

**UNIVERSITE DU QUEBEC**

**MEMOIRE**

**PRESENTE A**

**L'INRS-SANTE**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE**

**DE LA MAITRISE EN PHARMACOLOGIE**

**PAR**

**MICHEL GERMAIN**

**SYNTHESE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE (SPPS)**

**DE L'ENDOTHELIN-1,**

**UN PUISSANT VASOCONSTRICTEUR**

**FEVRIER 1992**

## REMERCIEMENTS

Je ne puis déposer ce mémoire sans exprimer mes remerciements les plus sincères. Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche, le Dr. Alain Fournier, qui a supervisé l'évolution de ce travail. Il montra un vif intérêt et les encouragements dispensés furent motivants.

Je désire remercier tous les membres du groupe de recherche du laboratoire des peptides de l'INRS-SANTÉ pour leur collaboration et souligne particulièrement l'aide technique de madame Carine Losito.

De plus, je remercie l'organisme FCAR pour m'avoir octroyé cette bourse d'études de second cycle tant appréciée et essentielle à la réalisation d'un tel projet.

Enfin, je dédie ce travail à mon épouse Sylvie, qui m'a tant appuyé tout au long de mes études.

## RESUME

L'endothéline-1 (ET-1), une des plus puissantes substances vasoconstrictrices connues, a été récemment isolée à partir de cellules endothéliales d'aorte. ET-1 est un peptide de 21 acides aminés caractérisé par la présence de deux ponts disulfures intramoléculaires. Dans le cadre d'une étude de la relation structure-activité de ce peptide, nous avons évalué différentes approches de synthèse et finalement mis au point une procédure unique, en utilisant la méthode en phase solide. Ainsi, nous avons assemblé sur une résine de polystyrène-divinylbenzène porteuse d'une fonction chlorométhylée, la séquence entière en utilisant une stratégie faisant appel au mode de protection labile en milieu acide. Le choix des groupes protecteurs des chaînes latérales a été fait en accord avec la stratégie utilisée afin d'assurer une protection complète des fonctions latérales tout au long de la synthèse. Les deux paires de résidus cystéines (positions 1-15 et 3-11) ont été respectivement protégées par les groupes acétamidométhyle et méthylbenzyle dont les niveaux de stabilité chimique permettent des déprotections sélectives. Les deux ponts disulfures ont été formés de façon régiosélective au moyen de techniques d'oxydation douces. Finalement, l'élimination de la protection formyle du tryptophane C-terminal a été réalisée par traitement à la pipéridine, un agent nucléophile. Après purification par PI-CLHP, la caractérisation du produit synthétique final a confirmé que cette préparation est identique à la substance naturelle.

## TABLE DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENTS .....	i
RESUME .....	ii
TABLE DES MATIERES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	v
LISTE DES FIGURES .....	vi
INTRODUCTION .....	1

### PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE 1. Profil pharmacologique de l'endothéline-1 .....	4
1.1. Site et mécanisme de biosynthèse .....	4
1.2. L' endothéline: une famille de peptides .....	7
1.3. Effets pharmacologiques et localisation des récepteurs .....	9
1.4. Relations de structure-activité .....	11
1.5. Mécanisme(s) d'action cellulaire .....	12
CHAPITRE 2. Synthèse peptidique en phase solide (SPPS) .....	18
2.1. Introduction .....	18
2.2. Principe .....	19
2.3. Stratégie .....	21
2.3.1. Choix du support polymérique .....	21
2.3.2. Groupements protecteurs .....	22
2.3.3. Formation du lien peptidique .....	26

2.3.4. Clivage, purification et caractérisation.....	27
--	----

## PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3. Synthèse de l'endothéline-1.....	29
--	----

3.1. Stratégie de synthèse compatible avec la formation non-régiospécifique des ponts disulfures.....	29
3.1.1. Introduction.....	29
3.1.2. Méthodologie.....	31
3.1.3. Résultats et discussion.....	34

3.2. Stratégie de synthèse compatible avec la formation régiospécifique des ponts disulfures.....	40
3.2.1. Introduction.....	40
3.2.2. Méthodologie.....	41
3.2.3. Résultats et discussion.....	48

CONCLUSION.....	69
-----------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	70
--------------------	----

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I. Activités biologiques non-vasculaires de ET-1.....	10
II. Principe de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS).....	20
III. Principaux groupements protecteurs Boc-compatibles utilisées en SPPS.....	24
IV. Etapes d'un cycle de synthèse avec le réactif BOP.....	34
V. Schéma de synthèse de ET-1.....	67

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. Mécanisme de biosynthèse de l'endothéline.....	6
2. Structure primaire des membres de la famille des endothélines.....	8
3. Mécanisme(s) d'action(s) de l'endothéline-1.....	17
4. CLHP analytique de ET-1 post-clivage.....	36
5. CLHP analytique de ET-1 linéaire post- purification (A), (B) avant et (C), (D) après oxydation à l'air libre.....	37
6. CLHP analytique de ET-1 post-clivage après traitement au $Tl(CF_3COO)_3$ .....	39
7. CLHP analytique de ET-1 brut post-clivage.....	48
8. CLHP analytique de ET-1 linéaire (A) avant, (B) après oxydation à l'air libre et (C) après oxydation au DMSO.....	50
9. CLHP analytique de ET-1 linéaire (A) avant et (B) après oxydation au $K_3Fe(CN)_6$ .....	51
10. CLHP analytique de $[Cys(Acm)^{1,15}]$ ET-1 (A) avant, après (B) cyclisation au $Tl(CF_3COO)_3$ , (C) traitement à l'AgOTf/oxydation à l'air libre et (D) oxydation à l' $I_2/CH_3OH$ 25 %.....	53
11. CLHP analytique de $[Cys(Acm)^{1,15}]$ ET-1 (A) avant, (B) après 6 h et (C) 24 h de traitement à l' $I_2/AcOH$ 80 %.....	54
12. CLHP analytique de (A) ET-1 commerciale, (B) ET-1 synthétique et (C) co-injection de (A) et (B).....	55
13. CLHP analytique de ET-1 post-clivage.....	58
14. CLHP analytique de (A) ET-1 linéaire (B) $[[Cys(Acm)^{1,15}, Trp(For)^{21}]$ ET-1 et (C) $[Trp(For)^{21}]$ ET-1...	59

15. Spectre de masse (FAB-MS) de [Trp(For) <sup>21</sup> ] ET-1.....	60
16. CLHP analytique de (A) ET-1 commerciale, (B) ET-1 post-pipéridine, (C) co-injection de (A) et (B) et (D) co-injection de ET-1 pré et post-pipéridine.....	62
17. CLHP analytique de ET-1 commerciale co-injectée avec (A) ET-1 post-NaOH et (B) ET-1 post-HCl.....	63
18. CLHP analytique et électrophorèse capillaire (EC) de ET-1.....	64
19. Spectre de masse (FAB-MS) de ET-1.....	65
20. Effet biphasique produit par ET-1 sur la pression artérielle du rat.....	66
21. Réponse contractile de la trachée de cobaye à des concentrations cumulatives de ET-1.....	66

## INTRODUCTION

L'essor connu par la biochimie au cours des deux dernières décennies, dû au développement de méthodes analytiques et synthétiques plus raffinées, a largement contribué à la découverte d'un nombre impressionnant de nouvelles structures peptidiques.

Parmi ces peptides, certains sont actuellement utilisés dans le domaine médical et agroalimentaire. Par exemple, la somatostatine, la somatotropine, l'oxytocine, l'hormone parathyroïdienne ou la calcitonine sont employés en thérapie de remplacement chez l'humain. Certains inhibiteurs d'enzymes comme le captotril, l'énalapril et le lisinopril représentent le traitement de choix pour des milliers d'hypertendus. Le peptide le plus répandu est sans doute l'aspartame (NUTRASUC<sup>md</sup>), qui est utilisé comme substitut du sucre dans un grand nombre de boissons gazeuses et autres types d'aliments.

En plus de ces peptides qui ont atteint le statut de la commercialisation, des dizaines d'autres, dont on connaît le potentiel, sont l'objet d'intenses recherches, en vue d'applications futures. Parmi ceux-ci, on retrouve l'endothéline-1 (ET-1) qui a été isolée et séquencée en 1988, par Yanagisawa *et al.* (1).

Depuis sa découverte, ce peptide de 21 acides aminés suscite un vif intérêt, puisqu'il est une substance vasoconstrictrice naturelle plus puissante que l'angiotensine II, la vasopressine ou le neuropeptide Y (2).

Ceci a été prouvé à partir d'essais biologiques réalisés chez différents mammifères (rat, lapin, chien et humain). En effet, il a été démontré que l'injection de ET-1 ( $10^{-9}$  mole/kg) chez le rat anesthésié provoque une augmentation de la pression artérielle supérieure à 50 mm de Hg (2).

Le rôle précis de ET-1 au niveau du contrôle de la fonction vasculaire n'est pas encore clairement établi et soulève plusieurs interrogations. Il est possible qu'une surproduction de cette substance par l'endothélium vasculaire puisse jouer un rôle prépondérant dans la genèse de certaines complications d'ordre cardiovasculaire; tels l'hypertension, le vasospasme coronarien ou l'insuffisance cardiaque globale (3, 4). Une augmentation des niveaux sanguins de ET-1 a également été rapportée dans certains états de stress cardiovasculaires sévères incluant le choc cardiogénique (5), l'infarctus du myocarde aigu (6), la transplantation du foie (7) et autres chirurgies abdominales majeures (8). Ces résultats confirment que ET-1 est un vasoconstricteur endogène important qui module la pression artérielle.

Afin de mieux définir le profil pharmacologique de ET-1, il s'avère d'abord essentiel d'accroître la disponibilité de ce vasoconstricteur. ET-1 est présent *in vivo* à des concentrations inférieures à la picomole/litre et les quantités isolées à partir de surnageants de cellules endothéliales en culture sont infimes. Afin d'attribuer avec certitude une ou des activités biologiques à une substance peptidique, la pureté de la préparation doit être excellente. Une approche de synthèse de ET-1 par voie chimique est donc préférable car elle permet d'obtenir, en grande quantité, des peptides exempts de contamination. De plus, elle facilite la conception des analogues requis pour une étude des relations de structure-activité.

La synthèse de ET-1 représente toutefois un défi de taille pour le chimiste des peptides, qui doit contourner plusieurs difficultés (résidus d'acides aminés sensibles aux transformations chimiques tels que l'alkylation et l'oxydation, formation régiospécifique des ponts disulfures, problèmes de solubilisation) afin d'obtenir un peptide homogène de qualité.

Ainsi, dans le cadre d'une étude des relations de structure-activité de ET-1, notre objectif principal a été de développer un schéma de synthèse efficace de ce nouveau peptide en utilisant la méthode de synthèse peptidique en phase solide (SPPS). Différentes stratégies de synthèse, rapportées dans la littérature, ont été investiguées et appliquées à la production de ET-1.

Le premier chapitre expose le profil pharmacologique actuel de l'endothéline. Le chapitre suivant présente le principe général de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) et la stratégie sous-jacente. On retrouve dans le dernier chapitre les approches de synthèse, cyclisation et purification évaluées. Les résultats expérimentaux y sont également discutés. Enfin, ce chapitre renferme les résultats de la caractérisation chimique et biologique de notre préparation synthétique.

# **CHAPITRE I**

## **PROFIL PHARMACOLOGIQUE DE L'ENDOTHELINE**

Le rôle physiologique précis de l'endothéline, ce nouveau peptide vasoconstricteur de 21 acides aminés, est indéterminé. Comment celui-ci est-il impliqué dans le maintien de l'homéostasie? Contribue-t-il à la genèse de certaines pathologies? Si oui, de quelle façon? Pour répondre à de telles interrogations, il est impératif de mieux définir le profil pharmacologique de ce peptide. Régulièrement, de nouvelles informations nous sont apportées et nous permettent, progressivement, de répondre à de telles interrogations.

### **1.1. SITE ET MECANISME DE BIOSYNTHESE**

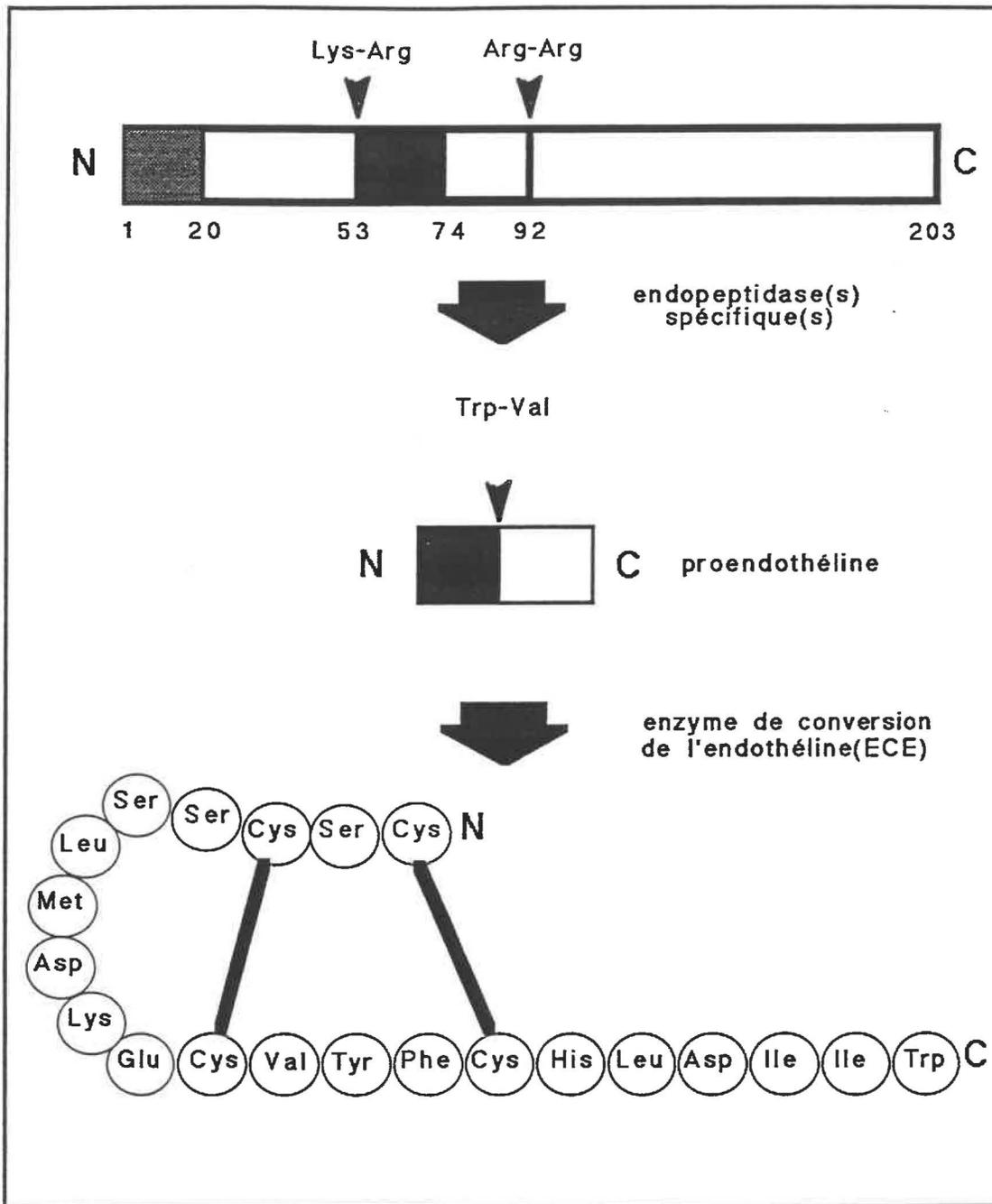
La contractilité des vaisseaux sanguins est régularisée principalement par l'intermédiaire de messages d'origine nerveuse et/ou hormonale. Depuis quelques années, on sait également que l'endothélium vasculaire produit et libère localement certaines substances vasoactives. L'attribution de cette nouvelle fonction résulte en grande partie des travaux de Furchgott et Zawadzki (9) réalisés au début des années 80. En effet, ceux-ci ont démontré que sous l'action de l'acétylcholine, les cellules endothéliales libèrent un facteur relaxant nommé "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF) qui induit la vasodilatation.

