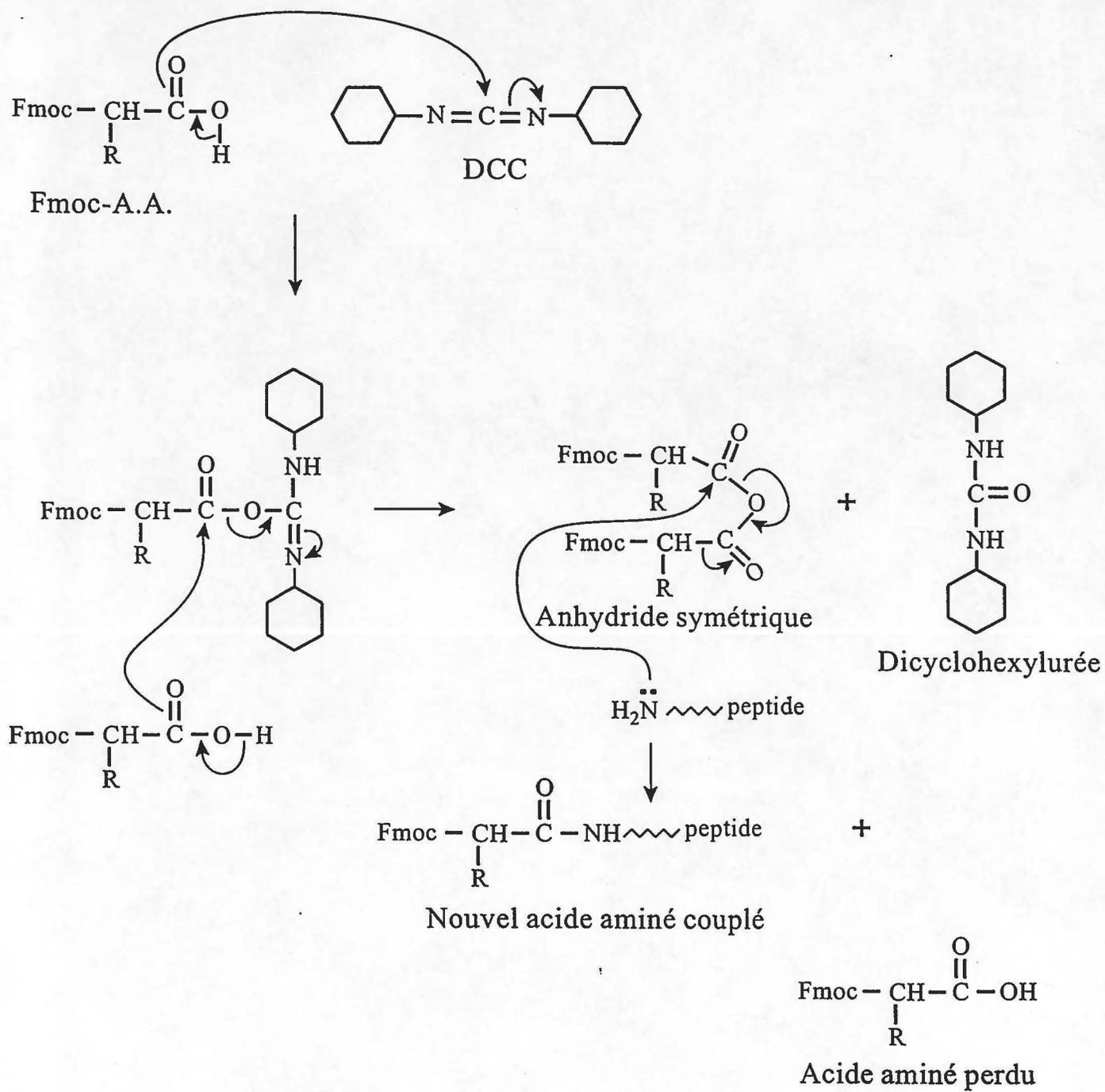


Figure 12 : Formation d'anhydrides symétriques pour le couplage du résidu cystéine.

### 3.4.3 Déprotection sélective et formation du lien amide

Suite à un lavage utilisant le DCM, l'élimination sélective des groupements allyle et aloc est réalisée, en effectuant une réduction à l'aide du palladium comme catalyseur. Le protocole emploie une combinaison de 0,05 équivalent de  $\text{PdCl}_2[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_2$  dissous dans le DCM, accompagné de 3 équivalents de  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ , prélevés sous atmosphère d'argon, ainsi que 3 équivalents de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Comme mentionné, le dérivé de palladium agit comme catalyseur alors que le  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  est un nucléophile qui capte les groupements libérés et finalement, le  $\text{CH}_3\text{COOH}$  agit comme donneur de proton, étant donné que l'on assiste à une réaction de réduction. Ce traitement est réalisé en quatre périodes de 20 min. Des lavages utilisant le DCM et le  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  permettent ensuite d'éliminer toute trace de réactif et de catalyseur (Lu et Felix 1994). Suite à ce traitement, un test quantitatif à l'acide picrique (section 3.3.2) n'a par contre montré qu'une déprotection partielle au niveau des chaînes latérales des résidus, ce qui nous a forcé à reprendre le traitement. Un traitement pour deux périodes de 20 min a d'abord été réalisé, suivi de lavages au DCM et au DMF. Un autre traitement a ensuite été repris en utilisant par contre le DMF comme solvant remplaçant le DCM, pour trois périodes de 20 min. Des lavages utilisant le DMF, le DCM et le  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  ont finalement été réalisés. Un test à l'acide picrique ne révélant encore une fois qu'une déprotection partielle, le traitement a été repris en utilisant le THF comme solvant, tout en augmentant la quantité de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  à 4 équivalents et celle de  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  à 15 équivalents, pendant environ 15 h. Divers lavages utilisant le DCM, le DMF et le  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$  0.5%/DMF ont ensuite été réalisés. Un test à l'acide picrique démontrait une réaction quasi complète mais un échantillon de produit brut, obtenu après clivage, semblait douteux. Nous avons alors décidé de reprendre un autre traitement sur 1/10 des peptides-résines, en utilisant évidemment 1/10 des réactifs utilisés lors du dernier traitement, toujours avec le THF comme solvant, pour une période d'environ 15 h. Des lavages utilisant le THF, le DCM, le DMF, le diméthylsulfoxyde (DMSO) 1%/DMF et le HOBt 1%/DMF ont finalement été réalisés.

Le lien amide a été formé sur des échantillons de peptide-résine (environ 1/10 des peptides-résines) ayant subi seulement trois traitements de réduction au palladium. Nous avons d'abord utilisé 6 équivalents de HBTU et 2 équivalents de HOBt dissous dans le

DMF, ainsi que 6 équivalents de DIEA. Les réactifs ont été renouvelés à deux reprises (1/2 quantité) sans effectuer aucun lavage. Finalement, des lavages ont été réalisés à l'aide de DMF, de DCM et de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ . Un test à la ninhydrine a permis de contrôler la complétion de la réaction de cyclisation.

Une fois la cyclisation complète, une étape de déprotection finale, à l'aide de pipéridine 20%/DMF pour des périodes de 2 min et 15 min, a permis d'éliminer le groupement Fmoc présent au niveau de l'amine- $\alpha$  du résidu N-terminal des divers analogues préparés. Le peptide-résine a alors été rincé à l'aide de DMF, de tert-amyle alcool, de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  et de méthanol, pour ensuite être séché sous vide. Ces divers lavages préparent le produit au clivage, éliminant toute trace de DMF qui possède un effet inhibiteur au niveau de l'acidolyse.

### 3.5 Clivage et déprotection au TFA

Le TFA permet d'éliminer les groupements protégeant les chaînes latérales des acides aminés (Trt, tBu et Boc), de même que la séparation des peptides à partir des billes de résine. Pendant le clivage, le groupement Boc protégeant l'indole du Trp est transformé en un intermédiaire N-in-carboxyle relativement stable, qui lui-même assure une protection contre les problèmes d'alkylation de ce résidu. Les traitements aqueux réalisés subséquemment permettent la décarboxylation, régénérant alors le Trp.

Le peptide-résine est introduit dans un ballon de verre en présence de  $\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$  (2,5%) et de phénol (3%), des capteurs de carbocations. A ceci est également ajouté du TFA (92%) ainsi que de l'eau (2,5%). La solution de clivage est utilisée à raison de 10-25mL/g de peptide-résine. La réaction est alors poursuivie pour 2 h, sous agitation et sous atmosphère d'azote. Le tout est ensuite filtré et rincé à l'aide de TFA. Le filtrat recueilli est par la suite évaporé pratiquement à sec et le produit est ensuite précipité à l'aide d'une généreuse quantité d'éther. Après un repos d'environ 15 min, le produit est filtré et lavé à l'éther, puis finalement séché sous vide. Le peptide brut est conservé à  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4. Synthèse d'autres dérivés de l'ET-1

La fixation du premier acide aminé, le test pour déterminer la substitution de la résine de même que le protocole de couplage des acides aminés ont été réalisés selon les méthodes décrites respectivement au niveau des sections 3.3, 3.3.1-2 et 3.4.1-2.

##### 4.1 Réactifs et solvants utilisés

Les acides aminés ainsi que le type de résine utilisés sont identiques à ceux mentionnés à la section 3.1. Le 2-méthylindole, la N-méthylmorpholine (NMM), le diéthylthiocarbamate sodique et le tetrakis(triphényl)phosphine palladium ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ) provenaient de Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI). Le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) a été obtenu de Anachemia Canada Inc. (Montréal, QC).

##### 4.2 Déprotection sélective suivie de la formation du lien amide

La méthode de déprotection sélective précédente n'ayant pas fonctionné (discuté ultérieurement), nous avons alors décidé d'opter pour une autre méthode mise au point par Kates et son équipe en 1993. C'est encore le palladium qui est utilisé comme catalyseur, mais cette fois-ci sous la forme d'un dérivé différent.

Les groupements allyle et aloc sont éliminés selon le protocole suivant : au peptide-résine, 3 équivalents de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  sont ajoutés en plus du mélange  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  : NMM (37 : 2 : 1), à raison de 15mL/g de peptide-résine, sous atmosphère d'argon. La réaction est poursuivie pendant 2 h, avec agitation douce occasionnelle. Des tests réalisés au préalable au niveau des acides aminés individuels ont permis de déterminer les conditions optimales de la réaction. Des lavages à l'aide de 3 x 15mL de DIEA 5%/DMF, 3 x 15mL de diéthylthiocarbamate sodique 0,5%/DMF et 3 x 15mL de DMF sont ensuite effectués afin d'éliminer le catalyseur. A l'aide d'un test à la ninhydrine, il est alors possible de vérifier la réussite de la réaction de déprotection. La formation du pont lactame peut ensuite être effectuée.

Suite à plusieurs essais à l'aide de divers agents de couplage notamment, une combinaison de 3 équivalents de HBTU et 1 équivalent de HOBt dissous dans le DMF, accompagnés de 3 équivalents de DIEA, 3 équivalents de BOP dissous dans le DMF en plus de 3 équivalents de DIEA, 3 équivalents de BOP dissous dans un mélange de DMF : trifluoroéthanol (TFE) (50 :50) accompagnés de 3 équivalents de DIEA, nous avons trouvé que le DCC était le meilleur agent de couplage pour effectuer la cyclisation. Avant de tenter l'expérience à l'aide du DCC, nous avons également tenté de procéder d'abord à la formation du pont disulfure situé en position 3-11 à l'aide de 50 équivalents d'iode, un oxydant, dissous dans un mélange de DMF : méthanol : TFE (2 : 1 : 1) pour une période de 24 h, alors que le peptide était encore ancré à la résine. Les groupements allyle et aloc ont ensuite été éliminés selon la méthode décrite plus haut et finalement la formation du lien amide a été amorcée à l'aide de 3 équivalents de BOP dissous dans le DMF : TFE (50 : 50), accompagnés de 3 équivalents de DIEA. Suite à ces divers essais, le lien amide a finalement été formé, après un lavage du peptide-résine avec du HOBt 1%/DMF, à l'aide de 4 équivalents de DCC et 4.1 équivalents de HOBt dissous dans le DCM. C'est toujours un test à la ninhydrine qui a permis de contrôler la complétion de la réaction.

On procède finalement à l'élimination du groupement Fmoc situé en position N-terminale des peptides à l'aide de pipéridine 20%/DMF, suivie des lavages précédents le clivage au TFA, tel que décrits à la section 3.4.3.

#### 4.3 Clivage au TFA

Pour l'analogue (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique, le clivage a été réalisé selon la méthode décrite à la section 3.5. Pour le reste des dérivés synthétiques, un autre protocole, utilisant des capteurs de carbocations différents, a été utilisé. Ce protocole a été décrit par Kitagawa et son équipe en 1994. La solution de clivage est effectuée à raison d'environ 10-15mL/g de peptide-résine. Le peptide-résine est alors placé dans un ballon de verre et la solution de clivage contenant du TFA 90%/H<sub>2</sub>O accompagné de m-crésol (2,5%) et de 2-méthylindole (1,25%), deux capteurs de carbocations, y est ajoutée. La réaction est poursuivie pour 3 h, sous agitation et sous atmosphère d'azote, à température de la pièce. La filtration, l'évaporation et les lavages ensuite effectués sont

identiques à ceux réalisés à l'aide de l'autre méthode de clivage (section 3.5), sauf qu'à la toute fin, des lavages à l'aide d'éther diéthylique froid (4°C) sont également réalisés. Comme à l'habitude, les peptides sont séchés sous vide et conservés à -20°C.

#### 4.4 Traitement de réduction au niveau des peptides

Suite au clivage, les résidus cystéines retrouvés aux positions 3 et 11 des quatre analogues de l'ET-1 sont maintenant libres. Or, ces résidus présentent un problème potentiel souvent rencontré, l'oxydation des groupements sulfhydryles. Il peut alors y avoir apparition de ponts disulfures intermoléculaires. Comme l'oxydation peut se produire à tout moment pendant la manipulation des peptides, il n'est pas vraiment possible de la prévenir. Heureusement, cette réaction est réversible à l'aide d'un traitement au borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) (Gailit 1993).

Ce traitement a été réalisé au niveau des dérivés ( $\text{Lys}^1\text{Asp}^{15}$ )ET-1 monocyclique et ( $\text{Orn}^1\text{Asp}^{15}$ )ET-1 monocyclique. Les peptides ont été dissous dans du tampon carbonate 0,1M, pH 9,1. Le  $\text{NaBH}_4$  a été ajouté à une concentration finale de 0,1M. La solution a été agitée soigneusement et le tout a été incubé pour 1 h à température de la pièce. La solution a finalement été acidifiée à pH 4,0 à l'aide de TFA pur, permettant alors la purification des peptides (Gailit 1993).

