Université du Québec
INRS Santé

ÉTUDE DE LA PORTION C-TERMINALE D'ANALOGUES À STRUCTURE RÉDUITE DE L'ENDOTHÉLINE-1

Par
Marie-Annick Forget-D.

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

Septembre 1995

© droits réservés de Marie-Annick Forget-D. 1995

Résumé

L'endothéline-1 (ET-1), un peptide de 21 acides aminés comportant 2 ponts disulfures, est le plus puissant vasoconstricteur connu chez l'humain. ET-1 présente également une gamme étendue d'actions physiologiques (contrôle du tonus vasculaire, production d'hormones, etc.). Ce peptide est aussi impliqué dans diverses pathologies humaines comme l'infarctus, l'asthme, l'insuffisance rénale aiguë ou chronique, etc. D'après les résultats des études pharmacologiques, l'organisme contiendrait divers sous-types de récepteurs pour les peptides de la famille de l'ET : ET_A, ET_{B1}, ET_{B2} et ET_C. La définition du rôle de chaque acide aminé et de sa contribution à la stabilité de l'ensemble de la structure ainsi qu'à l'activité biologique se situe au centre des études de structure-activité. L'identification de ces contributions facilitera la compréhension de l'interaction des ETs avec leurs récepteurs et conduira à la conception d'analogues sélectifs dans leur mode d'action biologique. Afin de préciser le mode d'action des ETs au niveau moléculaire, une série d'analogues ont été obtenus par synthèse en phase solide. Les dérivés peptidiques comprennent la portion 3-11 de ET-1 liée *via* l'acide aminocaproïque (Aca), un espaceur aliphatique flexible, à des segments C-terminaux de longueur variable (16-21, 17-21, ..., 21). Les peptides ont été étudiés sous forme linéaire ou cyclique, en présence ou en absence d'un groupement formyle sur le Trp^{21}. En effet, nous nous intéressons aux récepteurs ET_B et l'ajout de ce groupement chimique permettrait de discriminer entre les récepteurs ET_{B1} et ET_{B2}. Le rôle des ponts disulfures dans la liaison et l'activation des récepteurs a été étudié de même que l'importance des acides aminés hydrophobes Val^{12}, Tyr^{13} et Phe^{14}.

Le parenchyme de poumons de cobayes, un tissu produisant une réponse ET_B a permis la réalisation d'études pharmacologiques. Nous avons observé que, parmi les analogues linéaires formylés, [$Cys(Acm)^{3,11}$, $Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(17-21)ET est un agoniste partiel. L'ajout de His^{16}, comme dans [$Cys(Acm)^{3,11}$,

Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, cause une diminution de l'activité contractile suggérant que le groupement imidazole défavorise l'interaction des analogues linéaires avec le récepteur. L'activité biologique des dérivés linéaires déformylés suggère fortement que le groupement formyle joue un rôle stabilisateur dans la structure de ces molécules. Cet effet n'est pas observé au niveau des dérivés cycliques. La réalisation d'études de modélisation moléculaire a permis de relier la structure des analogues avec l'activité contractile enregistrée. Elles suggèrent que les dérivés cycliques et linéaires adoptent des conformations différentes. Enfin, les résultats montrent que les résidus C-terminaux 18-21 sont nécessaires à l'obtention d'une activité biologique significative sur le parenchyme de cobaye et que l'Aca joue un rôle important.

Finalement, nous sommes arrivés à la conclusion que ET-1 se lierait à ses récepteurs par des interactions hydrophobes. En effet, nos résultats montrent que la structure tridimensionnelle des pharmacophores s'avère plus importante que les charges présentes sur les acides aminés.

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer ma gratitude au directeur de mes recherches, le D[r] Alain Fournier, pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée et pour le temps qu'il dispense sans compter.

Je ne puis déposer ce mémoire sans remercier également :

le D[r] Pierre Sirois et son étudiante, Mme Nathalie Lebel, pour l'assistance apportée lors de la réalisation de la partie pharmacologique de mon projet,

le D[r] Yvan Boulanger et son technicien, M. Alain Larocque, qui ont réalisé les études de modélisation moléculaire,

les membres du laboratoire de L'INRS-Santé, plus particulièrement Mme Carine Losito et M. Patrick Sabourin,

Mme Diane Lacoste et M. Gilbert Leblanc de l'INRS-Santé pour leur aide appréciable,

Mme Micheline Dubois pour son excellent travail de révision et de correction lors de la mise en page de ce mémoire ainsi que pour son support constant et attentif,

le Conseil de Recherches Médicales du Canada et l'INRS-Santé pour leur support financier.

Table des matières

Résumé i

Remerciements iii

Liste des figures et des tableaux vi

Introduction 1

Matériel et méthodes 14

1. Synthèse et purification d'analogues de ET-1 14
    1.1 Réactifs et solvants utilisés 14
    1.2 Sélection de la résine et des groupements protecteurs des acides aminés 14
    1.3 Protocole de synthèse des peptides 15
        1.3.1 Fixation du premier acide aminé sur la résine 17
        1.3.2 Test à l'acide picrique 17
        1.3.3 Protocole de couplage des autres acides aminés 19
    1.4 Clivage à l'acide fluorhydrique 22
    1.5 Purification des peptides bruts 22
    1.6 Cyclisation et déformylation des analogues de ET-1 23

2. Caractérisation des analogues de ET-1 24
    2.1 CLHP analytique 24
    2.2 Électrophorèse capillaire 25
    2.3 Spectrométrie de masse 25
    2.4 Analyse de la composition en acides aminés 25

3. Évaluation pharmacologique de l'ET-1 et de ses analogues 26
    3.1 Animaux et réactifs 26
    3.2 Essais biologiques *in vitro* des analogues sur le parenchyme de poumons de cobayes 26

4. Étude de modélisation moléculaire 27

5. Synthèse en phase solide de BQ-123 30
    5.1 Réactifs et solvants utilisés 30
    5.2 Protocole de synthèse de Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH) 30
    5.3 Protocole de synthèse de BQ-123 31
        5.3.1 Couplage des acides aminés 31
        5.3.2 Cyclisation intramoléculaire 32

5.3.3 Clivage, purification et caractérisation 32

Résultats 33

6. Synthèse, purification et caractérisation des analogues de ET-1 33
6.1 Synthèse des dérivés peptidiques 33
6.2 Purification, déformylation et cyclisation des analogues de ET-1 33
6.3 Caractérisation des peptides 36

7. Études pharmacologiques sur le parenchyme de poumons de cobayes 40

8. Études de structure par modélisation moléculaire 43

9. Synthèse et caractérisation de BQ-123 49
9.1 Synthèse, cyclisation, clivage et purification 49
9.2 Caractérisation de BQ-123 53

Discussion 56

10. Élaboration des analogues de ET-1 et synthèse 56
10.1 Conception des analogues de ET-1 et choix des groupements protecteurs 56
10.2 Évaluation de la synthèse 60
10.3 Étude de l'identité et de la pureté des peptides : caractérisation des dérivés de ET-1 61

11. Études de structure-activité des analogues de ET-1 62
11.1 Choix des tissus utilisés 62
11.2 Étude des dérivés de ET-1 synthétisés 63
11.2.1 Analogues linéaires 63
11.2.2 Analogues cycliques 66

12. Généralisations des études de structure-activité 70

Conclusion 72

Appendice A 74

Appendice B 75

Liste des références 77

Listes des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Les peptides de la famille des endothélines 2

Figure 2 : Biosynthèse de ET-1 4

Figure 3 : Les récepteurs de ET-1 dans les tissus vasculaires humains 9

Figure 4 : Méthode de synthèse de peptides en phase solide 18

Figure 5 : Protocole des bioessais sur le parenchyme de poumons de cobayes 28

Figure 6 : Profils CLHP analytiques de [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET après : A) synthèse en phase solide avec le réactif BOP et clivage au HF; B) purification par CLHP préparative 34

Figure 7 : Profils CLHP analytiques de l'analogue linéaire 17-21 après : A) purification sur CLHP préparative; B) déformylation par traitement à la pipéridine 0,1 N, 30 min à 0 °C; C) co-injection de A et B 35

Figure 8 : Profils CLHP analytiques de l'analogue 19-21 déformylé : A) en solution dans CH_3COOH 80%/H_2O, avant cyclisation; B) après cyclisation avec 50 éq. de I_2 dans le méthanol; C) après purification post-cyclisation sur CLHP préparative 37

Figure 9 : Courbes concentration-réponse des analogues réalisées selon les conditions décrites [section 3.2] : A) linéaires formylés soit : [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET; B) linéaires soit : [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET 41

Figure 10 : Courbes concentration-réponse des analogues réalisées selon les conditions décrites [section 3.2] : A) cycliques formylés

soit : [Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, . . . (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET; B) cycliques soit : (3-11)-Aca-(16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, . . . (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET 44

Figure 11 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite [section 4] : A) ET-1; B) [Trp(For)^{21}]ET-1 45

Figure 12 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite [section 4] : A) [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET; B) [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET 47

Figure 13 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite [section 4] : A) [Cys(Acm^{3,11}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET; B) [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET 48

Figure 14 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite [section 4] : A) (3-11)-Aca-(16-21)ET; B) [Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET 50

Figure 15 : Profils CLHP analytiques de BQ-123 après : A) synthèse en phase solide avec le réactif de couplage BOP et clivage au HF; B) purification par CLHP préparative 52

Figure 16 : Profils CLHP analytiques de BQ-123 : A) provenant d'American Peptide Company inc.; B) synthétisé selon la méthode décrite [section 5]; C) co-injection de A et B 54

Figure 17 : Effet de l'injection de ET-1 (0,5 nmol/Kg) ou de la co-injection de ET-1 et de BQ-123 (1 μmol/Kg) sur la pression artérielle moyenne chez le rat (en mm Hg) 55

Liste des tableaux

Tableau I : Organes ou tissus sensibles à l'action de l'endothéline et effets produits 6

Tableau II : Groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels utilisés lors de la synthèse des analogues de ET-1 16

Tableau III : Cycle de couplage d'un acide aminé avec le réactif BOP 20

Tableau IV : Quantité et concentration des peptides utilisés afin d'obtenir une courbe dose-réponse 29

Tableau V : Caractérisation des analogues de ET-1 par CLHP analytique et par électrophorèse capillaire 38

Tableau VI : Pureté des analogues de ET-1 d'après les mesures par CLHP analytique et par électrophorèse capillaire 39

Tableau VII : Concentration des analogues produisant 50% de la réponse maximale à ET-1 dans le parenchyme de poumons de cobayes 42

Introduction

Dès le début des années 1980, des résultats expérimentaux montrent que l'endothélium des vaisseaux sanguins participe à la contraction des muscles lisses vasculaires (Holden et McCall, 1984). De multiples études ont alors été menées afin de caractériser cet élément vasoconstricteur (Agricola et al., 1984; O'Brien et McMurtry, 1984; Hickey et al., 1985). Par la suite, Gillespie et al., (1986) démontrent que cette substance est sensible à la trypsine et est donc de nature protéique.

C'est en 1988 que Yanagisawa et al. (1988b) ont isolé, cloné et caractérisé un peptide de 21 acides aminés nommé endothéline (ET). Ce dernier, isolé à partir du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc en culture, s'est avéré le plus puissant vasoconstricteur connu. Ce peptide, aujourd'hui connu sous le nom d'endothéline-1 (ET-1), appartient à une vaste famille de peptides vasoconstricteurs comprenant notamment l'endothéline-2 (ET-2) (Inoue et al., 1989), l'endothéline-3 (ET-3) (Yanagisawa et al., 1988a) et le *vasoactive intestinal contractor* (VIC) (Saida, Mitsui et Ishida, 1989). Ces molécules, très semblables à ET-1, ne diffèrent de cette dernière que par 2, 6 et 3 acides aminés respectivement (Figure 1). En parallèle, des équipes de recherches ont isolé des cardiotoxines présentant une remarquable homologie de séquence avec les endothélines. Ainsi, les sarafotoxines (SRTXs) (Kloog et al., 1988) et la bibrotoxine (Becker et al., 1993) ont été respectivement extraites du venin des serpents *Atractaspis engaddensis* et *Atractaspis bibroni*.

Tous ces peptides possèdent 21 acides aminés, 2 ponts disulfures entre les cystéines 1-15 et 3-11 de même que des extrémités amino- et carboxy-terminales libres. La similarité de la composition en acides aminés des peptides de la famille des endothélines, (71-95% entre les ETs, 81-95% entre les SRTXs et 52-67% entre les ETs et les SRTXs), montre l'importance physiologique de ces molécules peu modifiées pendant l'évolution des espèces, tout en suggérant une origine évolutive

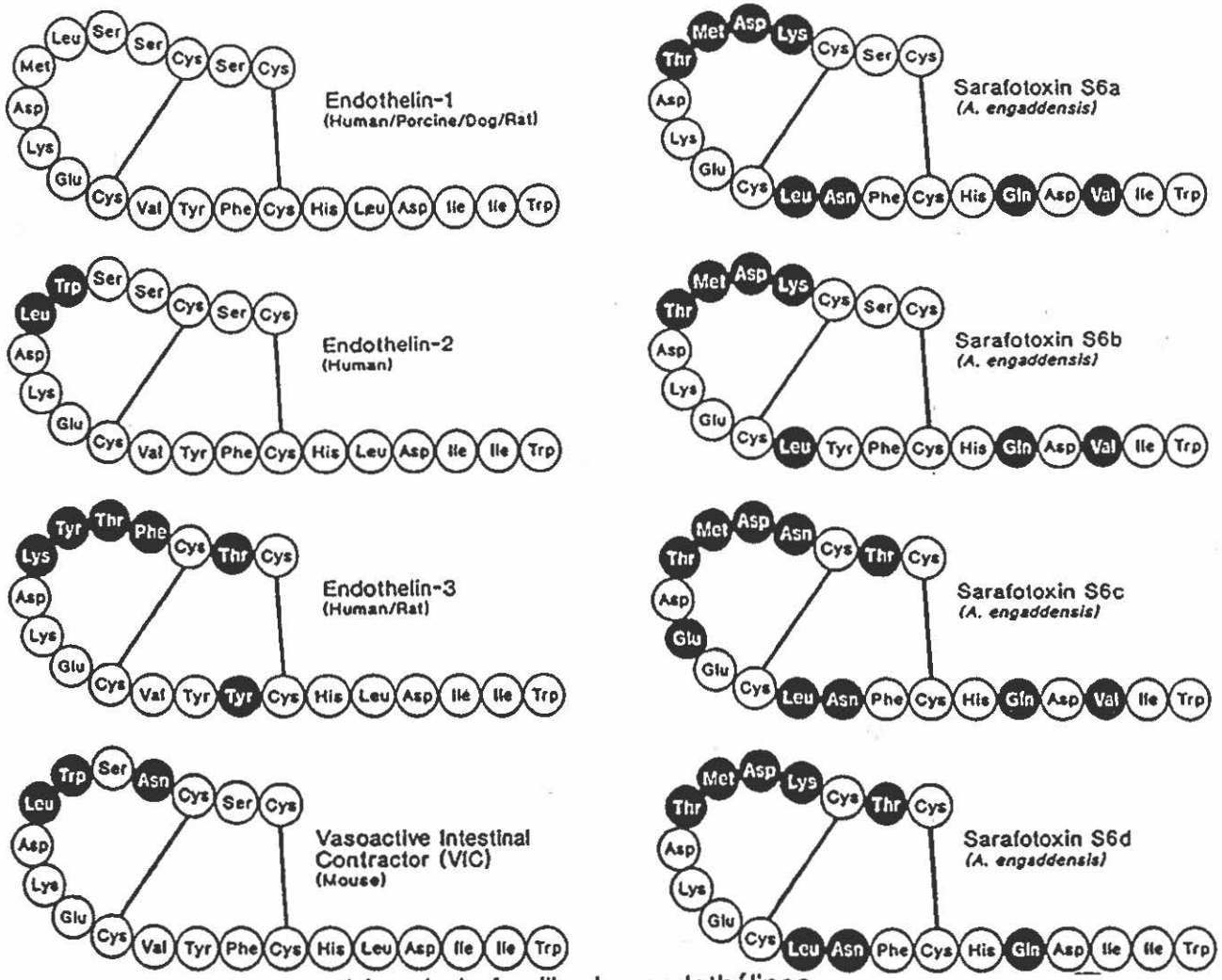


Figure 1 : Les peptides de la famille des endothélines

commune (Landan et al., 1991). Les 3 formes d'ETs sont libérées à partir de 3 précurseurs différents d'environ 200 acides aminés chacun, les préproendothélines. Ces dernières sont ensuite clivées, entre des résidus basiques (Lys-Arg ou Arg-Arg), en proendothélines (ou *big endothelins*) de 38, 37 ou 41 acides aminés (*big* ET-1, *big* ET-2 ou *big* ET-3 humaines). Le clivage des proendothélines s'effectue en un site inhabituel, Trp-Val pour ET-1 et ET-2 ou Trp-Ile pour ET-3, par des enzymes de conversion spécifiques, les *endothelin converting enzymes* (ECE) (Battistini, D'Orléans-Juste et Sirois, 1992) (Figure 2). La caractérisation de ces enzymes représente un défi important. Par exemple, ET-1 possède 140 fois plus d'activité que son précurseur (Kimura et al., 1989); un blocage ou un contrôle de la réaction de conversion pourrait donc agir directement sur l'activité pathophysiologique des ETs.

Jusqu'ici, aucune donnée n'est disponible sur ECE-2 et -3, alors que ECE-1 a été isolée et partiellement caractérisée. C'est une métalloprotéase neutre inhibée par le phosphoramidon mais insensible à d'autres inhibiteurs des métalloprotéases comme le captopril ou le thiorphan (McMahon et al., 1991; Sawamura et al., 1991; D'Orléans-Juste, Télémaque et Claing, 1991). D'autres enzymes, telle la cathepsine D, clivent la *big* ET-1. Également, celle-ci coupe le lien entre les résidus 18 et 19 de ET-1, c'est pourquoi la cathepsine D n'est pas considérée comme l'enzyme de conversion physiologique (Masaki et al., 1991). Selon Télémaque et al. (1993), l'ECE sensible au phosphoramidon s'avère spécifique à *big* ET-1. Cette enzyme serait liée à des membranes cellulaires, par une série de 12 acides aminés hydrophobes, dans divers tissus dont la veine ombilicale humaine et les cellules endothéliales d'aorte bovine (Ahn et al., 1992; Okada et al., 1990). De plus, Gui et al. (1993) ont caractérisé ECE-1 dans les membranes de l'appareil de Golgi de cellules pulmonaires de rat. La maturation de ET-1 se produirait lors du transit cellulaire, avant la sécrétion. Cependant, l'injection intraveineuse de *big* ET-1 *in vivo* chez le lapin augmente la concentration circulante de ET-1. Il existe donc une activité ECE-1 extracellulaire, dans le système vasculaire, peut-être liée à la surface

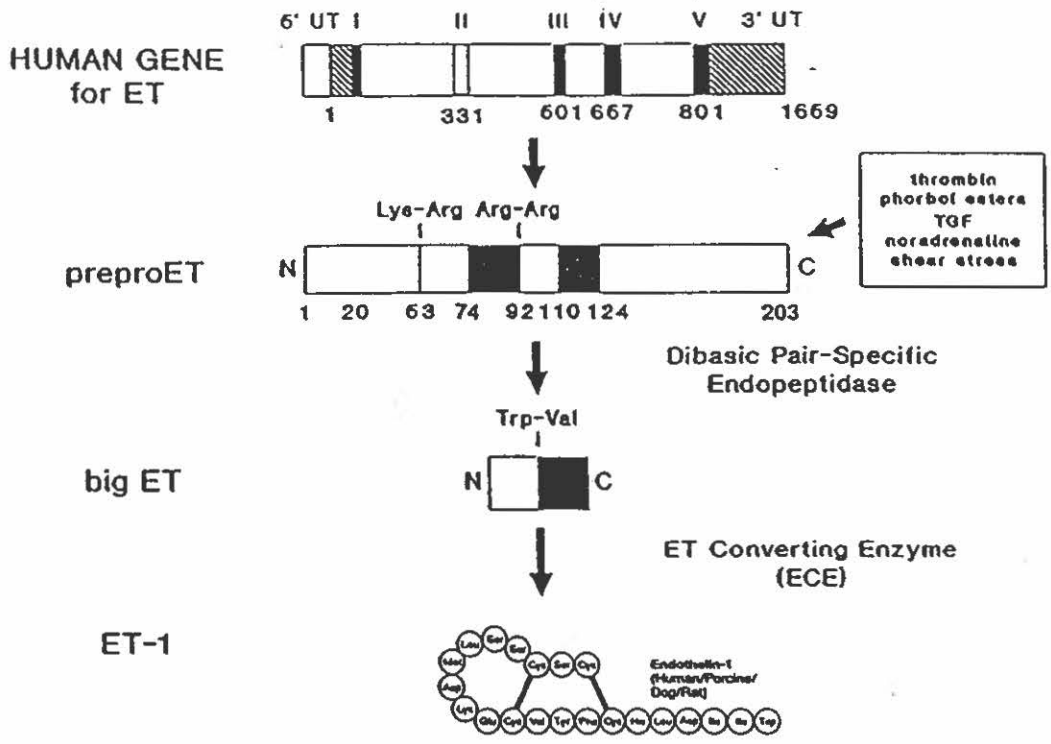


Figure 2 : Biosynthèse de ET-1

de l'endothélium (D'Orléans-Juste et al., 1990). Finalement, Shimada, Takahashi et Tanzawa (1994) ont réussi le clonage du gène et l'expression d'une ECE fonctionnelle à partir de cellules endothéliales de poumons de rat. C'est une protéine fortement glycosylée (M_r=130 000), possédant un domaine de liaison pour le zinc et une seule région transmembranaire. De plus, c'est une métalloprotéase neutre spécifique de *big* ET-1, inhibée par le phosphoramidon mais insensible au thiorphan.

La grande distribution de l'ET et de ses sites de liaison dans les organismes où elle est présente montre que ce peptide participe à la régulation de plusieurs organes ou systèmes (Tableau 1 ou pour une revue, Doherty, 1992). Les ETs présentent une vaste gamme d'actions, vasculaires ou non, dans différents tissus notamment le coeur, les reins, le foie, le cerveau, les systèmes nerveux central et périphérique. Les effets les plus marquants des ETs s'exercent cependant sur le système vasculaire. En effet, l'injection intraveineuse d'ET-1 cause d'abord une hypotension transitoire à la suite de la production de vasodilatateurs comme la prostaglandine I_2 (PGI_2) et l'*endothelium derived relaxing factor* (EDRF) identifié maintenant comme étant l'oxyde nitrique (NO) (Inoue et al., 1989; Okamura et al., 1992). Cet effet est suivi d'une constriction soutenue couplée à une augmentation du débit cardiaque et de la perméabilité vasculaire. Cette dernière serait initiée par le relargage du facteur activateur des plaquettes (PAF) et de tromboxane A_2 (TA_2) (Filep et al., 1991; Sirois et al., 1992). Les études menées jusqu'ici impliquent d'ailleurs les ETs dans diverses pathologies : l'ischémie du myocarde, l'arythmie, l'hypertension, l'asthme, l'insuffisance rénale aiguë ou chronique, etc. (Doherty, 1992). Toutefois, le rôle premier de ET-1 demeure vraisemblablement la constriction des muscles lisses vasculaires.