Ces résultats, combinés à la découverte de la prostacycline par Moncada et Vane (10), ont suscité un intérêt grandissant pour les substances vasoactives produites par la paroi des vaisseaux sanguins.

Par la suite, on remarqua que de nombreux stimuli chimiques tels la noradrénaline (11), la thrombine (12) et le neuropeptide Y (13), ou physiques comme l'hypoxie (14) et l'anoxie (15) favorisaient la réponse contractile du muscle lisse vasculaire. Ces observations ont soulevé l'hypothèse que les cellules endothéliales puissent aussi, sous l'action de stimuli variés, sécréter une ou plusieurs substance(s) vasoconstrictrice(s), en plus des puissants vasodilatateurs que sont la prostacycline et l'EDRF.

En 1988, Yanagisawa *et al.* (1) ont isolé l'endothéline à partir d'une culture de cellules endothéliales aortiques de porc et déterminé sa séquence. Ce puissant vasoconstricteur est un peptide de 21 acides aminés ( $M_r$  2492) qui contient 2 paires de ponts disulfures intramoléculaires, respectivement localisés entre les résidus de cystéine 1 et 15 et Cys 3 et 11. Cette fréquence de ponts disulfures est d'ailleurs unique à l'intérieur d'une séquence aussi courte et n'est retrouvée chez aucun autre peptide bioactif d'origine mammifère (1).

La biosynthèse de l'endothéline semble s'effectuer selon un schéma semblable à celui de plusieurs autres hormones peptidiques et neuropeptides. En effet, l'endothéline serait produite initialement par les cellules endothéliales sous forme d'un prépropeptide de 203 acides aminés. Suite à l'action spécifique d'endopeptidases, une prohormone de 39 acides aminés serait alors générée. Le peptide de 21 résidus serait ensuite produit grâce à l'action d'une enzyme de conversion (ECE) dont l'existence est encore hypothétique (1) (Fig. 1). Cette enzyme pourrait représenter un site d'intervention pharmacologique idéal afin de prévenir la synthèse de ce peptide vasoactif.



**Figure 1: Mécanisme de biosynthèse de l'endothéline.**

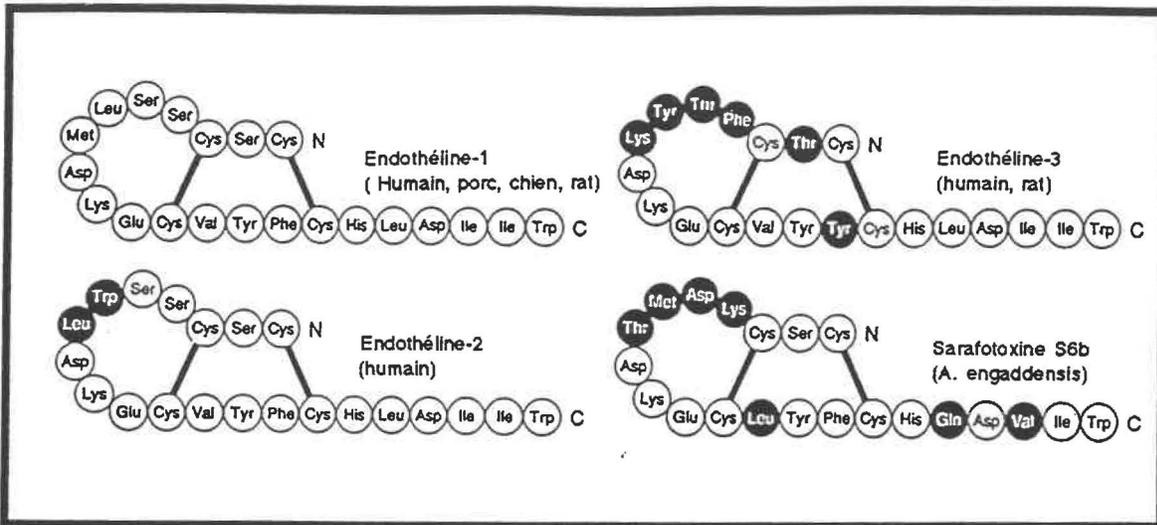
La séquence de la pièce sécrétoire et de ET-1 est respectivement représentée par la zone ombragée et noire. Selon ce mécanisme, la proendothéline de 39 acides aminés est générée par clivage protéolytique, au niveau de paires de résidus basiques. ET-1 est produite via l'intervention d'une enzyme de conversion non identifiée (1).

## 1.2. L'ENDOTHELINE : UNE FAMILLE DE PEPTIDES

L'endothéline présente une homologie structurale et fonctionnelle remarquable avec un groupe de toxines appelées sarafotoxines (Fig. 2). Ces peptides ont été isolés du venin du serpent *Attractaspis engaddensis* et provoquent un vasospasme coronarien très sévère. L'analogie est telle que l'on croit être en présence de peptides qui partagent une origine évolutive commune (16).

La présence de ces peptides homologues dans des tissus aussi différents que l'endothélium vasculaire d'un mammifère et les glandes venimeuses d'un serpent a suggérée que l'endothéline ne soit pas le seul membre de sa famille et qu'il puisse être synthétisé ailleurs que dans l'endothélium vasculaire.

Grâce au clonage et à l'analyse séquentielle de gènes, l'existence de trois membres distincts a été proposé chez l'humain ; ET-1, ET-2 et ET-3. ET-1 est le premier membre de cette famille qui a été découvert et isolé. Ainsi, l'emploi du terme général "endothéline" réfère habituellement à cette molécule. Les 2 autres isopeptides, ET-2 et ET-3, diffèrent de ET-1 par 2 et 6 résidus d'acides aminés respectivement mais la localisation des ponts disulfures y est conservée (17, 18). Il est à noter que 3 des 6 substitutions de ET-3 sont de type isofonctionnelles (Thr-2, Thr-5 et Tyr-14 au lieu de Ser-2, Ser-5 et Phe-14) (Fig. 2).



**Figure 2: Structure primaire des membres de la famille des endothélines.**

Les résidus qui diffèrent de la séquence de ET-1 sont représentés par des cercles noirs (17, 18).

Il semble toutefois que les cellules endothéliales ne produisent que ET-1 car seul le peptide ou son ARN messager ont pu y être détectés (2). La localisation tissulaire de ET-2 et ET-3 demeure inconnue, car il n'existe pas de preuves convaincantes de leur expression quel que soit le tissu étudié. Une étude récente attribuait à ET-3 un rôle de neuromodulateur, ce qui reste à confirmer (19).

### 1.3. EFFETS PHARMACOLOGIQUES ET LOCALISATION DES RECEPTEURS

A l'origine, l'endothéline (ET-1) a été identifiée comme un peptide vasoconstricteur des cellules musculaires lisses vasculaires. On sait maintenant qu'il possède un spectre d'activité beaucoup plus large et qu'il exerce des effets sur des tissus d'origine vasculaire et non-vasculaire.

ET-1 provoque une contraction puissante et soutenue des préparations de muscle lisse vasculaire chez presque tous les mammifères incluant le rat, le cobaye, le lapin, le porc, le chien, le chat et l'humain. Par exemple, l'injection i.v. de ce peptide produit un effet vasopresseur de très longue durée chez le rat, qui se traduit par une élévation de la pression artérielle (20). Parmi les autres effets vasculaires rapportés, ET-1 induit la libération d'éicosanoïdes et de EDRF (21). En effet, chez le rat la réponse induite par ET-1 est accrue par le pré-traitement à l'indométacine; conséquence de l'inhibition de la formation d'éicosanoïdes vasodépresseurs. ET-1 exerce également un vaste spectre d'effets pharmacologiques dans des tissus non-vasculaires (Tab. I).

Actuellement, nos connaissances des récepteurs de l'endothéline sont très limitées. Certaines études autoradiographiques réalisées avec ET-1 marquée à  $^{125}\text{I}$  ont révélé, chez le rat, la localisation de sites de liaison spécifique, à haute affinité ( $K_d = 2-4 \times 10^{-10} \text{ M}$ ) (23). Ceux-ci sont situés à l'intérieur du système vasculaire ainsi que dans certains tissus dont l'intestin, le cœur, le poumon, le rein, la surrénale et le cerveau (22-24). Des essais biologiques réalisés *in vivo* et *in vitro* avec les trois endothélines (ET-1,ET-2,ET-3) démontrent que ces

isopeptides possèdent des potentiels de vasoconstriction différents. Pour expliquer ces différents rôles physiologiques, on a postulé l'existence de sous-types de récepteurs, ce qui reste à démontrer (17). Conséquemment, les caractéristiques biochimiques de ces récepteurs sont inconnues.

L'identification d'activités biologiques variées, combinée avec la démonstration de l'existence de récepteurs de l'endothéline dans des tissus non-vasculaires, suggèrent que ce peptide est impliqué dans la régulation d'une variété de fonctions, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur du système cardiovasculaire.

**Tableau I. Activités biologiques non-vasculaires de ET-1**

Effets	Réf.
-constriction du muscle lisse (bronches, trachée, utérus, intestin)	21, 25, 26
-effets chronotropes et inotropes positifs sur le myocarde	27
-stimule la sécrétion de l'ANP	28
-effets rénaux ( inhibe la libération de rénine, l'ATPase Na+/K+ au niveau du tubule collecteur et l'effet antidiurétique de la vasopressine)	29, 30, 31
-prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules mésangiales et fibroblastes SWISS 3T3	32, 33, 34
-modulation de la libération de catécholamines des terminaisons sympathiques et cellules chromaffines	35
-production accrue d'aldostérone par les cellules de la corticosurrénale	36
-effets sur le SNC (action vasopressive, libération de substance P)	34

#### 1.4. RELATIONS DE STRUCTURE-ACTIVITE

En comparant les structures primaires des endothélines et de la sarafotoxine S6B, certaines caractéristiques communes sont mises en évidence chez ces peptides. On retrouve i) 2 ponts disulfures formés par les résidus de Cys 1-15 et Cys 3-11 ii) un groupe de résidus chargés (Asp 8-Lys 9-Glu 10) iii) une portion C-terminale hydrophobe (résidus 16-21) et iv) une région variable (résidus 4-7) (Fig 2). L'homologie retrouvée suggère donc que la conservation de ces domaines est importante pour l'expression d'une activité biologique, alors que la portion variable contribue aux propriétés spécifiques de chaque peptide.

En effet, tout comme plusieurs autres peptides bioactif (vasopressine, oxytocine, somatostatine...), la destruction de la structure cyclique résulte en une diminution marquée de l'activité biologique. La réduction et l'alkylation des 4 résidus de cystéine réduit le potentiel vasoconstricteur de ET-1 d'un facteur de plus de 100. Il semble aussi que la conservation du pont S-S "extérieur" (Cys 1-15) soit plus importante, puisque la substitution des résidus 1 et 15 par une alanine réduit le potentiel de ET-1 d'un facteur 10 fois supérieur à la substitution équivalente au niveau des cystéines 3 et 11 (38).

La topologie des liens est déterminante pour le maintien de l'activité, car il a été démontré que les isomères non-naturels [Cys 1-11/Cys 3-15]ET et [Cys 1-3/Cys 11-15]ET sont 100 fois moins actifs que la molécule naturelle (39).

L'altération de la longueur de la chaîne peptidique affecte aussi considérablement le potentiel vasoconstricteur de ET-1. L'élimination du résidu tryptophane C-terminal ou sa substitution par le D-Trp réduit son activité d'environ 100 fois (40). En amputant la chaîne peptidique d'un résidu supplémentaire (ET 1-19), on réduit l'activité d'un facteur additionnel de 100. De plus, l'alpha-amidation de l'extrémité C-terminale résulte en une diminution d'activité d'un facteur de 40 (41).

L'activité contractile du précurseur de 39 acides aminés est aussi considérablement inférieure (100 à 140 fois) à ET-1 (42). Ainsi, le peptide bicyclique de 21 acides aminés, doté d'une extrémité COOH terminale libre, semble représenter la structure qui est caractérisée par la puissance contractile optimale.

### **1.5. MECANISME(S) D'ACTION CELLULAIRE**

On connaît depuis plus d'une décennie le rôle important des ions calcium comme second messenger. Ils servent de relais entre les messages électriques et chimiques, qui arrivent à la surface des cellules, et la machinerie biochimique, à l'intérieur de celles-ci. Ils participent à la régulation de phénomènes biologiques variés; tels la contraction musculaire, le contrôle du métabolisme du glycogène dans le foie, la sécrétion d'hormones, d'enzymes digestives ou de neurotransmetteurs (43). Afin de bien orchestrer les mécanismes cellulaires, les ions calcium sont aussi soumis à une auto-régulation.