#### 4.5 Purification des peptides bruts

La purification des dérivés bruts monocycliques a été réalisée à l'aide de la méthode décrite au niveau de la section 1.7, avec des colonnes  $\text{C}_{18}$  en phase inverse de marque Delta Pak ( $15\mu\text{m}$ ;  $300\text{\AA}$ ) de 47mm x 30cm et de 30 x 2,8cm. Plus spécifiquement, nous avons tenté d'augmenter la solubilité de l'analogue ( $\text{Orn}^1\text{Glu}^{15}$ )ET-1 en le dissolvant (200mg) dans 2L de tampon acétate d'ammonium 0,05M, pH 6,5. L'injection du produit a été réalisée sur une colonne conditionnée à l'aide de ce même tampon. Une fois l'injection terminée, la colonne a été conditionnée dans du TFA/  $\text{H}_2\text{O}$  (0,06%) puis un gradient linéaire de 0-100 % (B) en 1,5 h a été réalisé à l'aide des solvants suivants : (A) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (0,06%) et (B)  $\text{CH}_3\text{CN}$  45%/ $\text{H}_2\text{O}$  contenant du TFA

(0,06%), à un débit de 40mL/min. Pour ce qui est de l'analogue (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1, nous avons tenté la même expérience en dissolvant d'abord le produit (200mg) dans 2mL de TFA pur pour ensuite l'ajouter à 1,5L de tampon acétate d'ammonium 0,05M, pH 6,5, contenant 4% de CH<sub>3</sub>CN A.C.S. Le produit a ensuite été injecté sur une colonne en phase inverse C<sub>18</sub> de marque Jupiter (15µm ; 300Å) de 250 x 21,2mm. L'élution a été réalisée à un débit de 20mL/min avec un gradient linéaire de 0-100% (B) en 1,5 h, à l'aide des solvants suivants : (A) tampon acétate d'ammonium 0,05M, pH 6,5 et (B) CH<sub>3</sub>CN 35%/tampon acétate ammonium 0,05M, pH 6,5. Comme le produit avait précipité, nous avons par la suite préféré effectuer les purifications de cet analogue, ainsi que celles des deux autres analogues restants, selon la méthode décrite au niveau de la section 1.7. Les gradients étaient réalisés de 0-100% (B), à un débit de 40mL/min, en 1,5 h et, selon les analogues, les solvants étaient composés de (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN 45%, 50% ou 55%/H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%). Il est à noter que les analogues (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 et (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 ont dû par contre subir un deuxième clivage au TFA utilisant le SHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH et le phénol comme capteurs de carbocations (Section 3.5). Les produits étaient difficiles à purifier suite au premier clivage ayant utilisé le 2-méthylindole accompagné du m-crésol comme capteurs de carbocations. Notons également qu'avant de recommencer le clivage, nous avons même tenté une extraction à l'éther au niveau du dérivé (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1. Pour ce faire, le matériel (225mg) a été ajouté à 1L de TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) contenant 10% de CH<sub>3</sub>COOH glacial. Le produit a ensuite été extrait avec 3 x 300mL d'éther. Le CH<sub>3</sub>COOH et l'éther ont été évaporés et le pH de la solution a été ajusté à 2,2 à l'aide de NH<sub>4</sub>OH pour ensuite être injectée sur HPLC préparative et purifiée.

Les fractions recueillies lors des purifications étaient cette fois-ci analysées au moyen d'un système HPLC analytique de marque Beckman System Gold, équipé d'un détecteur d'absorbance modèle 168 capable d'effectuer un balayage spectral de 190 à 300nm ainsi que d'un générateur de gradient modèle 128. La colonne utilisée, le gradient effectué ainsi que les solvants employés étaient par contre les mêmes que ceux décrits à la section 1.7. Les fractions correspondant au produit monocyclique purifié ont été mises en commun, lyophilisées et conservées à -20°C.

#### 4.6 Bicyclisation et purification des analogues de l'ET-1

La formation du pont disulfure au sein des dérivés obtenus a été réalisée selon le protocole décrit dans la section 1.8. La purification des analogues bicycliques a été effectuée au moyen du système décrit à la section 1.8 équipé d'une cartouche RCM de Waters de phase inverse, C<sub>18</sub> (15µm ; 300Å) 25 x 10. Le gradient a été réalisé de 0-100% (B) en 1,5 h, à un débit de 24mL/min, utilisant les solvants suivants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN 40%/H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%) pour le dérivé (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique et CH<sub>3</sub>CN 45%/H<sub>2</sub>O contenant du TFA (0,06%) pour les autres analogues bicycliques. Plus particulièrement, le dérivé (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique a subi deux séries de purification. La première purification, d'abord réalisée avec la colonne Delta Pak de 30 x 2,8cm, n'a pas permis une bonne séparation, ce qui nous a forcés à reprendre la purification à l'aide de la cartouche RCM de Waters avec un gradient réalisé en 2 h, plutôt qu'en 1,5 h.

Les fractions recueillies ont été analysées par le biais du système analytique de marque Beckman décrit à la section 4.5 et celles correspondant au produit bicyclique pur ont été mises en commun et lyophilisées.

### 5. Caractérisation des dérivés de l'ET-1

#### 5.1 HPLC analytique

La caractérisation par HPLC analytique a été effectuée au moyen du système de marque Beckman system Gold décrit à la section 4.5, muni d'une colonne Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (5µm ; 300Å) de 25 x 0,45cm. L'éluion, à un débit de 1mL/min, était réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de 20 à 60% (B) en 20 min composé des solvants suivants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN pur.

## 5.2 Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire a été réalisée au moyen d'un système de marque Applied Biosystems (modèle 270A). Pour les quatre dérivés de l'ET-1, l'analyse a été réalisée à pH 2,7 à l'aide d'un tampon de citrate de sodium 0,02M ainsi qu'à pH 8,3 avec du tampon phosphate 0,02M. Les dimensions du capillaire étaient de 35cm x 50µm, le voltage était réglé à 20kV, la température de la chambre d'analyse à 30°C et la détection à 200nm. L'injection était réalisée par aspiration sous vide, pour une période de 1,5 sec.

## 5.3 Spectrométrie de masse

La détermination de la masse moléculaire des analogues de l'ET-1 a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de masse VG Quattro II triple quadrupole, muni d'un Electrospray (ESP) afin de générer les ions et d'un système de traitement des données Mass Lynx software system. L'ESP, par la présence d'un champ électrique élevé, a tendance à produire des ions qui possèdent des charges multiples. La calibration de l'appareil est effectuée au moyen d'une substance de référence, la myoglobine cardiaque de cheval (P.M. = 16 951,48). En mode ESP, il se produit une évaporation ionique à partir d'une gouttelette qui s'évapore au même rythme que les ions qui y sont présents, permettant alors d'effectuer la mesure. La vitesse de balayage est de 100amu/sec.

## 6. Vérification de l'efficacité du clivage au TFA utilisant le 2-méthylindole ainsi que le m-crésol comme capteurs de carbocations

### 6.1 Synthèse de trois pentapeptides

Les trois pentapeptides suivants ont été synthétisés :

- (1) NH<sub>2</sub>-Ile-Ala-Ala-Ala-Trp-COOH ;
- (2) NH<sub>2</sub>-Ile-Ala-Ala-Asn-Trp-COOH ;
- (3) NH<sub>2</sub>-Ile-Ala-Asn-Asn-Trp-COOH.

### 6.1.1 Réactifs et solvants utilisés

La synthèse a été effectuée en chimie Fmoc sur la résine de Wang substituée à 0,73mmole/g par le Fmoc-Trp(Boc), déjà décrite (Section 3.4.1). Les acides aminés utilisés étaient tous de configuration absolue L alors que leur fonction amine- $\alpha$  était protégée par un groupement Fmoc. L'alanine provenait de Advanced Chemtech (Louisville, KY) alors que l'asparagine(trityle) a été obtenue de Chem-Impex International (Wood Dale, IL).

### 6.2 Clivage des pentapetides

Les peptides-résines obtenus ont été divisés en deux fractions égales. Pour fins de comparaison, le clivage utilisant le  $\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$  combiné au phénol comme capteurs de carbocations (section 3.5) ainsi que le clivage employant le 2-méthylindole accompagné du m-crésol, également des capteurs de carbocations (section 4.3), ont été réalisés sur chacun des pentapeptides synthétisés.

## Résultats

### 7. Synthèse, purification et caractérisation de dérivés de l'ET-1

#### 7.1 Synthèse et clivage des peptides

Le rendement de la synthèse de Boc-Glu( $\gamma$ -OFm) a été de 88% et la TLC, effectuée pour vérifier la réussite de la réaction d'hydrogénation, a produit un  $R_f$  de 0,77 pour le Boc-Glu( $\alpha$ -OBzl,  $\gamma$ -OFm) et de 0,37 pour le produit désiré, soit le Boc-Glu( $\gamma$ -OFm).

Pour chacun des six analogues, 1,5g de résine PAM, substituée à 0,58mmole/g avec le Boc-Trp(For), a été déposée dans un système composé de six réacteurs de synthèse. L'échelle de synthèse était donc de 0,87mmole. Plusieurs doubles et triples couplages ont dû être effectués pendant la synthèse et ce au niveau des six dérivés. La formation du lien amide, alors que le peptide était encore ancré à la résine, fût plutôt problématique. En fait, la cyclisation a nécessité 119 h au total et ce, en utilisant divers agents de couplage. De plus, les dérivés ont nécessité deux traitements de déprotection des chaînes latérales impliquées dans la formation de ce lien, puisque le test à l'acide picrique démontrait que l'élimination des groupements chimiques les protégeant était incomplète suite à un seul traitement. Le clivage au HF a permis l'obtention de produits bruts sous la forme d'une poudre amorphe mauve, qui après analyse par HPLC présentaient plusieurs pics majeurs se distribuant sur un intervalle d'environ 4 min. (Figure 13). Un traitement basique des peptides bruts a par contre amélioré le profil de certains, notamment (Glu<sup>3</sup>Orn<sup>11</sup>)ET-1, (Glu<sup>1</sup>-Gly-Orn<sup>15</sup>)ET-1 et (Glu<sup>3</sup>-Gly-Orn<sup>11</sup>)ET-1 (Figure 14), en faisant ressortir davantage un pic majoritaire.

#### 7.2 Purification, bicyclisation et caractérisation des analogues

Suite à une première purification non maximisée des peptides post-clivage, nous avons isolé quelques pics pour chacun des dérivés. La formation du pont disulfure a été



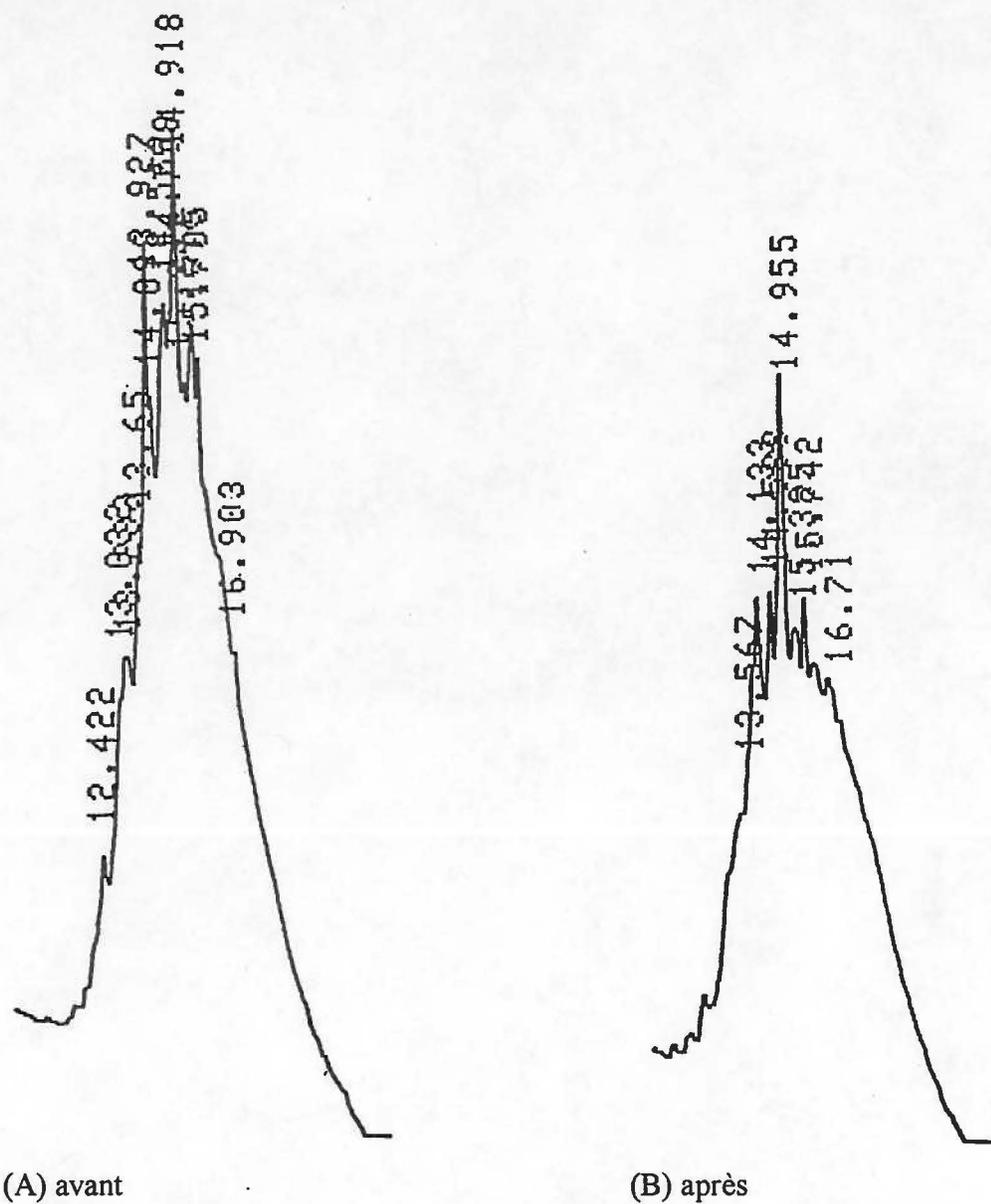


Figure 14 : Profils HPLC analytique de l'analogue (Glu<sup>3</sup>Orn<sup>11</sup>)ET-1 monocyclique (A) avant et (B) après traitement au NH<sub>4</sub>OH.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (10μm ; 300Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

effectuée sur chacun des pics recueillis. Nous avons pu voir qu'après réaction avec le  $K_3Fe(CN)_6$ , il y avait un très léger déplacement du temps de rétention ( $T_R$ ) vers une valeur plus élevée (Figure 15). La purification de ce matériel a permis l'obtention d'un dérivé montrant la présence de 2 pics par analyse HPLC sur particules de  $5\mu m$  (Figure 16). Le produit obtenu possédait 79% de pureté mais son pauvre rendement de 0,14% nous a convaincus d'évaluer une nouvelle stratégie de synthèse.

#### 8. Synthèse et clivage d'autres dérivés de l'ET-1

Pour chacun des quatre dérivés, 0,95g de résine de Wang substituée, d'après le test à l'acide picrique, à 0,71mmole/g avec du Fmoc-Trp(Boc), a été utilisée dans les réacteurs de synthèse. L'échelle de synthèse était alors de 0,67mmole. Pendant la synthèse, nous avons dû effectuer un double couplage pour le résidu His(Trt) en position 16, pour les analogues (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 et (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1, ainsi que pour le résidu Cys(Trt) en position 3, couplé sous la forme d'un anhydride symétrique et ce, pour les quatre dérivés. Le clivage au TFA d'échantillons de chacun des analogues comportant le groupement Fmoc en position N-terminale a permis d'obtenir des produits plutôt homogènes.

L'élimination des groupements allyle et aloc protégeant les chaînes latérales des résidus impliqués dans la formation du pont lactame, à l'aide d'une réduction catalytique avec le palladium, fût très difficile. Nous avons dû réaliser jusqu'à quatre traitements tout en tentant d'optimiser la réaction en employant divers solvants. Pendant les traitements, les solutions réactionnelles se coloraient en orangé. Le test à l'acide picrique démontrait que la déprotection était encore partielle après les deux premiers traitements. Après trois traitements, la déprotection apparaissait presque complète mais le clivage d'échantillons au moyen du TFA, a produit du matériel hétérogène. Comme montré à la figure 17, un quatrième traitement n'a pas apporté d'améliorations au produit.