Les multiples effets pharmacologiques des ETs suggèrent une hétérogénéité des récepteurs. ET-1 induit une vasoconstriction plus puissante que ET-3 alors que les 2 isopeptides possèdent une capacité équivalente à induire la vasodilatation

Tableau I : Organes ou tissus subissant l'action de l'endothéline et effets produits

tissus / organes	effets
muscle lisse vasculaire	-vasoconstriction prolongée -augmentation de la pression sanguine -action mitogénique *in vitro* -stimulation du relargage d'EDRF -réduction de l'agrégation des plaquettes
muscle lisse non vasculaire	-constriction de la trachée, de l'intestin et de l'utérus
coeur	-augmentation de la contractilité et du débit cardiaque -effet inotrope et chronotrope positif -augmentation du relargage d'ANF
poumons	-bronchoconstricteur puissant
reins	-inhibition du relargage de la rénine -diminution de la réabsorption de Na^+ -diminution du taux de filtration glomérulaire et du volume urinaire
foie	-activation de la glycogénolyse -stimulation de la production de PGE_2 par les cellules de Kupffer -augmentation de la pression portale
tissus nerveux	-augmentation du relargage de neurotransmetteurs
tissus osseux	-affecte la motilité et l'activité des ostéoclastes
peau	-prolifération les mélanocytes -augmentation de la synthèse de mélanine par les mélanocytes
production d'hormones	-augmentation de la sécrétion d'aldostérone, d'ACTH, de FSH, de LH, de TSH, de vasopressine et de rénine

initiale. Le profil de réponse peut donc être divisé, au moins, en 2 groupes. Ces résultats pharmacologiques ont par la suite été confirmés par le clonage de 2 récepteurs distincts chez les mammifères. Le premier, ET_A (Arai et al., 1990), se montre sélectif pour ET-1 et ET-2 alors que le second, ET_B (Sakurai et al., 1990), présente la même affinité pour les 3 isopeptides. Ces 2 récepteurs sont couplés à des protéines G et possèdent 7 segments transmembranaires comme tous les récepteurs de la famille de la rhodopsine à laquelle ils appartiennent (Masaki et al., 1991). ET_A s'avère présent dans les muscles vasculaires alors que ET_B se retrouve dans une vaste gamme de tissus dont le cerveau, les poumons et les reins (Doherty, 1992). Des mesures d'activité biologique, particulièrement dans le cervelet de rat, montrent l'existence d'un sous-type de récepteur spécifique à ET-3 qui a été nommé ET_C (Emori, Hirata et Marumo, 1990; Hiley et al., 1990; Nambi, Pullen et Feuerstein, 1990). L'échec des essais de clonage de cet ET_C à partir de séquences obtenues de ET_A ou ET_B suggère une faible homologie de séquence entre ET_A et ET_B d'une part et ET_C d'autre part (Sakurai, Yanagisawa et Masaki, 1992). Ce n'est qu'en 1993 que Karne, Jayawickreme et Lerner ont réussi le clonage d'un récepteur spécifique à ET-3 chez *Xenopus laevis*, une grenouille africaine. Jusqu'ici, ce récepteur n'a pu être cloné chez l'humain ou chez un autre mammifère.

La controverse entourant les sous-types de récepteurs clonés en comparaison avec les résultats des études pharmacologiques se poursuit à l'heure actuelle. L'existence de sous-types de récepteurs ET_B a été proposée par Sokolovsky, Ambar et Galron (1992). En effet, cette équipe est parvenue à isoler 2 types de réponse ET_B : l'une dans des cerveaux de rat et l'autre dans des oreillettes de coeur de rat. La première possède une affinité très élevée pour les ETs, soit de l'ordre du pM, alors que la seconde, qui correspond à la réponse ET_B déjà connue, présente une affinité élevée, de l'ordre du nM. Les sites de très haute affinité, nommés récepteurs ET_{B1}, s'avèrent incapables d'induire l'hydrolyse des phosphoinositides contrairement aux sites de haute affinité (ET_{B2}). L'équipe de

Sokolovsky suggère également que les récepteurs ET_{B1} seraient responsables de la vasodilatation produite par les ETs, alors que les récepteursET_{B2} induirait une vasoconstriction tout comme les récepteurs ET_A.

Cette hypothèse remettait en question les résultats acceptés selon lesquels les ET_A étaient responsables de la vasoconstriction et les ET_B de la vasodilatation. Les résultats de diverses équipes de chercheurs appuient d'ailleurs ceux de Sokolovsky et ses collaborareurs en proposant l'existence d'au moins 2 sous-types de récepteurs ET_B (Filep et al., 1992; Battistini et al., 1993; Lippton et al., 1993; Warner et al., 1993). Aujourd'hui, il est généralement accepté que l'endothélium vasculaire humain comporte des récepteurs ET_{B1} et ET_C produisant une vasodilatation *via* le relargage de NO et de PGI_2. De plus, des récepteurs ET_A et ET_{B2} agiraient sur les muscles lisses vasculaires pour induire la vasoconstriction caractéristique des ETs (Figure 3). À l'heure actuelle, il s'avère impossible de dire si ET_{B1} et ET_{B2} correspondent à 2 gènes différents ou si la différence entre les 2 apparaît à la suite de modifications post-traductionnelles. Les gènes de 2 autres récepteurs, ET_{AX} (Kumar et al., 1994) et ET_{BX} (Nambi, Pullen et Kumar, 1994), ont été clonés chez *Xenopus laevis*. La similarité de séquence entre ces 2 récepteurs et ceux des mammifères en fait probablement les équivalents amphibiens de ET_A et ET_B.

L'activité biologique des ETs et leur affinité pour les récepteurs dépend de leur arrangement chimique particulier en relation avec leur structure tridimentionnelle. Diverses études se sont penchées sur la question et, si les résultats obtenus se ressemblent, des incertitudes demeurent. Les ETs comportent une hélice dans leur portion médiane; la majorité des études par ^1H RMN la situe entre les résidus 9 et 15 ou 16 (Krystek et al., 1991; Saudek, Hoflack et Pelton, 1989; Tamaoki et al., 1991). Les mesures par dichroïsme circulaire rapportent également la présence de cette hélice (Perkins, Hider et Barlow, 1990; Tamaoki et al., 1992). Un coude, probablement de type β, situé entre les acides aminés 5

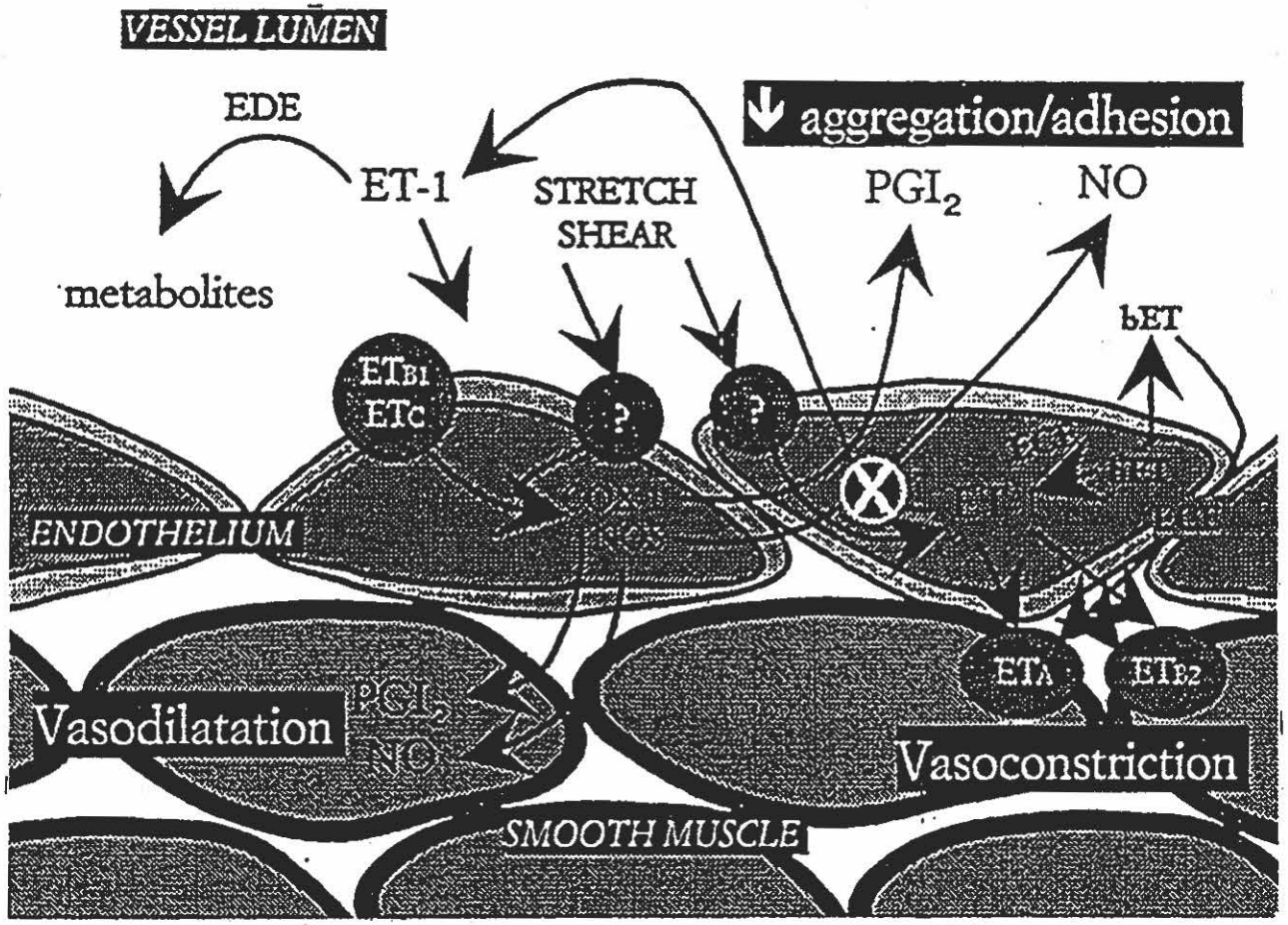


Figure 3 : Les récepteurs de ET-1 dans les tissus vasculaires humains

et 8 se retrouve dans un certain nombre de modèles (Aumelas et al., 1991; Krystek et al., 1991), alors que d'autres considèrent cette portion dépourvue de structure spécifique (Saudek, Hoflack et Pelton, 1989; Munro et al., 1991). La portion C-terminale de la molécule s'avère plus difficile à définir : sa conformation varie selon les études réalisées et les solvants utilisés. Elle peut être indéfinie (Munro et al., 1991; Tamaoki et al., 1991), étendue (Aumelas et al., 1991; Dalgarno et al., 1992) ou repliée vers la portion bicyclique de la molécule (Bortmann et al., 1991; Mills et al., 1992; Saudek, Hoflack et Pelton, 1989). Enfin, les résidus 1-4 présentent un arrangement tridimensionnel fortement contraint par la présence des 2 ponts disulfures.

La détermination des pharmacophores des ETs, c'est-à-dire des éléments essentiels à la reconnaissance et au déclenchement des mécanismes de réponse par les récepteurs, s'avère une étape essentielle dans la compréhension des mécanismes d'actions pathophysiologiques de ces peptides. Les études de structure-activité ont permis d'établir que les 2 ponts disulfures sont nécessaires à une pleine activité sur les récepteurs ET_A. Cependant, le pont Cys^1-Cys^{15} (voir appendice A pour la définition des abréviations des acides aminés) revêt une plus grande importance que le Cys^3-Cys^{11} car l'ouverture du premier lien disulfure donne un analogue 10 fois moins puissant sur l'aorte de rat (ET_A) que lors du bris du second pont disulfure (Topouzis, Pelton et Miller, 1989). Les récepteurs ET_B se montrent moins sensibles à l'absence des ponts disulfures. En effet, l'analogue [$Ala^{1,3,11,15}$]ET-1 conserve une activité similaire à celle de ET-1 dans l'artère pulmonaire de lapin (riche en ET_B). De plus, le cervelet de porc, une préparation contenant des récepteurs de type ET_B (Panek et al., 1992), est capable de lier cet analogue de façon substantielle.

Les extrémités N- et C-terminales des ETs doivent être libres (Nakajima et al., 1989). Les résidus 2-7 forment la portion la plus variable entre les isopeptides; elle est probablement impliquée dans la discrimination entre les types de

récepteurs (Erhardt, 1991). Conservés dans toutes les ETs et les SRTXs, les résidus Asp^{8}-Lys^{9}-Glu^{10} jouent certainement un rôle important dans l'activité biologique. Le blocage des chaînes latérales de Asp^{8} ou Glu^{10} par une fonction amide entraîne une perte importante de la contraction de l'artère pulmonaire de rat (Nakajima et al., 1989). Le remplacement des résidus subséquents par Ala montre que Phe^{14}, His^{16}, Leu^{17}, Asp^{18} et Trp^{21} sont essentiels à la contraction de l'artère pulmonaire de rat ou à la vasoconstriction *in vivo* chez le rat (Nakajima et al., 1989; Watanabe et al., 1991), deux tissus contenant des récepteurs ET_A. L'activation des récepteurs ET_B nécessite Glu^{10}, Phe^{14}, Leu^{17}, Asp^{18}, Ile^{20} et Trp^{21} (Erhardt, 1991; Saeki et al. 1992).

Des études touchant la relation structure-activité de ET-1 ont été réalisées dans notre laboratoire. La précision du rôle de Trp^{21} se place au centre de nos préoccupations. Nous avons observé que l'addition d'un groupement formyle sur l'indole de la chaîne latérale de ce Trp donne un analogue aussi puissant que ET-1 chez le rat mais incapable de produire l'hypotension transitoire induite par la molécule mère (Filep et al., 1992). Notre équipe a aussi montré que [$Trp(For)^{21}$]ET-1 présente la même activité biologique que ET-1 sur la trachée de cobaye (Germain et al., 1993), une préparation pharmacologique produisant une réponse ET_B-*like* (Cardell, Uddman et Edvinsson, 1992; Takai et al., 1992). Ainsi, il semble que [$Trp(For)^{21}$]ET-1 soit capable de discriminer les réponses ET_B-*like* mesurées dans la pression sanguine de rat et la trachée de cobaye.

Afin de pousser davantage l'exploration, au niveau moléculaire, du mode d'action des ETs, nous avons réalisé une série de molécules hybrides par la liaison *via* l'acide ϵ-aminocaproïque (Aca), un espaceur hydrophobe flexible, du segment 3-11 de ET-1 à des fragments C-terminaux de longueur variable (16-21, 17-21, ..., 21). Les analogues ont été étudiés sous forme linéaire ou cyclique (par formation du pont Cys^{3}-Cys^{11}), avec ou sans groupement formyle sur le Trp^{21} (l'appendice B donne la séquence des analogues). Les mesures d'activité biologique ont été

réalisées sur le parenchyme de poumons de cobayes où [Trp(For)^{21}]ET-1 garde une activité importante. Finalement, l'analyse par modélisation moléculaire des structures de certains analogues a permis de mieux comprendre les éléments moléculaires nécessaires à l'activité de ET-1 dans cette préparation pharmacologique. Les hypothèses suivantes ont guidé les recherches entreprises :

- le groupement formyle ajouté sur le Trp^{21} perturbe le repliement de l'hexapeptide terminal de ET-1 vers la portion bicyclique de la molécule;
- la formation d'un pont disulfure entre ET-1 et son récepteur serait nécessaire à la liaison et/ou à l'activation de ce récepteur;
- les résidus hydrophobes 12-15 de ET-1 peuvent être remplacés par l'Aca.

Le deuxième volet de la présente recherche concerne les antagonistes des récepteurs de ET. Pourquoi développer des antagonistes? Le niveau de ce peptide en circulation augmente dans plusieurs pathologies (athérosclérose, hypertension, asthme, insuffisance rénale). Les antagonistes bloquent sélectivement un type de récepteur. Ceci permet d'étudier les rôles pathophysiologiques reliés à chaque récepteur et à chacune des ETs. Ils imitent les éléments structuraux essentiels à la liaison aux récepteurs. Permettant une approche différente dans l'étude des pharmacophores, la mise au point de nouveaux antagonistes et la compréhension de leur mécanisme de liaison ocupent une place importante dans les recherches sur les ETs (Lüsher, 1993). Un antagoniste des récepteurs ET_A, BE-18257B [cyclo(-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-Leu-D-Trp-)], est un pentapeptide cyclique isolé de *Streptomyces misakiensis* (Ihara et al., 1991). Des études de structure-activité modifiant des acides aminés ont permis l'obtention de BQ-123 [cyclo(-D-Asp-D-Trp-L-Leu-D-Val-L-Pro-)]. Ce dernier possède 1000 fois plus d'affinité pour ET_A que pour ET_B, c'est un des plus puissants antagonistes connus pour ce premier récepteur (Ishikawa et al., 1992).

Jusqu'ici, la cyclisation de BQ-123 était effectuée en solution, une technique laborieuse nécessitant une dilution importante afin de limiter les cyclisations

intermoléculaires. Nous proposons donc une nouvelle synthèse basée sur un schéma de protection orthogonale avec cyclisation sur la résine de synthèse, avant le clivage. L'élément clé de cette méthode est un Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH) (Schiller, Nguyen et Miller, 1985; Félix et al., 1988) qui se lie à la résine par sa chaîne latérale plutôt que par le α-COOH. Cette nouvelle approche permet de simplifier considérablement la méthode de synthèse.

Matériel et méthodes

1. Synthèse et purification d'analogues de ET-1

1.1 Réactifs et solvants utilisés

La synthèse des peptides a été effectuée sur des billes de résine dites de Merrifield (Merrifield, 1963), soit du polystyrène ponté avec 1% de divinylbenzène et fonctionnalisé, au niveau des groupes phényles, par des groupements chlorométhyles (0,75 méq/g de résine) (Bio-Rad, Richmond, CA). Un groupe tert-butyloxycarbonyle (Boc) protégeait la fonction amine alpha des dérivés d'acides aminés. Asp(OcHex), Glu(OcHex), His(Tos), Ile, Leu, Met et Ser(Bzl) provenaient de Propeptide (Vert le Petit, France), alors que l'acide ϵ-aminocaproïque (Aca), Cys(Acm) et Lys(2-ClZ) ont été achetés de Bachem (Torrance, CA). Boc-Trp(For) vient de Advanced ChemTech (Louisville, KY). Les acides aminés utilisés sont de configuration absolue L. Le réactif de couplage employé est le Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (Richelieu Biotechnologies, Montréal, QC). Les solvants utilisés, soit le diméthylformamide (DMF) de qualité ACS et le dichlorométhane (DCM), proviennent de Anachemia Canada Inc. (Ville St-Pierre, QC) tandis que l'acide trifluoroacétique biograde (TFA) a été fournis par Halocarbon (Hackensack, NJ). La diisopropyléthylamine (DIEA) a été obtenue de Pfaltz and Bauer (Waterbury, CT). Cette base organique a été distillée avant utilisation. Finalement, l'acide fluorhydrique (HF) provient de Liquid Carbonic Inc. (Scarborough, Ont.).

1.2 Sélection de la résine et des groupements protecteurs des acides aminés

L'utilisation de la synthèse en phase solide sur la résine de Merrifield permet d'obtenir une extrémité peptidique N-terminale libre après une dernière déprotection et, à la suite du clivage, un groupement carboxy-terminal libre. La rapidité de synthèse, de même que la facilité des changements de solvants et

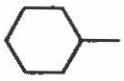
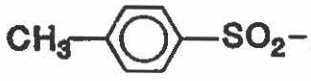
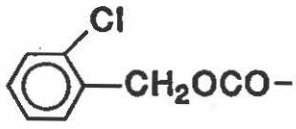
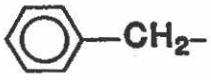
d'isolation des peptides sur leur support de résine, constituent les principaux avantages de cette méthode. Des dérivés α-Boc-acides aminés ont été utilisés pour le schéma de protection orthogonale. Ceci signifie que la labilité de la protection est variable de sorte que le retrait des groupes protecteurs s'effectuera dans des conditions assurant une spécificité. En effet, le groupement Boc est labile en milieu acide, par exemple en présence de TFA, alors que les groupes protecteurs des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels (Tableau II) doivent être retirés à l'aide d'un acide plus fort, le HF (Stewart et Young, 1984), lors du clivage du peptide de la résine polymérique. Les groupements protecteurs des chaînes latérales sont sélectionnés afin de résister au TFA tout en étant la source d'un minimum de réactions secondaires lors de la synthèse et du clivage. Les groupements formyle sur le Trp^{21} et acétamidométhyle sur Cys^{3} et Cys^{11} résistent au HF. Ils sont ensuite retirés sélectivement après une première purification des peptides bruts.

De plus, les Boc-acides aminés sont plutôt stables et solubles dans les solvants organiques utilisés au cour de la synthèse. Boc s'avère un groupement chimique relativement facile à retirer avec du TFA 40% dans le DCM. Les produits de cette réaction, l'isobutylène et le dioxyde de carbone, sont gazeux. Ceci facilite grandement leur élimination et évite ainsi une contamination du milieu de synthèse (Stewart et Young, 1984). Cependant, le produit intermédiaire de cette réaction, un ion carbonium tertiaire très réactif, s'attaque, par exemple, à l'atome de soufre de la méthionine ou des cystéines. Afin de contourner ce problème, l'éthanethiol (0,5%), un capteur de carbocations, est ajouté dans le TFA lors de chaque étape de déprotection.

1.3 Protocole de synthèse des peptides

Le principe de base de la synthèse en phase solide consiste à fixer le résidu C-terminal du peptide sur des sites d'attache d'une résine polymérique. Le

Tableau II: Groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels utilisés lors de la synthèse des analogues de ET-1

Acides aminés	Groupements protecteurs		
	nom	abréviation	structure
Asp, Glu	cyclohexyle ester	OcHex	
Cys	acétamidométhyle	Acm	$CH_3CONHCH_2-$
His	p-toluène sulfonyle	Tos	
Lys	2-chlorobenzyle-oxycarbonyle	2-ClZ	
Ser	benzyle	Bzl	
Trp	formyle	For	CHO-

groupement Boc protégeant l'amine de ce premier acide aminé est ensuite retiré et, après quelques rinçages, le second couplage peut être effectué. La répétition de cette séquence permet d'obtenir les peptides désirés (Figure 4).

1.3.1 Fixation du premier acide aminé sur la résine

En vue de fixer le premier acide aminé sur la résine, le Trp dans le cas de ET et de ses analogues, un sel de césium doit être préparé (Gisin, 1973; Wang et al., 1977). Un sel de césium plutôt qu'un autre sel alcalin est utilisé. En effet, les premiers essais de couplage, réalisés à l'aide de sodium, donnaient des sels très polaires qui ne pénétraient que très peu à l'intérieur du réseau hydrophobe des billes de résine formé par la co-polymérisation de styrène et de divinylbenzène. L'ion Cs^+ possède la même charge que le Na^+, le K^+ ou le Li^+ mais son rayon plus important diminue sa densité de charge et donc sa polarité. Ceci permet de meilleurs rendements au niveau du couplage du premier résidu sur les groupements dichlorométhyles de la résine polymérique. Afin de préparer le sel de césium, 3 équivalents de Boc-Trp(For), dissous dans un mélange éthanol : H_2O (4:1) sont titrés avec une solution de $CsHCO_3$ 2M jusqu'à pH 7. Ensuite, la solution est évaporée à sec et le sel obtenu dissous à nouveau dans du DMF en présence de 100 mg de KI/g de résine. Ce mélange est agité à 50 °C pendant 24 h puis filtré afin de récupérer la résine. Différents solvants organiques, DMF, méthanol et DCM, servent ensuite aux rinçages. Un test à l'acide picrique permet de mesurer le degré de substitution du Boc-Trp(For) sur la résine.