Ainsi, au cours de l'évolution les cellules se sont progressivement dotées d'un système complexe, afin de contrôler la concentration plasmatique de ce messager. Des pompes, des échangeurs et des canaux ioniques ajustent la concentration en ions calcium dans le cytosol. Certaines protéines interagissent avec ces ions et assurent la transmission et la réception des messages intracellulaires.

Les premiers chercheurs qui ont décrit la structure et la pharmacologie de ET-1, ont également suggéré un mécanisme d'action cellulaire pour expliquer les bases moléculaires de son action biologique. Selon ceux-ci, ce peptide induit la vasoconstriction en favorisant l'entrée d'ions  $Ca^{++}$  dans la cellule, via des canaux voltage-dépendant spécifiques.

Cette hypothèse était basée sur l'observation que la vasoconstriction induite par ET-1 était inhibée dans un milieu de culture qui ne contenait pas de calcium et/ou en présence de la nifédipine, une dihydropyridine qui bloque les canaux calciques (44). Ce mécanisme a aussi été retenu par d'autres chercheurs pour expliquer l'action de ET-1 dans divers tissus (45, 46).

Toutefois, d'autres travaux ont contredit cette théorie et ont suggéré que ET-1 n'est pas un activateur direct de ces canaux (47-49). Par exemple, selon certains auteurs, aucun des antagonistes des canaux à calcium (nifédipine, nifédipine, diltiazem et vérapamil) n'influencent la contraction induite par ET-1, dans le tissu aortique de rat. Dans un tel cas, il semble que si la vasoconstriction est médiée partiellement par un influx de calcium, l'apport est effectué par des canaux non-sensibles à ces bloqueurs.

Dans certains tissus, on croit donc que l'action de ET-1 est presque complètement indépendante des canaux calciques voltage-dépendant, tandis qu'ailleurs, elle est étroitement associée à l'activation de ces canaux, par un mécanisme qui est toutefois inconnu.

Il est également probable que ET-1 utilise, chez certaines cellules cibles, un système de second messenger apparenté à celui des sarafotoxines, c'est-à-dire l'hydrolyse de phosphoinosides (PI) suivie d'une mobilisation de calcium intracellulaire (50). Un tel mécanisme implique l'interaction de ET-1 avec son récepteur membranaire spécifique, entraînant l'activation d'une enzyme membranaire ; la phospholipase C (PLC). Cette activation représente l'évènement clé de la cascade et va donner naissance à deux signaux intracellulaires distincts. L'hydrolyse du phospholipide membranaire phosphatidyl inositol 4-5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) par la PLC engendre le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1, 4, 5, trisphosphate (IP<sub>3</sub>). Le premier, confiné à la membrane, active une protéine kinase C (PKC) qui induit la phosphorylation séquentielle de protéines, assurant une réponse cellulaire soutenue. L'autre messenger (IP<sub>3</sub>) est un sucre qui diffuse dans le cytoplasme où il induit la libération du calcium emmagasiné dans des vésicules appelées calcisomes, dérivées du réticulum endoplasmique. Ceci entraîne une élévation transitoire de la concentration intracellulaire de calcium qui, finalement, sera responsable de la réponse cellulaire brève et initiale (43).

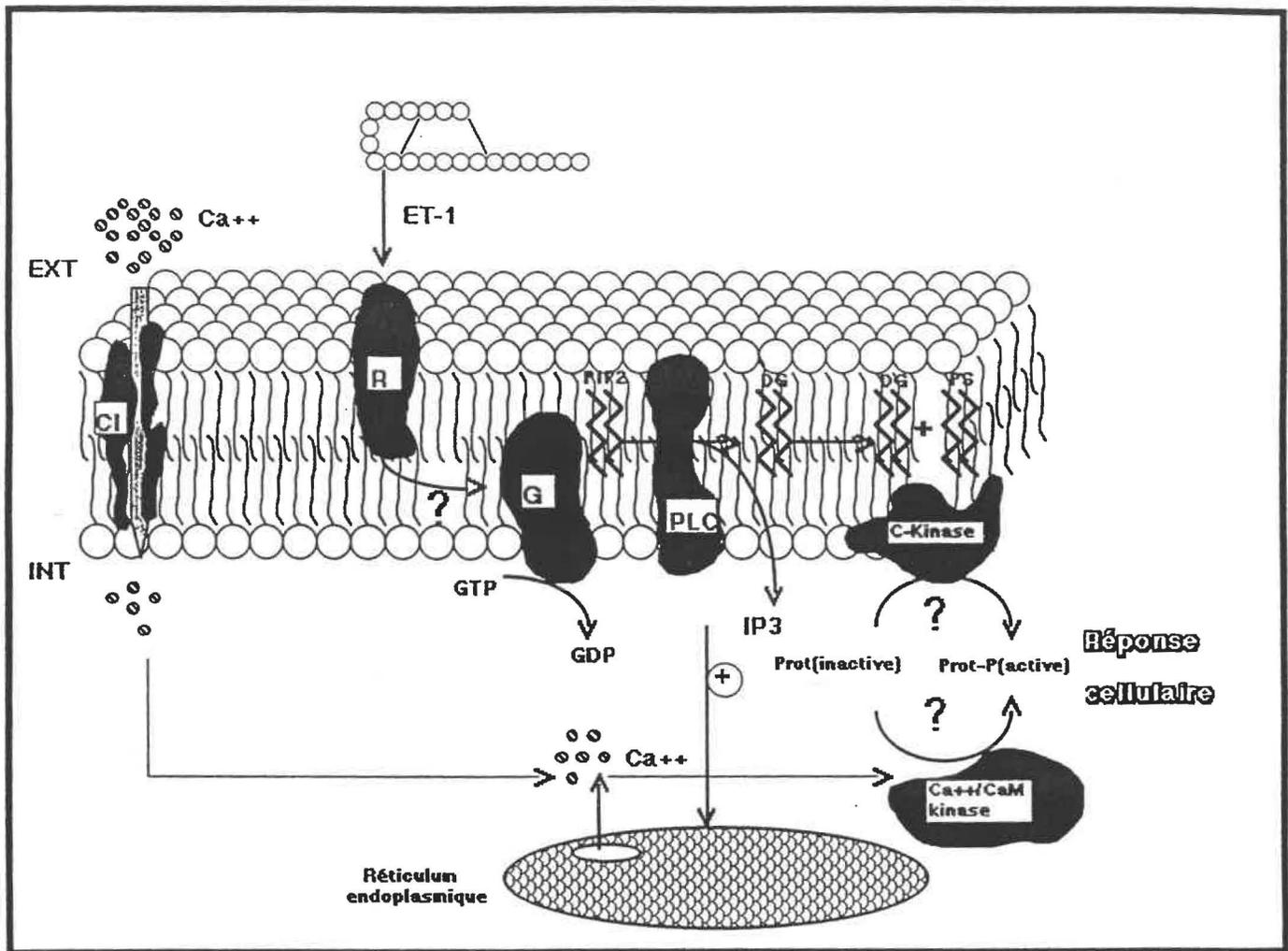
Dans des cellules musculaires lisses vasculaires provenant de l'homme, du boeuf, du rat (51) et dans des fibroblastes (52), maintenus en culture, ET-1 stimule la phospholipase C et entraîne une production accrue et rapide d'IP3 et de DAG. L'IP3 serait ainsi responsable de la mobilisation du calcium des sites de stockage provoqué par ET-1 (53, 54). De plus, la réponse contractile semble être partiellement dépendante de l'activation de la protéine kinase C puisque la staurosporine, un puissant inhibiteur de cette enzyme, diminue sensiblement la contraction induite par ET-1 (49).

Il a aussi été démontré que ET-1, via l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), conduit à la production d'acide arachidonique (44). Une fois métabolisé, ce précurseur se transforme en éicosanoïdes (leucotriènes, thromboxanes et prostaglandines). ET-1 induit donc indirectement la production de substances aux propriétés vasoactives.

Le site précis et le mécanisme par lequel ET-1 active le "turnover" des phosphoinositides demeure indéfini et l'activation directe ou indirecte de la phospholipase C est possible. Une activation indirecte implique la participation d'une charnière qui couple le récepteur et la phospholipase C, ce qui pourrait être accompli par une protéine G, non identifiée.

Il est possible que l'activation de la protéine kinase C soit médiée de façon directe par l'interaction ET-1-PLC, d'une façon analogue aux esters de phorbol, ou conséquente indirectement d'une élévation des niveaux cellulaires de DAG . Ceci est toutefois hypothétique et reste à confirmer.

De nouvelles données sont requises afin de mieux discerner le ou les mécanismes d'action de ET-1. Actuellement, nos connaissances nous laissent croire à la participation variable des 2 mécanismes ci-haut mentionnés, soit l'entrée du calcium par des canaux voltage-dépendant et/ou la stimulation du "turnover" de phosphoinosides. La participation relative de ces 2 voies pourrait être orchestrée selon le type de réponse et de tissu impliqué. Une réponse brève et rapide impliquerait un apport calcique accru de l'extérieur de la cellule et/ou des réserves intracellulaires, tandis qu'une réponse soutenue ferait appel à l'activation de la C- kinase (Fig. 3).



**Figure 3: Mécanisme(s) d'action(s) de l'endothéline-1.**

La vasoconstriction qui est induite est partiellement dépendante d'un influx de Ca<sup>++</sup>, via des canaux ioniques spécifiques voltage-dépendant (Cl). Parallèlement, la fixation de ET-1 à son récepteur cellulaire (R) active une enzyme membranaire (PLC), dont l'efficacité est dépendante ou non d'une protéine G (G). Le phosphatidyl inositol 4-5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) est alors clivé en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1, 4, 5, trisphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> diffuse dans le cytoplasme et entraîne la libération du Ca<sup>++</sup> emmagasiné dans le réticulum endoplasmique. Le DG demeure dans la membrane où il active une autre enzyme (C-kinase), avec la collaboration du phosphatidyl sérine (PS), un cofacteur. Ces deux embranchements conduisent à la phosphorylation de protéines qui initient la réponse cellulaire.

## **CHAPITRE II**

### **SYNTHESE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE**

#### **2.1. INTRODUCTION**

La synthèse par voie chimique constitue un outil important dans le but de définir de façon complète le profil pharmacologique d'un nouveau peptide biologiquement actif. Par exemple, elle est couramment utilisée pour confirmer la composition chimique d'une structure peptidique ou accroître sa disponibilité, pour permettre la réalisation d'études biologiques complètes. Elle rend aussi accessible l'étude des relations structure-activité par l'intermédiaire du "design" d'analogues synthétiques, dérivés de la molécule-mère.

La découverte de plusieurs peptides aux propriétés variées a stimulé la recherche en synthèse peptidique et favorisé le développement de nouvelles méthodologies. Pour réaliser la synthèse d'un peptide, on avait alors recours aux techniques de synthèse en solution. Par ces méthodes, l'assemblage d'un peptide de longueur moyenne (20 résidus) pouvait demander jusqu'à 1 an de travail ardu par une équipe spécialisée.

Conscient des limites de cette approche, Merrifield a conçu en 1963 le principe de synthèse en phase solide (SPPS) qui révolutionna le monde de la chimie des peptides. Cette découverte a d'ailleurs valu à son auteur le prix Nobel de Chimie en 1984.

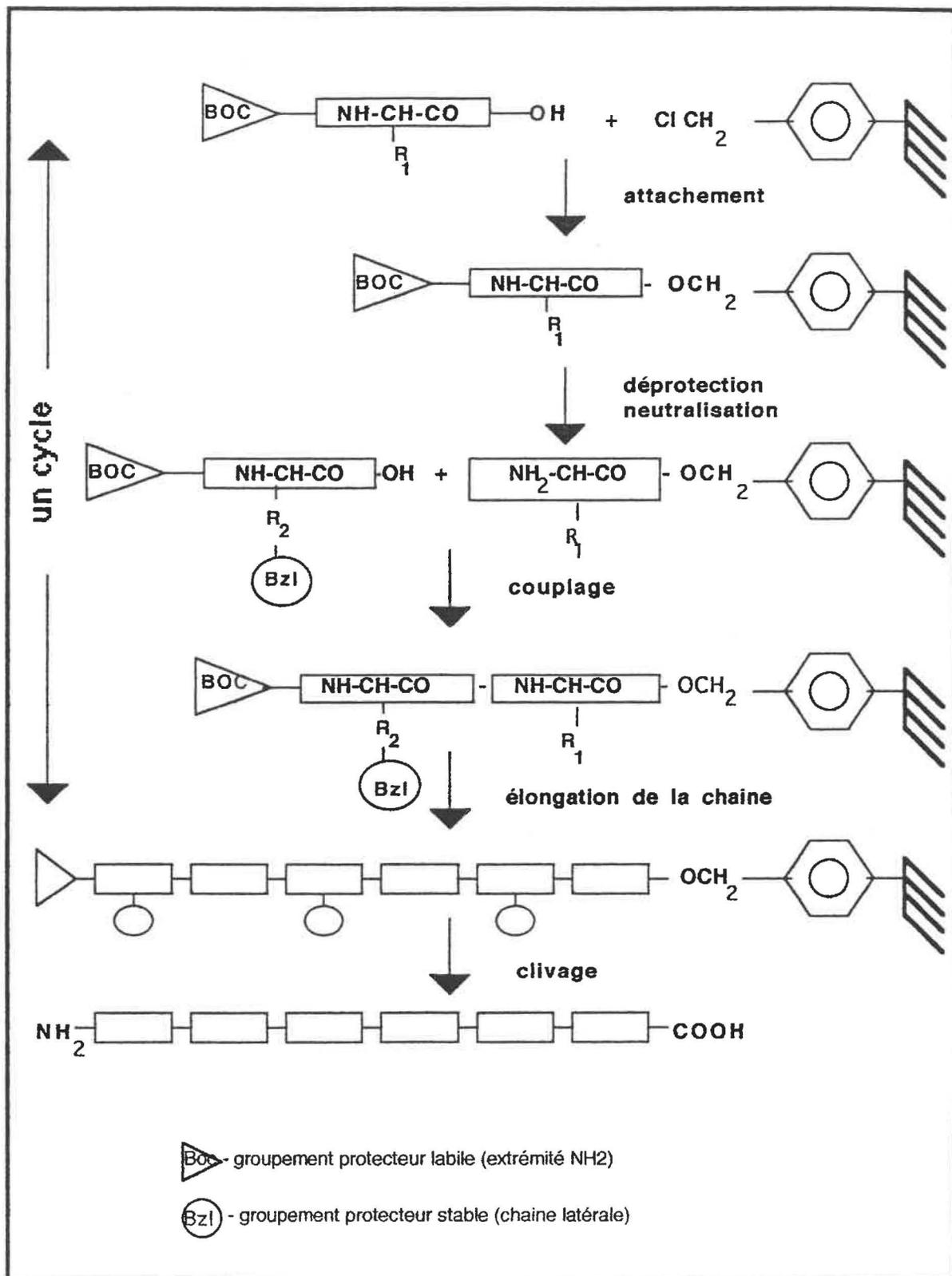
## 2.2. PRINCIPE

La SPPS consiste à former un peptide de longueur et de séquence variable tout en maintenant une extrémité rattachée à un support polymérique insoluble (Tab. II).