Nous avons tout de même décidé de procéder à la formation du lien amide sur un échantillon de chacun des quatre analogues ayant subi trois traitements au palladium. La cyclisation a duré 27 h, en utilisant les agents de couplage usuels employés en chimie

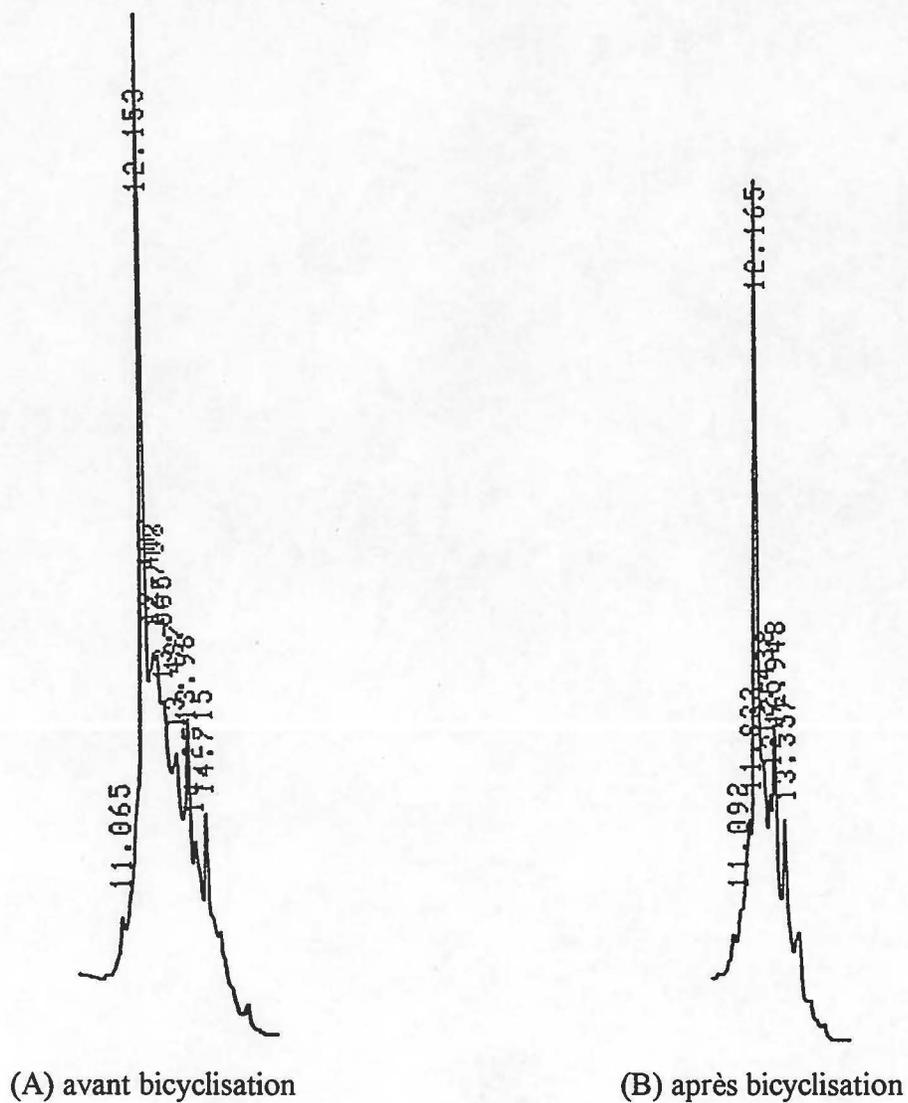


Figure 15 : Profils HPLC analytique du dérivé (A) (Glu<sup>1</sup>Lys<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique et (B) (Glu<sup>1</sup>Lys<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

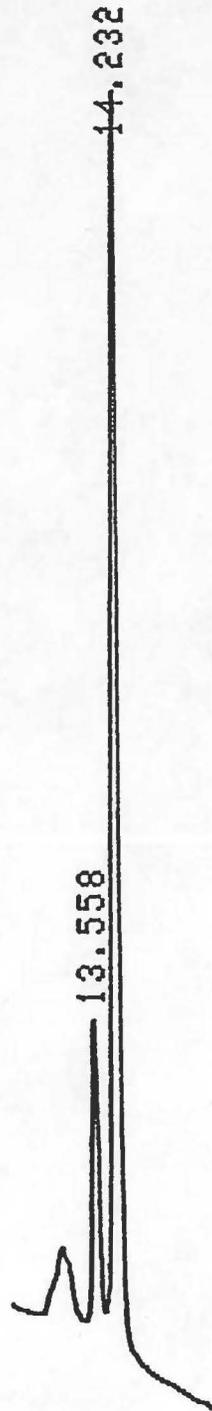


Figure 16 : Profil HPLC analytique de l'analogue (Glu<sup>1</sup>Lys<sup>15</sup>) ET-1 bicyclique.

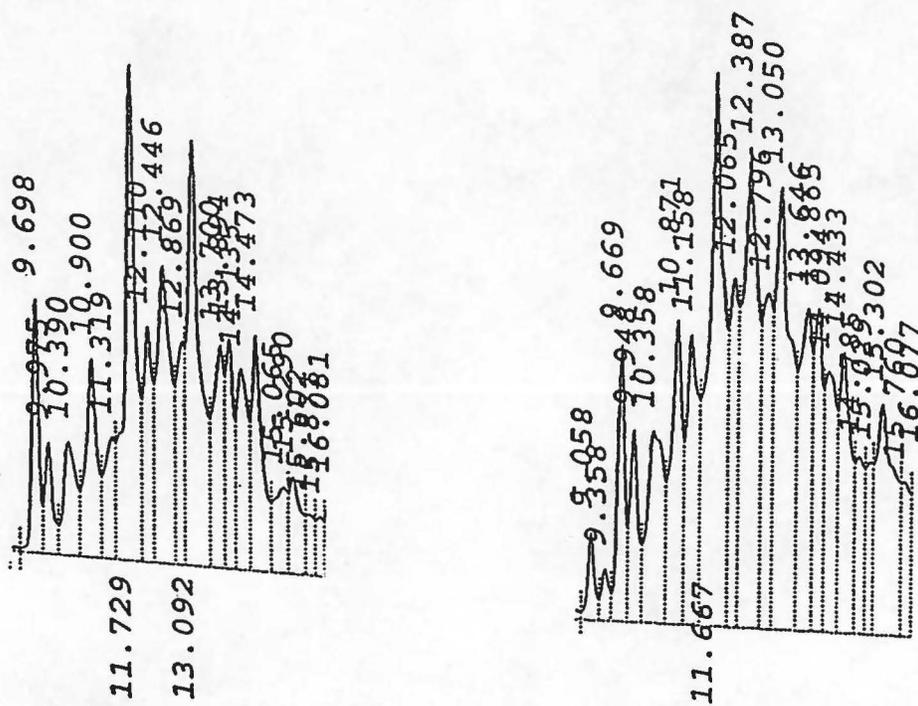
Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (5 $\mu$ m ; 300 $\text{\AA}$ ) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1mL/min

Détection : 230nm



(A) après 3 traitements au palladium

(B) après 4 traitements au palladium

Figure 17 : Profils HPLC analytique du dérivé (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 linéaire (A) après trois traitements au palladium et (B) après quatre traitements au palladium.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

Fmoc. Le clivage au TFA a donné des produits bruts comportant plusieurs pics et ayant encore une fois une distribution s'étalant sur plusieurs minutes. Ces résultats étaient comme les précédents, non concluants. Nous avons donc repris le protocole de synthèse sans modification, mais la méthode d'élimination des groupements allyle et aloc a par contre été révisée.

## 9. Synthèse, purification et caractérisation de nouveaux analogues de ET-1

### 9.1 Synthèse et clivage des dérivés peptidiques

La synthèse des quatre peptides a été réalisée à l'aide de la résine de Wang substituée à 0,73mmole/g avec du Fmoc-Trp(Boc). Un (1)g de résine a été déposé dans chacun des quatre réacteurs composant le système de synthèse. L'échelle de synthèse était donc de 0,73mmole. La synthèse des quatre dérivés de l'ET-1 s'est très bien déroulée puisque seul un double couplage a été effectué au niveau du résidu Cys(Trt) situé en position 3, couplé sous la forme d'un anhydride symétrique. Le nouveau protocole d'élimination des groupements allyle et aloc, utilisant encore le palladium comme catalyseur mais par contre sous la forme cette fois d'un dérivé différent, a permis la déprotection des chaînes latérales des résidus impliqués dans la formation du lien amide, en 2 h. Un test à la ninhydrine a montré que la déprotection était vraisemblablement complète. Le clivage au TFA d'un échantillon de chacun des quatre dérivés peptidiques linéaires a donné des produits plutôt homogènes pour les dérivés comportant un résidu Glu au niveau du lien amide et un peu plus contaminés pour les deux autres analogues (Figure 18).

Cette fois-ci, c'est lors de la formation du pont lactame que nous avons expérimenté divers problèmes. Différents agents de couplage accompagnés de divers solvants ont été vérifiés avec des échantillons de chacun des peptides, avant que nous ne trouvions que l'agent de couplage le plus efficace était le DCC accompagné de HOBt dissous dans le DCM. Les autres agents de couplage produisaient du matériel brut très hétérogène. La tentative de former le pont disulfure en position 3-11 avec une oxydation à l'iode, suivie de l'élimination des groupements allyle et aloc et de la formation du lien

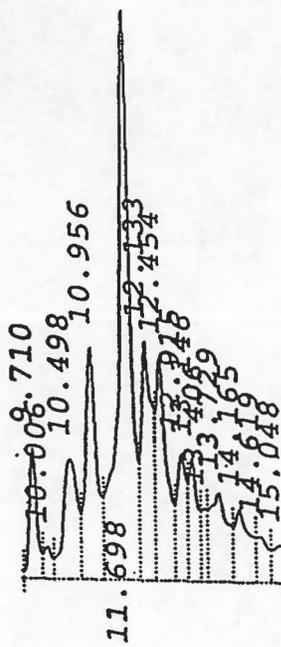
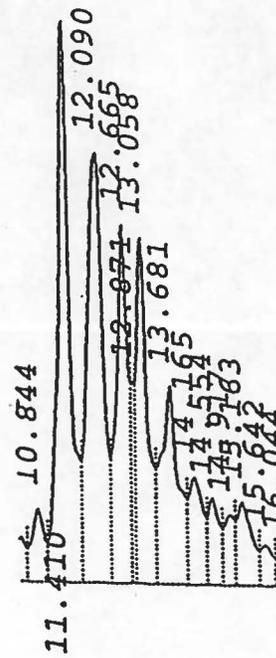
A) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 linéaireB) (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 linéaire

Figure 18 : Profils HPLC analytique du dérivé (A) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 linéaire et (B) (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 linéaire.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

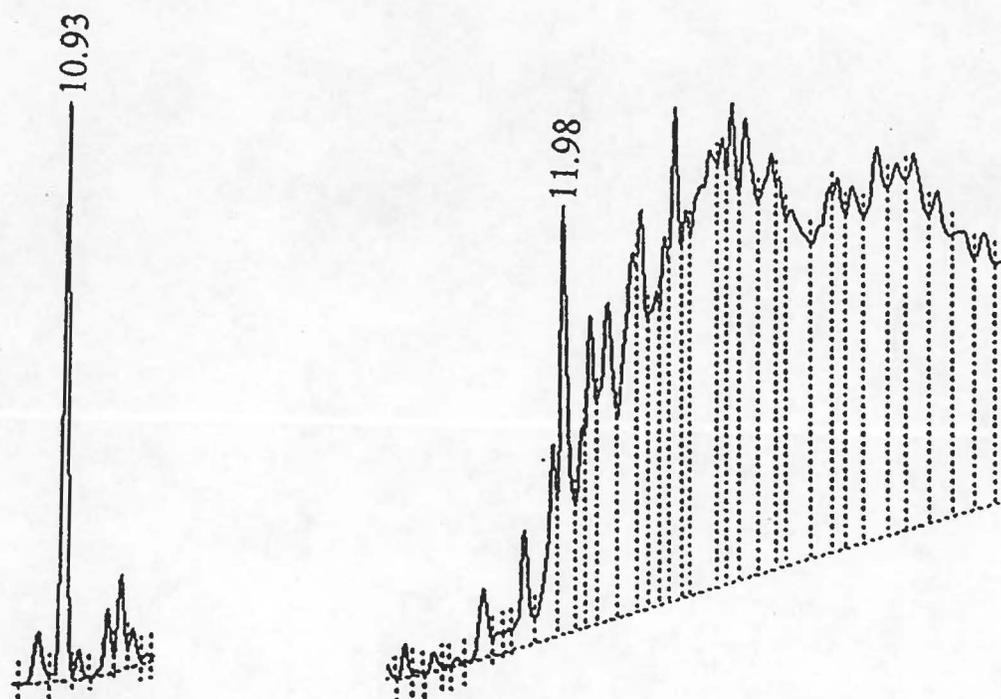
Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

amide, n'a pu permettre l'obtention de produits homogènes après clivage. Finalement, contrôlée par un test à la ninhydrine, la cyclisation totale à l'aide du DCC a nécessité de 22 h à 41 h, dépendamment des analogues. Le clivage au TFA, utilisant comme capteurs de carbocations le SHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH et le phénol pour l'analogue (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique et le 2-méthylindole accompagné du m-crésol pour les trois autres dérivés, a donné des produits bruts sous la forme d'une poudre amorphe blanchâtre dans le premier cas et légèrement rosée dans le deuxième cas. Les analogues comportant un résidu Glu au niveau du lien amide présentaient un pic très majoritaire après analyse par HPLC alors que les deux autres dérivés étaient assez hétérogènes et présentaient un profil en forme de cloche (Figure 19).

## 9.2 Purification et bicyclisation des dérivés peptidiques

Suite à une première purification des dérivés bruts, nous avons réussi à isoler le pic majoritaire retrouvé pour (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique et (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique. Pour ce qui est des deux autres analogues comportant un résidu Asp au niveau du lien amide, nous n'avons pu réussir à isoler un tel produit. Un deuxième clivage au TFA des deux dérivés, en utilisant cette fois-ci le SHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH ainsi que le phénol comme capteurs de carbocations, a nettement amélioré l'allure des produits puisqu'il y avait maintenant deux pics majeurs qui ressortaient et ceci pour les deux peptides (Figure 20). Un traitement au NaBH<sub>4</sub> a également permis d'améliorer l'allure des produits, tout en provoquant un changement de T<sub>R</sub> d'environ 1 min vers un temps plus court (Figure 21). A l'aide d'une première purification, il nous a alors été possible d'isoler les pics majoritaires retrouvés issus de ces deux produits. La formation du pont disulfure a été effectuée pour les quatre analogues au moyen de la méthode utilisant le K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Le suivi de la réaction de cyclisation, par HPLC analytique, a permis de noter qu'il y avait un très léger changement du T<sub>R</sub>, vers un temps plus court, d'environ 0,1 min ou moins, dépendamment des analogues (Figure 22).



(A) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique brut (B) (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique brut

Figure 19 : Profils HPLC analytique de (A) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique brut et (B) (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique brut.