1.3.2 Test à l'acide picrique (Gisin, 1972)

Le protocole décrit ci-après a été réalisé avec 20 mg de résine inséré dans une ampoule avec robinet munie d'un filtre en laine de verre. Pour effectuer ce test, il faut tout d'abord déprotéger l'amine en alpha du Boc-Trp(For). Pour ce faire, la technique suivante s'applique : lavage de la résine 3 fois avec 4 mL de

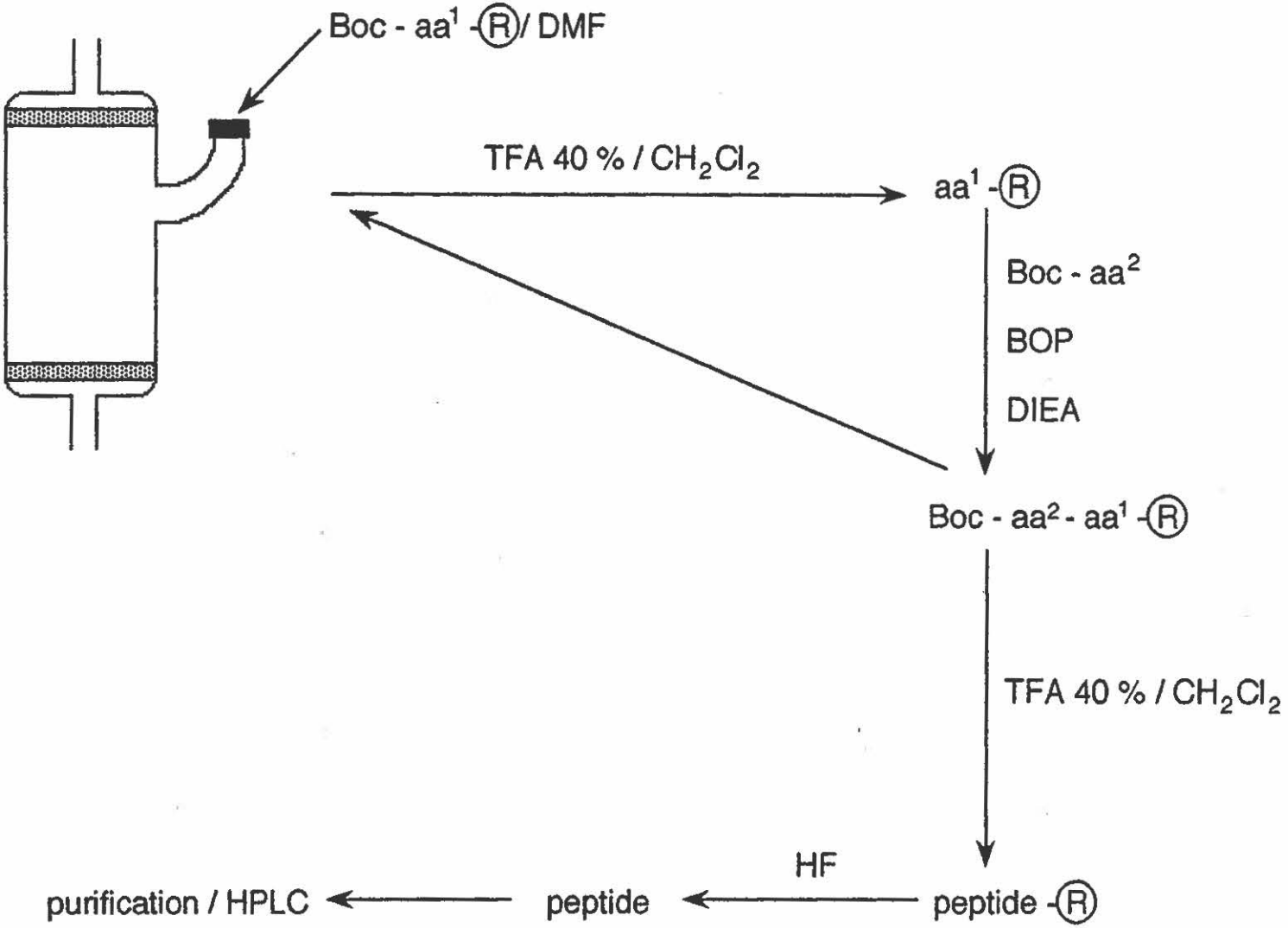


Figure 4 : Méthode de synthèse de peptides en phase solide

DCM, puis 1 fois avec 4 mL de TFA 40% dans le DCM. Ensuite, 4 mL de TFA 40% sont remis dans l'ampoule, la réaction est poursuivie pendant 20 min puis le solvant est retiré. La deuxième étape comporte des lavages et une neutralisation. Le processus de rinçage se présente ainsi :

- 1 fois avec 4 mL de TFA 40% dans le DCM
- 5 fois avec 3 mL de DCM
- 2 fois avec 4 mL de DCM : dioxane (1:1)
- 4 fois avec 3 mL de DCM
- 2 fois avec 4 mL de DIEA 5% dans le DCM

Enfin, 4 mL de DIEA 5% sont remis dans l'ampoule pour 5 min. Il faut ensuite former un complexe avec l'acide picrique en lavant 5 fois avec 3 mL de DCM, 1 fois avec 4 mL d'acide picrique 0,05 M dans le DCM avant d'ajouter 4 autres mL d'acide picrique pour 10 min de réaction. L'excès d'acide est ensuite lavé 4 fois avec 3 mL de DCM puis d'éthanol absolu et à nouveau avec du DCM; 10 mL de DIEA 5% sont alors ajoutés sur la résine puis filtrés dans une fiole jaugée de 100 mL. L'étape suivante consiste en un lavage de la résine, jusqu'à disparition de la couleur jaune, avec de l'éthanol absolu. Le solvant est recueilli dans la fiole. Le volume est complété à 100 mL et l'absorbance est lue à 358 nm. Finalement, la formule suivante permet de calculer la substitution sur la résine :

$$\text{substitution (mmol/g)} = \text{absorbance} \times 10^5 \times (16\,250)^{-1} \times \text{poids (mg)}^{-1}$$

1.3.3 Protocole de couplage des autres acides aminés

La méthode d'élongation des peptides se retrouve dans une publication antérieure de notre laboratoire (Forest et al., 1990). De façon générale, elle s'effectue au moyen d'un système manuel relié à un réacteur dans lequel sont réalisées toutes les étapes de la synthèse soit la déprotection, le couplage et les lavages (Tableau III). Tel que mentionné ci-haut, la déprotection s'effectue à l'aide de TFA 40%/éthanethiol 0,5% dans le DCM à raison d'environ 10 mL/g de résine.

Tableau III : Cycle de couplage d'un acide aminé avec le réactif BOP

Étape	Réactifs [a]	Temps (min)
Déprotection	40% TFA, 0.5% CH_3CH_2SH / DCM	1 x 5
Déprotection	40% TFA, 0.5% CH_3CH_2SH / DCM	1 x 20
Lavage	DCM	2 x 2
Lavage	CH_3CH_2OH	1 x 2
Lavage	DCM	1 x 2
Lavage	DMF	2 x 2
Couplage	4 éq de Boc-AA-COOH / DMF 4 éq de BOP / DMF 5 éq de DIEA	1 x 45[b]
Lavage	DMF	1 x 2
Lavage	DCM[c]	2 x 2

[a] Les volumes de solvant utilisés pour les lavages sont d'environ 10 mL/g de résine.
[b] Certains couplages ont nécessité 90 min; le contrôle des couplages est effectué à l'aide d'un test à la ninhydrine.
[c] Entre les couplages, les peptides-résines sont conservés dans du DCM.

Deux étapes permettent de retirer le groupement Boc. Tout d'abord, la solution de TFA est ajoutée au réacteur, la résine est ensuite agitée sous azote 5 min puis le réacteur drainé au moyen d'une pression d'azote. La seconde étape, identique, se poursuit durant 20 min. Des rinçages réalisés avec du DCM, de l'éthanol, à nouveau du DCM puis du DMF éliminent l'acide résiduel. Par la suite, 4 équivalents de Boc-acide aminé et 4 de BOP sont dissous dans un minimum de DMF en présence de 5 équivalents de DIEA (Le-Nguyen et al., 1985; 1987). La solution obtenue est alors ajoutée au réacteur et agitée sous azote 45 min. L'addition d'une amine tertiaire comme le DIEA permet d'obtenir une charge négative sur le groupement carboxyle du Boc-acide aminé à coupler. Les ramifications du DIEA créent un encombrement stérique qui diminue l'accessibilité à l'atome d'hydrogène du carbone α des acides aminés. Ceci limite la racémisation en cours de synthèse. La charge négative du carboxylate attaquera le P^+ du BOP, le réactif de couplage proposé par Castro et al., (1975). C'est un sel non hygroscopique, stable à la température de la pièce, soluble dans les solvants organiques utilisés en synthèse et dont l'utilité comme agent de couplage lors de synthèses peptidiques en phase solide a été démontrée (Forest et Fournier, 1990; Fournier, Wang et Félix, 1988). L'activation de la fonction carboxy-terminale du résidu à coupler se fait probablement *via* la formation d'un dérivé acyloxyphosphonium. Ce dernier serait directement attaqué par l'amine déprotégée du peptide en formation, permettant ainsi le couplage et la libération d'hexaméthyle phosphoramide (HMPA). Après le couplage, des lavages au DMF et au DCM éliminent l'excès de réactifs. Un test qualitatif à base de ninhydrine, décrit par Kaiser et al. (1970), évalue le degré de couplage.

Cette séquence de déprotection-lavages-couplage-lavages se répète jusqu'à l'assemblage complet des peptides. Une déprotection finale retire le groupement Boc de l'acide aminé N-terminal, une cystéine dans le cas des analogues de ET-1 synthétisés ici. Finalement, le peptide-résine est retiré du réacteur, rincé abondamment au DMF, au DCM et enfin au méthanol avant d'être complètement

séché sous vide.

1.4 Clivage à l'acide fluorhydrique

Cette étape vise la séparation des peptides des billes de polymère. Le HF, couramment utilisé pour les clivages, est un acide fort et volatil. Cette étape permet également de retirer la plupart des groupements protecteurs des acides aminés (OcHex, Tos, 2-ClZ, Bzl). Les groupements Acm des cystéines sont résistants au HF, ce qui évite la formation désordonnée de ponts disulfures. Protégeant le Trp-21 de l'alkylation ou de l'oxydation, le groupement formyle de l'indole résiste également au clivage (Stewart et Young, 1984).

Le peptide-résine est introduit dans un réservoir de Kel F en présence de *m*-crésol (1 mL/g) et d'éthanethiol (1 mL/g) comme capteurs de carbocations. Le réacteur est amené à -80 °C et le HF introduit à raison de 10 mL/g de résine. La réaction de clivage se poursuit à 0 °C pendant 1 h puis le HF est évaporé complètement (environ 30 min). Le peptide est précipité à l'éther, trituré avec le même solvant sur un verre fritté puis filtré. Une extraction avec du TFA biograde sépare le peptide de la résine. Le TFA est ensuite évaporé, le peptide remis dans l'éther 1 h, filtré et séché sous vide. La congélation à -20 °C garantit la conservation des peptides bruts jusqu'à la purification.

1.5 Purification des peptides bruts

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) préparative sur phase inverse avec un système Prep LC 500A de Waters comprenant un module PrepPak 1 000 et un détecteur d'absorbance modèle 441 permet la purification des analogues de l'endothéline obtenus après le clivage. Le matériel à purifier (600 mg) est dissous dans 1 L d'H_2O contenant 0,06% de TFA dégazé 15 min au moyen d'un jet d'azote. La solution obtenue est injectée sur une colonne Deltapak C_{18} (15

μm; 300 Å) de 30 x 5,7 cm. L'élution s'effectue à l'aide d'un gradient linéaire de 0% à 100% de (B) en 3 h avec les solvants suivants : (A) H_2O (0,06% TFA) et (B) CH_3CN 30%/H_2O (0,06% TFA). Le débit a été fixé à 40 mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 229 nm. Un système de CLHP analytique, muni d'un contrôleur automatisé de gradient et couplé à un spectrophotomètre Lambda Max modèle 481 LC est utilisé pour l'analyse des fractions recueillies. Une colonne Vydac (10 μm) de phase inverse (30 x 0,39 cm) permet d'effectuer la séparation à l'aide des solvants suivants : (A) H_2O (0,06 %TFA) et (B) CH_3CN selon un mode de gradient linéaire (20% à 50% de (B) en 15 min). La mesure de l'absorbance à 230 nm permet la détection. Le débit est fixé à 1,5 mL/min. Enfin, les fractions correspondant au peptide pur ont été regroupées, évaporées puis lyophilisées. Une fraction des analogues linéaires formylés purs obtenus a été mise de côté pour fins de caractérisation et pour les essais biologiques. Le reste de la fraction a été utilisé pour les étapes subséquentes.

1.6 Cyclisation et déformylation des analogues de ET-1

La cyclisation des peptides retire les groupements Acm des cystéines afin de former le pont disulfure intramoléculaire. Pour ce faire, les peptides sont dissous dans un mélange dégazé d'acide acétique et d'H_2O (4:1). Ensuite, 50 éq d'iode dissous dans un minimum de méthanol sont ajoutés goutte à goutte. La réaction se poursuit, à la température de la pièce, jusqu'à cyclisation complète. Le temps nécessaire, de 2 à 4 h, varie selon les analogues. Le système de CLHP analytique décrit précédemment sert au suivi de la réaction. En effet, un déplacement d'environ 0,2 min du temps de rétention est observé entre les produits linéaires et cycliques. L'ajout d'acide ascorbique jusqu'à décoloration complète arrête la réaction. La plus grande partie de l'acide acétique est évaporée et la solution restante est diluée 100 fois avec de l'H_2O (0,06% TFA). Cette solution est alors injectée sur le système de CLHP préparatif. Le gradient suivant a été utilisé afin d'obtenir une meilleure purification: 0% à 35% (B) en 20 min, puis 35%

à 100% (B) en 2,5 h. Les fractions contenant le peptide pur sont réunies, évaporées et lyophilisées. Une partie de ces produits cycliques formylés a été conservée en vue des essais biologiques.

Le protocole suivant a permis la déformylation d'échantillons de chacun des analogues linéaires et cycliques. Une solution aqueuse 0,1 N de pipéridine est dégazée 15 min à 0 °C et le peptide ajouté à raison de 1 mg pour 3 mL de solution. La réaction se poursuit durant 30 min; un refroidissement rapide par congélation de la solution dans de l'azote liquide l'arrête. Le solvant est éliminé par lyophilisation. Enfin, 2 ou 3 autres lyophilisations avec dissolution du peptide dans de l'H_2O sont nécessaires pour obtenir des produits blancs amorphes. Encore une fois, la déformylation produit un déplacement de quelques secondes du temps de rétention sur CLHP analytique.

2. Caractérisation des analogues de ET-1

Les étapes précédentes ont donc permis d'obtenir 6 peptides comportant les segments C-terminaux 16-21, 17-21,..., 21 de ET-1. Dans chaque cas, des produits linéaires formylés ou non et des dérivés cycliques formylés ou non ont été obtenus. Un total de 24 peptides sera donc traité lors des étapes subséquentes.

2.1 CLHP analytique

Une CLHP analytique permet de soumettre l'ensemble des dérivés à des mesures de pureté. Une colonne Pep-S Super Pac (5 μm) (25 x 0,4 cm) de Pharmacia, reliée à un système formé d'un contrôleur 600E de Waters et d'un détecteur d'absorbance ajustable modèle 484 a rendu possible la chromatographie. Le détecteur était réglé à 230 nm. Le système utilise les éluants (A) H_2O (0,06% TFA) et (B) CH_3CN avec un gradient de 25% à 45% de (B) en 20 min pour un débit de 1,5 mL/min.

2.2 Électrophorèse capillaire

Un appareil de Applied Biosystems (modèle 270A) a été utilisé pour la caractérisation par électrophorèse capillaire. Les conditions suivantes ont été appliquées à chacun des peptides : tampon citrate de sodium 20 mM, pH 2,5; capillaire de 35 cm x 50 μm; voltage de 7 kV; température de 30 °C; injection pendant 1 s par aspiration sous vide et détection à 200 nm.

2.3 Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse Fisons autospec-Q, comportant un générateur d'ions Liquid Sims et un système de traitement des données OPUS, donne les mesures FAB/MS. Afin de générer les ions, du xénon a été activé sous 22 kV et 2 μA d'énergie. De l'iodure de césium (CsI) est utilisé pour la calibration de l'appareil et la mesure s'effectue au moyen d'une matrice de glycérol. La vitesse de balayage est de 5 s/décade et la résolution statique : M/ΔM de 1000.

2.4 Analyse de la composition en acides aminés

Un système de CLHP muni d'un injecteur automatique 715 Ultra WISP (Waters), de 2 pompes Waters 510, d'un détecteur d'absorbance modèle 484, d'un contrôleur de température de la même compagnie et d'une colonne Cosmosil C_{18} 5 μm (30 x 0,39 cm) a permis cette analyse. La méthode utilisée, PICO TAG, est celle de la compagnie Waters également. Cette dernière consiste en l'hydrolyse de 0,1 mg de peptide par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 6N contenant 1% de phénol, pendant 24h, à 110 °C. Les standards utilisés (Pierce, Rockford, IL) contiennent 2,5 μmol/mL de chacun des L-acides aminés, sauf dans le cas de la L-cystine (1,25 μmol/mL), dans du HCl 0,1 N. Le HCl est alors évaporé sous vide et les hydrolysats séchés avec une solution éthanol : H_2O : triéthylamine (2:2:1) qui est également évaporée sous vide. Par la suite, l'ajout d'une solution éthanol

: H_2O : triéthylamine : phénylisothiocyanate (7:1:1:1), suivi d'une incubation de 20 min à la température de la pièce et d'une évaporation sous vide permettent la dérivation des échantillons. Ceux-ci sont ensuite dissous dans un tampon phosphate de sodium pH 7,4 contenant 5% de CH_3CN. Un gradient de 0-100% (B) en 20 min et les solvants suivants permettent l'élution séquentielle des acides aminés : (A) tampon acétate de sodium pH 6,4 contenant 4% de CH_3CN et 0,05% de triéthylamine et (B) 60% CH_3CN/H_2O. La lecture de la densité optique à 254 nm détecte les acides aminés. Le contrôle du système et l'analyse des données sont effectués au moyen d'un ordinateur NEC-APC IV équipé du logiciel Waters Baseline 810.

3. Évaluation pharmacologique de l'ET-1 et de ses analogues

3.1 Animaux et réactifs

La compagnie Charles River Canada (St-Constant, Québec) a fourni les cobayes Dunkin Hartley utilisés, mâles et femelles indifféremment, et pesant 250-300 g. Ils ont été traités selon un cycle lumière-noirceur de 12 h avec des soins appropriés et conformes aux standards établis par l'Université de Sherbrooke et le Comité canadien sur les soins aux animaux (CCAC).

L'histamine utilisée comme standard lors des essais biologiques provient de Sigma (St-Louis, MO). Les produits entrant dans la composition du tampon de Krebs proviennent de chez Fisher (Montréal, QC) et BDH (Toronto, Ontario).

3.2 Essais biologiques *in vitro* des analogues sur le parenchyme de poumons de cobayes

Les cobayes ont été sacrifiés par dislocation cervicale puis saignés promptement. Le prélèvement rapide des poumons, qui sont placés dans un

tampon de Krebs Henseleit, assure la conservation des tissus. Ce tampon se compose des éléments suivants (mmol/L) : NaCl, 118; KCl, 4,7, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 1,18; KH_2PO_4, 1,18; $NaHCO_3$, 25; $CaCl_2$, 2,5; glucose 11,1; pH 7,0. Le parenchyme des 4 lobes des poumons est alors délicatement disséqué pour obtenir 4 bandes de même grosseur. Celles-ci sont montées dans des bains à organes isolés réglés à 37 °C. L'irrigation des tissus s'effectue au goutte à goutte à raison de 5 mL/min de tampon de Krebs oxygéné (95% O_2 et 5% CO_2). Une pompe modèle 375A de Sage Instruments, une division de Orion Research Incorporated, assurait la circulation du tampon dans le système qui comprenait 2 cascades de 3 bains à organes. Un polygraphe Grass 7D utilisant des transducteurs de force Grass modèle FT03 a permis l'enregistrement isométrique des réponses mécaniques (Figure 5). Une tension initiale de 2,0 g a été exercée sur les tissus pendant les 60 min de calibration. Ensuite, l'injection de $1x10^{-8}$ M d'histamine puis de $1x10^{-10}$ M ET-1 a permis de vérifier la contractilité de chacun des échantillons de parenchyme afin de s'assurer que leurs réponses sont comparables. La dissolution des dérivés dans l'eau, juste avant la première injection, et la conservation de la solution à 4 °C, assurent l'intégrité des peptides pour la durée de l'expérimentation. Des concentrations d'ET-1 et de chacun des analogues variant de $1x10^{-11}$ M à $3x10^{-8}$ M ont été injectées sur les tissus afin d'obtenir des courbes dose-réponse (Tableau IV). Des mesures de la contraction pour l'ensemble de la courbe ont été effectuées chez 4 cobayes différents pour chacun des analogues (6 dans le cas de ET-1) pour un total de 4-6 expérimentations par analogue (9 pour ET-1).

4. Étude de modélisation moléculaire

Ces analyses ont été effectuées sur ET-1 et [Trp(For)^{21}]ET-1 de même que sur quelques analogues sélectionnés pour leur activité biologique intéressante : [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET et [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET, [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET et [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET, [Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET et (3-11)-Aca-(16-21)ET. Le

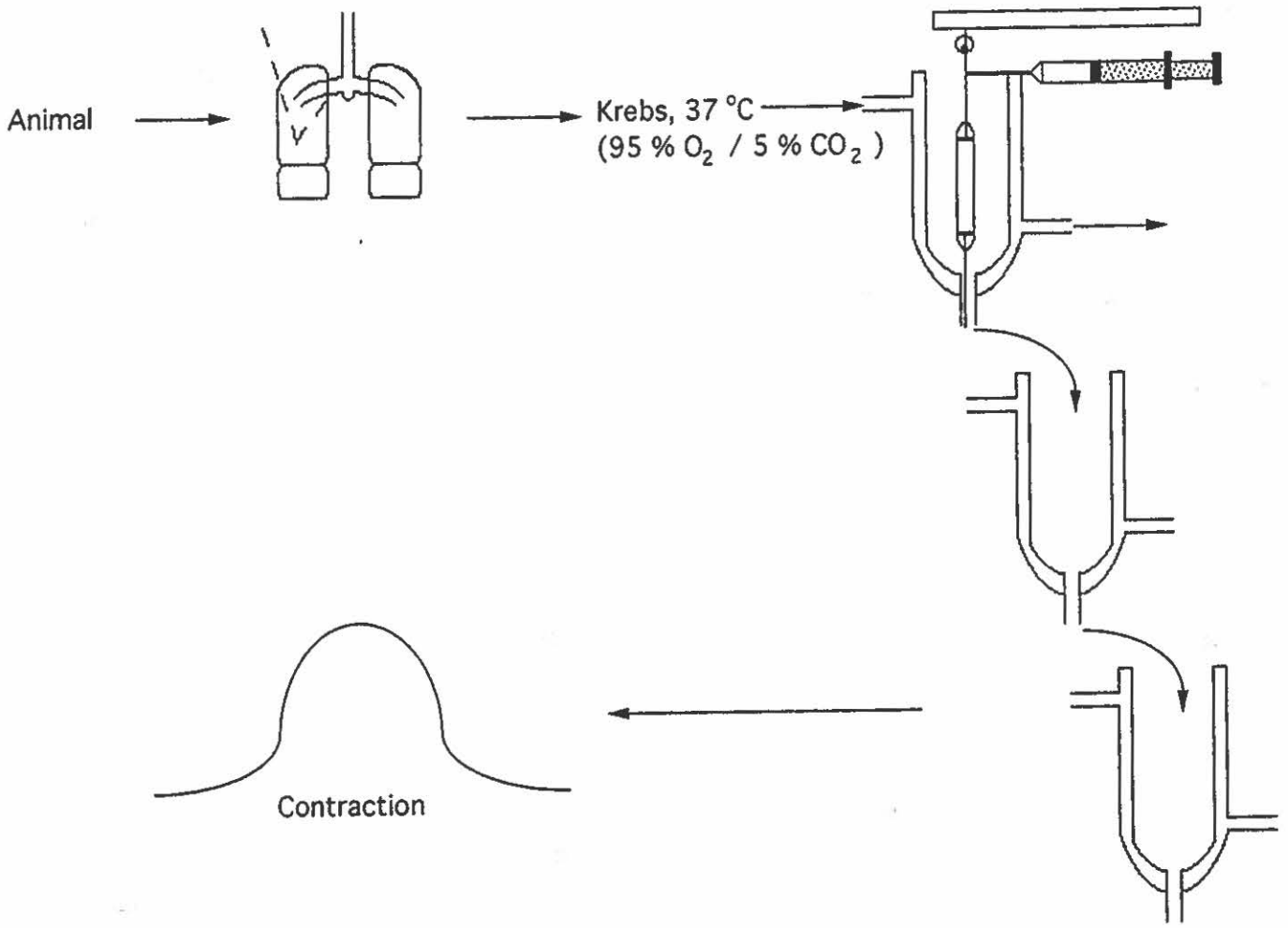


Figure 5 : Protocole de bioessais sur le parenchyme de poumons de cobayes

Tableau IV : **Quantité et concentration des peptides utilisés afin d'obtenir une courbe dose-réponse**

Peptide	Quantité (pmol)	Concentration (M)	Nombres d'injections
histamine	10 000	$1x10^{-8}$	2
ET-1	100	$1x10^{-10}$	2
analogue	10	$1x10^{-11}$	1
	30	$3x10^{-11}$	1
	100	$1x10^{-10}$	1
	300	$3x10^{-10}$	1
	1 000	$1x10^{-9}$	1
	3 000	$3x10^{-9}$	1
	10 000	$1x10^{-8}$	1
	30 000	$3x10^{-8}$	1

module BIOPOLYMER du programme INSIGHT II version 2.30 de Biosym Technologies Inc. (San Diego, CA) a permis la construction de modèles sous forme étendue sur le poste de travail Silicon Graphics Indigo R4000. Les structures obtenues ont d'abord été soumises à 300 étapes de minimisation d'énergie par la méthode de descente rapide (*steepest descent energy minimization*) en utilisant un champ de force avec valences conséquentes (*consistent valence force field*) dans le module DISCOVER du programme INSIGHT II. Par la suite, 10 000 étapes de minimisation d'énergie par gradient conjugué (*conjugate gradient energy minimization*) ont été réalisées avec un critère de dérivation maximum de 0,01 Kcal/mole-Å. Dans tous les cas, la dérivation maximum a été atteinte en moins de 10 000 étapes.