La première étape consiste, le plus souvent, à lier de façon covalente l'acide aminé C-terminal du peptide à un support polymérique fonctionnalisé. Par la suite, on procède à l'ajout séquentiel des résidus d'acides aminés désirés. Leurs fonctions réactives sont protégées tout au long de la synthèse afin de préserver leur intégrité chimique. La séquence complétée, le peptide sera libéré de la phase solide par clivage chimique et finalement purifié.

La SPPS offre plusieurs avantages sur les méthodes en solution. Premièrement, puisque le polymère utilisé est insoluble dans les solvants employés en synthèse, il ne sera pas nécessaire de purifier les intermédiaires à chaque cycle d'addition. En effet, tous les réactifs, solvants et produits secondaires générés seront éliminés par filtration et lavage ; ce qui sera entièrement accompli dans le même réacteur. La répétition et la vitesse des étapes favorisent l'automatisation de la technique et permet l'assemblage d'un peptide en quelques jours.

Tableau II. Principe de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS)



## 2.3. STRATEGIE

### 2.3.1. Choix du support polymérique

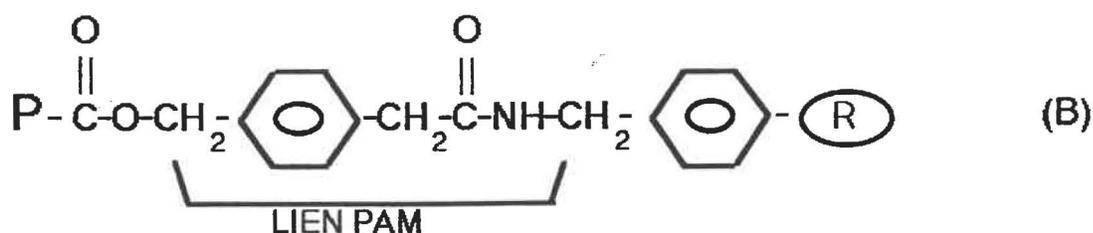
Développé par Merrifield (55), le support polymérique de choix pour la synthèse de courts peptides acides est généralement le polystyrène ponté avec 1 % de *m*-divinylbenzène. Un tel degré de pontage assure le gonflement adéquat de la résine, surtout en présence de solvants organiques chlorés ou aromatiques sans affecter la stabilité physique de celle-ci. Cette propriété de gonflement est essentielle afin d'assurer la diffusion adéquate des réactifs à l'intérieur de la matrice du polymère.

Pour la synthèse de peptides longs (plus que 15 A.A), cette résine fonctionnalisée, par chlorométhylation par exemple, n'est pas très efficace. En effet, le lien ester établit entre le peptide et la résine (A) n'est pas suffisamment stable pour résister aux conditions acidolytiques requises, lors des déprotections successives. Le lien peptide-résine (P-R) est labile puisque la chaîne alkyle de la résine accroît la densité électronique sur l'oxygène du lien ester et favorise donc la protonation.



Il existe actuellement des résines qualifiées de "seconde génération" qui sont plus stables à l'acidolyse, comme la résine fonctionnalisée avec le groupe

phénylacétamidométhyle (PAM). Le pouvoir électroattracteur du groupe acétamide résulte en une diminution de la densité électronique, au niveau du groupement carbonyle qui se traduit par une stabilité supérieure du lien ester à l'acidolyse ( $\approx 100$  fois plus stable) (56). Cette résine PAM (B) est donc, actuellement un choix des plus judicieux pour réaliser la synthèse de peptides acides de longueur moyenne ou élevée (plus de 15 A.A).

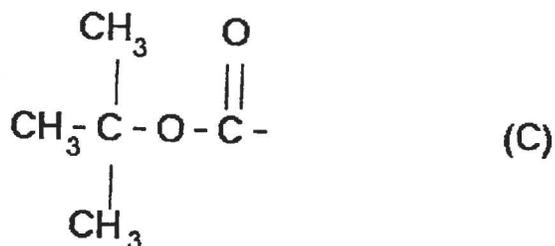


### 2.3.2. Groupements protecteurs

L'assemblage de peptides par voie chimique nécessite la protection des fonctions réactives, qui ne sont pas impliquées directement dans la formation du lien peptidique. Soumis à l'acidolyse progressive, les groupements protecteurs utilisés devront posséder au moins 2 niveaux de stabilité chimique. Premièrement, une protection "labile" qui permettra la déprotection de l'amine-alpha des acides aminés par traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA), après formation de chaque nouveau lien peptidique. Deuxièmement, une protection "stable" qui préviendra la formation de réactions secondaires lors de la synthèse et qui sera éliminée par clivage à l'acide fluorhydrique (HF), lorsque l'assemblage du peptide sera complété.

Le premier niveau de protection est assuré par l'introduction d'un groupement tert-butyloxycarbonyle (Boc) (C). Le groupe Boc, éliminé en présence

de conditions acides, est sans contredit le groupe alpha-protecteur le plus populaire.



Les Boc-acides aminés sont relativement stables, solubles dans la plupart des solvants de synthèse et disponibles sur le marché à un prix modéré. Leur déprotection est simple (TFA 20-50 % dans le dichlorométhane) et relativement propre puisque deux gaz sont principalement générés (CO<sub>2</sub>, Isobutylène) comme sous-produits. De plus, le groupe Boc, donneur d'électrons, défavorise les réactions de racémisation lors de la synthèse. Ce problème est particulièrement sérieux avec l'histidine (57).

Parallèlement, des dérivés benzyliques, "stables" en milieu acide (TFA), sont utilisés pour la protection des chaînes latérales. Pour chaque acide aminé qui possède une chaîne latérale réactive, on a développé un dérivé qui assure la stabilité chimique désirée. Ce raffinement est conféré par l'incorporation contrôlée de groupement électrodonneurs (par exemple, méthyle) ou électroattracteurs (par exemple, halogènes) sur le noyau benzylique (Tab. III). La protection est adéquate dans la plupart des cas bien qu'une amélioration soit souhaitable dans le cas de l'histidine et du tryptophane (58, 59).

Tableau III. Principaux groupements protecteurs Boc-compatibles utilisés en SPSS

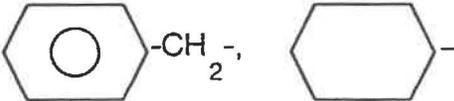
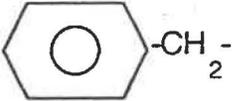
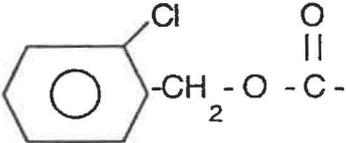
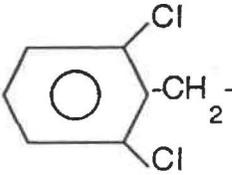
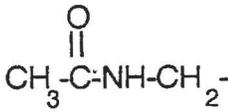
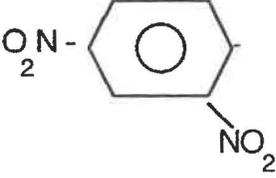
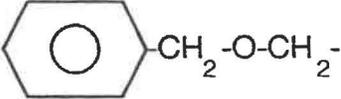
Acide aminé	Structure partielle	Abréviation
Asp, Glu		Bzl, OcHex
Ser, Thr		Bzl
Lys		2-ClZ
Tyr		2,6-ClBzl
Cys		4-MeBzl
		MeOBzl
		Acm

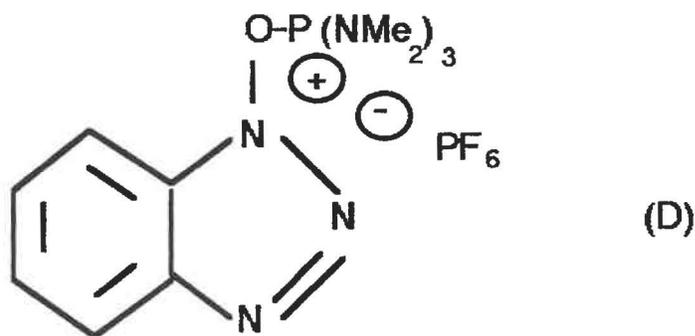
Tableau III. (suite)

Acide aminé	Structure partielle	Abréviation
His		Tos
		Dnp
		Bom
Arg		Tos
Trp	HCO-	For
Met, Asn, Gln, Leu, Ile, Val, Ala, Gly, Phe, Pro	—	—

### 2.3.3. Formation du lien peptidique

Introduit par Sheehan et Hess (60) en 1955, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) a longtemps été le réactif de couplage le plus utilisé par les chimistes des peptides. Cependant, celui-ci n'est pas sans défauts. Certaines réactions secondaires, comme la racémisation ou le réarrangement intramoléculaire de l'intermédiaire réactif O-acylisourée, ont été rapportées durant l'étape d'activation. Par cette méthode, la répétition de l'étape de couplage est fréquente pour introduire quantitativement un résidu d'acide aminé, ce qui cause une consommation élevée de temps et de réactifs. De plus, son utilisation requiert une certaine prudence puisque le DCC est allergène.

Parmi tous les réactifs de couplage suggérés pour remplacer le DCC, le réactif BOP [hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino) phosphonium] (D) introduit par Castro *et al.* (61) a été identifié comme un agent de choix en synthèse peptidique. En effet, les couplages réalisés avec le réactif BOP s'accomplissent plus rapidement et permettent d'obtenir de meilleurs rendements comparativement à la technique classique au DCC ou aux autres méthodes d'activation ( anhydrides symétriques, DCC/HOBt) (62).



Le réactif BOP est un sel non hygroscopique, très stable, qui est soluble dans les solvants organiques usuels. Le mécanisme d'activation de la fonction COOH est médié par la formation d'un dérivé acyloxyphosphonium qui serait, par la suite, transformé *in situ* en ester actif d'hydroxybenzotriazole (HOBT) (63).

Ce dernier pourrait réagir directement avec la fonction amine libre du peptide en croissance et participer à la réaction de condensation. L'utilisation du BOP accélère les réactions de couplage et conduit à de meilleurs rendements que la procédure conventionnelle au DCC.

#### **2.3.4. Clivage, purification et caractérisation**

Une fois que la chaîne peptidique, sous forme protégée, a été assemblée sur le support polymérique, tous les groupes protecteurs doivent être retirés. En plus, le lien covalent situé entre le peptide et la résine doit être clivé afin de libérer le peptide.

Il existe plusieurs procédures de clivage, mais la réaction la plus populaire se base sur l'utilisation de l'acide fluorhydrique (HF), un acide fort, volatil. Les conditions drastiques du clivage sont souvent la source des problèmes rencontrés lors de la SPPS. Par exemple, afin de préserver les résidus d'acides aminés sensibles à l'alkylation et/ou l'oxydation (Met, Cys, Tyr, Trp), on incorporera au mélange un agent capteur de carbocations. Ces carbocations, très réactifs, sont générés lors de la déprotection finale. On utilise généralement des agents comme l'anisole, le m-crésol, le diméthylsulfure, l'éthanedithiol, etc.

La SPPS ne peut être considérée complète que lorsque le produit synthétique a été purifié des produits secondaires et soumis aux analyses qui confirment sa structure primaire.

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une technique efficace qui permet une purification adéquate de la plupart des peptides, souvent par une seule étape de CLHP sur phase inversée (PI). Parfois, celle-ci devra être complétée par d'autres techniques de séparation comme l'échange d'ions ou la chromatographie de partage. Par la suite, l'intégrité de la séquence sera généralement confirmée par l'analyse d'acides aminés, la spectrométrie de masse et l'évaluation de l'activité biologique.

## CHAPITRE III

### SYNTHÈSE DE L'ENDOTHELIN-1

#### 3.1. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE COMPATIBLE AVEC LA FORMATION NON-REGIOSPECIFIQUE DES PONTS DISULFURES

##### 3.1.1. Introduction

L'endothéline-1 (ET-1) est caractérisée par la présence de deux ponts disulfures intramoléculaires; ce qui est unique à l'intérieur d'une séquence aussi restreinte, chez un peptide d'origine mammifère (1). Pour réaliser la synthèse de ce dernier, la stratégie employée devra permettre de reproduire sa structure bicyclique; essentielle à l'expression complète de ses activités biologiques.

Malgré tous les progrès connus en synthèse au cours des trois dernières décennies, la formation de liens disulfures par voie chimique représente toujours une limite importante de la SPPS. Avec le besoin croissant de synthétiser des peptides cycliques, différentes approches plus ou moins efficaces et/ou spécifiques ont été proposées. Parmi celles-ci, l'oxydation à l'air libre (56), une méthode non-spécifique, est la plus répandue. Selon cette technique, l'oxydation est réalisée en solution diluée, afin de favoriser le processus intramoléculaire, et ainsi minimiser la dimérisation ou l'oligomérisation. Cependant, cette procédure "aléatoire" peut-elle être appliquée à la synthèse d'un peptide bicyclique comme ET-1 et donner des résultats satisfaisants?

Les travaux de Kumagaye *et al.* (39) semblent confirmer cette hypothèse. Ils ont été les premiers à publier un protocole de synthèse de ET-1. Ils ont suggéré que l'oxydation aléatoire de ET-1 linéaire résulte en la formation, selon des proportions variées, des 3 analogues cycliques possibles [Cys 1-11/Cys 3-15]ET, [Cys 1-3/Cys 11-15]ET et [Cys 1-15/Cys 3-11]ET. L'étude chromatographique (PI-CLHP) a révélé que l'isomère [Cys 1-15/Cys 3-11]ET représente 75 % du mélange et est identique en tout point à ET-1 naturelle.