Colonne : Phenomenex C<sub>18</sub>, de phase inverse (10μm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 10-60% (B) en 25 min

Solvants : (A) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM pH 6,0 et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

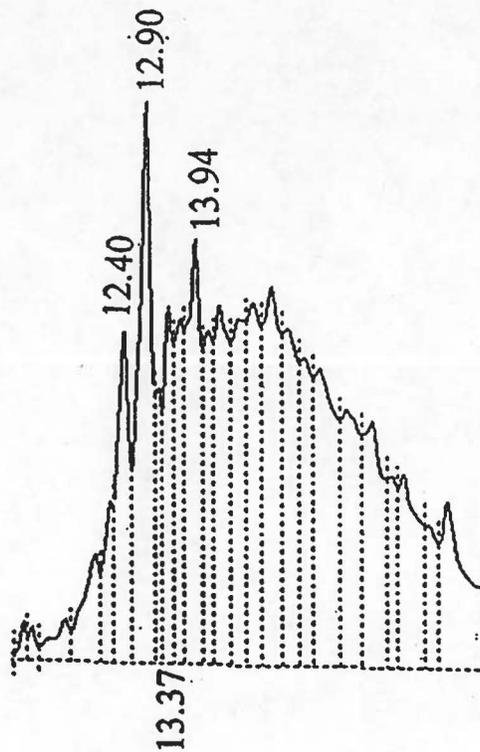


Figure 20 : Profil HPLC analytique de (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique brut ayant subi deux clivages au TFA.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (10μm ; 300Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

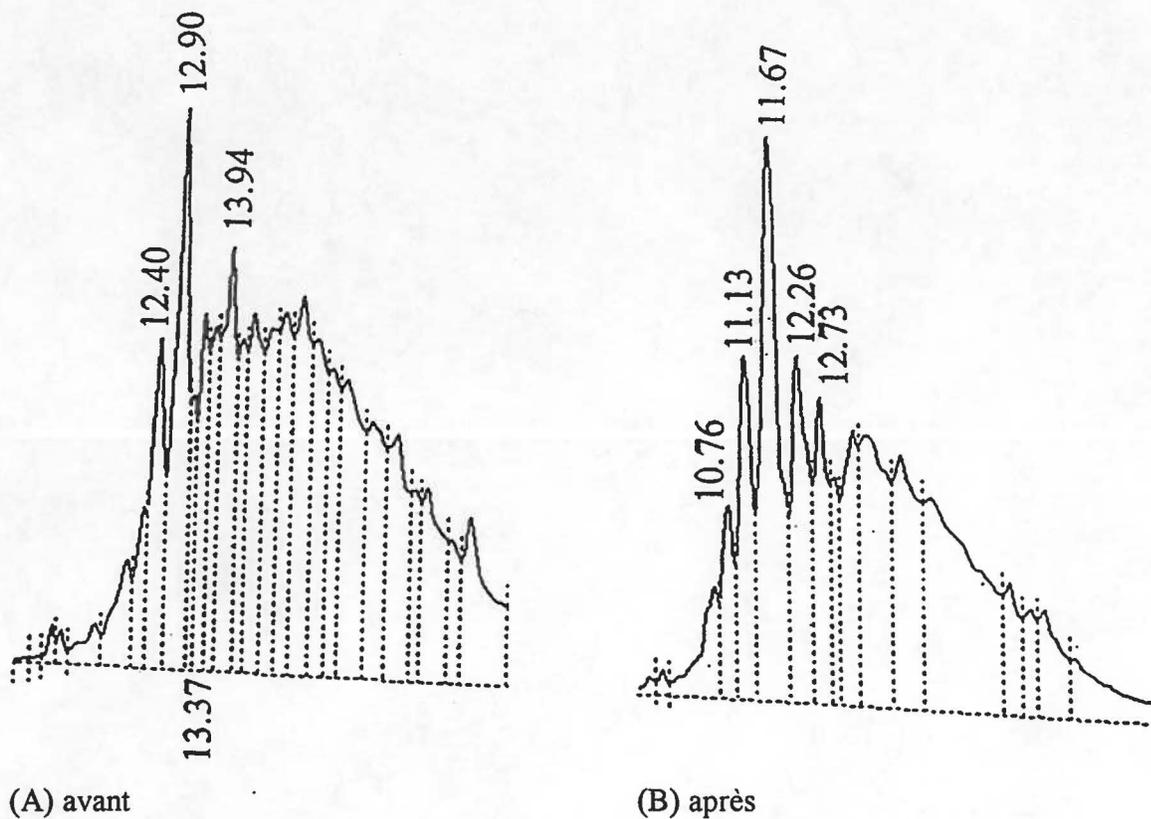


Figure 21 : Profils HPLC analytique de l'analogue (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique (A) avant et (B) après traitement au NaBH<sub>4</sub>.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (10μm ; 300Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

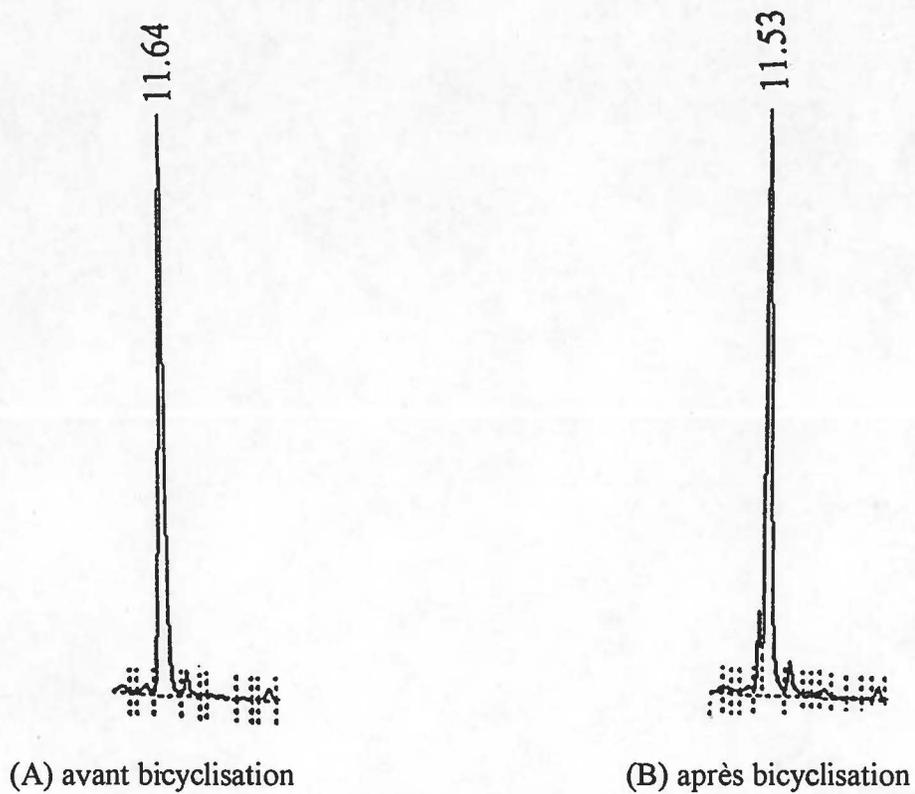


Figure 22 : Profils HPLC analytique de (A) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 monocyclique et (B) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (10μm ; 300Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1.5mL/min

Détection : 230nm

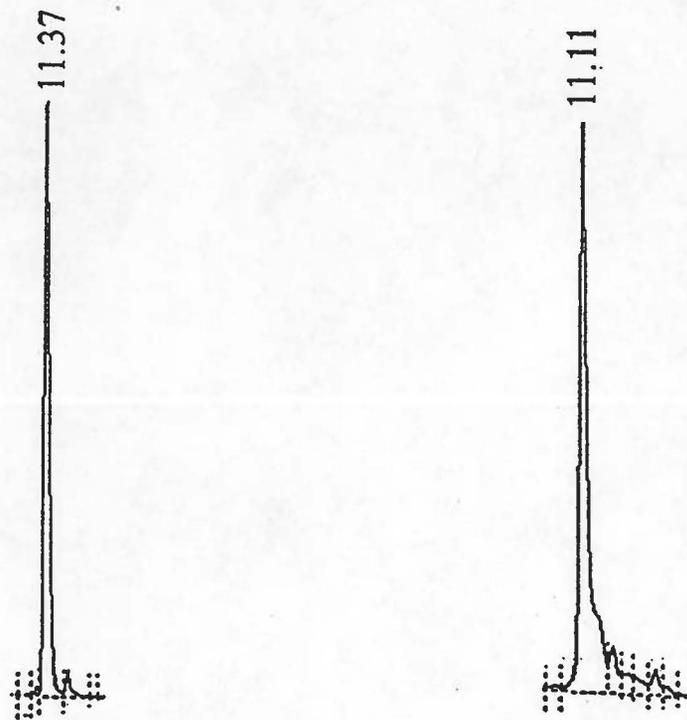
### 9.3 Caractérisation des dérivés de l'ET-1

La purification de ce matériel a donné des dérivés très homogènes pour ce qui est de ceux comportant un résidu Glu au niveau du lien amide et légèrement contaminés pour ceux comportant un résidu Asp au sein de ce même lien (Figure 23). Il est d'ailleurs à noter que deux pics ont été isolés pour l'analogue (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique. Les tableaux 6 et 7 présentent la description des résultats obtenus par HPLC analytique sur colonne de particules de 5µm et par électrophorèse capillaire à pH 2,7 avec un tampon citrate de sodium 0,02M et à pH 8,3 à l'aide d'un tampon phosphate 0,02M. La détermination du poids moléculaire des quatre dérivés par spectrométrie de masse a montré que les analogues (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1, (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 et (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 possèdent un poids moléculaire supérieur d'environ 200 par rapport au poids moléculaire attendu, alors que l'analogue (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 possède un poids moléculaire environ deux fois plus petit que celui attendu. Par contre, une analyse, également par spectrométrie de masse, de l'analogue (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 linéaire, possédant toujours les groupements allyle et aloc fixés sur les chaînes latérales des acides aminés destinés à la formation du lien amide, comporte un poids moléculaire identique à celui attendu. L'analyse par spectrométrie de masse a également pu montrer que les poids moléculaires des analogues (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 et (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 sont pratiquement identiques et que l'analogue (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 se présente sous la forme de plusieurs pics, limitant ainsi l'identification réelle du produit recherché, qui semble plutôt en minorité.

## 10. Synthèse et clivage de trois pentapeptides permettant de vérifier l'efficacité du clivage au TFA utilisant une combinaison de 2-méthylindole et de m-crésol comme capteurs de carbocations

### 10.1 Synthèse des pentapeptides

Pour chacun des pentapeptides, 0,5g de résine de Wang substituée à 0,73mmole/g avec du Fmoc-Trp(Boc) a été placée dans les trois réacteurs de synthèse. De cette façon, l'échelle de synthèse était de 0,37mmole. Des doubles couplages ont dû être réalisés au niveau des résidus Ile<sup>1</sup> et Ala<sup>2</sup>.



(A) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique

(B) (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique

Figure 23 : Profils HPLC analytique de (A) (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique après purification et (B) (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 bicyclique après purification.

Colonne : Vydac C<sub>18</sub>, de phase inverse (5 μm ; 300 Å) 25 x 0,45cm

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

Solvants : (A) TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%) et (B) CH<sub>3</sub>CN

Débit : 1mL/min

Détection : 230nm

Tableau 6 : Caractérisation par HPLC analytique et par électrophorèse capillaire des dérivés de l'ET-1.

ANALOGUE	HPLC <sup>a</sup> (T <sub>R</sub> en min)	EC (T <sub>M</sub> en min) pH 2,7	EC (T <sub>M</sub> en min) pH 8,3
(Lys <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1	11,37	17,76	9,33
(Orn <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1	11,29	17,56	9,47
(Lys <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1	11,10	10,68	7,49
(Orn <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1	11,33	11,22 + 11,77	8,91 + 11,19
(Orn <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1 <sup>b</sup>	11,44	11,15	8,73

<sup>a</sup> L'analyse HPLC a été réalisée sur une colonne de particules de 5µm.

<sup>b</sup> Deux pics ont été isolés pour l'analogue (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1.

Tableau 7 : Pureté des dérivés de l'ET-1 d'après les mesures par HPLC analytique.

ANALOGUE	HPLC <sup>a</sup> (%)
(Lys <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1	91
(Orn <sup>1</sup> Glu <sup>15</sup> )ET-1	84
(Lys <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1	79
(Orn <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1	68
(Orn <sup>1</sup> Asp <sup>15</sup> )ET-1 <sup>b</sup>	69

<sup>a</sup> L'analyse HPLC a été réalisée sur une colonne de particules de 5µm.

<sup>b</sup> Deux pics ont été isolés pour l'analogue (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1.

## 10.2 Clivage des pentapeptides

Le clivage au TFA utilisant le  $\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$  et le phénol comme capteurs de carbocations ainsi que celui utilisant le 2-méthylindole et le m-crésol comme capteurs de carbocations ont permis l'obtention de six pentapeptides ayant l'aspect d'une huile visqueuse. D'ailleurs, le pentapeptide  $\text{NH}_2\text{-Ile-Ala-Ala-Ala-Trp-COOH}$  avait plutôt l'aspect d'une gelée lors de l'étape de précipitation à l'éther. Comme le montre la figure 24, les produits clivés à l'aide de la méthode au 2-méthylindole sont légèrement plus contaminés que ceux clivés à l'aide de l'autre méthode.

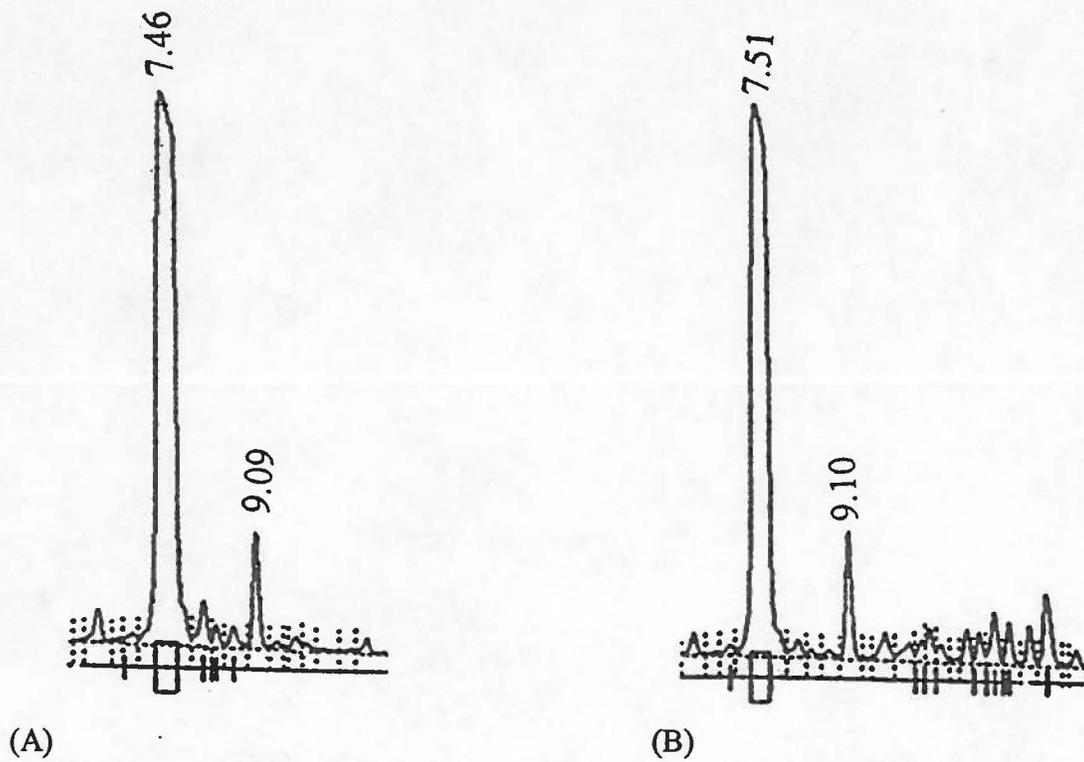


Figure 24 : Profils HPLC analytique de  $\text{NH}_2\text{-Ile-Ala-Ala-Asn-Trp-COOH}$  clivé au TFA (A) à l'aide du  $\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$  et du phénol comme capteurs de carbocations et (B) avec le 2-méthylindole et le m-crésol comme capteurs de carbocations.

Colonne : Vydac  $\text{C}_{18}$ , de phase inverse ( $10\mu\text{m}$  ;  $300\text{\AA}$ )  $25 \times 0,45\text{cm}$

Gradient : linéaire, 10-70% (B) en 20 min

Solvants : (A) TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (0,06%) et (B)  $\text{CH}_3\text{CN}$

Débit :  $1.5\text{mL/min}$

Détection :  $230\text{nm}$

## Discussion

### 11. Formation de dérivés de l'ET-1 par la méthode de synthèse peptidique phase solide

#### 11.1 Elaboration des peptides et choix des groupements protecteurs

L'identification des pharmacophores d'un peptide consiste à définir le rôle de chaque résidu présent dans la séquence, pour sa contribution à la stabilité de la structure de la molécule dans l'espace ainsi qu'à l'activité biologique. Bref, les études de structure-activité permettent de déterminer la façon avec laquelle le peptide interagit avec ses récepteurs et également la manière avec laquelle ce dernier parvient, une fois lié, à les activer. Pour ce faire, plusieurs méthodes peuvent être employées. On peut décider de changer successivement les résidus d'acide aminé, en les remplaçant par exemple par un résidu Ala, afin de vérifier la contribution de leur chaîne latérale pour la liaison de la molécule au récepteur et/ou au niveau de l'activité biologique (Tam et al 1994). Un élément spécifique du peptide peut également être changé pour ensuite examiner le changement apporté sur l'affinité de liaison et/ou l'activation du récepteur. Des fragments du peptide peuvent aussi être synthétisés afin de déterminer les régions de la molécule qui sont essentielles à l'affinité et/ou à l'activité pharmacologique. Finalement, des changements mineurs au niveau des résidus d'acide aminé peuvent être réalisés en les remplaçant par des résidus modifiés tel l'O-méthyle tyrosine (OMeTyr) qui permet, par exemple, de vérifier la contribution du proton présent sur le noyau phénolique de Tyr pour l'affinité et/ou l'activation du récepteur (Campbell et al 1995).