5. Synthèse en phase solide de BQ-123

5.1 Réactifs et solvants utilisés

Des billes de résine hydroxy-méthyle (0,5 méq/g) de la compagnie Bachem (Torrance, CA) ont été utilisées. Le Boc-D-Asp(β-OBzl) provient de la même compagnie. Du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Aldrich, Milwaukee, WI) et de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (Sigma, St-Louis, MO) ont permis le couplage du premier acide aminé sur la résine.

5.2 Protocole de synthèse de Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH)

Le dérivé Boc-D-Asp(β-OBzl) et le 9-fluorènylméthanol 2:1 (p/p) ont été dissous dans du DCM puis la solution a été agitée à 0 °C. Du DMAP et du DCC servent d'agents de couplage à la réaction qui demande 1h. Une filtration élimine le précipité de dicyclohexylurée (DCU) et le filtrat est dilué avec du DCM. La solution est alors extraite avec 2x40 mL d'acide citrique 10%, 1x40 mL d'H_2O, 2x40 mL de $NaHCO_3$ 2,5%, 2x40 mL d'H_2O puis séchée à l'aide de $MgSO_4$, filtrée et

concentrée jusqu'à obtenir un solide huileux qui est recristallisé dans un mélange d'éthanol et d'éther de pétrole. Du Boc-D-Asp(α-OFm)(β-OBzl) est donc obtenu.

Une hydrogénation catalytique avec du palladium 10% sur carbone pendant 1,5 h, à la température de la pièce, et une pression de H_2 de 40 psi permettent de retirer le benzyle. Une filtration sur célite élimine le catalyseur. Le filtrat est alors dissous dans de l'éther puis extrait avec 1x40 mL de $NaHCO_3$ 2,5%, 1x40 mL d'H_2O, 1x40 mL de $NaHCO_3$ 2,5%, 1x40 mL d'H_2O. Les différentes phases aqueuses sont alors combinées et amenées à pH 2 par ajout d'acide citrique 10%. Le précipité obtenu est extrait avec 4x40 mL d'éther. Les fractions éthérées sont combinées et séchées avec du $MgSO_4$, puis filtrées et concentrées. Une recristallisation à l'aide de méthanol et d'éther donne le Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH) désiré.

5.3 Protocole de synthèse de BQ-123

5.3.1 Couplage des acides aminés

Dans un réacteur, 5 g de résine sont rincés 4 fois avec du DCM. Dans un bécher, 2 équivalents de Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH) sont dissous à l'aide d'environ 40 mL de DCM et 5 mL de DMF. Ensuite, 60 mg de DMAP sont dissous dans un minimum de DCM et ajoutés dans la solution d'acide aminé. Dans un erlenmeyer à 0 °C, 2 équivalents de DCC sont dissous dans du DCM; la solution de Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH)/DMAP est ajoutée et le mélange agité 5 min. Par la suite, une filtration permet de retirer le précipité de DCU. Le filtrat orange foncé obtenu est alors ajouté sur la résine, dans le réacteur, et le couplage poursuivi 48 h avec vérification qualitative du taux de couplage après 12, 24 et 48 h par le test à la ninhydrine (décrit à la section 1.3.3). Après le couplage, la résine est abondamment rincée au DCM, à l'éthanol, au DMF et à nouveau au DCM. Le test à l'acide picrique (voir section 1.3.2) permet de déterminer le degré de couplage

de ce premier acide aminé sur la résine. Puis, une réaction d'acétylation bloque les sites inoccupés de la résine : 7,5 mmoles d'anhydride acétique et 7,5 mmoles de DIEA dans du DMF sont agités 30 min dans le réacteur. Le couplage des résidus suivants (D-Trp, L-Leu, D-Val et L-Pro) est effectué selon le protocole déjà décrit (section 1.3.3).

5.3.2 Cyclisation intramoléculaire

Tout d'abord, il faut retirer le groupement α-OFm de l'acide aspartique à l'aide d'une solution 20% de pipéridine dans du DMF. La réaction se poursuit 20 min et le peptide-résine est rincé avec du DMF, de l'éthanol et du DCM. Le test de Kaiser à la ninhydrine permet à nouveau d'évaluer le degré de la réaction. Ensuite, il faut déprotéger l'amine de la Pro N-terminale en retirant le groupement Boc tel que décrit précédemment. Les 2 extrémités libres obtenues sont alors cyclisées en présence de 3 éq de BOP et de 5 éq de DIEA dissous dans un minimum de DMF. La résine est retirée du réacteur et séchée complètement.

5.3.3 Clivage, purification et caractérisation

Les méthodes déjà décrites ont permis le clivage et la purification du BQ-123. Le gradient de CLHP préparative allait de 0%-100% (B) en 4 h alors que pour l'analyse des fractions par CLHP analytique, c'était 25%-55% (B) en 15 min.

La caractérisation par CLHP analytique a été effectuée sur le même système que les analogues de ET-1 avec un gradient de 30%-50% (B) en 20 min. De plus, une co-injection, dans les même conditions, du produit obtenu dans notre laboratoire et du BQ-123 d'American Peptide Company Inc. (Sunnyvale, CA) permet la comparaison des 2 produits. La détermination du poids moléculaire par spectrométrie de masse (voir méthode section 2.3) a également permis de confirmer la composition du BQ-123 synthétisé.

Résultats

6. Synthèse, purification et caractérisation des analogues de ET-1

6.1 Synthèse des dérivés peptidiques

Un sel de césium de Boc-Trp(For) a permis le couplage de l'acide aminé C-terminal sur la résine dans tous les cas. Le test à l'acide picrique, effectué en duplicata, donne une substitution de 0,40 et 0,42 mmole de peptide/g de résine pour une moyenne de 0,41 mmole/g. Pour chacun des analogues à synthétiser, 3 g de résine sont utilisés pour une échelle de synthèse de 1,2 mmole dans un système comptant 6 réacteurs manuels. Le clivage au HF, en présence des capteurs de carbocations appropriés, donne une poudre amorphe de couleur violacée. Le profil CLHP analytique post HF montre que nos produits de synthèse sont de qualité. Toutefois, dans certains cas, un deuxième pic important, séparé par quelques secondes du pic majeur, a aussi été enregistré.

6.2 Purification, déformylation et cyclisation des analogues de ET-1

La purification par CLHP préparative a permis la séparation des 2 pics majeurs lorsque nécessaire. La figure 6 montre le profil CLHP analytique de [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET après le clivage au HF de même que suite à la première purification. Sur le profil post HF, on distingue bien le dédoublement du pic majeur aux temps de rétention (Tr) 13,02 et 13,33 min.

Afin de retirer le groupement formyle, une solution de pipéridine 0,1 N a été utilisée. La réaction de déformylation a été suivie par CLHP analytique. Celle-ci modifie le Tr du peptide comme le montre la figure 7. Cependant, lorsque 2 pics majeurs étaient présents dans les peptides bruts, un seul des 2 peptides isolés a présenté un déplacement sur CLHP après le traitement à la pipéridine. Il est

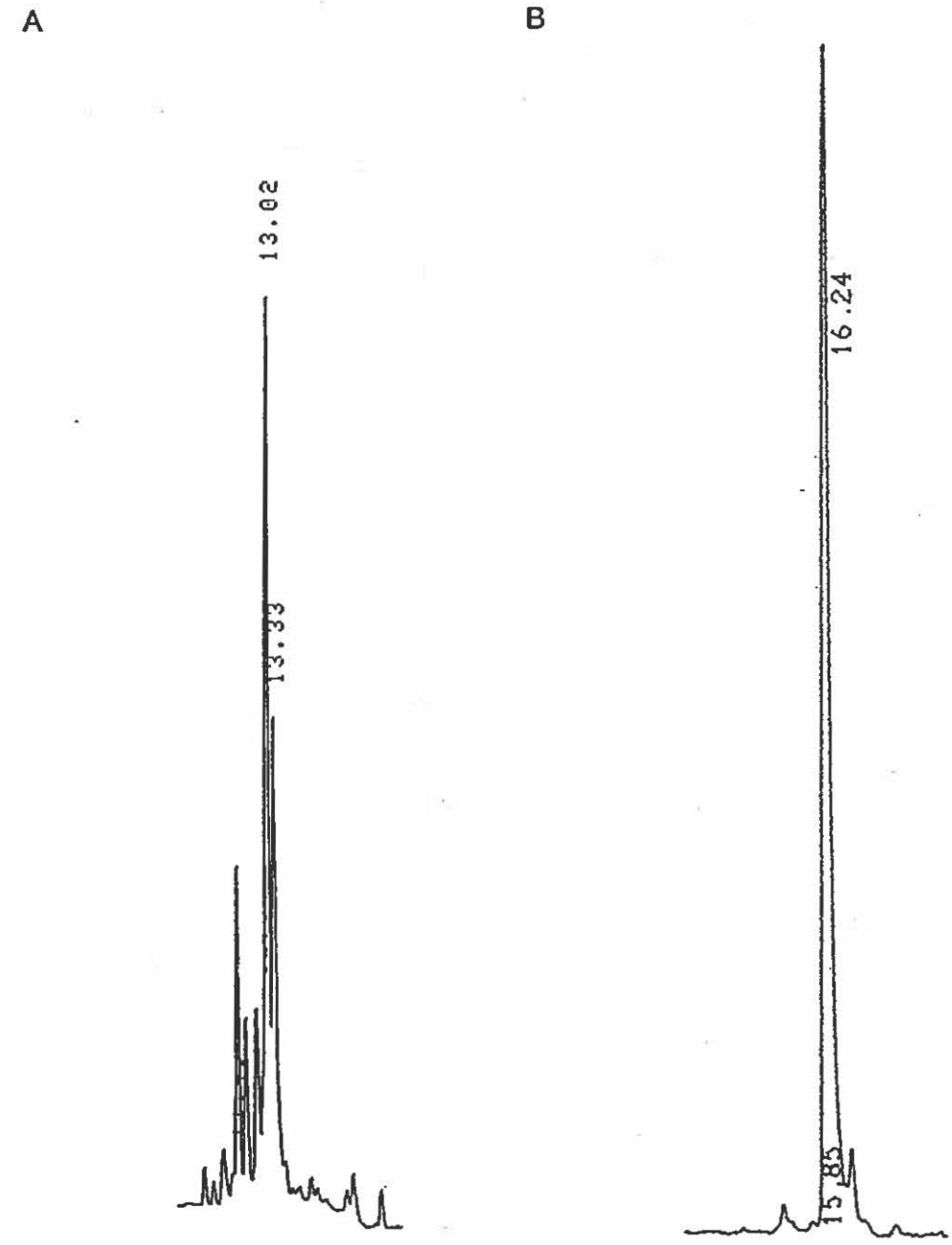


Figure 6 : Profils CLHP analytiques de [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET après :

A) synthèse en phase solide avec le réactif BOP et clivage au HF;

B) purification par CLHP préparative.

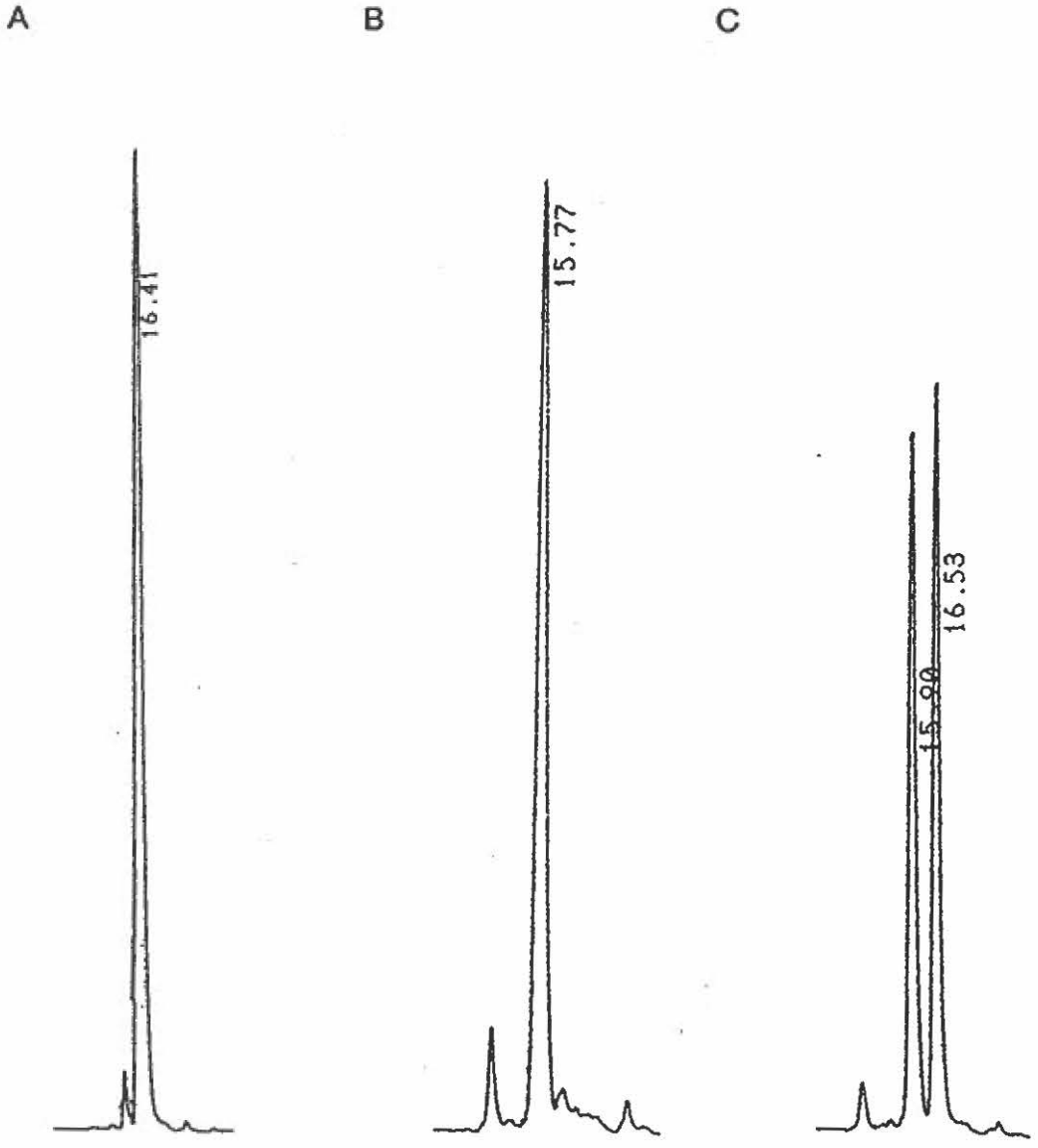


Figure 7 : Profils CLHP analytiques de l'analogue linéaire 17-21 après :
A) purification sur CLHP préparative;
B) déformylation par traitement à la pipéridine 0,1 N, 30 min à 0 °C;
C) co-injection des produits A et B.

donc vraisemblable que le clivage au HF retire une partie des groupements formyles. Les résultats obtenus suggèrent que plus la couleur violacée du peptide post HF est prononcée, plus la déformylation s'avère importante. Un test avec le réactif de Ehrlich (Stewart et Young, 1984) confirme la présence ou l'absence de groupement formyle sur les analogues. Ce test qualitatif utilise le p-diméthylaminobenzaldéhyde qui réagit avec le noyau β-indole du Trp pour former un complexe violet. La présence d'un groupement formyle situé au même emplacement sur ce Trp bloque la réaction. Des échantillons de peptides dissous dans une solution méthanol : H_2O (1:1) ont été appliqués sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice. Le réactif de Ehrlich, *p*-diméthylaminobenzaldéhyde 10%/HCl : acétone (1:4), est appliqué sur la plaque de CCM. Boc-Trp donne une tache d'un violet intense alors que Boc-Trp(For) produit une tache mauve très pâle. Nos résultats, obtenus avec les divers analogues, ne sont pas concluants, peut être parce que la quantité de peptides sur la plaque de CCM, donc de Trp^{21}, formylé ou non, était insuffisante pour une détection sans équivoque.

Le suivi de la réaction de cyclisation, réalisée à l'aide d'iode dissous dans une solution aqueuse d'acide acétique, a été effectué également au moyen de la CLHP analytique. La figure 8 montre le profil CLHP de chacune des étapes de cette réaction soit le changement du Tr (8a et 8b) puis la purification post-cyclisation (8c).

6.3 Caractérisation des peptides

Les analyses par CLHP analytique sur colonne de particules de 5 μm et par électrophorèse capillaire avec un tampon citrate de sodium 2,5 mM, pH 2,5, ont montré la pureté des analogues obtenus après l'ensemble des étapes de purification. La description des résultats de ces 2 méthodes de caractérisation se retrouve dans les tableaux V et VI. La détermination du poids moléculaire par

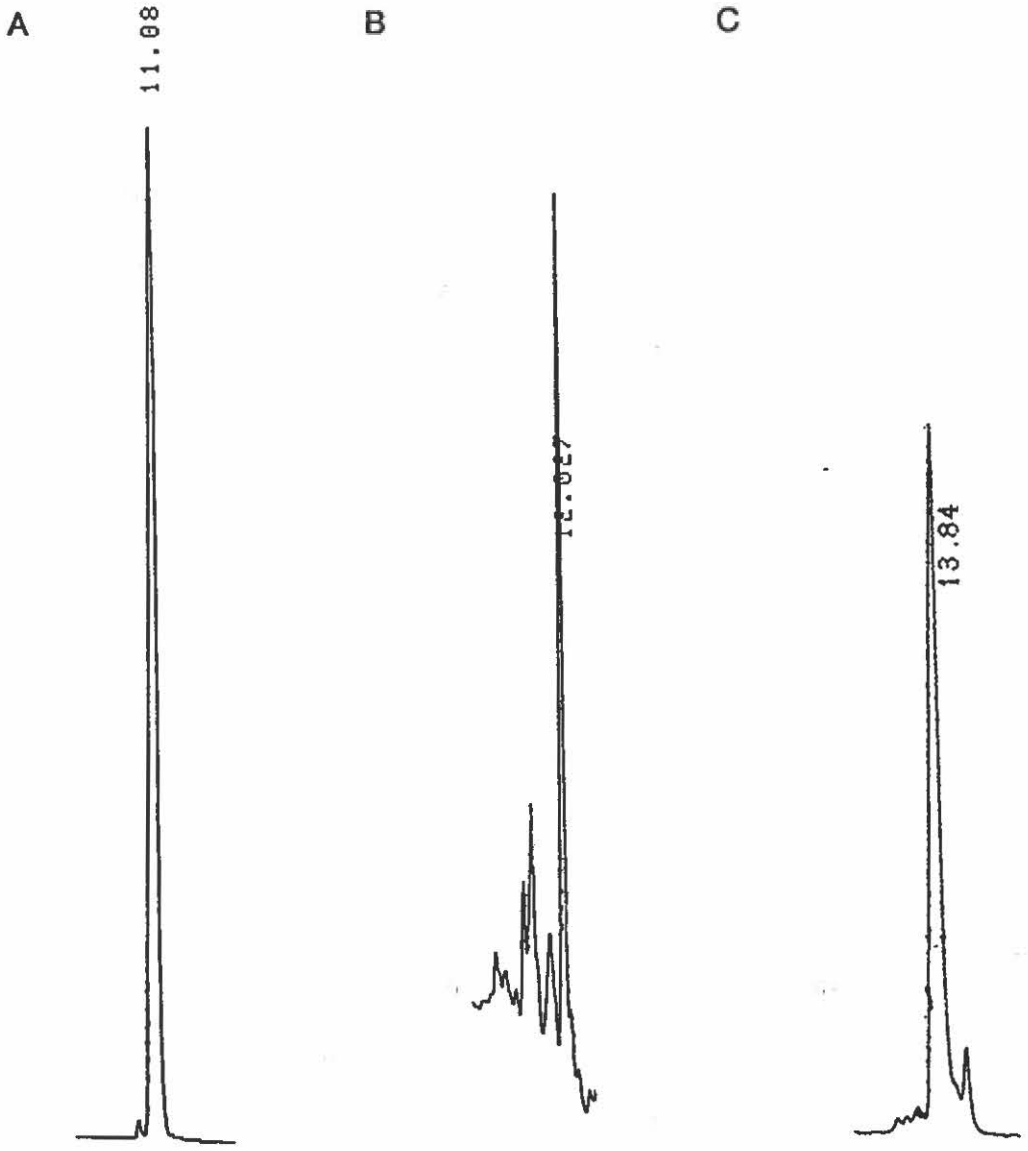


Figure 8 : Profils CLHP analytiques de l'analogue linéaire 19-21 déformylé :

A) en solution dans CH_3COOH 80%/H_2O, avant cyclisation;

B) après cyclisation avec 50 éq de I_2 dans le méthanol;

C) après purification post-cyclisation sur CLHP préparative.