Afin de reproduire la synthèse de ET-1 par cette procédure d'oxydation non-spécifique, la fonction sulfhydryle des cystéines (positions 1, 3, 11, 15) sera protégée par le groupement 4-MeBzl. Après le clivage acidolytique au HF, le peptide, entièrement déprotégé, sera soumis à l'oxydation à l'air libre et l'efficacité de la méthode évaluée par comparaison des temps de rétention sur PI-CLHP analytique.

Parallèlement, nous investiguerons une procédure tout à fait nouvelle et peu étudiée en SPPS. Celle-ci consistera à réaliser la déprotection et l'oxydation des cystéines, pendant que la chaîne peptidique demeure ancrée à son support. Ceci sera accompli au moyen du trifluoroacétate de thallium  $[(CF_3COO)_3TI]$ , un réactif qui permet la déprotection (64) et l'oxydation(65) des cystéines de façon simultanée.

### 3.1.2. Méthodologie

#### Synthèse peptidique

La synthèse a été initiée sur un copolymère de styrène-divinylbenzène fonctionnalisé avec le groupement phényl-acétamidométhyle (PAM). Pour assurer la protection labile de l'amine-alpha des résidus à incorporer, nous avons utilisé des acides aminés protégés par le groupement tert-butyloxycarbonyle (Boc). De plus, les groupes suivants ont protégé les chaînes latérales réactives des acides aminés: Asp(OcHex), Cys(4-MeBzl), Glu(Bzl), His (Tos), Lys(2-ClZ), Ser(Bzl) et Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl).

Le premier cycle de synthèse s'est déroulé ainsi: après lavage et déprotection (Tab. IV, étapes 1 à 5) de la résine Boc-Trp-OCH<sub>2</sub>-PAM (10,0 g, 0,23 méquiv./g de résine), on a ajouté au réacteur le Boc-Ile (4 équiv., 9,2 mmoles, 2,2 g dans ≈100 mL de N-méthylpyrrolidone (NMP)), la réactif BOP (4 équiv., 9,2 mmoles, 4,1 g dans ≈50 mL de NMP) et la diisopropyléthylamine (DIEA) (4 équiv., 9,2 mmoles, 1,6 mL). La réaction de couplage s'est déroulée à température de la pièce durant 120 min. Après avoir confirmé la formation du lien peptidique par le test de Kaiser (66), on a éliminé l'excès des réactifs présents par filtration, lavages (étapes 7 et 8) puis la résine-peptide a été soumise, selon les mêmes conditions, au cycle d'addition suivant.

### **Clivage du lien peptide-résine**

Après l'introduction du dernier acide aminé et la déprotection finale de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale, la résine-peptide a été lavée successivement avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NMP et CH<sub>3</sub>OH, puis séchée sous vide (poids obtenu: 15,0 g). On plaça dans un premier réacteur de clivage (A) 3,75 g de résine-peptide et 3,75 mL de m-crésol (1 mL/g) tandis que dans le second (B), on ajouta en plus 3,75 mL de diméthylsulfure (DMS) (1 mL/g). On initia le clivage par l'ajout d'environ 40 mL de HF (≈10 mL/g) à chaque réacteur et la réaction se déroula durant 60 minutes à une température de 0 °C, sous agitation constante. Par la suite, on évapora rapidement le HF sous vide et lava la résine à l'éther (100 mL/g). Le peptide a alors été extrait au TFA (10 mL/g), puis l'acide évaporé sous vide. L'extrait brut, d'aspect huileux et de couleur violacée, a été précipité de nouveau à l'éther, filtré puis séché sous vide.

### **Réduction de l'extrait brut post-HF**

Une quantité de 500 mg de peptide post-HF (réacteur A) a été dissoute dans 10 mL de TFA pur. On ajouta ce mélange, goutte à goutte, à 2,0 L d'eau distillée maintenue sous vive agitation et dans laquelle avait barbotté de l'azote durant 20 min (concentration finale TFA: 0,05 %). A cette solution peptidique (≈0,25 mg/mL), on ajouta 0,325 g de dithiothréitol (≈10 équiv., 2 mmoles). Des aliquots ont été prélevés à différents temps de réaction (0, 30 min, 1 h, 6 h et 18 h) et analysés sur PI-CLHP

### Purification de l'endothéline-1 réduite

Après l'étape de réduction, le pH a été ajusté à 2,0-2,5 avec du  $\text{NH}_4\text{OH}$  dilué et la solution peptidique filtrée. Celle-ci a alors été injectée sur une colonne (30 X 5,7 cm) Delta Pak  $\text{C}_{18}$  (15  $\mu\text{m}$ , 300 Å) à compression radiale, couplée à une pompe de type Waters Prep LC 3000 et à un spectrophotomètre Waters 441. A partir d'une solution (A)  $\text{H}_2\text{O}$  contenant 0,06 % TFA et (B) 65 %  $\text{CH}_3\text{CN}/(\text{A})$ , on a procédé à l'élution du peptide selon le gradient linéaire suivant: 0-35 % (B) en 20 min, 35-100 % (B) en 100 min. Débit: 60 mL/min. Détection: 230 nm. Les différentes fractions d'intérêt recueillies ont été analysées par CLHP analytique, sur une colonne Vydac  $\text{C}_{18}$  (10  $\mu\text{m}$ ) (30 X 0,39 cm), selon le gradient linéaire suivant: 20-60 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  en 20 min. Débit 1,5 mL/min. Détection: 230 nm.

### Oxydation à l'air libre

Après avoir récolté et combiné les fractions d'intérêt (F182-188, F218-222), le pH de ces solutions peptidiques a été ajusté à 5,0 avec du  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Celles-ci ont alors été soumises à l'oxydation à l'air libre en maintenant une température d'environ 4 °C. Des aliquots ont été prélevés après 24, 48, 72 et 96 heures et le suivi de la réaction effectué par PI-CLHP.

### Clivage et cyclisation sur résine: essai au $\text{Ti}(\text{CF}_3\text{COO})_3$

A 4 tubes à essai contenant 2 mL de TFA préalablement refroidi à 0°C, nous avons ajouté 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{Ti}(\text{CF}_3\text{COO})_3$  (3 équiv.) et 20  $\mu\text{L}$  d'anisole (2 équiv.). Pour démarrer la réaction d'oxydation, nous avons ajouté 250  $\mu\text{g}$  de résine-peptide à chaque tube. Après 15, 30, 60 et 120 min, la réaction a été interrompue

par filtration et toute trace de TI éliminée par lavages répétés au TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>OH. Ces échantillons et une portion équivalente de résine-peptide non-traitée au Ti(CF<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub> ont alors été clivés au HF dans un multi-réacteur, selon les conditions expérimentales ci-haut mentionnées.

### 3.1.3. Résultats et discussion

L'assemblage de l'endothéline-1 (ET-1) par SPPS a été réalisé selon un protocole semi-automatisé, basé sur une approche acidolytique (TFA/HF) progressive (56), compatible avec l'utilisation du réactif de couplage BOP (Tab.IV).

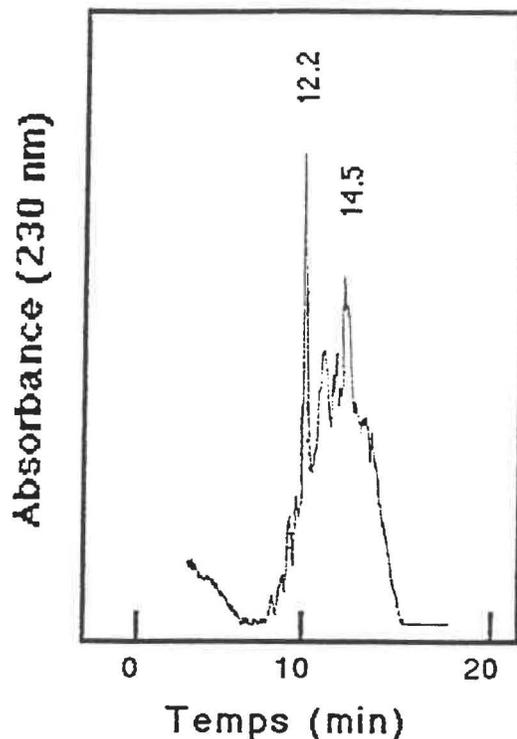
Tableau IV. Etapes d'un cycle de synthèse avec le réactif BOP

Etape	Réactif	Temps
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 1 min
2	40%TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 0,2%EDT	1 x 2 min
3	40%TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + 0,2%EDT	1 x 20 min
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 x 1 min
5	NMP	2 x 1 min
6	4 éq. de Boc-AA-COOH/NMP + 4 éq. de réactif BOP/NMP + 6 éq. de DIEA <sup>a</sup>	1 x <sup>b,c</sup>
7	NMP	3 x 1 min
8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 x 1 min

a pour le couplage du Boc-His(Tos): 4 éq. de DIEA  
b couplage réalisé en 120 min ou moins et contrôle des couplages effectué par le test à la ninhydrine  
c volume de solvants: 10-20 mL/g de résine

Le choix des groupements protecteurs des chaînes latérales a été fait, de façon à assurer la protection optimale des résidus d'acides aminés durant la synthèse. Pour minimiser les réactions d'oxydation et d'alkylation, lors des déprotections au TFA, un alcanedithiol, l'éthanedithiol (EDT 0,2 %) a été ajouté à la solution de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40 % afin de capter les carbocations générés et protéger les résidus sensibles aux effets de l'oxygène. Tous les couplages ont été complétés en 120 minutes ou moins et le contrôle de la réaction a été effectué au moyen du test qualitatif à la ninhydrine (66). Récemment, Forest et Fournier (67) ont démontré que le couplage du dérivé Boc-His(Tos) est possible avec le réactif BOP. Les problèmes de racémisation, fréquemment observés avec cet acide aminé, peuvent être évités lorsque la quantité de base (DIEA) est maintenue dans les mêmes proportions (ratio 1:1) que celles du Boc-His(Tos) et du réactif BOP.

Le clivage du lien résine-peptide a été réalisé par acidolyse au HF selon un protocole faisant appel à un mécanisme réactionnel de type S<sub>N</sub>1 (68). La présence d'agents capteurs de carbocations (ACC) est également impérative lors de cette étape. En plus du m-crésol (1mL/g), du DMS (1mL/g) a été inclus dans un des deux réacteurs de clivage. Ceci avait pour but d'assurer la protection optimale du peptide et d'évaluer l'impact d'une addition double d'ACC sur le produit brut post-clivage. L'extraction de ET-1 a été réalisée avec du TFA pur, puisque ni l'acide acétique 30 % ou l'urée 8M ne permettait de solubiliser adéquatement la forme réduite du peptide. L'analyse sur PI-CLHP de l'extrait brut post-HF clivé avec ou sans DMS a démontré que l'addition de cet ACC n'améliorait pas la qualité du peptide post-clivage. Le profil chromatographique du produit post-HF (Fig. 4) révèle la présence d'un mélange complexe de produits.

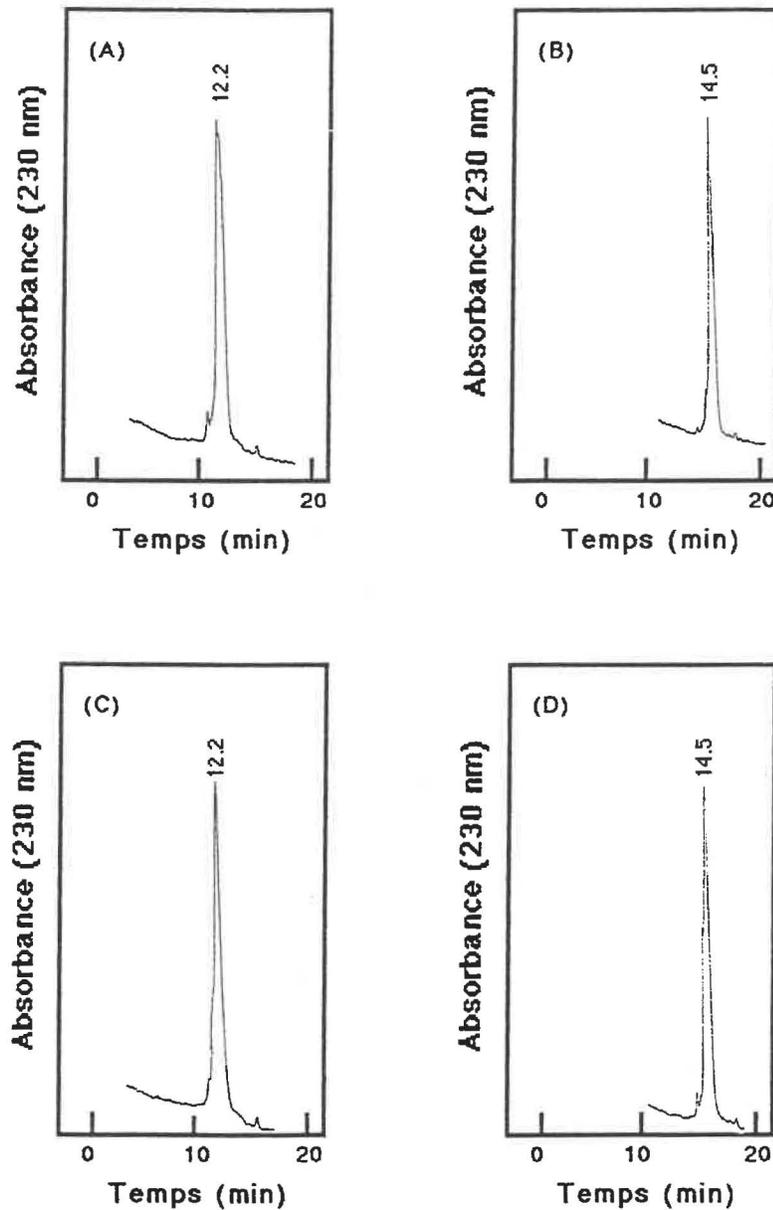


**Figure 4: CLHP analytique de ET-1 post-clivage.**

Conditions: colonne Vydac C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m; 30 x 0,39 cm); Eluants: (A) 0,06 % TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN; gradient linéaire: 20-60 % (B) en 20 min; débit: 1,5mL/min; détection: 230 nm.

Il semble justifié de croire que la séquence peptidique désirée corresponde à l'un des deux produits majeurs, soit le peptide élué à un temps de 12,2 min ( $\approx$  25 % du mélange) ou 14,5 min ( $\approx$  14 %). La mauvaise qualité du peptide post-HF peut être attribuée à des conditions de synthèse et/ou de clivage inappropriées, à une séquence particulièrement difficile à reproduire ou bien à la présence dans le mélange du peptide sous une forme polymérisée. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nous avons soumis un échantillon post-HF à une procédure de réduction au dithiothréitol. L'analyse d'aliqots à des temps réactionnels variés (0, 30 min, 1 h, 6h, et 18h) sur PI-CLHP nous a permis de rejeter celle-ci, puisque aucune modification du profil ne fut constaté.