Une variété d'études de structure-activité ont été réalisées afin d'identifier de façon précise les pharmacophores de l'ET et notre laboratoire participe depuis plusieurs années à cet objectif. L'approche privilégiée consiste à changer un élément précis de la molécule pour ensuite vérifier la répercussion au niveau de l'affinité et de l'activation des récepteurs. Par exemple, le remplacement d'une façon successive des ponts disulfures aux positions 1-15 et 3-11, par un pont lactame, permet de vérifier l'implication des résidus Cys lors de l'interaction de la molécule d'ET avec ses récepteurs. Autre stratégie, l'ajout

d'un espaceur Gly au niveau de ce pont lactame permet en plus de vérifier l'effet de la dimension du cycle sur l'affinité de liaison ainsi que sur l'activité pharmacologique. Ce type de modification apportée à la molécule d'ET permet alors de vérifier l'effet d'un changement donné à l'intérieur de sa structure. De cette manière, les extrémités N- et C-terminales libres, la région chargée (8 à 10), la structure hélicoïdale (9 à 15 ou 9 à 16) ainsi que la queue hydrophobe (16 à 21), tous des éléments déterminants pour l'activité biologique de l'ET, sont conservés à peu près intacts (Hunt et al 1991 ; Tam et al 1994).

La synthèse en phase solide des dérivés de l'ET-1 a été réalisée sur une résine réticulée. Ce support est ponté avec 1% de divinylbenzène, ce qui empêche sa solubilisation dans les solvants usuels. De cette manière, le peptide greffé au polymère est en pseudo solution pendant toutes les étapes de la synthèse. Ceci permet d'effectuer des filtrations et des lavages rapides, afin d'éliminer les réactifs excédentaires et les produits de réaction. Une propriété remarquable du polystyrène réticulé est sa capacité de se saturer en solvants. Ainsi, en présence de DMF et de DCM, les solvants employés en synthèse peptidique, la résine peut gonfler de 3 à 4 fois, comparativement à son volume original. Ceci permet alors une meilleure diffusion des réactifs (Merrifield 1986). La résine utilisée comportait déjà le résidu C-terminal lié au polymère via son groupement carboxylique. Cette résine, appelée Pam est environ 100 fois plus résistante aux acides que la résine classique de Merrifield. En effet, l'attraction électronique du groupement acétamidométhyle présent sur les noyaux aromatiques, auquel le peptide est accroché, procure une stabilité additionnelle. Il est connu à ce sujet qu'une grande densité électronique facilite la protonation du lien ester ancrant le peptide à la matrice insoluble et résulte en un lien très labile en milieu acide (Stewart et Young 1984).

Pendant la synthèse peptidique, les fonctions amines en position alpha des résidus sont protégées par un groupement Boc ou par un groupement Fmoc, deux groupements protecteurs standards. Le retrait de ces groupements est assuré par l'ajout de TFA dans le premier cas et par l'addition de pipéridine dans le second cas. Dans notre stratégie, c'est le Boc qui a été utilisé, mis à part pour le résidu Gly impliqué dans la formation du pont lactame qui est quant à lui protégé par le Fmoc. Ceci permet alors son retrait sélectif sans affecter les groupements protégeant les autres résidus (Stewart et Young 1984).

Les chaînes latérales de certains résidus doivent également être protégées étant donné leur réactivité. Le résidu Asp, par exemple, est sujet à la formation d'un dérivé succinimide. Cette réaction est catalysée autant en milieu acide qu'en milieu basique. Donc, lors de l'élimination du groupement Boc de la fonction amine du résidu, à l'aide de TFA, cette réaction secondaire peut prendre place. La formation de ce dérivé cyclique ne présente toutefois que la moitié du problème puisqu'en milieu aqueux, lors des purifications par exemple, l'aspartimide s'ouvre et peut alors devenir un  $\beta$ -aspartyle ou bien redevenir un résidu Asp normal. La formation de ce dérivé  $\beta$ -aspartyle est favorisée thermodynamiquement. Heureusement, l'ajout d'un groupement cyclohexyle (cHex) réduit de façon significative la formation de ce dérivé. Ce même groupement protecteur protège également la chaîne latérale du résidu Glu puisque ce dernier est susceptible à une réaction similaire qui amène la formation d'acide pyroglutamique. C'est d'ailleurs pourquoi l'étape de neutralisation à l'aide de DIEA 1%/DMF est omise lors des lavages post déprotection acide, puisque cette réaction est favorisée par les substances ayant un caractère basique. La chaîne latérale de l'His possède un caractère basique rendant alors ce résidu particulièrement susceptible à la racémisation. L'azote distal de l'imidazole est alors bloqué par un groupement p-toluène sulfonyle (Tos), diminuant grandement le risque de racémisation. Le groupement amine présent au niveau de la position epsilon ( $\epsilon$ ) de la chaîne latérale de la Lys est un nucléophile qui pourrait, sans protection adéquate, entrer facilement en compétition avec la fonction amine situé en alpha, lors d'une réaction de couplage. L'ajout de 2-chlorobenzoyloxycarbonyle (2-ClZ) sur le  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> empêche cette réaction secondaire. Le groupement hydroxyle de la chaîne latérale du résidu Ser est protégé par un groupement benzyle (Bzl) puisqu'étant nucléophile, il entre en compétition avec l'amine en alpha lors des réactions de couplage. D'autre part, pour éviter la formation d'esters de phényle, la fonction phénolique présente sur la chaîne latérale de Tyr est protégée par le 2-bromobenzoyloxycarbonyle (2-BrZ). Le résidu Trp est le plus problématique. Ce dernier est en effet très sensible à une réaction d'oxydation irréversible et de plus, son noyau indole peut facilement être alkylé. Le groupement formyle (For) permet de protéger le résidu contre l'oxydation et l'alkylation de l'indole. Finalement, le résidu Cys est sensible à l'oxydation. La formation de ponts disulfures d'une façon aléatoire est évitée par l'incorporation d'un groupement 4-méthylbenzyle (4-MeBzl) au

niveau de sa chaîne latérale. Ce groupement est éliminé lors du clivage au HF, permettant alors d'effectuer la cyclisation appropriée à l'aide de  $K_3Fe(CN)_6$ , en solution diluée. Il est à noter que le résidu Met est aussi susceptible à une réaction d'oxydation qui est toutefois réversible avec un traitement à l'iodure d'ammonium ( $NH_4I$ ). Le soufre du résidu Met ayant un caractère nucléophile peut également donner lieu à une réaction d'alkylation. Toutefois, ces réactions secondaires ne sont pas assez problématiques pour faire l'usage de groupements protecteurs au niveau de ce résidu pendant la synthèse des dérivés de l'ET (Bodanszky et Martinez 1981). Un groupement OFm est utilisé pour protéger la chaîne latérale du résidu Glu impliqué au niveau du pont lactame, alors qu'un groupement Fmoc protège la chaîne latérale des résidus Lys ou Orn également impliqués dans ce lien. Ces groupements peuvent être retirés sélectivement à l'aide de pipéridine, permettant alors d'effectuer la cyclisation sur résine. Avant d'effectuer le clivage, le groupement Boc en position N-terminale est retiré, afin d'éliminer le carbocation t-butyle, un agent alkylant potentiel généré en condition acide (Stewart et Young 1984).

### 11.2 Evaluation de la synthèse de la première série d'analogues de l'ET-1

La synthèse de Boc-Glu( $\gamma$ -OFm) a été une réussite, tel que démontré par le rendement obtenu ainsi que les valeurs de  $R_f$  obtenus par TLC.

En général, la synthèse des dérivés de l'ET-1 a été assez difficile. En fait, dès qu'un acide aminé différent de celui normalement retrouvé au sein de l'ET-1 native était couplé, par exemple lorsque le résidu Lys en position 15 était couplé en remplacement de la Cys normalement présente à cette position, certains couplages devaient ensuite être repris pour les acides aminés suivants dans la séquence. Il semble que la chaîne latérale du nouveau résidu provoquait un changement de l'organisation structurale de la molécule rendant ensuite l'accès difficile aux réactifs. L'élimination des groupements Fmoc et OFm présents sur les chaînes latérales des résidus impliqués dans le lien amide a également été difficile. Des études ont à ce sujet déjà démontré que la déprotection de la Lys(Fmoc) est extrêmement lente, pouvant parfois nécessiter jusqu'à 16 h de traitement à l'aide de pipéridine 50%/DMF (Fields et Noble 1989). Il est alors possible que nous ayons assisté à

ce phénomène. La vérification de la déprotection a été effectuée à l'aide d'un test à l'acide picrique qui ne quantifie que les amines libres et donc seulement les chaînes latérales des résidus Lys ou Orn. Par contre, rien n'a montré que la déprotection de la chaîne latérale du résidu Glu était incomplète. Un autre problème s'est de plus posé lors de la formation du pont lactame. Malgré l'utilisation de l'agent de couplage BOP, reconnu pour conduire très rapidement la formation de liens peptidiques comparativement à d'autres agents conventionnels tel le DCC, la formation du pont lactame n'a pu être amenée à complétion (Fournier, Wang et Felix 1988). L'utilisation de HATU combiné au HOAt, lequel produit un effet ancre en figeant la structure peptidique par le biais de son atome d'azote interagissant avec l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle du dernier résidu fixé, n'a pas de plus permis la complétion de la cyclisation (Carpino et al 1993). Ce sont des agents de couplage utilisés en chimie Fmoc (HBTU et HOBt), fonctionnant sensiblement de la même manière que le BOP, qui ont permis d'achever la réaction de cyclisation. La difficulté à former ce pont lactame peut être une question de repliement de structure. Comme la cyclisation est réalisée alors que le peptide est encore ancré à la matrice insoluble, les groupements protégeant les chaînes latérales des autres résidus, encore présents à ce stade, peuvent provoquer un encombrement stérique, empêchant alors la molécule de se replier correctement. De plus, le changement de deux résidus dans la molécule d'ET peut modifier totalement sa conformation dans l'espace, défavorisant alors la formation du lien amide. Il est connu que chaque résidu, selon sa chaîne latérale, influence son entourage, ce qui entraîne généralement l'apparition d'une conformation définie au sein des molécules.

Le clivage au HF des peptides a donné des produits sous la forme d'une poudre amorphe légèrement mauve. D'après nos observations, nous savons que cette couleur provient des groupements indoles libres des résidus Trp. Il apparaît que le groupement For protégeant l'indole du résidu Trp a été retiré lors de l'étape de déprotection des chaînes latérales des résidus formant le lien amide, réalisée à l'aide de pipéridine 20%/DMF.

Les profils sur HPLC analytique des produits bruts suggéraient beaucoup de polymérisation, étant donné la présence de plusieurs pics. Cette polymérisation peut s'être

produite lors de la formation du lien amide sur résine. La substitution de la résine a été évaluée à 0,58mmole/g, ce qui signifie qu'il est possible pour les chaînes peptidiques greffées au support polymérique de se lier entre elles et donc de donner lieu à l'apparition de liens amides intermoléculaires alors qu'ils devraient évidemment être intramoléculaires. Cette polymérisation peut également représenter des ponts disulfures s'étant formés d'une façon aléatoire. Cette réaction indésirable peut s'être produite lors du clivage ou lors des étapes qui le succèdent puisque c'est à ce niveau que les chaînes latérales des résidus Cys se retrouvent libres.

Un traitement basique réalisé avec les dérivés de l'ET-1 a révélé qu'une réaction secondaire s'est produite au niveau des résidus Ser, pendant le clivage au HF. En effet, le profil HPLC de certains dérivés, notamment celui de (Glu<sup>3</sup>Orn<sup>11</sup>)ET-1 s'est amélioré suite à ce traitement, faisant ressortir davantage un pic majoritaire. Pendant la synthèse, la chaîne latérale du résidu Ser est protégée, lui conférant alors une résistance aux réactions secondaires. Par contre, lors du clivage, la protection est retirée et rien ne peut vraiment empêcher le réarrangement (déplacement N vers O) de ce résidu, catalysé en milieu acide (Bodanszky et Martinez 1981). D'autre part, l'usage, pendant le clivage, des capteurs de carbocations usuels, soit l'éthanthiol et le m-crésol en excès, a prévenu l'alkylation des résidus sensibles, notamment Met, Cys, Tyr et Trp. Comme les capteurs sont utilisés en excès, ce sont eux, suivant la loi d'action des masses, qui subissent l'attaque des ions carboniums (Stewart et Young 1984).

### 11.3 Caractérisation de la première série de dérivés de l'ET-1

Seul le dérivé (Glu<sup>1</sup>Lys<sup>15</sup>)ET-1 a subi l'étape de bicyclisation. La séparation par HPLC analytique en phase inverse a révélé que le produit isolé contenait deux espèces moléculaires. L'une représentait probablement l'analogue comportant son résidu Met oxydé et l'autre la forme non oxydée. Un traitement à l'aide de NH<sub>4</sub>I aurait possiblement permis de récupérer le matériel sous la forme d'un seul pic. Par contre, la pureté évaluée à 79% par HPLC analytique sur une colonne de particules de 5µm et surtout, la faible quantité de matériel obtenu n'étaient pas suffisants pour justifier ce traitement.

## 12. Elaboration d'une nouvelle série de dérivés de l'ET-1

### 12.1 Conception de la deuxième série de peptides et choix des groupements protecteurs

Pour cette nouvelle série d'analogues de l'ET-1, nous avons décidé de focaliser sur le pont disulfure situé en position 1-15. De plus, nous avons positionné le résidu acide en position 15 plutôt qu'en position 1, amenant par conséquent le positionnement du résidu basique en position 1, un arrangement inverse comparativement à la première série de dérivés. C'est d'ailleurs de cette manière que Spinella et son équipe (1991) avaient disposé leurs résidus impliqués dans le lien amide. Le fait d'introduire le résidu acide en position 15 diminue un risque de réaction secondaire car, comme décrit à la section 11.1, le résidu Glu peut facilement former un dérivé pyroglutamique alors que le résidu Asp peut pour sa part se transformer en un dérivé aspartimide. Il est connu que la formation du pyrrolidone est d'autant plus facilitée en position N-terminale. (Bodanszky et Martinez 1981).

La synthèse en phase solide des dérivés de l'ET-1 a été réalisée cette fois-ci en chimie Fmoc. D'une façon générale, les conditions de réactions sont plus douces en chimie Fmoc qu'en chimie Boc. Le peptide est exposé à des conditions acides seulement à la fin de la synthèse, lors du clivage. L'acide utilisé, soit le TFA, est d'ailleurs beaucoup moins problématique que le HF utilisé en chimie Boc. Plusieurs études ont montré que le rendement en peptide final ainsi que la qualité du produit obtenu sont nettement augmentés en chimie Fmoc (Atherton et Sheppard 1989).

La résine choisie pour la synthèse des nouveaux analogues a été celle de Wang. Cette résine possède des groupements hydroxyméthyle auxquels le premier résidu, situé en position C-terminale du peptide, est greffé via un lien ester. Cette résine est beaucoup plus labile en milieu acide comparativement à la résine classique de Merrifield, dû à une plus grande densité électronique (Stewart et Young 1984).