Tableau V : Caractérisation des analogues de ET-1 par CLHP analytique et par électrophorèse capillaire

Peptide	CLHP[a] (% ACN)	EC[b] (Tr en min)
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	38,40	8,86
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	41,10	11,49
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	37,58	11,14
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	38,91	10,67
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	36,25	11,40
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(21)ET	33,85	11,89
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	37,23	9,13
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	40,77	12,40
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	37,24	11,58
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	38,38	11,13
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	35,52	10,77
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(21)ET	33,28	10,55
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	36,71	9,62
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	40,15	12,91
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	38,69	11,27
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	37,31	10,69
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	34,07	10,00
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(21)ET	29,68	9,47
(3-11)-Aca-(16-21)ET	37,85	9,33
(3-11)-Aca-(17-21)ET	41,49	11,67
(3-11)-Aca-(18-21)ET	38,20	8,41
(3-11)-Aca-(19-21)ET	38,78	10,49
(3-11)-Aca-(20-21)ET	31,87	10,53
(3-11)-Aca-(21)ET	28,75	10,11

[a] Pourcentage d'ACN nécessaire à l'élution des analogues sur CLHP analytique (5 μm) selon les conditions décrites section 2.1

[b] Temps de rétention en minutes obtenu par électrophorèse capillaire (section 2.2)

Tableau VI : **Pureté des analogues de ET-1 d'après les mesures par CLHP analytique et par électrophorèse capillaire** 39

Peptide	CLHP (%)	EC (%)
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	96,8	100
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	95,7	100
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	91,9	98,5
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	96,8	100
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	97,1	100
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(21)ET	97,1	100
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	74,9	100
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	87,9	100
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	82,1	98,1
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	83,9	98,1
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	87,8	92,6
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(21)ET	83,9	87,8
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	98,2	100
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	92,0	100
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	90,1	100
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	82,9	89,3
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	94,8	100
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(21)ET	97,5	97,9
(3-11)-Aca-(16-21)ET	97,4	100
(3-11)-Aca-(17-21)ET	80,8	83,0
(3-11)-Aca-(18-21)ET	85,3	100
(3-11)-Aca-(19-21)ET	83,3	100
(3-11)-Aca-(20-21)ET	84,4	100
(3-11)-Aca-(21)ET	75,8	87,4

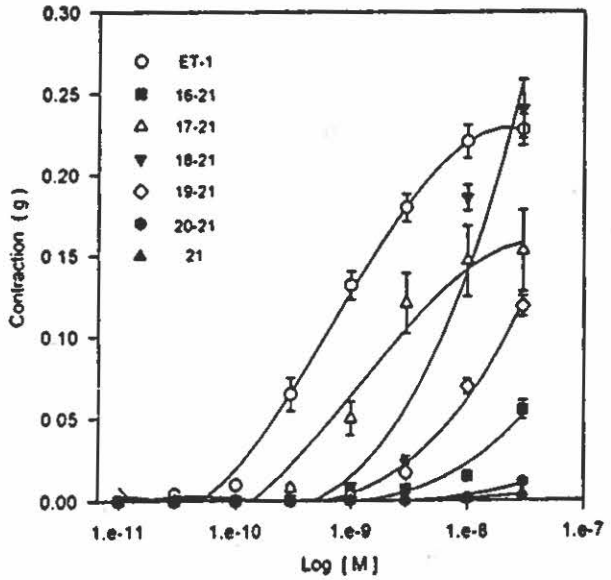
Les conditions de CLHP analytique se retrouvent section 2.1 et celles d'électrophorèse capillaire section 2.2

spectrométrie de masse n'a pu être complétée. En effet, plusieurs de nos dérivés peptidiques se sont décomposés en petits fragments de masse variable et le pic moléculaire était absent des spectres obtenus. Enfin, un échantillon de chacun des analogues a été soumis à une hydrolyse acide (HCl 6 N/phénol 0,1%, 110 °C 24 h). Après séchage et dérivation au phénylisothiocyanate (PITC), l'analyse de la composition en acides aminés a donné des résultats compatibles avec les valeurs théoriques.

7. Études pharmacologiques sur le parenchyme de poumons de cobayes

Ce tissu, choisi pour la réponse ET_B-*like* qu'il produit, s'avère relativement facile à prélever et donne une réponse reproductible car la taille des poumons est très semblable entre des cobayes de même poids. L'évaluation de l'activité biologique sur le parenchyme montre que l'analogue [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET se comporte comme un agoniste partiel avec un EC_{50} de $1,4x10^{-9}$ M alors que ET-1 montre un EC_{50} de $6,8x10^{-10}$ M (Figure 9A). C'est le seul peptide de cette série présentant une telle propriété. Le retrait d'autres acides aminés pour obtenir les dérivés linéaires formylés avec les portions C-terminales 18-21 et 19-21 donne des peptides environ 10 et 20 fois moins actifs que la molécule-mère respectivement (Tableau VII). De nouveaux raccourcissements du segment C-terminal, pour obtenir les dérivés linéaires formylés 20-21 et 21, génèrent des produits inactifs. De façon surprenante, l'addition de His^{16} aux analogues linéaires formylés, comme dans [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, entraîne une diminution importante de la contraction induite sur le parenchyme de cobaye (EC_{50} >> 10^{-7} M). De plus, le retrait du groupement formyle des composés linéaires nuit de façon importante à l'activité biologique sur la préparation pharmacologique utilisée. En fait, seuls les dérivés comportant les segments C-terminaux 18-21 ou 19-21 conservent une faible activité contractile. Chacune de ces activités s'avère plus de 1000 fois moins puissante que celle induite par ET-1 (Figure 9B) avec des EC_{50} >> 10^{-7} M pour les 2 analogues.

A



B

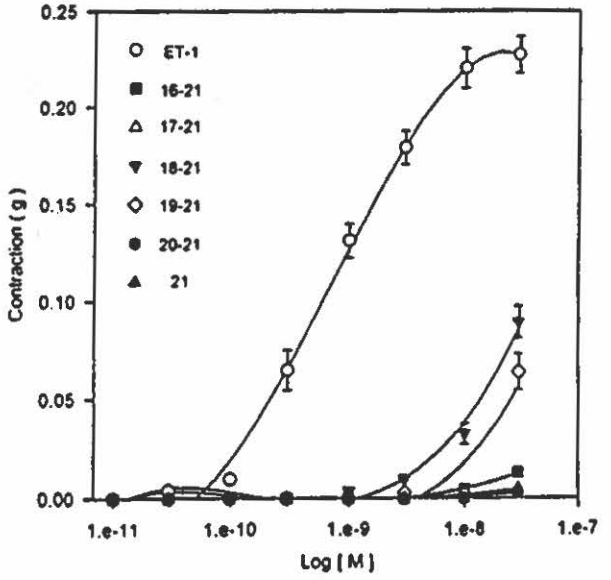


Figure 9 : Courbes concentration-réponse des analogues réalisées selon les conditions décrites [section 3.2] :

A) linéaires formylés soit : [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, . . . (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET;

B) linéaires soit : [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, . . . (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET.

Tableau VII : Concentration produisant 50% de la réponse maximale à ET-1 dans le parenchyme de cobayes

Peptide	EC_{50} (M)
ET-1	$6,8x10^{-10}$
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	$>> 10^{-7}$
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	$1,4x10^{-9}$‡
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	$5,6x10^{-9}$
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	$3,0x10^{-8}$
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	inactif*
[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(21)ET	inactif*
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	inactif*
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	inactif*
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	$>> 10^{-7}$
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	$>> 10^{-7}$
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	inactif*
[Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(21)ET	inactif*
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET	$3,6x10^{-9}$
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET	inactif*
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET	$>> 10^{-7}$
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET	inactif*
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(20-21)ET	inactif*
[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(21)ET	inactif*
(3-11)-Aca-(16-21)ET	$3,6x10^{-9}$
(3-11)-Aca-(17-21)ET	inactif*
(3-11)-Aca-(18-21)ET	inactif*
(3-11)-Aca-(19-21)ET	inactif*
(3-11)-Aca-(20-21)ET	inactif*
(3-11)-Aca-(21)ET	inactif*

‡ agoniste partiel * analogues inactifs jusqu'à $3,0x10^{-8}$ M

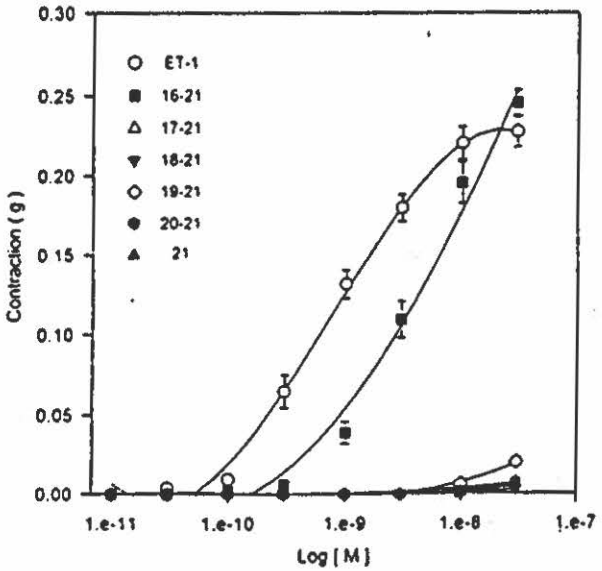
Dans le cas des produits cycliques, contrairement à ce qui est observé au niveau des composés linéaires, la présence de His^{16} avec sa chaîne latérale imidazole chargée positivement favorise l'activité biologique. En effet, les contractions enregistrées pour [$Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(16-21)ET et (3-11)-Aca-(16-21)ET s'avèrent identiques et seulement un ordre de grandeur plus faibles que celle de la molécule-mère; ces 2 analogues possèdent un EC_{50} de $3,6x10^{-9}$ M (Figure 10 A et B). Que le groupement formyle soit présent ou non sur l'indole de la chaîne latérale du Trp^{21}, l'acide aminé 16 est nécessaire à l'activité de ces dérivés cycliques. Toute tentative de raccourcissement du segment C-terminal élimine la réponse sur le parenchyme pulmonaire de cobayes.

Les résultats montrent également que les ponts disulfures ne s'avèrent pas essentiels à l'obtention d'une activité biologique significative dans la préparation pharmacologique de récepteurs ET_B-*like* utilisée. En effet, le pont Cys^1-Cys^{15} est absent de l'ensemble de nos dérivés peptidiques alors que le lien Cys^3-Cys^{11} ne peut se former dans les analogues linéaires. Ces derniers comportent des groupes Acm sur leurs Cys, ce qui empêche toute formation de ponts disulfures.

8. Études de structure par modélisation moléculaire

Les résultats obtenus avec ET-1 (Figure 11A) montrent que le segment C-terminal de ce peptide est replié vers la portion bicyclique de la molécule. Les chaînes latérales de Ser^4, Ser^5, Leu^6, Asp^8 et Glu^{10} pointent vers l'extérieur de la portion en boucle de ET-1 tandis que celles de Ser^2 et Met^7 s'orientent vers l'intérieur. Au niveau de la portion hydrophobe 12 à 15, Val^{12} et Phe^{14} se placent près de Glu^{10} alors que Tyr^{13} est au-dessus du pont disulfure Cys^3-Cys^{11}. Les chaînes latérales de His^{16} et Asp^{18} sont près l'une de l'autre, par contre celle de Leu^{17} se place à proximité de Asp^8 et Met^7. Ile^{19} et Ile^{20} s'éloignent au maximum l'un de l'autre. Enfin, l'indole de Trp^{21} est isolé malgré le repliement vers la portion bicyclique de ET-1. L'ajout d'un groupement formyle sur le Trp^{21}, comme dans

A



B

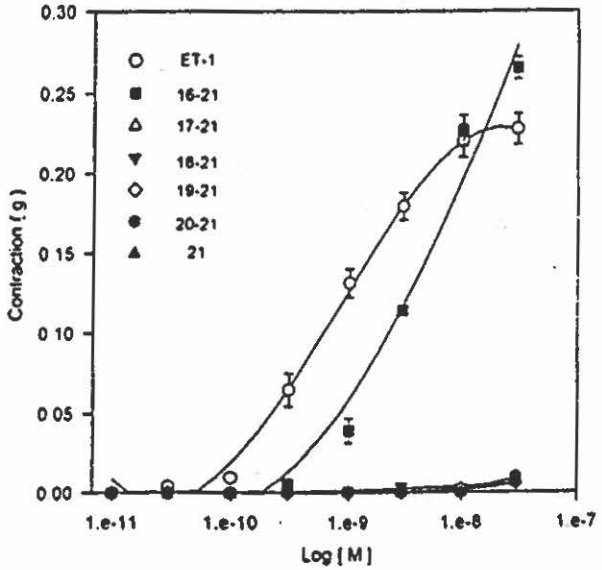


Figure 10 : Courbes concentration-réponse des analogues réalisées selon les conditions décrites [section 3.2] :

A) cycliques formylés soit : [Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, . . . (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET;

B) cycliques soit : (3-11)-Aca-(16-21)ET, . . . (17-21)ET, . . . (18-21)ET, . . . (19-21)ET, . . . (20-21)ET, . . . (21)ET.

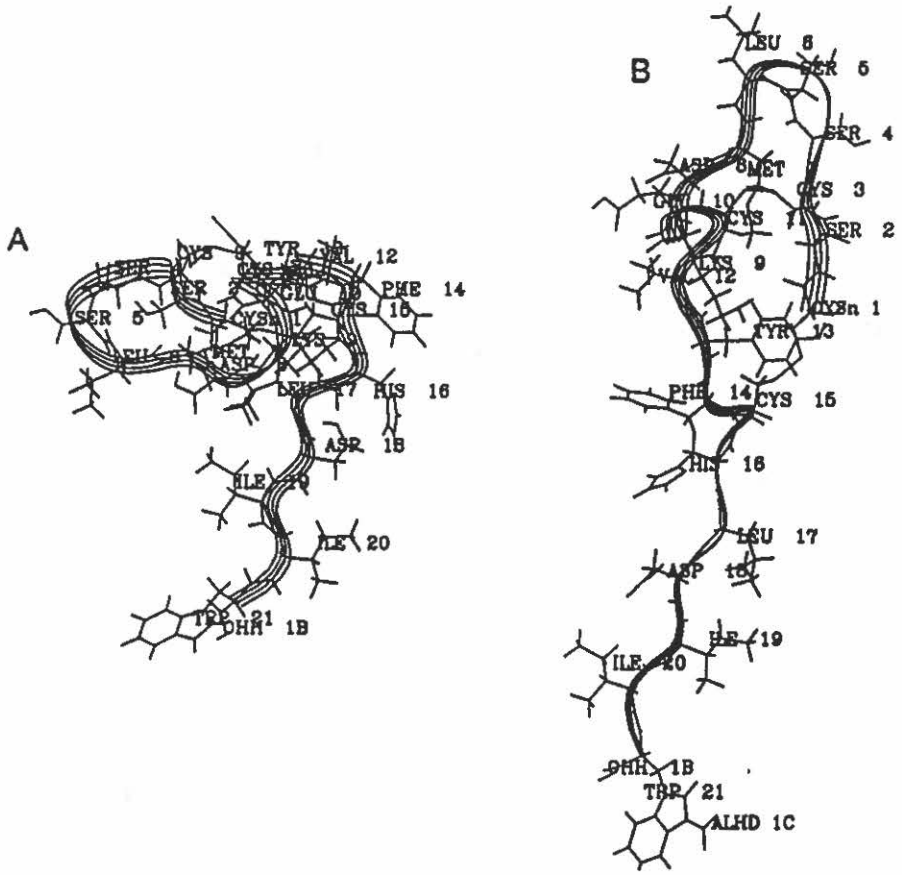


Figure 11 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite section 4 sur : A) ET-1; B) [Trp(For)^{21}]ET-1.

[Trp(For)^{21}]ET-1, modifie l'orientation de l'hexapeptide C-terminal qui devient linéaire à la suite du segment 12 à 15 (Figure 11B). La portion qui s'étend des résidus 1 à 10 de ce dérivé peptidique demeure inchangée par rapport à ET-1. La chaîne latérale de Val^{12} est maintenant plus isolée et éloignée de Phe^{14}. Tyr^{13} se retrouve à bonne distance du pont Cys^{3}-Cys^{11} mais à proximité de Cys^{1}-Cys^{15}. Les chaînes latérales des acides aminés de l'hexapeptide C-terminal sont assez éloignées les unes des autres et le β-indole du Trp^{21} ne se rapproche d'aucun autre résidu. En définitive, les principales modifications observées dans l'environnement des chaînes latérales des acides aminés lors de l'ajout du groupement formyle sur Trp^{21} concernent Glu^{10}, Phe^{14}, His^{16} et Asp^{18}. Contrairement à ET-1, Asp^{8} est éloigné du segment C-terminal, surtout de la chaîne latérale de Ile^{19}.

Des études de modélisation moléculaire ont également été réalisées sur quelques analogues sélectionnés d'après les résultats des essais pharmacologiques. La structure générale de [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET est repliée sur elle-même en une forme plus ou moins carrée (Figure 12A). Plusieurs chaînes latérales s'orientent vers l'intérieur de la molécule notamment Ser^{4}, Glu^{10}, Ile^{19} et Trp^{21} tandis que Ser^{5}, Met^{7}, Lys^{9}, Leu^{17}, Asp^{18} et Ile^{20} se démarquent de la forme compacte du peptide. L'ajout du groupement formyle donne un produit linéaire où les chaînes latérales sont nettement plus accessibles et s'étendent régulièrement tout autour du squelette du peptide (Figure 12B). Les résidus hydrophobes Leu^{17} et Ile^{19} entourent l'indole du Trp^{21}. Enfin, l'orientation des chaînes latérales des résidus 17-21 de [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET est très semblable à celle de la même portion de ET-1. Cependant, Asp^{8} demeure distant du segment C-terminal.

Cet important effet du groupement formyle ne s'observe pas de façon aussi marquée entre les analogues 18-21 linéaires (Figure 13A et B). En fait, la conformation de la partie N-terminale des 2 molécules, jusqu'à l'Aca, s'avère

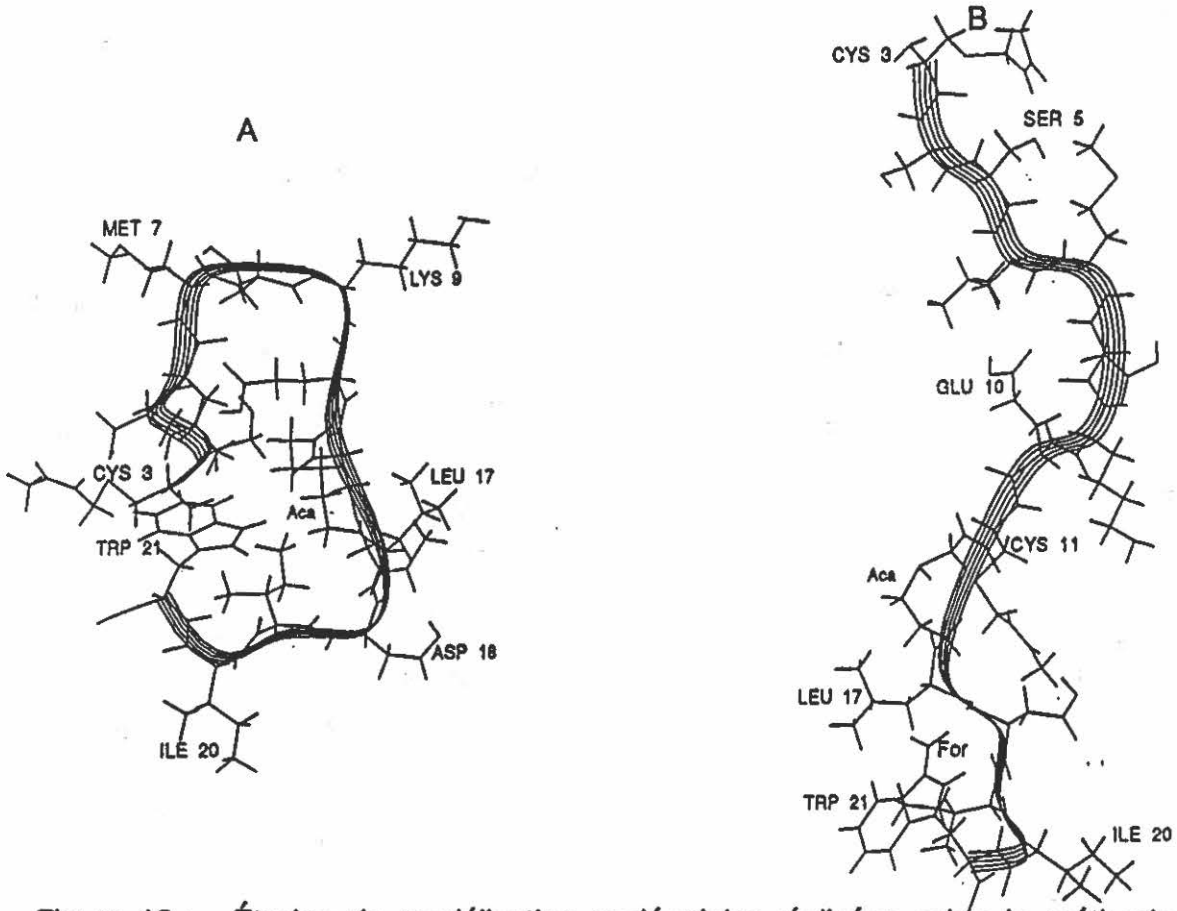


Figure 12 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite [section 4] sur : A) [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET; B) [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET.

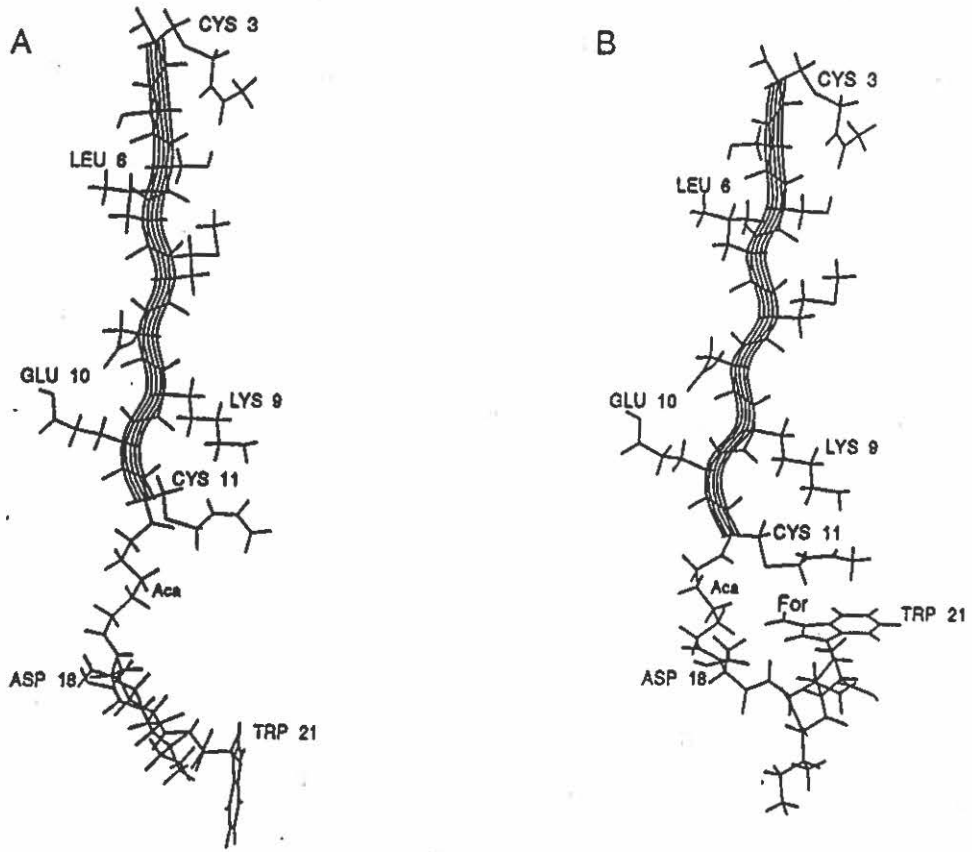


Figure 13 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite section 4 sur : A) [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET; B) [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(18-21)ET.

identique. Les chaînes latérales des résidus 3-11 sont disposées régulièrement autour du squelette peptidique. Les différences entre les dérivés formylés ou non commencent donc avec Asp^{18}. En effet, la portion C-terminale de [$Cys(Acm)^{3,11}$]-(3-11)-Aca-(18-21)ET est linéaire, comme l'ensemble de la molécule. Les chaînes latérales de Asp^{18}, Ile^{19} et Ile^{20} sont rapprochées du squelette de la molécule et l'indole du Trp^{21} se positionne afin d'être le plus éloigné possible du reste de la molécule. L'addition du groupement formyle, comme dans [$Cys(Acm)^{3,11}$, $Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(18-21)ET, modifie l'orientation des résidus C-terminaux qui se replient davantage vers la portion linéaire de la molécule. Le groupement β-indole du Trp^{21} s'oriente maintenant vers l'Acm protégeant Cys^{11} et vers l'espaceur aminocaproïque. De nouveau, l'indole est entouré d'éléments hydrophobes : la chaîne latérale de Ile^{19} et l'Aca.