Cette solution peptidique a ensuite été injectée sur une colonne préparative afin d'isoler chacun de ces produits. Les fractions appropriées (F 182-188, Tr 12,2 min; F 218-222, Tr 14,5 min) ont été rassemblées, puis soumises à l'oxydation à l'air libre pour une durée totale de 96 heures. Après ce délai, un aliquot de ces deux solutions a été analysé et comparé au temps 0 (Fig. 5).



**Figure 5: CLHP analytique de ET-1 linéaire post-purification (A), (B) avant et (C), (D) après oxydation à l'air libre.**

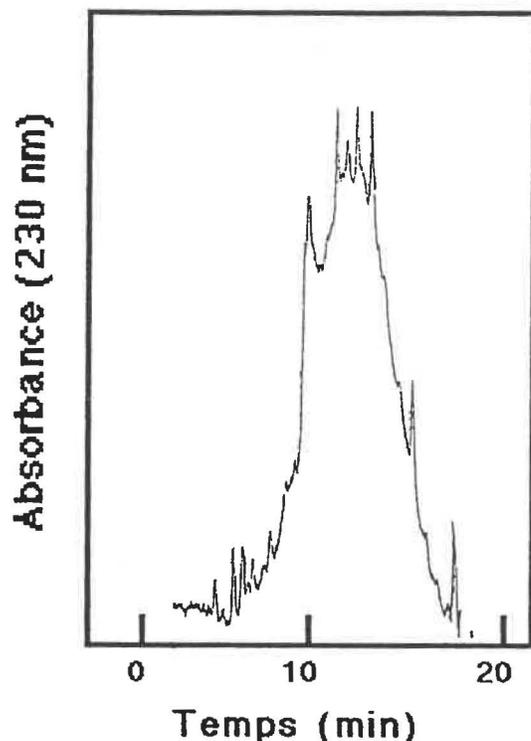
Conditions: voir figure 1.

Cette procédure ne nous a pas permis de mettre en évidence la formation de résidus cystines, qui se serait traduit par un changement de la mobilité chromatographique du peptide. Expérimentalement, nous avons observé que la solubilité de la forme réduite de notre préparation synthétique était considérablement diminuée dans la zone de pH 6,5-7,5, où se situe approximativement le point isoélectrique (pI) de ET-1. Ainsi, pour contourner cette difficulté, l'oxydation à l'air libre s'est déroulée à pH 5,0 plutôt qu'à pH faiblement alcalin.

Il est improbable que ce changement de condition explique, à lui seul, l'incapacité à former les ponts disulfures. La réaction s'est déroulée durant 96 heures, ce qui devait normalement suffire à former les cystines. Selon Kumagaye *et al.*(39), l'oxydation à l'air libre de ET-1 est complétée après trois heures. Compte tenu de ces résultats, l'intégrité chimique des cystéines de notre peptide doit être remise en question pour expliquer nos résultats.

A ce moment, nous avons examiné une procédure alternative de cyclisation au moyen du  $Tl(CF_3COO)_3/TFA$ . Les travaux réalisés par Yajima *et al.* (69) ont démontré sa capacité à cliver différents groupements S-protecteurs, comme le 4-MeBzl. De plus, il agit simultanément comme un oxydant pour former le pont S-S. Comparativement au peptide post-HF non-traité (Fig. 4), on remarque que le traitement au  $Tl(CF_3COO)_3/TFA$  (Fig. 6) a conduit à une détérioration évidente du peptide.

Le profil chromatographique obtenu est peut être une conséquence de l'oxydation d'un produit de synthèse non préalablement purifié, ce qui a généré le mélange complexe observé. Cependant, puisque les dommages causés à un peptide originent généralement du clivage, cette hypothèse est peu probable.



**Figure 6: CLHP analytique de ET-1 post-clivage après traitement au  $Ti(CF_3COO)_3$ .** Conditions: voir figure 1.

Yajima *et al.* (69) ont proposé que cette procédure d'oxydation cause des dommages irréversibles aux acides aminés sensibles de la séquence soit: l'histidine, la méthionine, la tyrosine et le tryptophane. Ainsi, pour appliquer avec succès cette technique à la synthèse d'un peptide, nos résultats suggèrent que les résidus mentionnés doivent être absents, puisque le niveau actuel de protection offert pour ceux-ci semble incompatible avec le traitement au  $Ti(CF_3COO)_3$ .

## 3.2. STRATEGIE DE SYNTHÈSE COMPATIBLE AVEC LA FORMATION REGIOSPECIFIQUE DES PONTS DISULFURES

### 3.2.1. Introduction

La protection des cystéines lors de la synthèse peptidique est une condition essentielle, compte tenu de l'extrême sensibilité du groupement sulfhydryle aux réactions indésirables d'alkylation et d'oxydation (70,71).

De plus, pour former de façon sélective les ponts disulfures de ET-1, l'introduction de groupements S-protecteurs, qui possèdent des niveaux de stabilité chimique différents, est souhaitable pour procéder à des déprotections sélectives. Parmi les groupements S-protecteurs disponibles, les groupes méthylbenzyle (4-MeBzl) et acétamidométhyle (Acm) offrent cette possibilité attrayante. De plus, contrairement au 4-MeBzl, la fonction Acm est relativement stable au HF (72,73) et doit être éliminée à l'aide d'un réactif adéquat.

Ainsi, lors de cette synthèse, les deux paires de cystéines (1-15 et 3-11) seront respectivement protégées par les groupes Acm et 4-MeBzl. Ce schéma de protection des cystéines avait permis à Kumagaye *et al.* (69) de former les ponts disulfures de ET-1 de façon sélective. Ultimement, les résidus cystines seront formés selon la configuration naturelle de ET-1 au moyen de techniques d'oxydation douces.

### 3.2.2. Méthodologie

#### Synthèse peptidique

La synthèse a été initiée sur un copolymère de styrène-divinylbenzène fonctionnalisé avec le groupement phényl-acétamidométhyle (PAM). Pour assurer la protection labile de l'amine-alpha des résidus à incorporer, nous avons utilisé des acides aminés protégés par le groupement tert-butyloxycarbonyl (Boc). De plus, divers groupes protégeaient les chaînes latérales réactives des acides aminés sensibles: Asp(OcHex), Cys 3 et 11(4-MeBzl), Cys 1 et 15(Acm), Glu(Bzl), His (Tos), Lys(2-ClZ), Ser(Bzl) et Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl).

Le premier cycle de synthèse se déroula ainsi: après lavage et déprotection (Tab. IV, étapes 1 à 5) de la résine Boc-Trp-OCH<sub>2</sub>-PAM (5,0 g, 0,23 méquiv./g de résine), on a ajouté au réacteur le Boc-Ile (4 équiv., 4,6 mmoles, 1,1 g dans ≈50 mL de NMP), le réactif BOP (4 équiv., 4,6 mmoles, 2,0 g dans ≈25 mL de NMP) et le DIEA (4 équiv., 4,6 mmoles, 1,2 mL). La réaction de couplage s'est déroulée à la température de la pièce. Après avoir confirmé l'établissement du lien peptidique par le test qualitatif à la ninhydrine (66), on a éliminé l'excès des réactifs présents par filtration et lavages (Tab. IV, étapes 7 et 8) puis la résine-peptide a été soumise, selon les mêmes conditions, au cycle d'addition suivant.

### Clivage du lien peptide-résine

Après l'introduction du dernier acide aminé et la déprotection finale de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale, la résine-peptide a été lavée successivement avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NMP et CH<sub>3</sub>OH, puis séchée sous vide (poids obtenu : 7,3 g). On plaça dans le réacteur de clivage 2,0 g de résine-peptide, 2 mL de m-crésol (1 mL/g) et 4 mL d'éthanedithiol (2 mL/g). On a initié le clivage par l'ajout d'environ 30 mL de HF (≈15 mL/g) à chaque réacteur et la réaction se déroula durant 60 minutes à une température d'environ 0 °C, sous agitation constante. Par la suite, on a évaporé rapidement le HF sous vide et lavé la résine avec une solution d'éther qui contenait 1 % de mercaptoéthanol (100 mL/g). Le peptide a alors été extrait au TFA + DMS 1 % (10 mL/g), puis l'acide a été évaporé sous vide. L'extrait brut, d'aspect huileux et de couleur violacée, a été précipité de nouveau à l'éther, filtré puis séché sous vide.

## **PREPARATION DE L'ENDOTHELINE MONOCYCLIQUE**

### Purification de l'endothéline-1 réduite

Le protocole type de purification du produit brut post clivage s'est déroulé de la façon suivante. Le peptide post-HF (200 mg) a été dissous dans le TFA pur (6 mL). On ajouta ce mélange, goutte à goutte, à une solution d'eau distillée (3,0 L) maintenue sous vive agitation et dans laquelle avait barboté de l'azote durant 20 min (concentration finale TFA: 0,2 %). Le pH de cette solution peptidique (≈0,07 mg/mL) a été ajusté à 2,0-2,5 avec du NH<sub>4</sub>OH dilué puis filtrée. Celle-ci a été injectée sur une colonne (30 X 5,7 cm) Delta Pak C<sub>18</sub> (15 μm, 300 Å), à

compression radiale, couplée à une pompe de type Waters Prep LC 3000 et à un spectrophotomètre Waters 441.

A partir d'une solution (A) H<sub>2</sub>O contenant 0,06 % TFA et (B) 70 % CH<sub>3</sub>CN/(A), nous avons procédé à l'élution du peptide selon le gradient linéaire suivant: 0-50 % (B) en 20 min, 50-100 % (B) en 100 min. Débit: 60 mL/min. Détection: 230 nm.

Les différentes fractions recueillies ont été analysées par CLHP analytique sur une colonne Vydac C<sub>18</sub> (10 μm) (30 X 0,39 cm). A partir des solutions (A) H<sub>2</sub>O (0,06 % TFA) et (B) CH<sub>3</sub>CN, nous avons utilisé le gradient linéaire suivant: 25-55 % (B) en 15 min ou 25-65% (B) en 20 min. Débit 1,5 mL/min. Détection: 230 nm.

### **Oxydation à l'air libre**

Se référer aux conditions expérimentales de la section 3.1.2.

### **Oxydation au diméthyl sulfoxyde**

Une quantité de 5 mg de peptide post-purification a été dissoute dans le TFA pur (1 mL). On a ajouté ce mélange, goutte à goutte, à une solution d'eau distillée (60 mL) maintenue sous vive agitation et dans laquelle avait barbotté de l'azote durant 20 min, avant l'addition du diméthylsulfoxyde (15 mL) (concentration finale DMSO: 20 %, TFA 1,3 %). Le pH de cette solution peptidique (≈0,07 mg/mL) a été ajusté à 2,0-2,5 avec du NH<sub>4</sub>OH dilué. Un aliquot a été analysé sur PI-CLHP selon les conditions déjà mentionnées.

### Oxydation au $K_3Fe(CN)_6$

Le peptide lyophilisé (ET-1 linéaire, 25 mg), a été solubilisé selon la procédure décrite à la section 3.1.2., sauf que le pH a été ajusté à 8,0-8,5 avec du  $NH_4OH$ . A cette préparation, nous avons ajouté 20 mL d'une solution de ferricyanate de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) 0,01 M (20 équiv.). Après une agitation lente qui dura une heure, le pH a été abaissé à 5,0 avec de l'acide acétique pour interrompre la réaction.

## **PREPARATION DE L'ENDOTHELIN BICYCLIQUE**

### Purification de ET-1 monocyclique ([Cys(Acm)<sup>1,15</sup>] ET-1)

Cette solution a été injectée sur une colonne (30 X 2,6 cm) Vydac C<sub>18</sub> (15  $\mu$ m, 300 Å) couplée à une pompe de type Waters Prep LC 3000 et à un spectrophotomètre Waters 441. A partir des solutions (A)  $H_2O$  (0,06 % TFA) et (B) 70 %  $CH_3CN/(A)$ , on a procédé à l'élution du peptide selon le gradient linéaire suivant: 0-25 % (B) en 15 min, 25-60 % (B) en 70 min, 60-100 % (B) en 20 min. Débit: 40 mL/min. Détection: 230 nm.

### Oxydation au $Tl(CF_3COO)_3$

A 1 tube à essai contenant 1 mL de TFA préalablement refroidi à 0°C, nous avons ajouté 2,0 mg de  $Tl(CF_3COO)_3$  (3 équiv.) et 2  $\mu$ L d'anisole (2 équiv.). Pour la réaction d'oxydation, nous avons ajouté 3,0 mg de ET-1 monocyclique. Après 60 min, la réaction a été interrompue par précipitation à l'éther et filtration. Un échantillon post-traitement a ensuite été analysé sur PI-CLHP.

### **Déprotection à l'(AgOTf) et oxydation à l'air libre**

A 1 tube à essai contenant 1 mL de TFA préalablement refroidi à 0°C, nous avons ajouté 3,0 mg de trifluoroacétate d'argent (AgOTf) (10 équiv.) et 2  $\mu$ L d'anisole (2 équiv.). Pour démarrer la réaction d'oxydation, nous avons ajouté 3,0 mg de ET-1 monocyclique. Après 60 min, la réaction a été interrompue par précipitation à l'éther et filtration. Après l'oxydation à l'air libre, selon les conditions déjà mentionnées, un échantillon post-traitement a été analysé sur PI-CLHP.

### **Oxydation à l'iode**

Le peptide lyophilisé (ET-1 monocyclique, 3,0 mg) a été dissous dans 1) 25 % méthanol/H<sub>2</sub>O (15 mL) ou 2) acide acétique 80 %/H<sub>2</sub>O (15 mL). A cette solution nous avons ajouté, goutte à goutte, de l'iode (15 équiv.) dissous dans un volume minimal de méthanol. Après 0, 6 et 24 heures de réaction à température de la pièce, un aliquot a été prélevé. L'acide acétique des échantillons du test no.2 a été évaporé jusqu'à ce que la concentration atteigne environ 10 %. Le peptide bicyclique a ensuite été analysé sur PI-CLHP après s'être assuré que le pH était dans l'intervalle 2,0-3,0.