La fonction amine en position alpha des résidus est protégée par un groupement Fmoc, éliminé par l'ajout de pipéridine (Stewart et Young 1984). Comme il a déjà été décrit à la section 11.1, les chaînes latérales de certains résidus réactifs doivent également être protégées. Par contre, étant donné que la synthèse utilisant la chimie Fmoc repose sur des principes différents de celle utilisant la chimie Boc, les groupements protecteurs utilisés sont différents. En fait, ils doivent être résistants aux conditions basiques utilisées pour l'élimination des groupements Fmoc mais doivent être plus labiles en conditions acides que ceux utilisés en chimie Boc, puisque le clivage est réalisé à l'aide d'un acide plus faible. Les groupements protecteurs utilisés comportent donc une plus forte densité électronique, favorisant alors l'attaque d'un proton. Ainsi, les chaînes latérales des résidus Asp, Glu, Ser et Tyr sont protégées par le tert-butyle (tBu), celles des résidus Cys et His sont protégées par le trityle (Trt) alors que celle du résidu Lys est protégée par le tert-butoxycarbonyle (Boc). Afin d'éviter autant que possible la formation de pyroglutamate, catalysée en milieu basique, un traitement à l'aide de pipéridine 50%/DMF pendant 10 min remplace le traitement normal d'élimination du groupement Fmoc situé sur l'amine en alpha du résidu Glu. Les résidus impliqués au niveau de la formation du pont lactame sont protégés par des groupements ne pouvant être éliminés qu'en milieu neutre, une façon sélective de procéder à la formation du lien amide alors que le peptide est encore ancré au niveau de la résine. Un groupement allyle protège donc la chaîne latérale des résidus Asp et Glu alors que les résidus Lys et Orn sont protégés par l'allyloxycarbonyle (aloc). Avant le clivage, le groupement Fmoc situé en position N-terminale est retiré, de façon à éliminer un agent alkylant potentiel supplémentaire (Stewart et Young 1984).

## 12.2 Evaluation de la synthèse de la deuxième série d'analogues de l'ET-1

La synthèse utilisant la chimie Fmoc a été beaucoup plus facile que celle utilisant la chimie Boc réalisée précédemment. Même après le couplage des résidus remplaçant ceux normalement retrouvés au niveau de la structure native de la molécule d'ET-1, la synthèse n'a posé aucun problème. Il est normal que des couplages aient été repris lors de l'usage des anhydrides symétriques puisque, comme il a été expliqué à la section 3.4.2, seulement 2 équivalents d'acide aminé réagissent alors qu'en temps normal l'excès est de 3. De plus, le DCM utilisé comme solvant pour le couplage des anhydrides symétriques

s'évapore facilement dans un système dont l'agitation est assurée par un flux d'azote, limitant de ce fait la diffusion adéquate des réactifs (Merrifield 1986). L'élimination des groupements allyle et aloc des chaînes latérales des résidus impliqués dans la formation du lien amide a par contre posé un problème. Le clivage, au moyen du TFA, d'échantillons de peptide-résine ayant subi plus d'un traitement de réduction catalytique, a montré que les produits étaient très détériorés par le traitement de déprotection. L'hydrure de tributylétain ( $\text{Bu}_3\text{SnH}$ ) utilisé comme nucléophile est une substance très réactive et pourrait donc être inadéquate pour la séquence de l'ET.

En effet, le protocole exécuté, tiré de Lu et Felix (1994), n'avait pas été réalisé avec des peptides apparentés à l'ET. Il avait plutôt été réalisé sur un fragment d'interleukine-2 comportant un dérivé de polyéthylène glycole (PEG) à son extrémité N-terminale. Ainsi, ce peptide ayant une structure totalement différente et des résidus moins sensibles que ceux de l'ET, tels Trp et Met, il a alors été possible pour eux d'effectuer l'élimination des groupements allyle et aloc sans abîmer le peptide et de plus d'une façon beaucoup plus rapide. Cet échec nous permet donc de constater que chaque peptide possède des propriétés distinctes selon la nature des résidus le composant. Un protocole qui fonctionne parfaitement bien pour un peptide donné peut s'avérer totalement destructeur pour un autre peptide. Il est évident que la tentative de former le pont lactame sur les dérivés peptidiques obtenus après traitement au palladium n'a pas amélioré leur pureté. Comme les peptides avaient nettement été endommagés, il était alors totalement inutile de tenter de les purifier. Il était d'ailleurs évident que tout comme pour la première série d'analogues synthétisés, le rendement en produit final aurait été extrêmement faible. Chose certaine par contre, la méthode de synthèse peptidique en phase solide utilisant la chimie Fmoc était beaucoup plus appropriée que celle utilisant la chimie Boc, pour la mise au point de dérivés de l'ET-1. Heureusement, plus d'un protocole d'élimination des groupements allyle et aloc existent et c'est ce qui a guidé notre approche subséquente.

### 13. Mise au point d'une troisième série d'analogues de l'ET-1

#### 13.1 Conception de la nouvelle série de dérivés de l'ET-1 et choix des groupements protecteurs

La mise au point de cette nouvelle série de peptides s'apparentant à l'ET-1 a été réalisée comme il est déjà décrit au sein de la section 12.1.

#### 13.2 Evaluation de la synthèse de la troisième série d'analogues de l'ET-1

La synthèse et l'élimination des groupements allyle et aloc se sont bien déroulées. La nouvelle méthode d'élimination des groupements allyle et aloc est une méthode beaucoup plus douce que celle effectuée précédemment. Le remplacement du  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  par la N-méthylmorpholine (NMM) ainsi que le changement du dérivé de palladium utilisé ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ) ont grandement amélioré l'allure des produits linéaires obtenus après clivage au TFA. Kates et son équipe, en 1993, ont d'ailleurs suggéré que la méthode utilisée est complètement compatible avec les groupements protecteurs utilisés en chimie Fmoc ainsi qu'avec les résidus d'acide aminé sensibles, tel Met et Trp. Les analogues comportant un résidu Asp au niveau du lien amide étaient par contre plus hétérogènes que ceux comportant un résidu Glu. Il semble donc que ce résidu serait plus sensible au traitement de déprotection, amenant alors la production de matériel contaminé après clivage au TFA. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a rapporté une réaction problématique au niveau du résidu Asp lors de l'élimination du groupement allyle protégeant sa chaîne latérale. D'ailleurs, une étude réalisée par Kunz et ses collègues, en 1985, a montré que le groupement allyle était un très bon groupement protecteur du résidu Asp, minimisant la formation d'aminosuccinimide. Nous devons cependant tenir compte du fait que cette étude a été réalisée avec des dipeptides, dont la conformation et le comportement chimique sont évidemment différents de la molécule d'ET, composée de 21 acides aminés.

Suite à la formation du lien amide utilisant le HBTU+HOBt/DMF accompagnés de DIEA ainsi que le BOP/DMF également accompagné de DIEA en plus du BOP/DMF : TFE (50 : 50), dont les propriétés solvatrices du TFE devraient pourtant minimiser la

formation de ponts lactames intermoléculaires, les produits monocycliques bruts obtenus reflétaient énormément de polymérisation. Nous croyons que cette polymérisation s'est produite à cause de la substitution importante de la résine utilisée. Il semblerait à ce sujet que le rendement et la pureté des peptides cycliques, obtenus par la méthode utilisant la protection allyle au niveau des acides aminés impliqués dans le cycle, seraient grandement influencés par le choix du support polymérique et que les plus hauts taux de substitution donneraient de plus faibles résultats. Kates et son équipe (1993) ont d'ailleurs utilisé une résine PEG-PS pour la mise au point du protocole d'élimination des groupements allyle et aloc. Il semblerait que ce support serait bien solvato dans les solvants chlorés utilisés lors de la déprotection et que la présence de tentacules au niveau de cette matrice aiderait à minimiser la polymérisation intermoléculaire.

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) a tout de même permis de minimiser la polymérisation. Une étude menée par Fournier, Wang et Felix, en 1988, a démontré à ce sujet que le BOP est un réactif qui permet d'effectuer des cyclisations d'une manière beaucoup plus rapide que le DCC mais que par contre, le taux de produit polymérique obtenu est grandement augmenté. Cette étude a également permis de noter que plus une résine est substituée, plus le pourcentage de dimères formés lors d'une cyclisation est augmenté. Avec une haute substitution de la résine combinée à une grande vitesse de cyclisation, utilisant le BOP, une quantité considérable de matériel polymérique risque alors de se retrouver dans le produit brut. Le DCC a donc minimisé la polymérisation de nos produits en diminuant la vitesse de la réaction de cyclisation.

Le clivage au TFA utilisant le 2-méthylindole et le m-crésol comme capteurs de carbocations a produit du matériel sous la forme d'une poudre amorphe rose. Cette couleur est attribuée au 2-méthylindole et démontre donc que les lavages post-clivage à l'aide de l'éther diéthylique n'ont pas permis l'élimination complète des capteurs de carbocations.

Les produits bruts monocycliques, possédant un résidu Asp au niveau du pont lactame, présentaient par contre toujours de la polymérisation. Malgré l'usage du DCC, nous n'avons pas réussi à minimiser cette réaction indésirable. Nous avons cependant

remarqué un phénomène très intéressant, soit que plus les chaînes latérales impliquées dans la formation du lien amide sont courtes, plus les produits bruts obtenus sont polymérisés. Ainsi, dans l'ordre croissant de polymérisation, nous retrouvons : (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1, (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1, (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1 et (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1. Nous suggérons que les chaînes latérales des peptides comportant un résidu Asp au sein du lien amide sont trop courtes pour favoriser le lien intramoléculaire. Il faut tenir compte du fait que la cyclisation est effectuée alors que le peptide est encore ancré au support polymérique et qu'ainsi, les groupements protégeant les chaînes latérales des autres résidus sont présents, pouvant alors produire un effet d'encombrement stérique. De cette manière, la molécule ne peut se replier facilement pour permettre la formation du pont lactame intramoléculaire. Alors, les molécules, suivant les lois thermodynamiques, forment donc plutôt des ponts lactames intermoléculaires, phénomène d'autant plus favorisé par la très grande substitution de la résine. Un traitement au NaBH<sub>4</sub> de ces deux analogues de l'ET-1 a par contre permis d'améliorer leur allure sur HPLC analytique, démontrant ainsi qu'il pouvait y avoir également eu formation de ponts disulfures aléatoires et/ou oxydation de la Met-7.

### 13.3 Evaluation de la pureté et de l'identité des dérivés de l'ET-1

L'évaluation de la pureté des produits a été réalisée par HPLC analytique et par électrophorèse capillaire (EC), deux techniques complémentaires. Par HPLC analytique, les dérivés présentent une pureté de 68% à 91% (Tableau 7), laquelle est directement proportionnelle à la longueur des chaînes latérales impliquées dans la formation du pont lactame. La pureté obtenue par EC est par contre plus faible. Ce phénomène est tout à fait normal puisque les deux méthodes d'analyse exploitent des propriétés physico-chimiques différentes et c'est d'ailleurs la raison pour laquelle ces méthodes sont utilisées. La HPLC sur phase inverse sépare les molécules selon un principe d'hydrophobicité alors que l'EC repose sur des propriétés électriques, de masse et de rayon des molécules à séparer. Le facteur déterminant dans l'EC est le flux électroosmotique. Ce dernier dépend du fait que le capillaire porte un grand nombre de charges fonctionnelles négatives à sa surface, dû à la présence de groupements silanols (SiOH) ionisés. Les ions positifs présents dans la solution tampon utilisée pendant la procédure ont donc une tendance

naturelle à s'accumuler à proximité de la surface du capillaire, créant alors une couche diffuse. Sous l'effet du champ électrique appliqué, les ions positifs migrent en direction de la cathode entraînant avec eux le tampon qui contient le soluté à séparer. Les molécules sont alors séparées selon leur résistance à ce flux, résistance qui est d'autant plus forte que la molécule est chargée négativement. A pH faible, comme nous l'avons réalisé, ce flux est plutôt inexistant puisque les groupements SiOH sont neutres. Les molécules sont alors séparées seulement selon leur charge positive. A pH élevé par contre, comme nous l'avons également effectué, les molécules chargées négativement sont alors séparées selon leur résistance au flux électroosmotique, les groupements SiOH étant chargés (Pairaud 1989).

A pH faible, les analogues comportant un résidu Asp au niveau du lien amide présentaient un temps de migration beaucoup plus court que les analogues comportant un résidu Glu à ce même niveau. Il se pourrait alors que le lien amide n'ait pas été formé et qu'à un tel pH il y ait apparition d'une charge positive sur la fonction amine de la chaîne latérale des résidus Lys et Orn. Le nombre de charge étant alors augmenté, par rapport aux autres analogues avec Glu, ceci pourrait diminuer le temps de migration. Il est également possible qu'il y ait eu une terminaison de chaîne par la formation d'un dérivé aspartimide, rendant ainsi la molécule plus petite et ayant donc plus de facilité à se déplacer à l'intérieur du capillaire. Pour le dérivé (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1, deux pics majoritaires ont été isolés par HPLC. Le pic ayant un T<sub>R</sub> de 11,33 min sur particules de 5µm présente deux pics par EC, aux deux pH étudiés. Il a déjà été démontré que les dimères de ponts disulfures présentent parfois un seul pic sur HPLC et deux pics par EC (Leban et al 1996). Nous supposons alors qu'il pourrait y avoir eu formation de dimères lors de l'oxydation utilisant le K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Cela pourrait également représenter des dimères de ponts lactames.

Les mesures par spectrométrie de masse démontrent que les produits obtenus ne sont pas ceux attendus. D'abord, les analogues (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 et (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 possèdent un poids presque identique qui est en plus supérieur de 200 au poids moléculaire attendu. En fait, on devrait observer au moins une différence de 14 entre les deux, puisque l'analogue (Orn<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 possède un méthylène (-CH<sub>2</sub>) de moins dans sa

chaîne latérale, par rapport au dérivé (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1. Ce phénomène est difficilement explicable. Cela pourrait provenir d'une réaction quelconque qui se serait produite pendant l'analyse par spectrométrie de masse. Pour le dérivé (Orn<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1, il est possible qu'il y ait eu terminaison de chaîne en cours de synthèse, par la formation d'un dérivé aspartimide, rendant ainsi la molécule plus petite. Cette réaction secondaire expliquerait la faible valeur de poids moléculaire obtenue par spectrométrie de masse, comparativement au poids moléculaire attendu, ainsi que la plus faible valeur de temps de migration observée par électrophorèse capillaire par rapport aux autres analogues. Etant donné la grande similitude entre les différents analogues, la valeur de temps de migration par électrophorèse capillaire aurait dû être très similaire. Donc, les analyses par spectrométrie de masse viennent confirmer les analyses par électrophorèse capillaire. Quant au dérivé (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1, la quantité de pics obtenus par spectrométrie de masse démontre que le produit n'est pas très pur. Le poids attendu est trouvé au sein du spectre en quantité très minoritaire alors que le pic majoritaire présente un poids supérieur de 200 au poids attendu. Par HPLC 5 $\mu$ m, le produit présente seulement 79% de pureté, ce qui vient expliquer l'allure du spectre de masse obtenu, soit que le produit attendu ne présente pas la majorité. Finalement, l'analyse de l'analogue (Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1 linéaire, comportant les groupements allyle et aloc au sein des chaînes latérales des résidus impliqués dans le lien amide, démontre que le poids moléculaire de 200 supérieur au poids envisagé provient de l'étape d'élimination des groupements allyle et aloc. Ce dernier présente un poids moléculaire identique à celui attendu. Dans la séquence des dérivés synthétisés, on retrouve deux résidus d'acide aspartique qui il est connu peuvent former un dérivé d'aspartimide (Bodanszky et Martinez 1981). Dans un article paru en 1998, par Limal et ses collègues, on note que plusieurs études ont déjà démontré que sous des conditions acides ou basiques, les dérivés d'acide aspartique, possédant un groupement tert-butyle comme groupement protecteur sur leur chaîne latérale, ce qui est notre cas puisque nous sommes en chimie Fmoc, peuvent mener à la formation de dérivés d'aspartimide. Le traitement d'élimination des groupements allyle et aloc nécessite l'ajout de N-méthylmorpholine et d'acide acétique, deux réactifs amenant soit des conditions acides ou basiques, pouvant alors favoriser la formation de dérivés d'aspartimide. Limal et son équipe ont également noté, lors de leur étude, que la pipéridine pouvait agir sur les dérivés d'acide aspartique pour produire une substitution nucléophile, menant à la formation d'un

dérivé de pipéridide. Dans notre cas, on peut supposer, de façon analogue, qu'après la formation de deux aspartimides, leur ouverture serait causée par la N-méthylmorpholine, suite à une action nucléophile au niveau du carbonyle de l'imide (Figure 25). Comme le poids moléculaire de la N-méthylmorpholine est de 101 et que deux molécules sont susceptibles d'avoir réagi, on arrive à un total de 202. Ceci correspond bien à la masse moléculaire supérieure observée par spectrométrie de masse pour la majorité des analogues. Encore une fois, il semble que ce traitement d'élimination des groupements allyle et aloc ne soit pas approprié pour les analogues de l'ET-1 synthétisés. Il faudrait donc envisager une autre stratégie, afin d'éliminer de manière efficace les groupements allyle et aloc. Par exemple, on pourrait utiliser une base plus forte que la N-méthylmorpholine, tel le 1, 8-diazabicyclo-(5.4.0)undec-7-ene (DBU), qui permettrait à la réaction d'élimination des groupements allyle et aloc de procéder de façon plus rapide. Ceci diminuerait alors les chances d'action du nucléophile sur les résidus d'acides aspartique (Limal et al 1998).