En ce qui concerne les dérivés cycliques, des études de modélisation moléculaire ont été réalisées sur (3-11)-Aca-(16-21)ET et sur [$Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, les seuls analogues de cette série capables d'induire une contraction dans le parenchyme de cobaye. Si ces 2 composés présentent des activités biologiques identiques, leurs conformations s'avèrent très semblables et l'ajout du groupement formyle sur le Trp^{21} ne modifie pas l'arrangement tridimensionnel de la molécule (Figure 14A et B). En effet, l'orientation des chaînes latérales des résidus 3 à 11 s'avère pratiquement identique entre les 2 molécules. C'est plutôt l'arrangement global de la portion N-terminale par rapport à l'hexapeptide C-terminal qui est modifié. Une autre différence se retrouve dans l'orientation du β-indole du Trp^{21}. Cependant, ce dernier s'entoure à nouveau de chaînes latérales hydrophobes, celles de Leu^{17} et Ile^{19}.

9. Synthèse et caractérisation de BQ-123

9.1 Synthèse, cyclisation, clivage et purification

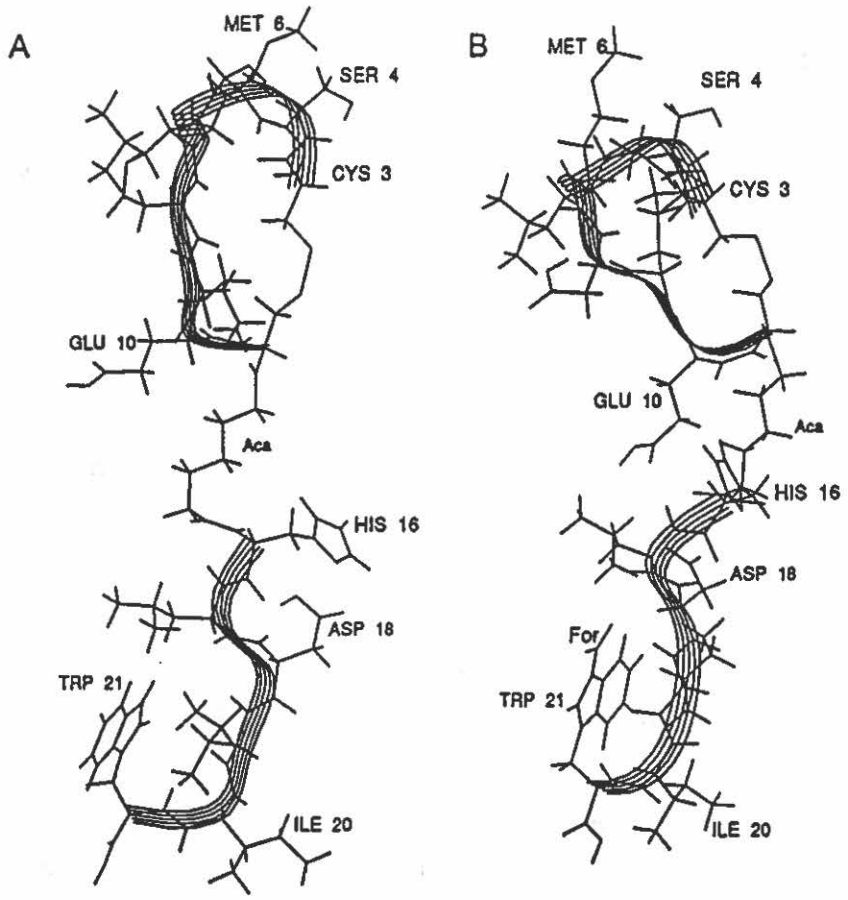


Figure 14 : Études de modélisation moléculaire réalisées selon la méthode décrite section 4 sur : A) (3-11)-Aca-(16-21)ET; B) [Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET.

Après le couplage du premier résidu sur la résine, le Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH), le test à l'acide picrique effectué en duplicata donne une substitution de 0,19 et 0,18 mmole de peptide/g de résine pour une moyenne de 0,185 mmol/g. Suite à l'acétylation visant à bloquer les sites demeurés libres sur la résine, un test qualitatif a été réalisé afin de s'assurer de la présence du groupement Fmoc sur le dérivé de D-Asp. De la résine couplée au premier résidu est prélevée et agitée 10 min dans une solution de pipéridine 20% dans l'éthanol puis l'absorbance du surnageant est ensuite lue à 325 nm; elle est de 0,150. Le même traitement est appliqué à du Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH) mais il s'avère impossible d'obtenir une lecture d'absorbance correcte car l'acide aminé dissous dans la solution absorbe à cette longueur d'onde. Cependant, la solution de résine devient légèrement jaune alors que celle du dérivé de D-Asp ne développe pas de couleur visible malgré sa plus forte absorbance. Le surnageant de la solution de résine contient donc le groupement Fmoc clivé par la pipéridine. Suite au développement de cette couleur jaune, il a fallu confirmer que l'absorbance lue lors du test à l'acide picrique était bien due à ce composé et non à la présence dans la solution, de groupements Fmoc clivés par le DIEA. À 358 nm, une solution de DIEA 5% dans l'éthanol (voir protocole du test à l'acide picrique section 1.3.2) possède une absorbance de 0,035 alors que l'ajout de résine-Boc-D-Asp(α-OFm)(β-COOH) dans cette solution donne une absorbance de 0,041. Donc, la seule absorbance retrouvée à cette longueur d'onde est celle du DIEA. L'absorbance mesurée lors du test à l'acide picrique n'était pas due à du Fmoc en solution mais bien au picrate.

Les autres acides aminés ont été couplés, les protections C- et N-terminales retirées, le peptide cyclisé puis clivé en présence des capteurs de carbocations appropriés. La figure 15A montre la qualité du BQ-123 obtenu. La purification sur CLHP préparative a permis l'obtention d'un produit pur à 97,5% (Figure 15B).

A

B

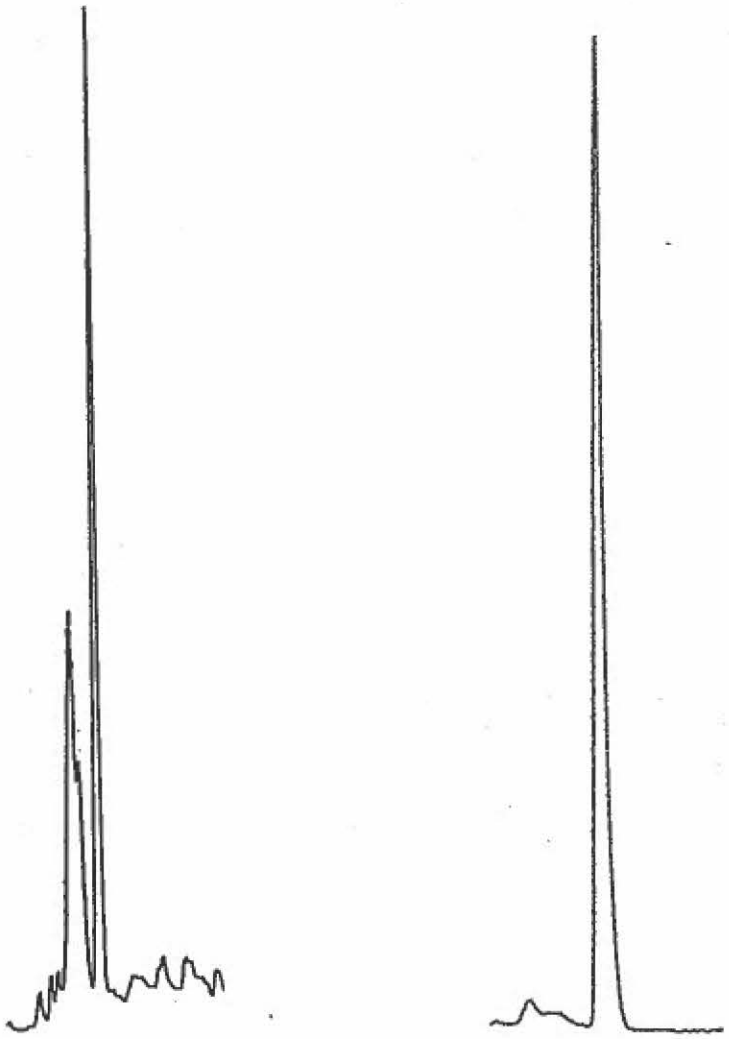


Figure 15 : Profils CLHP analytiques de BQ-123 après :
A) synthèse en phase solide avec le réactif de couplage BOP et clivage au HF;
B) purification par CLHP préparative.

9.2 Caractérisation de BQ-123

Le BQ-123 purifié a été analysé sur le système CLHP analytique décrit dans la section 2.1. Le temps de rétention du BQ-123 synthétisé selon le protocole mis au point dans notre laboratoire, soit 16,12 min, s'avère identique à celui du même peptide acheté de American Peptide Company inc. (Sunnyvale, CA). De plus, la co-injection du pentapeptide synthétisé dans notre laboratoire et du produit commercial donne un seul pic (Tr de 16,16 min) sur CLHP analytique, comme le montre la figure 16.

La mesure, par spectrométrie de masse, du poids moléculaire du BQ-123• Na synthétique donne 633 g/mol. La valeur théorique attendue pour BQ-123 est de 610 g/mol pour le pentapeptide et 23 pour le sodium. La réalisation d'essais pharmacologiques chez le rat a montré l'activité antagoniste du BQ-123 synthétisé selon la nouvelle méthode proposée (Figure 17). L'injection de 0,5 nmole de ET-1/Kg chez le rat cause une augmentation de la pression artérielle moyenne de plus de 45 mm Hg. La co-injection de ET-1 et de BQ-123 (1 μmol/Kg) produit une augmentation significativement plus faible que lors de l'injection de ET-1 seule, comme attendu avec l'ajout de cet antagoniste des récepteurs ET_A.

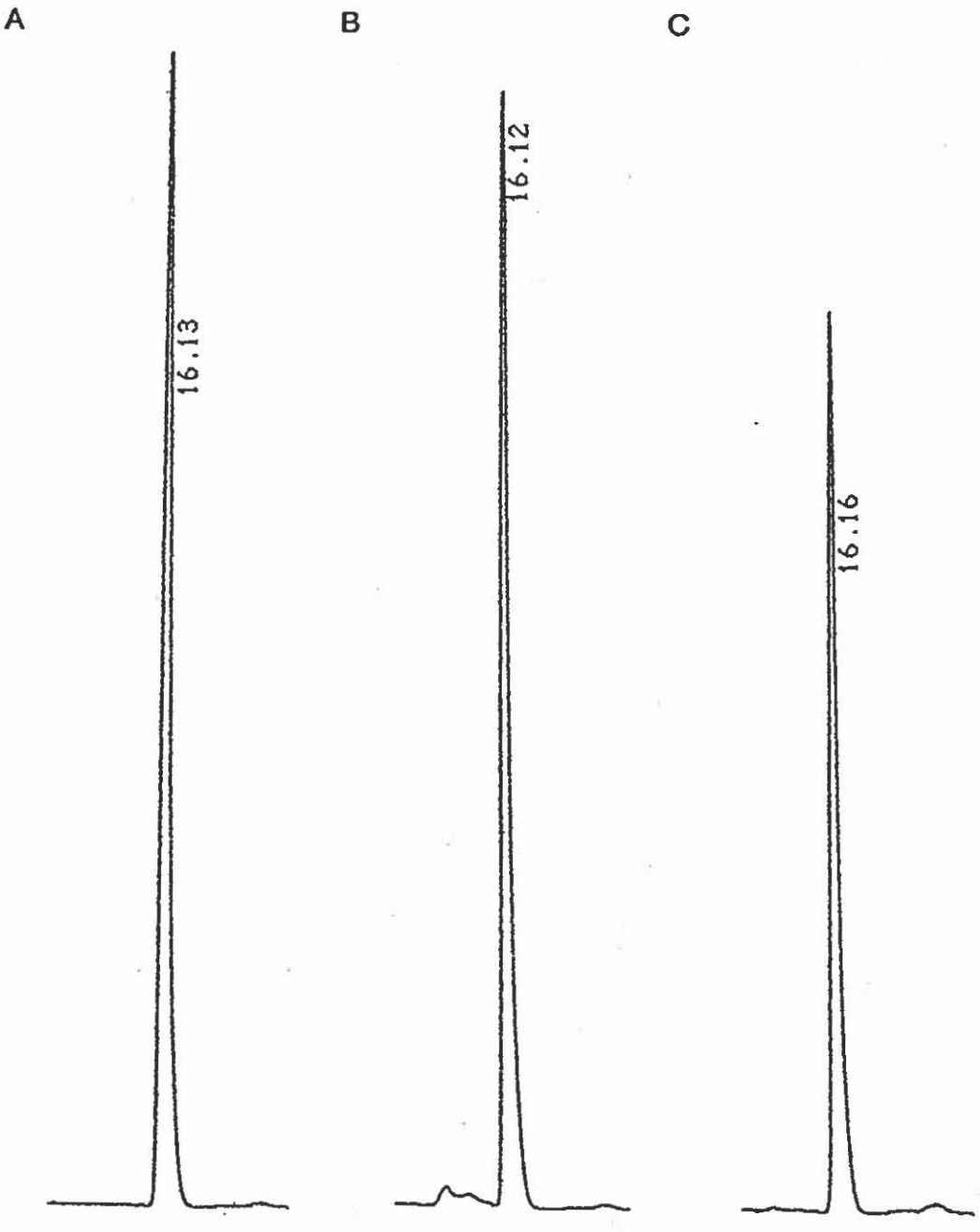


Figure 16 : Profils CLHP analytiques du BQ-123 :
A) provenant d'American Peptide Company inc.;
B) synthétisé selon la méthode décrite section 5;
C) co-injection de A et B.

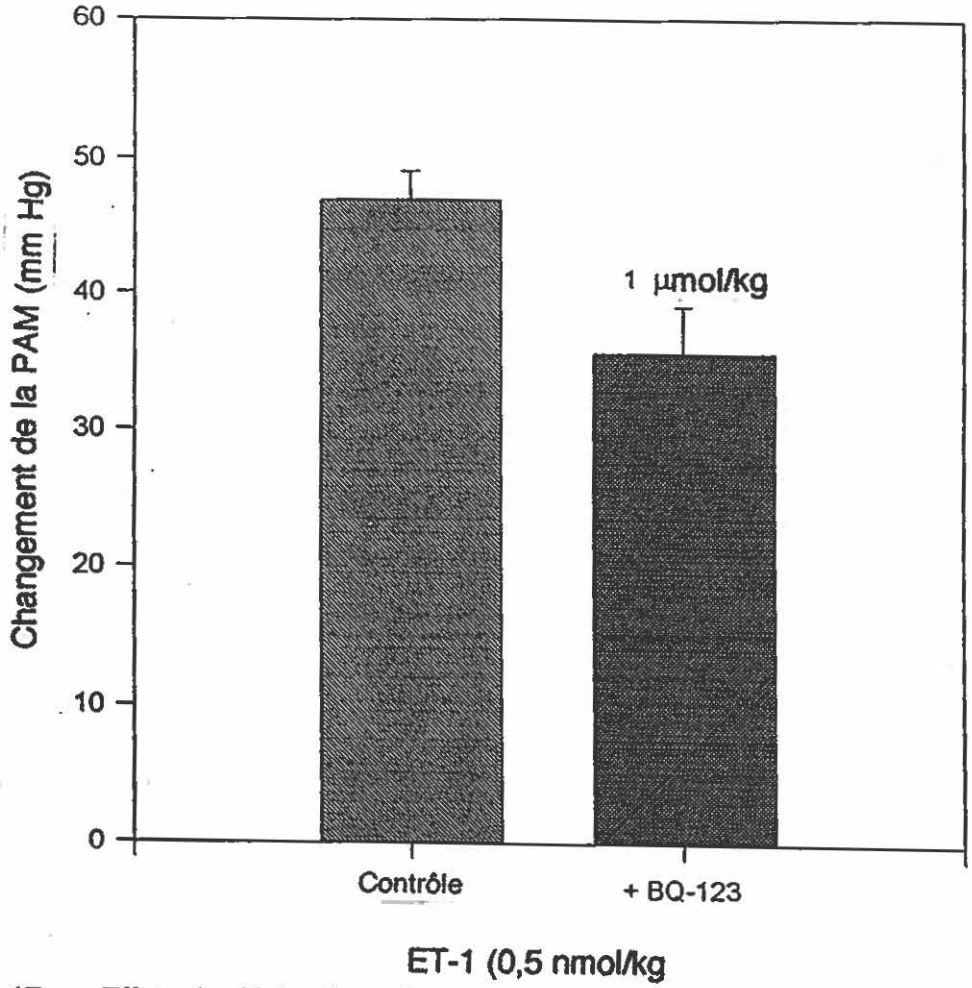


Figure 17 : Effet de l'injection de ET-1 (0,5 nmol/Kg) ou de la co-injection de ET-1 et de BQ-123 (1 µmol/Kg) sur la pression artérielle moyenne chez le rat (en mm Hg).

Discussion

10. Élaboration des analogues de ET-1 et synthèse en phase solide

10.1 Conception des analogues de ET-1 et choix des groupements protecteurs

L'identification des pharmacophores d'un peptide est une étape essentielle dans la compréhension de son mécanisme d'action moléculaire. Afin d'y parvenir, il faut développer des analogues et des antagonistes du peptide étudié pour déterminer les groupements fonctionnels et les éléments de la molécule essentiels au déclenchement de l'activité biologique et/ou son affinité de liaison. Deux approches sont courantes dans le développement d'analogues : la méthode concertée et la méthode systématique. La première sélectionne des éléments du peptide et les remplace par d'autres pour des raisons précises, alors que la deuxième change plusieurs parties de la molécule successivement mais de la même façon (Tam et al., 1994).

La méthode utilisée pour concevoir les analogues de ET-1 synthétisés dans notre laboratoire combine les 2 approches. En effet, le retrait des acides aminés 1 et 2, tout en conservant les résidus 3 à 11 de ET-1, permet d'étudier de façon plus spécifique le rôle du pont Cys^{3}-Cys^{11} en absence des résidus Cys^{1} et Cys^{15}. Également, l'étude des analogues sous forme linéaire aussi bien que cyclique favorise la compréhension de l'effet de l'ouverture et de la fermeture de ce lien chimique. Ainsi, cette approche permet d'évaluer, au niveau moléculaire, l'interaction possible des groupements thiols de Cys^{3} et Cys^{11} avec ceux des Cys extracellulaires du récepteur. C'est donc une action concertée qui modifie un aspect donné de la molécule. La conservation des acides aminés 8 à 10, dont la charge globale négative posséderait un rôle important dans l'activité biologique (Nakajima et al., 1989), permet d'étudier la conformation de leur chaîne latérale. L'analyse de l'organisation tridimensionnelle de ces résidus est effectuée à l'aide des études de modélisation moléculaire.

La nécessité d'introduire des modifications chimiques dans les chaînes latérales des peptides a favorisé le développement et l'usage de plusieurs acides aminés non naturels. Ceux-ci facilitent l'étude des divers paramètres impliqués dans l'interaction peptide-récepteur comme l'aromaticité, l'hydrophobicité, l'encombrement stérique etc. (Roberts et Vellaccio, 1983). La substitution des acides aminés Val^{12}-Tyr^{13}-Phe^{14}-Cys^{15} par l'Aca est une application directe de ces principes et touche 2 paramètres différents soit l'hydrophobicité et l'encombrement stérique. En effet, l'Aca, $H_2N(CH_2)_5COOH$, possède une longue chaîne carbonée hydrophobe qui conserve cette propriété retrouvée au niveau des résidus 12 à 15 de ET-1. La flexibilité de la portion centrale de l'Aca et l'absence de chaîne latérale limitent l'encombrement stérique. Ceci devrait conférer un maximum de flexibilité aux analogues. Un autre facteur important dans le choix de l'Aca comme espaceur flexible est sa disponibilité sous forme de Boc-acide aminé pour la synthèse en phase solide.

L'étude de la portion C-terminale de la molécule est effectuée selon une approche plus systématique. Pour ce faire, les acides aminés 16 à 20 sont retirés successivement, jusqu'à ne conserver que le Trp^{21}. Ceci favorise l'étude de la contribution de chacun de ces résidus dans la production d'une activité contractile sur une préparation pharmacologique contenant des récepteurs ET_B-*like* : le parenchyme de poumons de cobayes. La présente étude n'a pas tenu compte de l'effet de la diminution progressive de la longueur de la portion C-terminale des analogues par rapport au segment N-terminal. Cependant, ceci aurait pu être fait en augmentant la longueur des espaceurs pour compenser le retrait de chacun des acides aminés. En ce qui a trait aux éléments moléculaires des ETs essentiels à la liaison ou à l'activation, les récepteurs ET_B semblent moins sélectifs que les ET_A (Panek et al., 1992). La portion C-terminale de ET-1 est considérée comme la partie la plus flexible de la molécule (Aumelas et al., 1991; Munro et al., 1991). C'est pourquoi un rôle important dans la discrimination entre les différents types de récepteurs lui est attribué (Erhardt, 1991). Un des principaux objectifs visés lors

de l'élaboration de cette série d'analogues était la précision du rôle moléculaire de chacun des résidus C-terminaux. Tous les dérivés peptidiques synthétisés ont été étudiés en présence ou en absence d'un groupement formyle sur le noyau indole du Trp^{21} car, comme montré par la mise en commun des conclusions de Filep et al. (1992) et de Germain et al. (1993), l'ajout de ce groupement permettrait à ET-1 de discriminer entre la vasodilatation et la vasoconstriction produites par les récepteurs ET_B (Figure 3).

Afin de réaliser la synthèse en phase solide, le support polymérique doit être insoluble dans l'ensemble des solvants utilisés pour les lavages et les filtrations. La résine doit également comporter des groupements fonctionnels capables de lier de façon covalente le groupement carboxy α de l'acide aminé C-terminal du peptide à synthétiser (Merrifield, 1963). La résine choisie a donc été un copolymère de styrène ponté avec 1% de divinylbenzène, fonctionnalisée par des groupements chlorométhyles.

Pour s'assurer qu'un seul acide aminé est ajouté par peptide, lors de chaque étape de couplage, l'extrémité N-terminale des résidus doit être protégée. Pour ce faire, 2 groupements sont couramment utilisés, le t-butyloxycarbonyle (Boc) et le 9-fluorenylmethoxycarbonyle (Fmoc). Le premier se retire en milieu acide, avec du TFA, alors que le second s'enlève à l'aide d'une base : la pipéridine (Stewart et Young, 1984). Le choix du Boc pour la synthèse des analogues de ET-1 s'explique par la facilité d'élimination des produits de la réaction de déprotection qui sont gazeux (isobuthylène et dioxyde de carbone). En tant que donneur d'électrons, le Boc diminue de façon importante la racémisation des peptides en cours de synthèse.

Les chaînes latérales de certains acides aminés sont très réactives et doivent également être protégées (Tableau II). Un groupement cyclohexyle (cHex) protège la chaîne latérale de Asp. Sans celui-ci, le TFA, présent au cours de la

déprotection qui retire le Boc, favorise la fermeture de l'acide aminé en aspartimide stable. Par la suite, l'eau attaque ce cycle sur 1 de ses 2 groupements carbonyles, ce qui cause son ouverture pour donner soit le peptide correct soit un peptide comportant un β-Asp, c'est la transpeptidation (Bodanszky et Martinez, 1981). Le cHex protège Glu d'une réaction secondaire semblable, la fermeture en acide pyroglutamique ou en glutarimide. Tous les acides aminés sont susceptibles de racémisation mais His y est particulièrement sensible à cause de la réactivité de sa chaîne latérale imidazole; le Boc ne suffit pas à contrôler cette réaction secondaire. Le blocage de l'azote distal de l'imidazole par un groupement *p*-toluène sulfonyle (Tos) diminue cette réaction de façon importante (Stewart et Young, 1984). La chaîne latérale de Lys se termine par un NH_2 capable de lier un acide aminé lors d'un couplage, ce qui entraîne une ramification du peptide en cours de synthèse. Cette réaction s'avère contrôlable par l'ajout de 2-chlorobenzyloxy-carbonyle (2-ClZ) sur le ε-NH_2 (Bodanszky et Martinez, 1981). Au niveau de Ser, le OH nucléophile de la chaîne latérale est susceptible de produire un lien ester lors du couplage d'un acide aminé. L'ajout d'un groupement benzyle (Bzl) élimine cette réaction.