### **Purification semi-préparative de ET-1 bicyclique**

La solution peptidique post-évaporation (AcOH 10 %) a été injectée sur une colonne (30 X 0,39 cm) Vydac C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m, 300 Å) couplée à une pompe de type Waters Prep LC 3000 et à un spectrophotomètre Waters 441.

A partir des solutions (A) H<sub>2</sub>O (0,06 % TFA) et (B) 80 % CH<sub>3</sub>CN/(A), nous avons procédé à l'élution du peptide selon le gradient linéaire suivant: 0-25 % (B) en 10 min, 25-100 % (B) en 150 min. Débit: 2 mL/min. Détection: 230 nm.

### Caractérisation de ET-1

La pureté de ET-1 a été évaluée par PI-CLHP analytique et par électrophorèse capillaire (EC). Conditions CLHP: colonne Vydac C<sub>18</sub> (5 µm, 30 x 0,39 cm). Eluant (A) 0,06 % et (B) CH<sub>3</sub>CN. Gradient linéaire 20-50 % (B) en 30 min. Débit: 1,0 mL/min. Détection: 230 nm. Conditions EC: tampon citrate de sodium 20 mM pH 2,5. Temps d'injection: 1 sec. Tension: 20 KV. Dimensions du capillaire: (45 cm x 50 µm). Température: 30 °C. Détection: 200 nm.

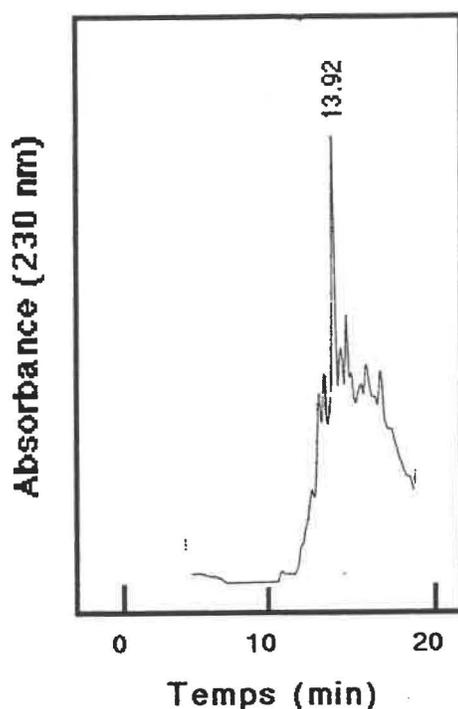
Un échantillon du peptide a été hydrolysé, dans du HCl 6N contenant 0,1 % de phénol, à 110 °C durant 24 h. L'hydrolysate a ensuite été séché et dérivé avec le phénylthiocyanate (PITC) selon le protocole décrit par la compagnie Waters. L'analyse du contenu en acides aminés a été réalisée à l'aide d'un système CLHP comprenant deux pompes Waters 510, un injecteur (Waters 715 Ultra Wisp - Sample processor), un chauffe-colonne (Waters TCM) et une colonne en phase inversée (Waters PICO-TAG). Durant l'analyse, la température de la colonne a été maintenue à 38 °C et l'élution du dérivé d'acide aminé a été accomplie avec des gradients successifs, à partir de CH<sub>3</sub>CN et d'un tampon acétate de sodium, selon le protocole recommandé par la compagnie Waters.

## **Bioessais**

Des cobayes mâles Dunkin Hartley pesant 400-500 g ont été tués par dislocation cervicale puis rapidement saignés. La trachée a alors été prélevée, placée dans une solution tampon Krebs-Henseleit et délicatement débarrassée de tout tissu conjonctif ou adipeux. Des bandelettes hélicoïdales de trachée ont été préparées puis installées dans des bains de 5 mL. La composition du tampon était (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,18; NaHCO<sub>3</sub>, 25; CaCl<sub>2</sub>, 2,5; glucose, 11,1; pH 7,0 à 37 °C. Les réponses ont été enregistrées isométriquement sur un polygraphe Grass 7D utilisant un transducteur de force-déplacement Grass modèle FT03C. Les tissus ont été soumis à une tension initiale de 1,0 g puis lavés toutes les 15 min durant une période de calibration de 60 min. Les effets vasoconstricteurs induits par des concentrations cumulatives de l'endothéline-1 (1-100 nM) synthétique ou naturelle (Institut Henri Beaufour) ont été comparés. Chez le rat, la pression artérielle moyenne (MABP) a été évaluée au niveau de l'artère carotide après injection i.v. de ET-1 (2 nmole/Kg) dans la veine jugulaire.

### 3.2.3. Résultats et discussion

L'analyse chromatographique (PI-CLHP) d'un échantillon de peptide brut post-clivage nous a permis d'identifier la forme réduite de ET-1 (Fig. 7). Celle-ci représente une fraction d'environ 30-40 % du produit synthétique total (Tr = 13,92 min).



**Figure 7: CLHP analytique de ET-1 linéaire post-clivage.**

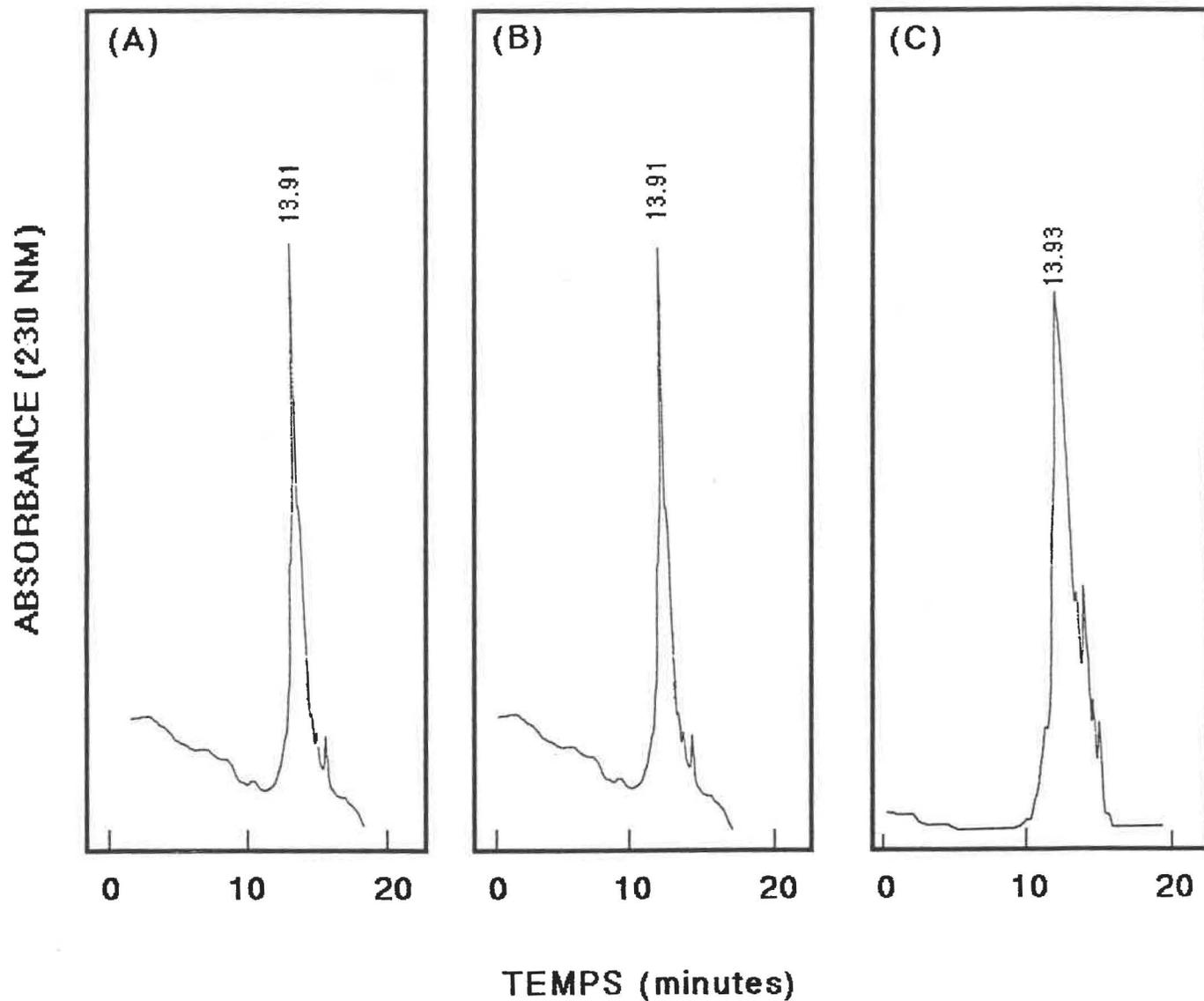
Conditions: colonne Vydac C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m; 30 x 0,39 cm); Eluants: (A) 0,06 % TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN; gradient linéaire: 25-65 % (B) en 20 min; débit: 1,5 mL/min; détection: 230 nm.

A partir du peptide post-HF (600 mg), nous avons procédé à la purification de ET-1 linéaire, selon le protocole décrit à la section précédente. Après avoir complété l'analyse chromatographique des différentes fractions, nous avons

combiné les tubes d'intérêt afin d'obtenir un produit post-lyophilisation ( $\approx 30$  mg) relativement homogène (Fig. 8a).

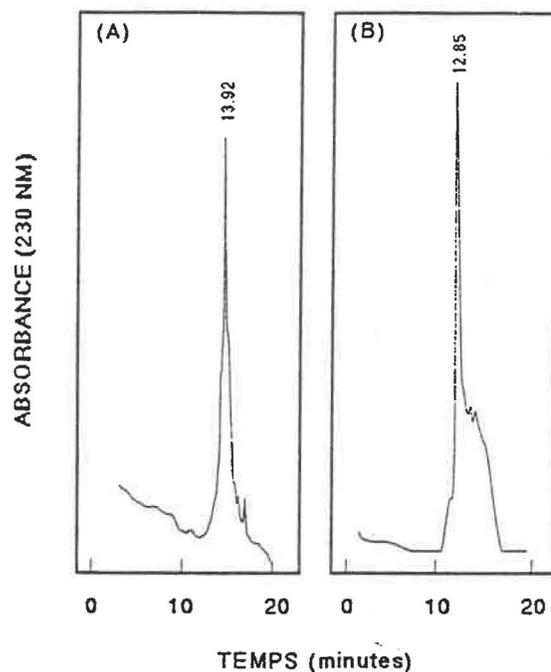
Pour former le premier pont disulfure, entre les Cys 3 et 11, nous devons faire appel à une stratégie oxydative qui n'altère pas la protection S-Acm des résidus 1 et 15. A cette fin, nous avons comparé trois différentes procédures. Initialement, l'oxydation à l'air libre a été réalisée, selon le protocole déjà décrit (section 3.1.2). En comparant le chromatogramme de ET-1 avant (Fig. 8a) et après (Fig. 8b) traitement, on remarque que le temps de rétention ( $T_r$ ) est demeuré le même (13,91 min) et que l'aspect général du produit a été conservé. Combiné aux résultats précédents (section 3.1.3.), ceci démontre clairement l'inefficacité de cette méthode d'oxydation à former le pont disulfure requis, dans les conditions utilisées.

Notre second essai d'oxydation a été effectué avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) en milieu acide. Il a été récemment proposé que ce dernier permet la conversion complète des cystéines en cystines, sans affecter le tryptophane, la tyrosine ou la méthionine (74). L'application de cette technique à ET-1 s'avère particulièrement intéressante, puisque ce peptide est fortement insoluble à un pH voisin de la neutralité; tel que le requiert la procédure d'oxydation à l'air libre. Expérimentalement, cette procédure a modifié le profil chromatographique du peptide mais n'a pas entraînée de variation significative du temps d'élution (Fig. 8c).



**Figure 8: CLHP analytique de ET-1 linéaire (A) avant, (B) après oxydation à l'air libre et (C) après oxydation au DMSO.**  
Conditions: voir figure 7.

Nous avons alors investigué la méthode au ferricyanate de potassium  $K_3Fe(CN)_6$ , initialement décrite par Rivier *et al.* (75) et utilisée par Kumagaye *et al.* (39) pour former le premier pont disulfure de ET-1. La cinétique de la réaction d'oxydation a été suivie sur PI-CLHP analytique et une diminution importante du Tr (1,07 min) (Fig. 9b) a été observé en comparaison avec le témoin (Fig. 9a). Ce résultat confirmait alors l'hypothèse voulant que le réarrangement intramoléculaire, provoqué par la formation du pont disulfure, se traduise par une modification des propriétés chromatographiques de ET-1. Le [Cys(Acm)<sup>1,15</sup>] ET-1 monocyclique a ensuite été purifié une seconde fois afin d'éliminer le  $K_3Fe(CN)_6$  et de séparer le peptide des produits secondaires générés lors de la réaction. Précisons que l'essai pilote de réduction (DTT, 10 équiv.) de ces fractions secondaires s'est avéré inefficace pour régénérer la forme linéaire de ET-1.



**Figure 9: CLHP analytique de ET-1 linéaire (A) avant et (B) après oxydation au  $K_3Fe(CN)_6$ .**

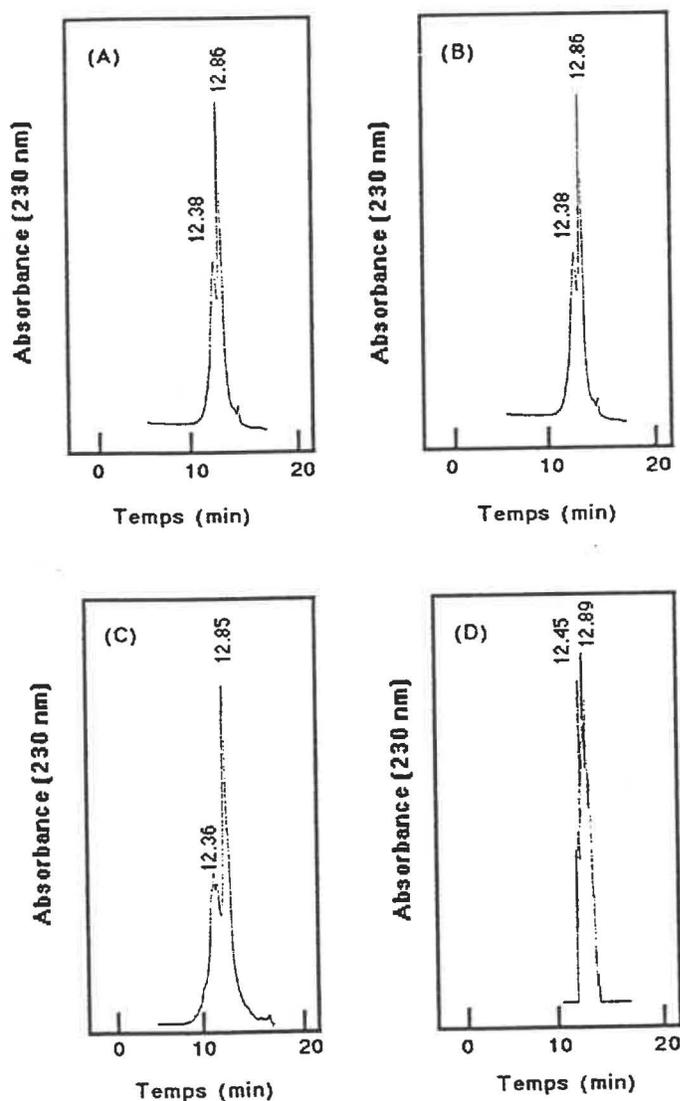
Conditions: voir figure 7.