#### 14. Efficacité du clivage utilisant le 2-méthylindole et le m-crésol comme capteurs de carbocations

Ce test nous a permis de conclure que le clivage utilisant le 2-méthylindole accompagné du m-crésol est autant efficace, malgré quelques petites impuretés mineures, que le clivage utilisant l'éthanedithiol combiné au phénol. L'odeur moins désagréable du 2-méthylindole que celle de l'éthanedithiol peut présenter un avantage à son utilisation. Le but de cette étude était par contre de vérifier si le 2-méthylindole se transformait en un dérivé de méthylindole carbonate, pendant le clivage, dû au départ du groupement Boc protégeant le noyau indole du Trp. En fait, la formation de ce dérivé est indésirable, puisque le groupement Boc doit rester accroché au Trp, afin de le protéger des carbocations générés. Il est connu que lors du clivage utilisant l'éthanedithiol, le Boc reste ancré sur le Trp, tout au long du traitement. Ainsi, puisque les produits clivés à l'aide des deux méthodes semblent assez similaires par HPLC analytique, ceci nous porte à croire qu'il n'y a pas formation du dérivé méthylindole carbonate, lors du clivage avec le 2-méthylindole. Il semble par contre que cette dernière méthode de clivage ne soit pas efficace pour tous les peptides. En effet, le clivage de certains dérivés de l'ET-1,

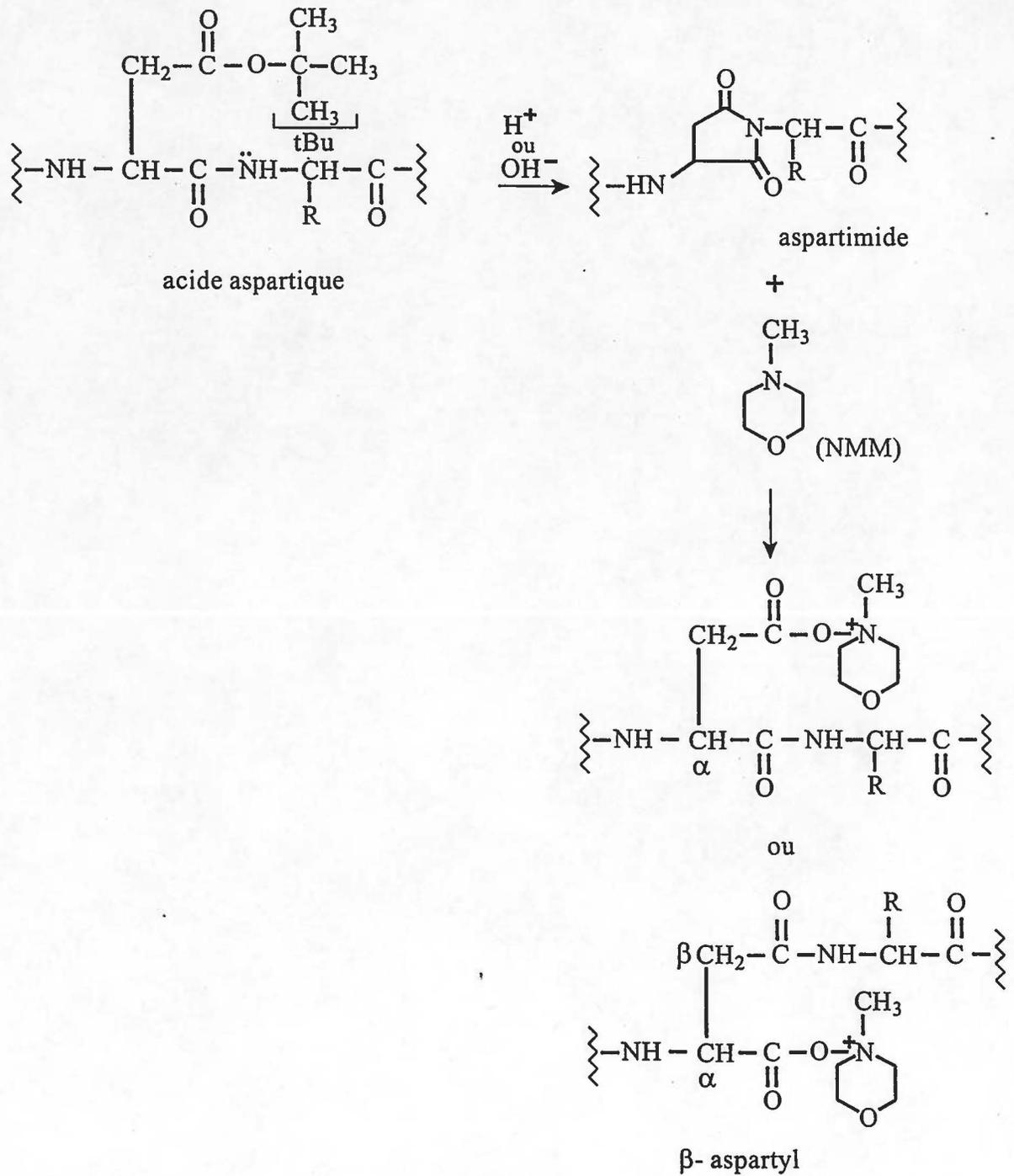


Figure 25 : Action de la N-méthylmorpholine sur les résidus d'acide aspartique (Limal et al 1998).

notamment (Lys<sup>1</sup>Asp<sup>15</sup>)ET-1, à l'aide de cette méthode, a permis l'obtention de dérivés très hétérogènes et très difficiles à purifier par HPLC en phase inverse. Il apparaît que certains groupements protecteurs n'ont pas été éliminés puisqu'un deuxième clivage utilisant l'éthanedithiol combiné au phénol a nettement amélioré l'allure du matériel brut obtenu.

## Conclusion

L'endothéline-1 (ET-1), composé de 21 acides aminés et présentant deux ponts disulfures, selon un arrangement unique parmi les peptides bioactifs retrouvés chez les mammifères, est le plus puissant vasoconstricteur connu chez l'humain. L'implication de ce peptide au niveau de diverses physiopathologies, tels l'infarctus du myocarde et l'asthme, démontre à quel point il est important, autant d'un point de vue thérapeutique que fondamental, de développer des substances facilitant son étude et pouvant possiblement contrer ses actions néfastes.

C'est pourquoi nous avons tenté de mettre au point une série de dérivés de l'ET-1 comportant un lien amide substitué à un de ces deux ponts disulfures. Pour ce faire, un résidu acide (acide aspartique ou acide glutamique) et un résidu basique (lysine ou ornithine) étaient utilisés pour remplacer les résidus cystéines normalement rencontrés au sein de la molécule native. L'ajout d'un espaceur glycine dans ce lien amide, provoquant une augmentation du nombre d'atomes impliqués dans la formation du cycle, a également été effectué pour certains des analogues. Ceci avait pour but d'en étudier l'effet sur l'affinité et/ou l'activation du récepteur. La synthèse peptidique en phase solide utilisant la chimie Boc et celle utilisant la chimie Fmoc ont été expérimentées, pour finalement noter que la chimie Fmoc est la plus appropriée pour l'élaboration de tels dérivés sensibles. La méthode de protection sélective sur les chaînes latérales des résidus impliqués dans la formation du lien amide utilise les groupements allyloxycarbonyle (aloc) et allyle. L'élimination de ces groupements emploie une réduction catalytique en présence de palladium combinée à un nucléophile, la N-méthylmorpholine et un donneur de proton, l'acide acétique. Il semble par contre que cette méthode devra être révisée, puisqu'une réaction secondaire se produit à ce niveau entre la N-méthylmorpholine et les deux résidus d'acide aspartique retrouvés au sein de la séquence des analogues de l'ET-1 synthétisés. La formation du pont lactame est réalisée à l'aide du DCC, un des premiers agents de couplage introduits en synthèse peptidique.

Dès que la méthode d'élimination des groupements allyle et aloc sera à point, une vaste gamme de dérivés peptidiques similaires pourront être effectués. Il pourra y avoir

substitution du pont disulfure en position 1-15, 3-11 ou les deux simultanément, en y incluant un espaceur glycine ou non et finalement en utilisant une diversité de résidus d'acides aminés acides et basiques. Comme plusieurs dérivés pourront être réalisés, les chances de découvrir un antagoniste de la molécule seront grandement augmentées, suite à la vérification de leur activité pharmacologique sur les différents récepteurs de l'ET. Les antagonistes peuvent donner des informations importantes quant aux rôles de la molécule au niveau de la physiologie cardio-vasculaire, soit la manière avec laquelle elle interagit avec ses différentes sous-classe de récepteurs ainsi que la distribution de ces derniers dans l'organisme, tout comme son implication dans diverses pathologies.

Bref, les tests d'activités pharmacologiques de ces analogues permettront d'élucider l'implication des résidus cystéines lors de l'interaction de l'endothéline avec ses récepteurs.

## Appendices

### Appendice A

#### Abréviations des acides aminés

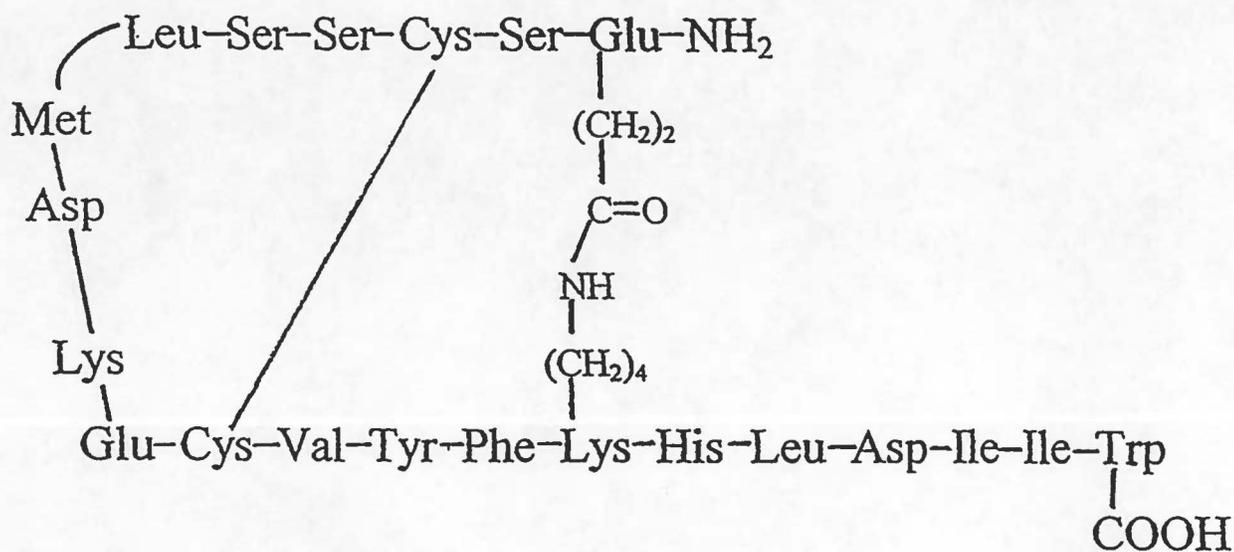
ACIDE AMINÉ	ABRÉVIATION
acide aspartique	Asp
acide glutamique	Glu
Cystéine	Cys
Glycine	Gly
Histidine	His
Isoleucine	Ile
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Méthionine	Met
Ornithine	Orn
Phénylalanine	Phe
Sérine	Ser
Tryptophane	Trp
Tyrosine	Tyr
Valine	Val

Appendice B

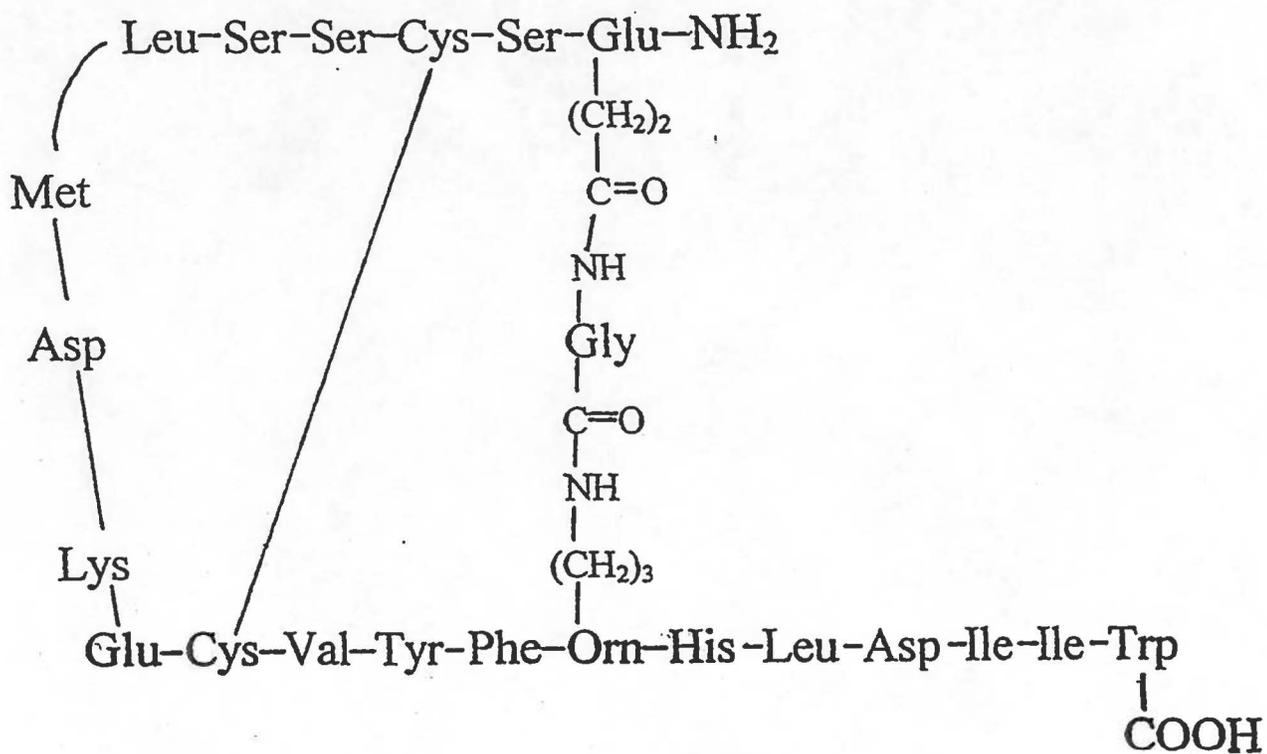
Exemples de séquences des dérivés de l'ET-1 synthétisés