En plus des propriétés déjà attribuées au groupement formyle sur le Trp, ce groupement protecteur permet de contrôler les réactions d'oxydation et d'alkylation qui dégradent le β-indole. Enfin, les Cys doivent être protégées pour éviter les cyclisations intra- et intermoléculaires désordonnées. Parmis les groupements protecteurs disponibles, le méthylbenzyle (MeBzl) et l'acétamidométhyle (Acm) sont très utilisés. Le premier est retiré lors du clivage au HF et l'oxydation est effectuée à l'aide de $K_3Fe(CN)_6$ en milieu dilué. Le second, l'Acm, résiste au HF ce qui permet de conserver, comme désiré ici, des peptides linéaires. De plus, la réaction à base d'iode qui permet de le retirer s'effectue de façon concomitante à la formation du pont disulfure. Ceci rend possible un plus grand contrôle de la cyclisation et évite les solutions trop diluées. L'Acm a donc été choisi pour la synthèse de nos analogues.

10.2 Évaluation de la synthèse

Le clivage au HF des analogues a donné, dans plusieurs cas, des poudres d'un violet foncé. Après purification sur CLHP préparative, l'exposition à la pipéridine, afin de retirer le formyle du Trp^{21}, n'a produit aucun déplacement du Tr sur CLHP analytique. D'autres analogues, notamment celui comportant le segment C-terminal 17-21, ont donné un profil CLHP analytique post HF comportant 2 pics majeurs (Figure 6). Dans ce cas, les peptides obtenus après le clivage sont violacés. On sait que la coloration provient des groupements indoles libres sur les Trp comme démontré par le test avec le réactif de Ehrlich (voir section 6.2). En effet, ce test qualitatif ou l'indole du Trp réagit avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde pour former un complexe violet, montre que la présence d'un groupement formyle sur ce Trp bloque la coloration. Une proportion plus ou moins importante des groupements protecteurs formyles a donc été perdue. De plus, à la suite de la séparation par CLHP préparative de ces 2 pics, le traitement à la pipéridine donne un changement du Tr pour un seul des 2 pics. Ceci confirme la perte partielle (un pic de peptide formylé et un pic de peptide déformylé) de ce groupement protecteur en cours de synthèse ou lors du clivage.

Le groupe formyle est résistant au TFA et presque entièrement stable en présence de HF. Les mesures de la présence du formyle après la déprotection de même que les études de cinétique suggèrent que ce groupement résiste bien au TFA (Lundt et al., 1978). Certains capteurs de carbocations, comme le 1,2-éthanedithiol, provoqueraient la perte du groupement formyle pendant le clivage (Matsueda et al., 1981). Comme suggéré par Stewart et Young (1984), ce problème a été évité par l'utilisation d'éthanethiol et du *m*-crésol comme capteurs de carbocations. Une nouvelle série de clivages à partir des peptides-résines conservés a permis d'obtenir, dans tous les cas, des produits présentant 2 pics majeurs, sur CLHP analytique, séparables lors de la purification. Un seul des 2 pics subit un changement de Tr en présence de pipéridine et représenterait donc

un peptide formylé. La température ambiante de même que la rapidité d'exécution, surtout lors de l'évaporation, sont les seules différences entre les deux séries de clivages. La première série a été réalisée dans des conditions ou la température ambiante était élevée (26-28 °C) tandis que la seconde dans des conditions de température ambiante oscillant autour de 20 °C. Si le clivage lui-même s'effectue à 0 °C, l'évaporation du HF sous vide est réalisée à la température de la pièce. Or plus le HF se rapproche de son point d'ébullition (19 °C), plus les réactions secondaires, qui dépendent souvent de la température, augmentent (Stewart et Young, 1984). Ainsi, lorsque la température ambiante est élevée, le peptide serait exposé à davantage de réactions secondaires lors de l'évaporation du HF. C'est probablement ce qui explique la nature variable des analogues après traitement au HF.

10.3 Étude de l'identité et de la pureté des peptides : caractérisation des dérivés de ET-1

Les analogues linéaires formylés, desquels dérivent tous les autres, présentent une pureté variant de 92% à 97% selon les mesures sur CLHP analytique et de 98,5% à 100% par EC (Tableau VI). La séparation par CLHP sur phase inverse se base en majeure partie sur l'hydrophobicité des peptides présents alors que l'EC sépare selon la taille et la charge de l'analyte (Novotny, Cobb et Liu, 1990). Ces deux techniques sont donc complémentaires lorsqu'il s'agit de déterminer la pureté d'un peptide. Comme la purification des analogues s'effectue sur CLHP préparative, il s'avère possible qu'un produit co-élué avec le peptide à purifier ne soit pas détecté sur un système CLHP analytique qui sépare selon le même principe de base. C'est pourquoi nous avons utilisé l'EC comme seconde méthode de vérification de la pureté. Selon Gordon et al. (1988), l'EC donne fréquemment des niveaux de pureté plus faibles que la CLHP analytique en permettant la séparation selon des propriétés physiques différentes. Ceci n'a pas été observé avec nos dérivés, vraisemblablement à cause de la grande similitude

de charge et de masse entre le produit principal et les contaminants mineurs.

Des mesures par spectrométrie de masse sur les dérivés linéaires formylés n'ont pas donné de résultats concluants car les peptides se sont décomposés en petits fragments sans préserver le pic moléculaire. La matrice de glycérol utilisée comme véhicule du peptide est possiblement en cause pour la difficulté rencontrée lors des mesures. Enfin, l'analyse de la composition en acides aminés a montré que les peptides obtenus contiennent les résidus attendus.

11. Études de structure-activité des analogues de ET-1

11.1 Choix des tissus utilisés

Le parenchyme de poumons de cobayes a été choisi pour la réponse ET_B-*like* qu'il produit. Cette réponse est ainsi décrite car [Trp(For)^{21}]ET-1 induit une constriction de la trachée de cobaye, un tissus contenant des récepteurs ET_B, sans provoquer de vasodilatation chez le rat (Filep et al., 1992). Selon la littérature, cette dernière réponse serait aussi médiée par la sous-classe ET_B des récepteurs de l'ET. Lors de la publication de ces résultats, l'existence de plus d'un sous-type de récepteurs ET_B n'était qu'une hypothèse. Aujourd'hui, plusieurs évidences pharmacologiques supportent l'existence des récepteurs ET_{B1} et ET_{B2} même si un seul gène n'a été, jusqu'à maintenant, cloné pour les récepteurs ET_B (Battistini et al., 1993; Warner et al., 1993; Hori et al., 1994). Ainsi, selon le modèle actuel (Figure 3), [Trp(For)^{21}]ET-1 se lierait aux récepteurs ET_{B2} des muscles lisses de la trachée mais serait incapable de se lier aux récepteurs ET_{B1} situés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins. L'ajout du groupement formyle permettrait donc la discrimination entre les récepteurs ET_{B1} et ET_{B2}. Ceci expliquerait la présence d'une vasoconstriction en absence de vasodilatation transitoire. C'est pour préciser davantage cette hypothèse que les analogues ont été synthétisés puis leur activité biologique mesurée sur le parenchyme de cobaye.

11.2 Étude des dérivés de ET-1 synthétisés

11.2.1 Analogues linéaires

Sur le parenchyme de poumons de cobayes, [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET se comporte en agoniste partiel. Comme le montrent les études de modélisation moléculaire, cet analogue linéaire est très flexible. En effet, le simple retrait du groupement formyle modifie de façon importante l'arrangement tridimensionnel de la molécule qui se replie complètement sur elle-même (Figure 12A et B). L'analogue formylé expose davantage ses groupements fonctionnels, ce qui lui permettrait de mieux s'adapter aux conditions de liaison des récepteurs présents dans la préparation pharmacologique utilisée. Selon Nakamichi et al. (1992), ces récepteurs serait du type ET_B. Le dérivé [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET, très compact, ne possède aucune activité biologique (Figure 9). Ceci confirme la grande flexibilité de la portion C-terminale de la molécule comme le suggèrent les mesures par RMN effectuées avec ET-1 (Munro et al., 1991; Tamaoki et al., 1991; Mills et al., 1991). Ces résultats confirment également que la présence d'un petit groupement chimique comme le formyle (CHO) peut avoir une influence déterminante sur l'arrangement spatial d'un peptide.

La grande similarité observée entre l'orientation des chaînes latérales du segment C-terminal de l'analogue 17-21 linéaire formylé et celle de la même portion de ET-1 explique certainement l'activité biologique de ce dérivé peptidique. En fait, il est généralement accepté que la portion C-terminale 16 à 21 de ET-1 joue un rôle important dans l'activation des récepteurs ET_B (Doherty, 1992; Sakamoto et al., 1993b). Dans une étude récente de la structure cristalline de ET-1 humaine, Janes et al. (1994) suggèrent que toute la portion C-terminale de la molécule est en forme d'hélice, soit les résidus 9 à 21. De plus, dans ce cristal, les auteurs observent que la chaîne latérale de Asp^8 est éloignée de celle de Leu^{17}. Un arrangement similaire s'observe dans l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-

11)-Aca-(17-21)ET, ce qui pourrait expliquer en partie l'activité agoniste enregistrée. Toutefois, cette hypothèse demande de plus amples vérifications car les résultats des mesures de cristallographie de Janes et al. (1994) ne sont pas en accord avec ceux des études par RMN. Ces dernières rapportent plutôt une hélice s'étendant des résidus 9 à 15 (Krystek et al., 1991; Munro et al., 1991; Tamaoki et al., 1991). De façon intéressante, l'analogue 17-21 linéaire formylé agit comme un agoniste partiel. Comme ce peptide est un dérivé à structure réduite de ET-1, son activité partielle peut venir d'une chaîne latérale manquante ou d'un repliement inadéquat de la molécule causé par l'absence de pont disulfure. Aussi, l'incorporation de l'Aca ajoute une grande flexibilité à la molécule.

Comme montré par les résultats de la modélisation moléculaire (Figure 12A), la structure compacte de [Cys(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET et l'inaccessibilité de certaines chaînes latérales pourraient expliquer l'absence d'activité contractile jusqu'à 30 nM (Figure 9B). Particulièrement, les chaînes latérales de certains acides aminés considérées importantes pour la liaison aux récepteurs ET_B comme Glu^{10} et Trp^{21} (Saeki et al., 1992) sont cachées à l'intérieur de la molécule. De façon surprenante, l'ajout de His^{16}, comme dans [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET, cause une diminution importante de l'activité contractile suggérant que la chaîne latérale imidazole défavorise, dans les analogues linéaires, l'interaction adéquate entre la molécule et son récepteur. Ces résultats montrent que l'hydrophobicité du segment C-terminal de ET-1 pourrait être un paramètre important de l'activité biologique dans le parenchyme de cobaye. Le caractère hydrophobe additionnel obtenu par le retrait de His^{16} favoriserait l'interaction du peptide avec la poche hydrophobe auxiliaire à la liaison proposée par Cody et al. (1994) pour les récepteurs de ET-1. Ces auteurs concluent que la charge positive de His^{16} n'est pas un élément essentiel de la liaison avec le récepteur. En outre, Huggins, Pelton et Miller (1993) avancent que la grande stabilité du complexe ET-récepteur impliquerait le rapprochement de régions fortement hydrophobes.

L'analogue 18-21 linéaire formylé est un agoniste complet mais il s'avère 10 fois moins puissant que ET-1. Ainsi, le retrait de Leu^{17} provoque un effet important sur l'activité contractile enregistrée. Ce résidu et Phe^{14} sont considérés comme des éléments clés de l'activation des récepteurs ET_B (Erhardt, 1991). Phe^{14} et Leu^{17} sont importants mais non essentiels puisque [$Cys(Acm)^{3,11}$, $Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(18-21)ET possède, dans le parenchyme de poumons de cobayes, une activité intrinsèque semblable à celle de ET-1. Dans les dérivés 18-21 linéaires, le groupement formyle semble à nouveau jouer un rôle déterminant dans l'activité, probablement en changeant l'orientation du β-indole du Trp^{21} (Figure 13). Ceci cause une modification dans l'environnement du Trp^{21} qui est certainement responsable d'une partie de la différence d'activité observée entre les dérivés linéaires formylés 17-21 et 18-21. Effectivement, dans le premier analogue, Leu^{17} est près du Trp^{21} alors que, dans le second, c'est plutôt Ile^{19} (comme dans ET-1). Le repliement de la portion C-terminale de l'analogue 18-21 linéaire formylé vers Cys^{11} modifie le caractère aliphatique de l'environnement du β-indole en 21. Ceci compenserait la perte de Leu^{17} hydrophobe.

Le retrait de nouveaux acides aminés du segment C-terminal des analogues de ET-1 donne des peptides environ 100 fois moins puissants que la molécule mère (19-21) ou inactifs (20-21, 21). Comme suggéré par Saeki et al. (1992), Asp^{18} s'avère essentiel pour une activité contractile intéressante dans la préparation pharmacologique de récepteurs ET_B utilisée. Cependant, dans l'analogue [$Cys(Acm)^{3,11}$, $Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(19-21)ET, l'addition du groupement formyle sur l'indole du Trp^{21} augmente l'activité biologique. Nos résultats tendent à démontrer que c'est l'orientation des pharmacophores qui est cruciale pour l'activité contractile plutôt que la charge négative de Asp^{18}. Ces conclusions apportent donc une nouvelle précision sur le rôle de cet acide aminé important pour la liaison aux récepteurs ET_B.

11.2.2 Analogues cycliques

L'effet stabilisateur du groupement formyle n'est pas présent ou apparent dans les analogues cycliques, ce qui suggère que la rigidité produite par le pont disulfure masque ou abolit cet effet. De plus, contrairement à ce qui est observé pour les dérivés linéaires, la présence de His^{16} favorise l'activité contractile. En fait, ce résidu possédant une charge positive sur sa chaîne latérale apparaît essentiel à l'activité biologique des analogues de ET-1 cycliques sur le parenchyme de poumons de cobaye; son retrait entraîne une perte complète de l'activité. Les dérivés 16-21 cycliques s'avèrent aussi puissant que [$Cys(Acm)^{3,11}$, $Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(17-21)ET mais sont des agonistes complets. Les ponts disulfures conservent donc une importance significative, probablement en diminuant la mobilité de la molécule, favorisant ainsi l'orientation correcte des pharmacophores. À nouveau, les chaînes latérales de Leu^{17} et Ile^{19} se placent près de celle du Trp^{21} (Figure 14A et B). Cet important environnement hydrophobe pourrait jouer un rôle déterminant dans l'activité observée pour ces analogues. En conséquence, la structure du segment C-terminal des dérivés 16-21 cycliques formylés ou non est similaire à celle de ET-1, sauf en ce qui concerme l'orientation de l'indole du Trp^{21}. Celui-ci se replie vers la portion cyclique de la molécule. Aussi, la distance entre la chaîne latérale de Leu^{17} et le groupe de résidus chargés (Asp^{8}-Lys^{9}-Glu^{10}) diffère entre ET-1 et les composés 16-21 cycliques. L'analogue ET-1(1-20) est inactif dans l'utérus de rate ou le coeur de lapin alors, Olsen et al. (1993) affirment que l'ensemble du segment C-terminal 16-21 de ET-1 est essentiel à l'activité. Ceci correspond aux résultats obtenus pour les analogues cycliques. Au niveau des dérivés linéaires, seule la portion 19-21 est essentielle. L'absence de pont disulfure augmente certainement la flexibilité de la molécule, lui permettant de compenser la perte des acides aminés. Tel qu'avancé plus tôt, l'arrangement tridimensionnel des pharmacophores serait plus important que, par exemple, les charges de His^{16} ou de Asp^{18}.

En se basant sur l'activité biologique de [Dpr^{1}-Asp^{15}]ET-1 où le pont disulfure extérieur est remplacé par un lien amide, Spinella et al. (1993) ont proposé un mécanisme d'interaction entre ET-1 et ses récepteurs. Il explique l'action prolongée de ce peptide par la formation d'un lien disulfure entre ET-1 et ses récepteurs. Cette hypothèse, formulée après des études menées sur des reins de cobayes, un tissus contenant des récepteurs ET_B, suggère que Cys^{1} et Cys^{15} des ETs réagissent avec des Cys présentes sur les boucles extracellulaires des récepteurs. Ce modèle ne considère pas que le complexe formé entre ET-1 et son récepteur *via* des ponts disulfures est directement responsable de l'activation des récepteurs mais que la formation de ce lien représente plutôt une étape intermédiaire nécessaire à l'activation. En ce qui concerne les analogues synthétisés au cours de cette étude, Cys^{1} et Cys^{15} sont absents. De plus, nous obtenons des produits linéaires biologiquement actifs dans lesquels des groupements Acm protègent Cys^{3} et Cys^{11}, empêchant ainsi toute formation de ponts disulfures. Un mécanisme nécessitant la formation de ce type de lien ne peut donc être proposé pour expliquer l'activité dans la préparation pharmacologique de récepteurs ET_B que nous avons utilisée. Néanmoins, le mécanisme proposé par Spinella et al. (1993) pourrait être approprié au niveau des récepteurs ET_A pour lesquels les ponts disulfures de ET-1 sont des éléments importants pour la liaison et l'activation (Panek et al., 1992). Les éléments hydrophobes semblent plus importants pour la liaison aux récepteurs ET_B que la formation de ponts disulfures ET-récepteur. D'ailleurs, Huggins, Pelton et Miller (1993) de même que Cody et al (1994) avancent qu'une interaction aliphatique entre les ETs et leurs récepteurs serait importante pour le déclenchement de l'activité biologique.

La plupart des différences entre ET-1, ET-2 et ET-3 se situent au niveau des résidus 2 à 7 (Figure 1). Ainsi, selon l'hypothèse formulée par Coles, Munro et Craik (1994), suite à des études par ^{1}H RMN sur [Aba^{1,15}]-ET-1 (Aba : acide α-aminobutyrique), les variations de l'acide aminé en position 2 (ET-1 et ET-2 : Ser;

ET-3 : Thr), la conformation des résidus 1 à 3 et l'orientation de la charge N-terminale seraient responsables de la capacité de discrimination entre les récepteurs ET_A et ET_B. Les résultats obtenus avec les analogues à structure réduite démontrent clairement que les résidus 1 et 2 ne sont pas nécessaires à l'activation des récepteurs ET_B. De façon similaire, Cody et al. (1994) ont étudié le rôle du segment 3-11 de ET-1 dans la liaison aux récepteurs ET_A et ET_B (dans les muscles lisses vasculaires de l'artère rénale de lapin et dans les membranes de cervelet de rat respectivement). Ainsi, ils ont testé l'analogue (3-11)-(16-21)ET qui montre un $IC_{50} > 10^{-5}$ M pour les récepteurs ET_B. Ils concluent donc que les segments 1 à 3 et 11 à 15 sont nettement plus importants pour la liaison que la portion 3 à 11. Par comparaison avec nos composés 16-21 cycliques, nous observons que l'espaceur aliphatique flexible (Aca) introduit dans la molécule joue un rôle déterminant dans l'activité puisque (3-11)-Aca-(16-21)ET et [Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET présentent un EC_{50} de $3{,}6 \times 10^{-9}$ M. Ceci suggère fortement que le noyau cyclique formé par les résidus 3 à 11 est une structure importante pour les récepteurs ET_B. De plus, il semble que les résidus 12 à 15 jouent un rôle que l'espaceur aliphatique imiterait partiellement en occupant l'espace approprié entre les pharmacophores N- et C-terminaux. L'analogue (3-11)-Aca-(16-21)ET est seulement 5 fois moins puissant que ET-1 dans le parenchyme de cobaye. En accord avec les observations de Tam et al. (1994), la substitution de Tyr^{13} ou de Phe^{14} par Ala cause une diminution marquée de l'affinité de liaison. Suivant l'hypothèse de Cody et al. (1994), laquelle affirme que le segment Val^{12}-Tyr^{13}-Phe^{14} interagit avec la poche hydrophobe auxiliaire retrouvée dans les récepteurs ET_A et ET_B, l'activité des analogues à structure réduite pourrait probablement être augmentée en utilisant un espaceur contenant des chaînes latérales hydrophobes supplémentaires.

Un modèle à 2 sous-domaines a été proposé afin d'expliquer la sélectivité des récepteurs ET_A et ET_B (Sakamoto et al., 1993a; 1993b). Selon cette hypothèse, chaque récepteur présenterait un site de liaison pour la portion N-terminale des

ETs et un pour le segment C-terminal. En accord avec des études précédentes (Doherty, 1992; Saeki et al., 1992) sur les éléments nécessaires à la liaison aux récepteurs ET_B, seul le second site serait essentiel pour l'activation. D'après les résultats obtenus, les acides aminés 19-21 sont cruciaux alors que Asp^{18} est important, au niveau des composés linéaires. En contraste, c'est l'ensemble du segment C-terminal 16-21 qui est requis pour les analogues cycliques. Conséquemment, l'arrangement tridimensionnel des chaînes latérales de ces résidus est déterminant pour l'activité biologique et le pont disulfure exerce un rôle décisif dans la conformation du fragment 16 à 21. L'activité observée en absence du segment N-terminal dans nos analogues supporte donc l'hypothèse d'un modèle à sous-domaines multiples pour les récepteurs des ETs. La liaison à 1 seul d'entre eux serait suffisante pour induire une contraction partielle dans le parenchyme de cobayes. Néanmoins, le modèle de Sakamoto et al. (1993a; 1993b) n'explique pas la sélectivité différentielle observée entre les récepteurs ET_{B1} et ET_{B2} qui sont tous deux capables de lier les 3 endothélines. Il demande donc à être perfectionné mais des agonistes ou des antagonistes hautement sélectifs pour ET_{B1} ou ET_{B2} ne sont pas encore disponibles. L'essai des analogues sur des tissus vasculaires possédant des récepteurs ET_{B1} et induisant une vasodilatation, à la suite de l'étude effectuée ici sur le parenchyme contenant théoriquement des récepteurs ET_{B2}, devrait faire progresser les connaissances en ce domaine. Une avenue de recherches futures pourrait être l'ajout en position 2 des analogues, d'une serine ou d'une thréonine afin de mieux comprendre le rôle de ce résidu. En effet, ET-1, ET-2, SRTXa et SRTXb possèdent une Ser^2 et se lient aux récepteurs ET_A alors que ET-1, SRTXc et SRTXd, qui sont sélectifs pour les récepteurs ET_B, présentent une Thr en position 2. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'acide aminé en position 2 sur la liaison aux récepteurs ET_A et ET_B des analogues à structure réduite déjà étudiés ici. De plus, une étude publiée récemment par Lamthanh et al. (1994) montre que $[Thr^2]$SRTXb induit seulement 35% de la vasoconstriction de SRTXb dans l'aorte de lapin, une préparation pharmacologique de récepteurs ET_A.

12. Généralisations des études de structure-activité

Les différences importantes dans la conformation de la portion C-terminale des analogues 17-21 linéaires formylés ou non (Figure 12A et B) supportent les hypothèses considérant que la portion C-terminale de ET-1 est très flexible (Munro et al. 1991; Tamaoki et al., 1991). Ainsi, la portion 16-21 de ET-1 serait capable de s'orienter différement selon les conditions du milieu même si le repliement vers la portion bicyclique donne la configuration demandant le minimum d'énergie (Figure 11A) (Bortmann et al., 1991; Saudek, Hoflack et Pelton, 1989). [Trp(For)^{21}]ET-1 apporte une preuve supplémentaire de cette flexibilité puisque l'orientation de sa portion C-terminale est modifiée par un petit groupement chimique comme CHO. Les portions C-terminales des composés [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(17-21)ET, [Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET et (3-11)-Aca-(16-21)ET possèdent une conformation très semblable à celle de ET-1. Ce sont également les analogues les plus actifs de cette série. Bien sûr, l'importance des résidus 16-21 conservés dans toutes les ETs est déjà connue (Erhardt, 1991; Doherty, 1992; Olsen et al., 1993). Cependant, le rôle de chacun des acides aminés est moins bien défini. L'activité contractile obtenue pour l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(19-21)ET montre que, pour la liaison aux récepteurs ET_B du parenchyme de poumons de cobayes, c'est l'orientation des chaînes latérales des pharmacophores qui joue un rôle décisif. En effet, les charges des chaînes latérales de His^{16} et de Asp^{18} peuvent être retirées sans perte complète d'activité. Celles-ci, présentes dans les trois ETs et les quatre SRTXs (Figure 1), n'interagiraient donc pas directement avec des charges contraires présentes à la surface des récepteurs. En ce qui concerne le Trp^{21}, il peut être remplacé par d'autres résidus aromatiques comme Phe ou Tyr sans perte complète d'activité alors que la substitution par D-Trp donne un peptide inactif (Erhardt, 1991). Donc, c'est l'orientation dans l'espace de la chaîne latérale aromatique qui s'avère déterminante pour l'activité biologique.

Des interactions hydrophobes semblent plus à même d'expliquer la liaison

prolongée des ETs avec leurs récepteurs. Ainsi, l'analogue (3-11)-(16-21)ET synthétisé par Cody et al. (1994) présente une faible capacité de liaison aux récepteurs ET_B du cervelet de rat ($IC_{50}>10^{-5}$ M). L'ajout de l'Aca produit un analogue possédant une activité biologique ($EC_{50}=3,6x10^{-9}$ M) (Tableau VII) très satisfaisante. Cet effet, associé entre autres à la présence d'une chaîne hydrophobe supplémentaire, supporte l'hypothèse d'une interaction aliphatique impliquant une poche hydrophobe auxiliaire à la liaison (Cody et al., 1994). Dans le même ordre d'idée, tous les analogues biologiquement actifs, synthétisés au cours de la présente étude et qui ont été analysés par modélisation moléculaire, possèdent une concentration de chaînes latérales hydrophobes autour du β-indole du Trp^{21}. Celle-ci est absente des dérivés peptidiques inactifs (Figures 12 à 14). Ce rapprochement de résidus hydrophobes permet peut-être de compenser la perte des chaînes latérales de Val^{12}-Tyr^{13}-Phe^{14}. Dans ce cas, l'hypothèse d'une interaction hydrophobe nécessaire à la liaison se trouve renforcée.

Conclusion

ET-1, le plus puissant vasoconstricteur connu chez l'humain, est un peptide de 21 acides aminés comportant deux ponts disulfures. Des études pharmacologiques impliquent ET-1 dans diverses pathologies humaines (hypertension, asthme etc.). De nombreuses équipes cherchent donc à comprendre son mécanisme d'action en vue de développer des outils capables de contrôler les actions pathophysiologiques des ETs.

Afin de préciser le mode d'action moléculaire des ETs, une série de molécules hybrides ont été synthétisées. Elles contiennent la portion 3-11 de ET-1 liée *via* l'Aca, un espaceur flexible, à des segments C-terminaux de longueur variable (16-21, 17-21, ..., 21). Les dérivés peptidiques ont été étudiés sous forme linéaire ou cyclique, en présence ou en absence d'un groupement formyle sur l'indole du Trp^{21}. En effet, l'ajout de ce groupement assurerait la discrimination entre les récepteurs ET_{B1} et ET_{B2}. L'introduction de l'Aca a permis d'étudier le rôle des résidus hydrophobes 12 à 14 alors que le retrait de Cys^{1} et de Cys^{15} permettait de se pencher sur le rôle des ponts disulfures. Enfin, le raccourcissement de la portion C-terminale visait la précision du rôle de chacun des acides aminés présents.

Au niveau des analogues linéaires formylés, la structure obtenue s'avère très flexible et capable de s'adapter aux besoins des récepteurs. Ceci a permis l'obtention d'une activité biologique sur le parenchyme de poumons de cobayes, un tissu qui contiendrait des récepteurs ET_{B2}. Dans ce cas, les résidus 18-21 sont nécessaires à l'obtention d'une activité contractile intéressante. Le groupement formyle exerce un rôle stabilisateur puisque son retrait élimine presque toute activité biologique. L'ensemble du segment C-terminal se révèle essentiel dans les analogues cycliques et la présence du pont disulfure masque ou abolit l'effet du groupement formyle. His^{16} permettrait l'orientation correcte du segment C-terminal

par rapport à la portion en boucle. Les résultats montrent que c'est l'orientation tridimensionnelle des pharmacophores qui serait déterminante pour l'activation des récepteurs ET_B. Les charges de His^{16} et de Asp^{18} peuvent être retirées sans perte complète d'activité dans les analogues linéaires. Elles n'interagiraient donc pas directement avec les récepteurs. Enfin, le pont Cys^3-Cys^{11} stabilise la structure, favorisant ainsi la liaison aux récepteurs ET_B alors que le segment Val^{12}-Tyr^{13}-Phe^{14}, ou un espaceur aliphatique correspondant, sont nécessaires à l'activité contractile. Les études de structure-activité réalisées montrent que l'activité biologique dépendrait d'une interaction hydrophobe entre ET-1 et ses récepteurs plutôt que de la formation de ponts disulfures ou de liaisons ioniques entre le peptide et ses récepteurs.

Ces précisions sur le mode d'interaction de ET-1 avec les récepteurs ET_{B2}, combinées à de futures études avec les mêmes analogues à structure réduite de ET-1 sur une préparation pharmacologique de récepteurs ET_A, permettront de mieux définir le mécanisme d'action de ET-1. Ces connaissances faciliteront le développement d'agonistes et d'antagonistes hautement sélectifs d'un sous-type de récepteurs ET_B ou d'un effet biologique précis.

Appendice A

Abréviations à 3 lettres des acides aminés

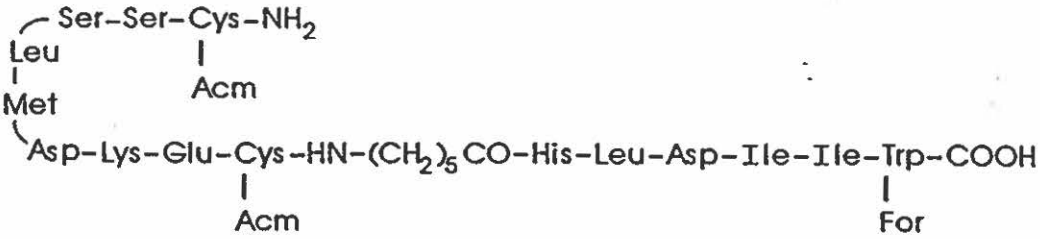
Nom	Abréviation
acide aspartique	Asp
acide glutamique	Glu
alanine	Ala
arginine	Arg
asparagine	Asn
cystéine	Cys
glutamine	Gln
glycine	Gly
histidine	His
isoleucine	Ile
leucine	Leu
lysine	Lys
méthionine	Met
phénylalanine	Phe
proline	Pro
sérine	Ser
thréonine	Thr
tryptophane	Trp
tyrosine	Tyr
valine	Val

Appendice B

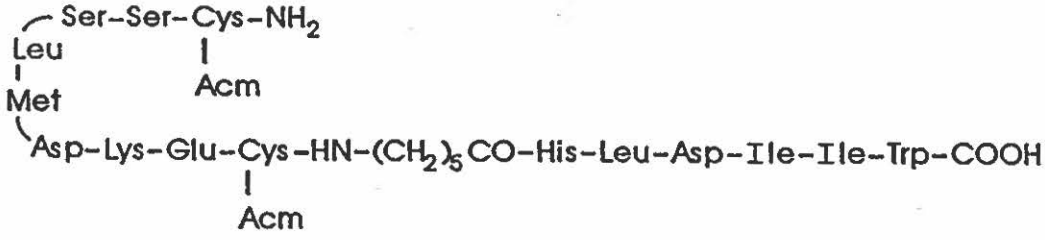
Exemples de séquences des analogues de ET-1 synthétisés

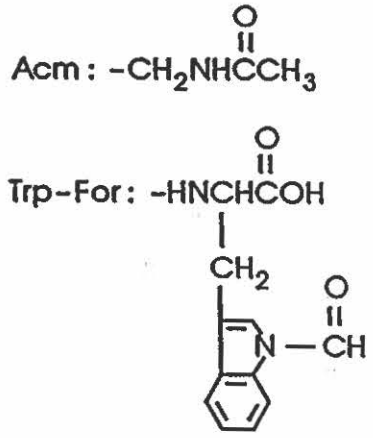
Dérivés linéaires

[CYS(Acm)^{3,11},Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET]



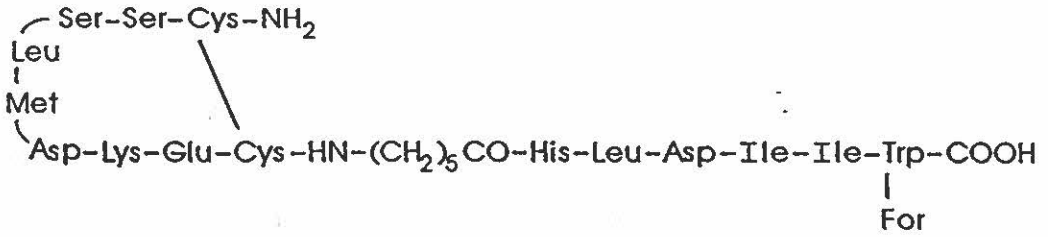
[CYS(Acm)^{3,11}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET]



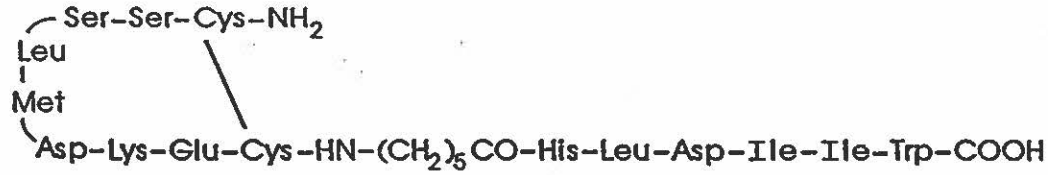


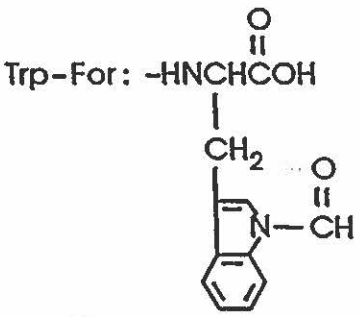
Dérivés cycliques

[Trp(For)^{21}]-(3-11)-Aca-(16-21)ET]



(3-11)-Aca-(16-21)ET]





Liste des références

AGRICOLA, K. M., G. Rubanyi, R. J. Paul et R. F. Highsmith. 1984. «Characterization of a Potent Coronary Artery Vasoconstrictor Produced by Endothelial Cells in Culture». Federation Proceedings, vol. 43, p. 899.

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.

AUMELAS, A., L. Chiche, E. Mahe, D. Le-Nguyen, P. Sizun, P. Berthault et B. Perly. 1991. «Determination of the Structure of [Nle^7]-Endothelin by ^{1}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.

BATTISTINI, B., M. Germain, A. Fournier et P. Sirois. 1993. «Structure-Activity Relationships of ET-1 and Selected Analogues in the Isolated Guinea Pig Trachea: Evidence for the Existence of Different ET_B Receptor Subtypes». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22, p. S219-S224.

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.

BODANSZKY, M. et J. Martinez. 1981. «Side Reactions in Peptide Synthesis». Synthesis, p. 333-356.

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

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

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

COLES, M., S. L. A. Munro et D. J. Craik. 1994. «The Solution Structure of a Monocyclic Analogue of Endothelin [1,15 Aba]-ET-1, Determined by ^{1}H NMR Spectroscopy». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 37, p. 656-664.

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., P. S. Lidbury, T. D. Warner et J. R. Vane. 1990. «Intravascular Big Endothelin Increases Circulating Levels of Endothelin-1 and Prostanoids in the Rabbit». Biochemical Pharmacology, vol. 39, p. R21-R22.

D'ORLÉANS-JUSTE, P., S. Télémaque et A. Claing. 1991. «Different Pharmacological Profiles of Big-Endothelin-3 and Big-Endothelin-1 *in vivo* and *in vitro*». British Journal of Pharmacology, vol. 104, p. 440-444.

EMORI, T., Y. Hirata et F. Marumo. 1990. «Specific Receptors for Endothelin-3 in Cultured Bovine Endothelial Cells and its Cellular Mechanism of Action». FEBS Letters, vol. 263, p. 261-264.

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

FELIX, A. M., C.-T. Wang, E. Heimer, A. Fournier, D. R. Bolin, M. Ahmad, T. Lambros, T. Mowles et L. Miller. 1988. «Synthesis and Biological Activity of Novel Linear and Cyclic GRF Analogs». Proceedings of the 10th American Peptide Symposium, p. 465-467.

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

FILEP, J. G., M. G. Sirois, A. Rousseau, A. Fournier et P. Sirois. 1991. «Effects of Endothelin-1 on Vascular Permeability in the Conscious Rat: Interactions with Platelet-Activating Factor». British Journal of Pharmacology, vol. 104, p. 797-804.

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

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

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.

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

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

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

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

GORDON, M. J., X. Huang, S. L. Pentoney Jr et R.N. Zare. 1988. «Capillary Electrophoresis». Science, vol. 242, p. 224-228.

GUI, G., D. Xu, N. Emoto et M. Yanagisawa. 1993. «Intracellular Localization of Membrane-Bound Endothelin-Converting Enzyme from Rat Lung». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22, p. S53-S56.

HAY, D. W. P., M. A. Luttmann, W. C. Hubbard et B. J. Undem. 1993. «Endothelin Receptor Subtypes in Human and Guinea-Pig Pulmonary Tissues». British Journal of Pharmacology, vol. 110, p. 1175-1183.

HICKEY, K. A., G. Rubanyi, R. J. Paul et R. F. Highsmith. 1985. «Characterization of a Coronary Vasoconstrictor Produced by Cultured Endothelial Cells». American Journal of Physiology, vol. 17, p. C550-C556.

HILEY, C. R., C. R. Jones, J. T. Pelton et R. C. Miller. 1990. «Binding of [^{125}I]-Endothelin-1 to Rat Cerebellar Homogenates and its Interactions with Some Analogues». British Journal of Pharmacology, vol. 101, p. 319-324.

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

HORI, M., S. A. Sudjarwo, K. Oda, Y. Urade et H. Karaki. 1994. «Two Types of Endothelin B Receptors Mediating Relaxation in the Guinea Pig Ileum». Life Sciences, vol. 54, p. 645-652.

HUGGINS, J. P., J. T. Pelton et R. C. Miller. 1993. «The Structure and Specificity of Endothelin Receptors: their Importance in Physiology and Medicine». Pharmacology and Therapeutics, vol. 59, p. 55-123.

IHARA, M., T. Fukuroda, T. Saeki, M. Nishikibe, K. Kojiri, H. Suda et M. Yano. 1991. «An Endothelin Receptor (ET_A) Antagonist Isolated from *Streptomyces misakiensis*». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p. 132-137.

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

ISHIKAWA, K., T. Fukami, T. Nagase, K. Fujita, T. Hayama, K. Niiyama, T. Mase, M. Ihara et M. Yano. 1992. «Cyclic Pentapeptide Endothelin Antagonists with High ET_A Selectivity. Potency- and Solubility-Enhancing Modifications». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 2139-2142.

JANES, R. W., D. H. Peapus et B. A. Wallace. 1994. «The Crystal Structure of Human Endothelin». Nature Structural Biology, vol. 1, p. 311-319.

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

KARNE, S., C. K. Jayawickreme et M. R. Lerner. 1993. «Cloning and Characterization of an Endothelin-3 Specific Receptor (ET_C Receptor) from *Xenopus laevis* Dermal Melanophores». The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 19 126-19 133.

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

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.

KRYSTEK Jr., S. R., D. A. Bassolino, J. Novotny, C. Chen, T. M. Marschner et N. H. Andersen. 1991. «Conformation of Endothelin in Aqueous Ethylene Glycol Determined by ^{1}H-NMR and Molecular Dynamics Simulations». FEBS Letters, vol. 281, p. 212-218.

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. 13 414-13 420.

LAMTHANH, H., A. Bdolah, C. Creminon, J. Grassi, A. Menez, Z. Wollberg et E. Kochva. 1994. «Biological Activities of [Thr^{2}]Sarafotoxin-b, a Synthetic Analogue of Sarafotoxin-b». Toxicon, vol. 32, p. 1105-1114.

LANDAN, G., A. Bdolah, Z. Wollberg, E. Kochva et D. Graur. 1991. «The Evolutionary History of the Sarafotoxin/Endothelin/Endothelin-Like Superfamily». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17, p. S517-S519.

LE-NGUYEN, D., A. Heitz et B. Castro. 1987. «Renin Substrates. Part 2. Rapid Solid Phase Synthesis of the Ratine Sequence Tetradecapeptide Using BOP Reagent». Journal of the Chemical Society Perkin Transaction I, p. 1915-1919.

LE-NGUYEN, D., R. Seyer, A. Heitz et B. Castro. 1985. «Renin Substrates. Part 1. Liquid-Phase Synthesis of the Equine Sequence with Benzotriazolyloxytris (dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphate (BOP)». Journal of the Chemical Society Perkin Transaction I, p. 1025-1031.

LIPPTON, H. L., T. A. Hauth, G. A. Cohen et A. L. Hyman. 1993. «Functional Evidence for Different Endothelin Receptors in the Lung». Journal of Applied Physiology, vol. 75, p. 38-48.

LUNDT, B. F., N. L. Johansen, A. Vølund et J. Markussen. 1978. «Removal of *t*-Butyl and *t*-Butoxycarbonyl Protecting Groups with Trifluoroacetic acid». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 12, p. 258-268.

LÜSCHER, T. F. 1993. «Do We Need Endothelin Antagonists?». Cardiovascular Research, vol. 27, p. 2089-2093.

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

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

McMAHON, E. G., M. A. Palomo, W. M. Moore, J. F. McDonald et M. K. Stern. 1991. «Phosphoramidon Blocks the Pressor Activity of Porcine Big Endothelin-1-(1-39) *in vivo* and Conversion of Big Endothelin-1-(1-39) to Endothelin-1-(1-21) *in vitro*». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, p. 703-707.

MERRIFIELD, R. B. 1963. «Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide». Journal of the American Chemical Society, vol. 85, p. 2149-2154.

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

MUNRO, S., D. Craik, C. McConville, J. Hall, M. Searle, W. Bicknell, D. Scanlon et C. Chandler. 1991. «Solution Conformation of Endothelin, a Potent Vaso-Constricting Bicyclic Peptide. A Combined Use of ^{1}H NMR Spectroscopy and Distance Geometry Calculations». FEBS Letters, vol. 278, p. 9-13.

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

NAKAMICHI, K., M. Ihara, M. Kobayashi, T. Saeki, K. Ishikawa et M. Yano. 1992. «Different Distribution of Endothelin Receptor Subtypes in Pulmonary Tissues Revealed by the Novel Selective Ligands BQ-123 and [$Ala^{1,3,11,15}$]ET-1». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 182, p. 144-150.

NAMBI, P., M. Pullen et G. Feuerstein. 1990. «Identification of Endothelin Receptors in Various Regions of Rat Brain». Neuropeptides, vol. 16, p. 195-199.

NAMBI, P., M. Pullen et C. Kumar. 1994. «Identification of a Novel Endothelin Receptor in *Xenopus Laevis* Liver». Neuropeptides, vol. 26, p. 181-185.

NOVOTNY, M. V., K. A. Cobb et J. Liu. 1990. «Recent Advances in Capillary Electrophoresis of Proteins, Peptides and Amino Acids». Electrophoresis, vol. 11, p. 735-749.

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

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

OKAMURA, T., T. Matsumoto, F. Ikemoto et N. Toda. 1992. «Mechanisms of the Biphasic Responses to Endothelin-3 in Dog Coronary Arteries». British Journal of Pharmacology, vol. 107, p. 1037-1041.

OLSEN, U. B., J. U. Weis, P. Suzdak, B. F. Lundt, K. Madsen, H. Thogersen et N. L. Johansen. 1993. «Important Role of C-terminal Peptide Bonds for Endothelin Receptor Binding and Activity». Pharmacology & Toxicology, vol. 73, p. 60-62.

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

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.

ROBERTS, D. C. et F. Vellaccio. 1983. «Unusual Amino Acids in Peptide Synthesis». Dans E. Gross et J. Meienhofer, (éd.). The peptides Analysis, Synthesis, Biology vol. 5 Special Methods in Peptide Synthesis, Part B, New York: Academic Press, p. 341-449.

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

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

SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyo-oka, M. Yano et T. Masaki. 1993. «The Ligand-Receptor Interactions of the Endothelin Systems Are Mediated by Distinct "Message" and "Address" Domains». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22, p. S113-S116.

SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sawamura, T. Enoki, T. Ohtani, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyo-oka et T. Masaki. 1993. «Distinct Subdomains of Human Endothelin Receptors Determine their Selectivity to Endothelin$_A$-Selective Antagonist and Endothelin$_B$-Selective Agonists». The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 8547-8553.

SAKURAI, T., M. Yanagisawa et T. Masaki. 1992. «Molecular Characterization of Endothelin Receptors». Trends in Pharmacological Sciences, vol. 13, p. 103-108.

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.

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

SAWAMURA, T., Y. Kasuya, Y. Matsushita, N. Suzuki, O. Shinmi, N. Kishi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto, T. Masaki et S. Kimura. 1991. «Phosphoramidon Inhibits the Intracellular Conversion of Big Endothelin-1 to Endothelin-1 in Cultured Endothelial Cells». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 174, p. 779-784.

SCHILLER, P. W., T. M.-D. Nguyen et J. Miller. 1985. «Synthesis of Side-Chain to Side-Chain Cyclized Peptide Analogs on Solid Supports». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 25, p. 171-177.

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. 18 275-18 278.

SIROIS, M. G., J. G. Filep, A. Rousseau, A. Fournier, G. E. Plante et P. Sirois. 1992. «Endothelin-1 Enhances Vascular Permeability in Conscious Rats: Role of Thromboxane A_2». European Journal of Pharmacology, vol. 214, p. 119-125.

SOKOLOVSKY, M., I. Ambar et R. Galron. 1992. «A Novel Subtype of Endothelin Receptors». The Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 20 551-20 554.

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, 176 p.

TAKAI, M., I. Umemura, K. Yamasaki, T. Watakabe, Y. Fujitani, K. Oda, Y. Urade, T. Inui, T. Yamamura et T. Okada. 1992. «A Potent and Specific Agonist, Suc-[Glu^{9}, Ala^{11,15}]-Endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B Receptor». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 184, p. 953-959.

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

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

TAMAOKI, H., Y. Kyogoku, K. Nakajima, S. Sakakibara, M. Hayashi et Y. Kobayashi. 1992. «Conformational Study of Endothelins and Sarafotoxins with the Cystine-Stabilized Helical Motif by Means of CD Spectra». Biopolymers, vol. 32, p. 353-357.

TÉLÉMAQUE, S., J.-P. Gratton, A. Claing et P. D'Orléans-Juste. 1993. «Pharmacologic Evidence for the Specificity of the Phosphoramidon-Sensitive Endothelin-Converting Enzyme for Big Endothelin-1». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22, p. S85-S89.

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

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

WARNER, T. D. 1995. «Importance of Endothelial Vasorelaxant and Vasoconstrictor Mediators for Vascular Physiology». International Angiology, In Press.

WARNER, T. D., G. H. Allcock, E. J. Mickley, R. Corder et J. R. Vane. 1993. «Comparative Studies with the Endothelin Receptor Antagonists BQ-123 and PD 142893 Indicate at least Three Endothelin Receptors». Journal of Cardiovascular

Pharmacology, vol. 22, p. S117-S120.

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

YANAGISAWA, M., A. Inoue, T. Ishikawa, Y. Kasuya, S. Kimura, S.-I. Kumagaye, K. Nakajima, T. X. Watanabe, S. Sakakibara, K. Goto et T. Masaki. 1988. «Primary Structure, Synthesis, and Biological Activity of Rat Endothelin, an Endothelium-Derived Vasoconstrictor Peptide». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 85, p. 6964-6967.

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.