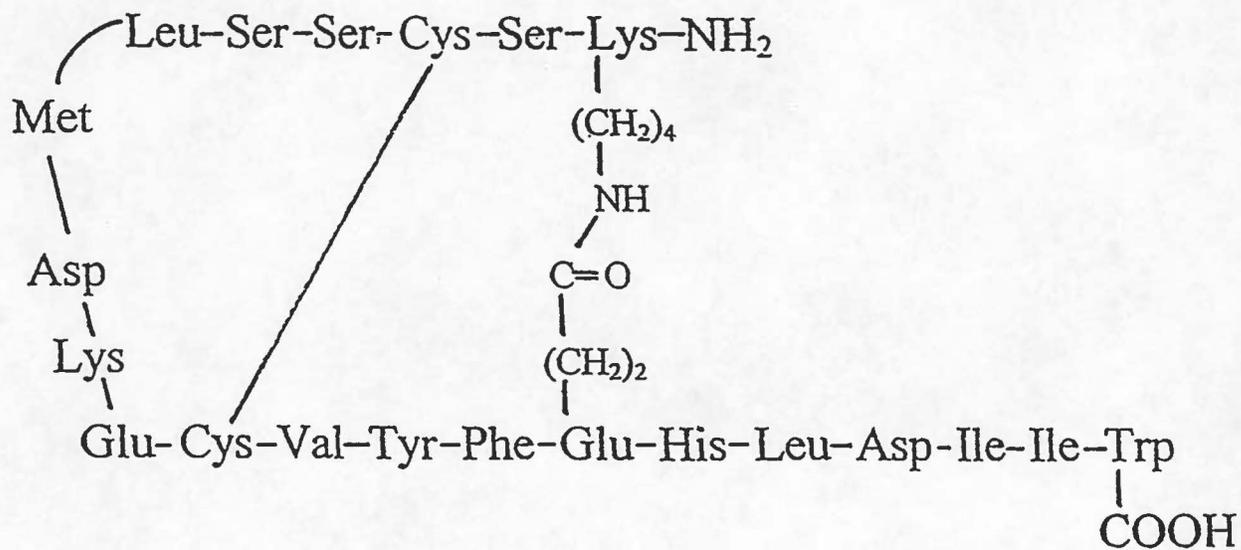
Première série d'analogues synthétisés

**(Glu<sup>1</sup>Lys<sup>15</sup>)ET-1**



**(Glu<sup>1</sup>-Gly-Orn<sup>15</sup>)ET-1**



Deuxième et troisième série de dérivés synthétisés**(Lys<sup>1</sup>Glu<sup>15</sup>)ET-1**

## Références

- AHN, K., K. Beningo, G. Olds et D. Hupe. 1992. « The Endothelin-Converting Enzyme from Human Umbilical Vein is a Membrane-Bound Metalloprotease Similar to that from Bovine Aortic Endothelial Cells ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 89, p. 8606-8610.
- ARAI, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo et S. Nakanishi. 1990. « Cloning and Expression of a cDNA Encoding an Endothelin Receptor ». Nature, vol. 348, p. 730-732.
- ATHERTON, E. et R.C. Sheppard. 1989. Solid Phase Peptide Synthesis : a Practical Approach. Oxford, England : IRL Press at Oxford University Press, 203p.
- AUMELAS, A., L. Chiche, E. Mahe, D. Le-Nguyen, P. Sizun, P. Berthault et B. Perly. 1991. « Determination of the Structure of [Nle<sup>7</sup>]-Endothelin by <sup>1</sup>H NMR ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 37, p. 315-324.
- BATTISTINI, B., P. D'Orléans-Juste et P. Sirois. 1992. « Les Endothélines et le Poumon ». Médecine/Sciences, vol. 8, p. 679-687.
- BECKER, A., E. B. Dowdle, U. Hechler, K. Kauser, P. Donner et W.-D. Schleuning. 1993. « Bibrotoxin, a Novel Member of the Endothelin/Sarafotoxin Peptide Family, from the Venom of the Burrowing Asp *Atractaspis bibroni* ». FEBS Letters, vol. 315, p. 100-103.
- BOCKAERT, J. 1996. « Récepteurs Couplés aux Protéines G : des Concepts à la Structure ». Médecine/Sciences, vol. 12, p. 79-85.
- BODANSZKY, M. et J. Martinez. 1981. « Side Reactions in Peptide Synthesis ». Synthesis, p. 333-356.
- CAMPBELL, R. M., J. Bongers et A. M. Felix. 1995. « Rational Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Growth Hormone Releasing Factor Analogues ». Biopolymers (Peptide Science), vol. 37, p. 67-88.
- CARPINO, L. A., A. El-Faham, G. Truran, F. Albericio, S.A. Kates, H. Shroff et S. A. Triolo. 1993. « Azabenzotriazole-Based Coupling Reagents in Solid-Phase Peptide Synthesis ». Thirteenth American Peptide Symposium.
- CASTRO, B., J. R. Dormoy, G. Evin et C. Selve. 1975. « Réactifs de Couplage Peptidique IV (1)-l'Hexafluorophosphate de Benzotriazolyl N-Oxytrisdiméthylamino Phosphonium (B. O. P.) ». Tetrahedron Letters, p. 1219-1222.

- 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.
- CORVOL, P., F. Alhenc-Gelas et F. Soubrier. 1993. « L'endothélium, Site de Production et de Métabolisme des Peptides Vasoactifs ». Médecine/Sciences, vol. 9, p. 1050-1060.
- DALGARNO, D. C., L. Slater, S. Chackalamannil et M. M. Senior. 1992. « Solution Conformation of Endothelin and Point Mutants by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 40, p. 515-523.
- DOHERTY, A. M. 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.
- ERGUL, A., R. L. Tackett et D. Puett. 1995. « Identification of Receptor Binding and Activation Sites in Endothelin-1 by Use of Site-Directed Mutagenesis ». Circulation Research, vol. 77, p. 1087-1094.
- FIELDS, G. B. et R. L. Noble. 1990. « Solid Phase Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 35, p. 161-214.
- FOREST, M. et A. Fournier. 1990. « BOP Reagent for the Coupling of pGlu and Boc-His(Tos) in Solid Phase Peptide Synthesis ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 35, p. 89-94.
- FORGET, M.-A., N. Lebel, P. Sirois, Y. Boulanger et A. Fournier. 1996. « Biological and Molecular Analyses of Structurally Reduced Analogues of Endothelin-1 ». Molecular Pharmacology, vol. 49, p. 1071-1079.
- FOURNIER, A., C.-T. Wang et A. M. Felix. 1988. « Applications of BOP Reagent in Solid Phase Synthesis ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 31, p. 86-97.
- GAILIT, J. 1993. « Restoring Free Sulfhydryl Groups in Synthetic Peptides ». Analytical Biochemistry, vol. 214, p.334-335.
- GERMAIN, M., B. Battistini, J. G. Filep, P. Sirois et A. Fournier. 1993. « Endothelin Derivatives Showing Potent Effects in the Guinea Pig Trachea ». Peptides, vol. 14, p. 613-619.

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

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

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

HASHIDO, K., M. Adachi, T. Gamou, T. Watanabe, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1993. « Identification of Specific Intracellular Domains of the Human ET<sub>A</sub> Receptor Required for Ligand Binding and Signal Transduction ». Cellular and Molecular Biology Research, vol. 39, p. 3-12.

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

HELUY, V., G. Germain, T. Fournier, F. Ferré et M. Breuiller-Fouché. 1995. « Endothelin ET<sub>A</sub> Receptors Mediate Human Uterine Smooth Muscle Contraction ». European Journal of Pharmacology, vol. 285, p. 89-94.

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

HUTCHISON, F. N. 1993. « Endothelin : A New Role for an Old Friend ». Journal of Laboratory Clinical Medicine, vol. 122, p. 126-127.

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

ISHIKAWA, K., M. Ihara, K. Noguchi, T. Mase, N. Mino, T. Saeki, T. Fukuroda, T. Fukami, S. Ozaki, T. Nagase, M. Nishikibe et M. Yano. 1994. « Biochemical and Pharmacological Profile of a Potent and Selective Endothelin B-Receptor Antagonist, BQ-788 ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 91, p. 4892-4896.

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

- KARNE, S., C. K. Jayawickreme et M. R. Lerner. 1993. « Cloning and Characterisation of an Endothelin-3 Specific Receptor (ET<sub>C</sub> Receptor) from *Xenopus laevis* Dermal Melanophores ». The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 19126-19133.
- KATES, S. A., S. B. Daniels, N. A. Solé, G. Barany et F. Albericio. 1993. « Automated Allyl Chemistry for Solid-Phase Peptide Synthesis : Applications to Cyclic and Branched Peptides ». Thirteenth American Peptide Symposium.
- KITAGAWA, K., S. Futaki, T. Yagami, S. Sumi et K. Inoue. 1994. « Solid-Phase Synthesis of Cionin, a Protochordate-Derived Octapeptide Related to the Gastrin/Cholecystokinin Family of Peptides, and its Mono-Tyrosine-Sulfate-Containing Derivatives ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 43, p. 190-200.
- KLOOG, Y., I. Ambar, M. Sokolovsky, E. Kochva, Z. Wollberg et A. Bdolah. 1988. « Sarafotoxin, a Novel Vasoconstrictor Peptide : Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Heart and Brain ». Science, vol. 242, p. 268-270.
- KRÄMER, B. K., M. Ackermann, S. M. Kohler et G. A. J. Riegger. 1994. « Role of Endothelin in Hypertension ». Clinical Investigation, vol. 72, p.88-93.
- KUMAR, C., V. Mwangi, P. Nuthulaganti, H.-L. Wu, M. Pullen, K. Brun, H. Aiyar, R. A. Morris, R. Naughton et P. Nambi. 1994. « Cloning and Characterization of a Novel Endothelin Receptor from *Xenopus* Heart ». The Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 13414-13420.
- KUNZ, H., H. Waldmann et C. Unverzagt. 1985. « Allyl Ester as Temporary Protecting Group for the  $\beta$ -Carboxy Function of Aspartic Acid ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 26, p. 493-497.
- KURODA, M., K. Yamazaki et T. Taga. 1994. « Conformation of the C-Terminus of Endothelin-1 in Aqueous Solution Studied by Monte-Carlo Simulation ». FEBS Letters, vol. 355, p. 263-266.
- LEBAN, J. J., A. Spaltenstein, A. Landavazo, W. Chesnut, A. Aulabaugh, L. C. E. Taylor et A. J. Daniels. 1996. « Synthesis, Structure and Stability of Novel Dimeric Peptide-Disulfides ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 47, p. 161-166.
- LERMAN, A., F. L. Hildebrand Jr., K. B. Margulies, B. O'Murchu, M. A. Perella, D. M. Heublein, T. R. Schwab et J. C. Burnett Jr. 1990. « Endothelin : A New Cardiovascular Regulatory Peptide ». Mayo Clinical Procedures, vol. 65, p. 1441-1455.
- LIMAL, D., J. P. Briand, P. Dalbon et M. Jolivet. 1998. « Solid-phase Synthesis and On-Resin Cyclization of a Disulfide Bond Peptide and Lactam Analogues Corresponding to the Major Antigenic Site of HIV gp41 Protein ». Journal of Peptide Research, vol. 52, p. 121-129.

LIN, H. Y., E. H. Kaji, G. K. Winkel, H. E. Ivs et H. F. Lodish. 1991. « Cloning and Functional Expression of a Vascular Smooth Muscle Endothelial 1 Receptor ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, p. 3185-3189.

LU, Y.-A. et A. M. Felix. 1994. « Pegylated Peptides II ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 43, p. 127-138.

LÜSCHER, T. F. 1991. « Endothelin ». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 18, p. S15-S22.

MALLAT, A. et S. Lotersztajn. 1996. « Multiple Hepatic Functions of Endothelin-1 : Physiopathological Relevance ». Journal of Hepatology, vol. 25, p. 405-413.

MASAKI, T., S. Kimura, M. Yanagisawa et K. Goto. 1991. « Molecular and Cellular Mechanism of Endothelin Regulation. Implications for Vascular Function ». Circulation, vol. 84, p. 1457-1468.

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

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

MOREAU, P. 1997. « Rôle de l'Endothéline dans l'Hypertension Artérielle ». La Presse Médicale, vol. 26, p. 700-702.

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

NEWBY, D. E. et D. J. Webb. 1997. « The Endothelin System in Cardiovascular Disease ». British Medical Journal, vol. 314, p. 531-532.

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.

OHLSTEIN, E. H., J. D. Elliott, G. Z. Feuerstein et R. R. Ruffolo Jr. 1996. « Endothelin Receptors : Receptor Classification, Novel Receptor Antagonists, and Potential Therapeutic Targets ». Medicinal Research Reviews, vol. 16, p. 365-390.

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

PAIRAUD, C. 1989. « L'Electrophorèse Capillaire ». Biofutur, vol. 82, p. 7-11.

PATT, W.C., J. J. Edmunds, J. T. Repine, K. A. Berryman, B. R. Reisdorph, C. Lee, M. S. Plummer, A. Shahripour, S.J. Haleen, J. A. Keiser, M. A. Flynn, K. M. Welch, E. E. Reynolds, R. Rubin, B. Tobias, H. Hallak et A. M. Doherty. 1997. « Structure-Activity Relationships in a Series of Orally Active  $\gamma$ -Hydroxy Butenolide Endothelin Antagonists ». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 40, p. 1063-1074.

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.

PERNOW, J., L. Kaijser, J. M. Lundberg et G. Ahlborg. 1996. « Comparable Potent Coronary Constrictor Effects of Endothelin-1 and Big Endothelin-1 in Humans ». Circulation, vol. 94, p. 2077-2082.

PETO, H., R. Corder, R. W. Janes et B. A. Wallace. 1996. « A Molecular Model for Human Big-Endothelin-1 (Big ET-1) ». FEBS Letters, vol. 394, p. 191-195.

SAIDA, K., Y. Mitsui et N. Ishida. 1989. « A Novel Peptide, Vasoactive Intestinal Contractor, of a New (Endothelin) Peptide Family ». The Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 14613-14616.

SAKURAI, T., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1990. « Cloning of a cDNA Encoding a Non-Isopeptide-Selective Subtype of the Endothelin Receptor ». Nature, vol. 348, p. 732-735.

SEDO, A. et Z. Vanickova. 1996. « Endothelins as Cell Growth Regulators ». Folia Biologica, vol. 42, p. 79-82.

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

SIEBER, P. 1987. « An Improved Method for Anchoring of 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Amino Acids to 4-Alkoxybenzyl Alcohol Resins ». Tetrahedron Letters, vol. 28, 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.

SPINELLA, M. J., R. Kottke, H. I. Magazine, M. S. Healy, J. A. Catena, P. Wilken et T. T. Andersen. 1993. « Endothelin-Receptor Interactions. Role of a Putative Sulfhydryl on the Endothelin Receptor ». FEBS Letters, vol. 328, p. 82-88.

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

TAKASUKA, T., T. Sakurai, K. Goto, Y. Furuichi et T. Watanabe. 1994. « Human Endothelin Receptor ET<sub>B</sub> ». The Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 7509-7513.

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

VOLLMAR, A. M. 1992. « Endothelins ». Journal of Veterinary Medicine, vol. A39, p. 481-493.

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.

WILCOX, J. G., I. E. Hatch, E. Gentschein, F. Z. Stanczyk et R. A. Lobo. 1997. « Endothelin Levels Decrease After Oral and Nonoral Estrogen in Postmenopausal Women with Increased Cardiovascular Risk Factors ». Fertility and Sterility, vol. 67, p. 273-277.

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.