Afin de former le second pont disulfure (Cys 1-15), il était d'abord impératif d'éliminer le groupement Acm, toujours présent sur les résidus 1 et 15. Dans la littérature, on mentionne que ce groupe protecteur peut être clivé avec l'iode (76), avec le trifluorométhanesulfonate d'argent (AgOTf) (77) ou par le trifluoroacétate de thallium [Tl(CF<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>] (78). De plus, il est reconnu que l'iode et le Tl(CF<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub> induisent la formation concomitante des résidus cystines, alors que l'AgOTf n'est considéré que comme un réactif de déprotection.

Notre premier essai de cyclisation s'est donc basé sur l'utilisation du Tl(CF<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>. La formation du second cycle devrait également se traduire par une diminution du temps requis pour éluer le peptide sur PI-CLHP et a servi à évaluer l'efficacité de l'oxydation. Expérimentalement, cette procédure ne s'est pas traduite par une diminution du Tr, comme la formation du second cycle pouvait le laisser présager (Fig. 10a, 10b).

Morimoto *et al.* (79) on utilisé avec succès l'AgOTf comme réactif de déprotection des Cys(Acm) situées en position 1, 3, 11 et 15 de ET-1. Par la suite, le peptide a été soumis à l'oxydation à l'air libre (pH 7,5, 4 °C, 3 jours). Le temps de rétention de ce produit était identique à l'ET-1 naturelle (Institut Henri Beaufour). Ainsi, nous avons tenté de reproduire les résultats obtenus par ces chercheurs. Expérimentalement, aucune différence significative n'a été remarqué par rapport au produit monocyclique pré-traité (Fig. 10c). Puisqu'il est difficile de remettre en question la capacité de l'AgOTf à cliver le groupement Acm, encore une fois, c'est l'oxydation à l'air libre qui semble inefficace dans ces conditions.

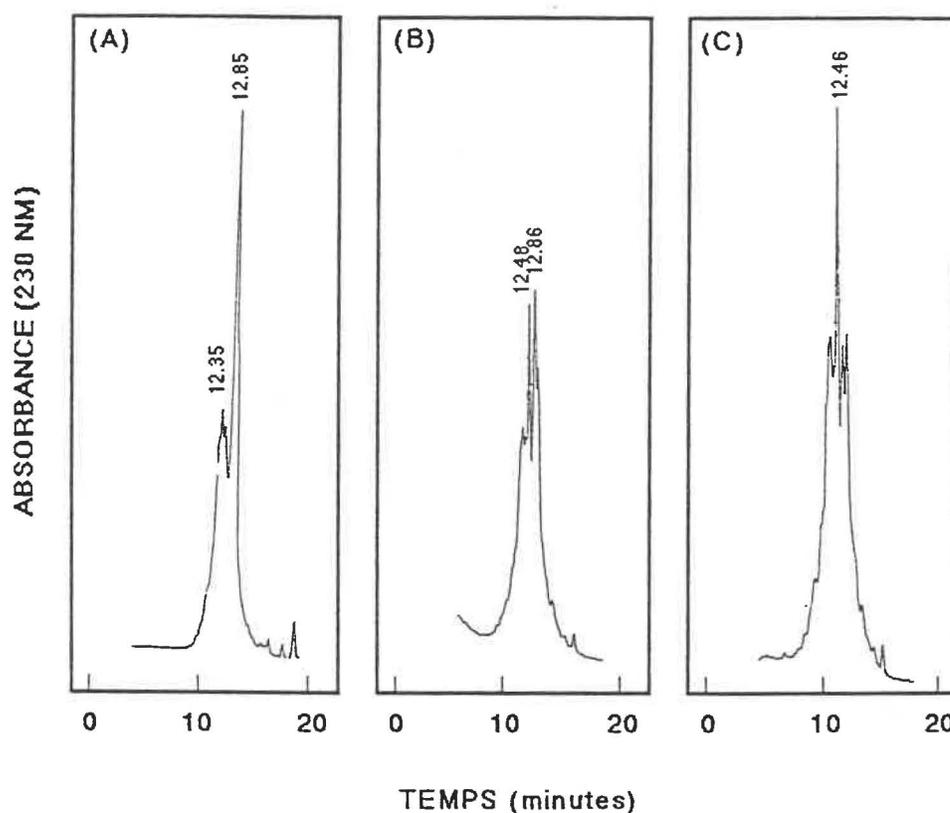
L'oxydation à l'iode représentait alors la dernière alternative. S'inspirant du protocole synthétique de Kumagaye *et al.* (39), le peptide a été soumis à un traitement à l'iode (15 équiv.) de 40 min dans le méthanol 25 %; ce qui suffit à solubiliser la forme monocyclique du peptide. Plusieurs sous-produits ont été générés par cette procédure et le Tr du produit majeur a été conservé par rapport à l'étape précédente (12,89 min) (Fig. 10d).



**Figure 10: CLHP analytique de [Cys(Acm)<sup>1,15</sup>] ET-1 (A) avant, après (B) traitement au  $\text{Ti}(\text{CF}_3\text{COO})_3$ , (C) traitement à l' $\text{AgOTf}$ /oxydation à l'air libre et (D) oxydation à l' $\text{I}_2$  dans le  $\text{CH}_3\text{OH}$  25 %. Conditions: voir figure 7.**

Yajima *et al.* (69) ont proposé que l'iodation de certains acides aminés (Tyr, His, Met et Trp) par cet agent oxydant est parfois favorisé par un "effet de solvant". Nos résultats suggèrent que le méthanol n'est pas un solvant approprié pour cette réaction d'oxydation. Comme le temps de réaction (40 min) proposé par Kamagaye *et al.* (39) a été respecté, il ne semble pas que le traitement prolongé à l'iode soit à l'origine de la détérioration évidente de ET-1.

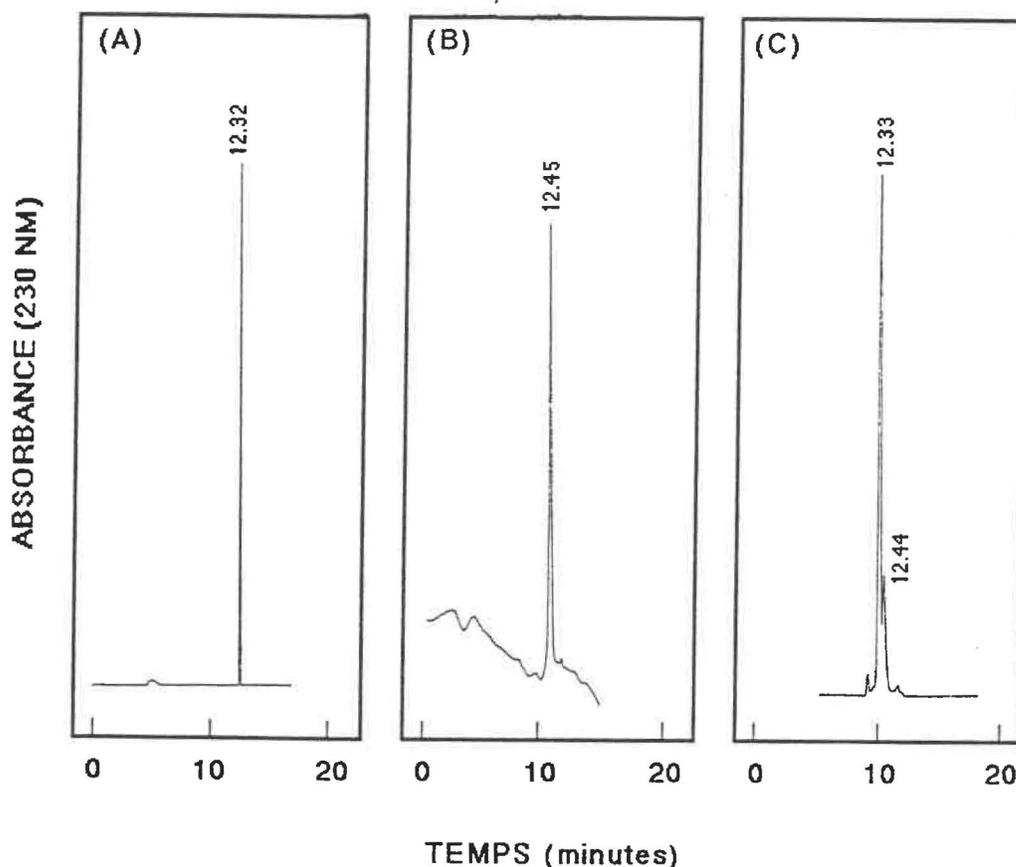
Comme seconde alternative, nous avons procédé à un essai équivalent dans l'acide acétique 80 %. Afin de suivre la cinétique d'oxydation, des échantillons ont été prélevés et analysés à différents temps, soit 0, 1, 3, 6, 12, 24 et 48 heures (Fig. 11a, b, c).



**Figure 11: CLHP analytique de [Cys(Acm)<sup>1,15</sup>] ET-1 (A) avant, (B) après 6 h et (C) 24 h de traitement à l'I<sub>2</sub> dans l'AcOH 80 %.**

Conditions: voir figure 7.

Nous avons remarqué que le temps réactionnel optimal (24 heures) assurait une réaction d'oxydation complète sans toutefois affecter la molécule par un traitement acide trop prolongé. Par exemple, ET-1 commençait à se détériorer après 48 heures, mais l'impact était mineur comparativement à un traitement équivalent de 40 min dans le méthanol, ce qui supporte l'hypothèse de l'effet de solvant. Expérimentalement, comme conséquence de la formation du second cycle, nous avons observé une baisse du Tr de 0,4 min. Celle-ci est inférieure à ce qui a été observé lors de l'établissement du cycle 1. Le Tr de notre préparation synthétique, une fois repurifiée, a alors été comparé à celui d'un échantillon de ET-1 naturelle (Institut Henri Beaufour) (Fig. 12).



**Figure 12: CLHP analytique de (A) ET-1 commerciale, (B) ET-1 synthétique et (C) co-injection de (A) et (B).**

Conditions: voir figure 7.

La présence de deux molécules identiques se serait traduit par l'obtention d'un même temps d'élution, si on fait abstraction de la variabilité instrumentale. Ainsi, pour éliminer cette variable, nous avons procédé à une co-injection sur la colonne analytique PR-CLHP. Celle-ci a clairement démontré que nous n'étions pas en présence de molécules "jumelles", puisque la résolution de deux pics distincts a été observée (Fig. 12c).

Certaines réactions secondaires ont possiblement perturbé l'intégrité chimique de ET-1. Ceci pourrait expliquer l'écart entre la préparation synthétique et son homologue naturel. Pour éliminer la possibilité d'une oxydation réversible de la méthionine (Met) en méthionine-sulfoxide [Met(O)], nous avons traité le peptide à l'iodure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{I}$ , 20 équiv., 30 min), ce qui régénère la forme intégrale de cet acide aminé sans affecter les liens disulfures (80).

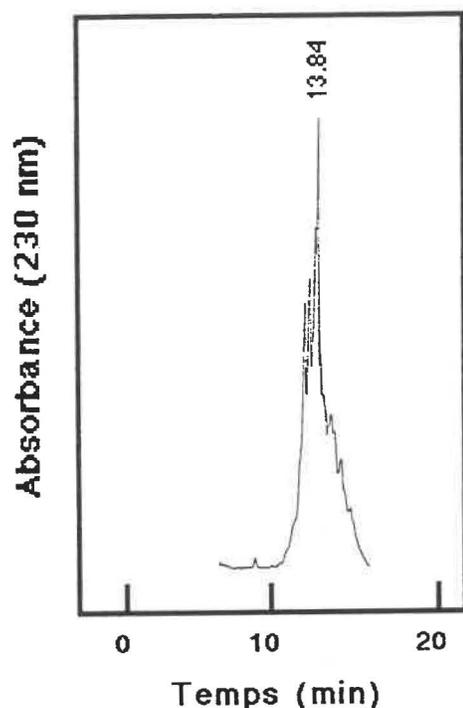
De plus, ET-1 a été soumis à un traitement basique (pH 9,0, 30 min), afin d'éliminer la possibilité du déplacement réversible N à O. Celui-ci a été rapporté avec la sérine et la thréonine et résulte de l'utilisation d'acides forts lors des déprotections et clivages (81). Ces deux procédures ont été, malheureusement, sans conséquences favorables sur le profil de ET-1. Ceci suggère qu'une altération irréversible quelconque a affecté notre préparation synthétique.

Il est possible que le résidu de tryptophane présent dans la séquence de ET-1 soit à l'origine des problèmes rencontrés. En effet, le noyau indole de cet acide aminé est particulièrement sensible à l'alkylation et à l'oxydation en milieu acide.

Cependant, il semble que la destruction du tryptophane est négligeable lorsque le clivage au HF à 0 °C est réalisé en présence de "scavenger", et que la durée de la réaction est inférieure à 1 h (81).

Selon Stewart et Young (56), la plupart des peptides qui contiennent des résidus tryptophane, peuvent être synthétisés sans protection préalable du noyau indole. Ceci est valide à la condition que des "scavengers" soient utilisés lors des étapes acides. Ainsi, nous avons jugé que la protection du noyau indole était superflue, puisque le clivage était réalisé dans ces conditions. Cependant, il est possible que le traitement répété au TFA, lors des étapes de déprotection, ait pu occasionner, même avec l'addition d'éthanedithiol, une détérioration de cet acide aminé. Par surcroît, le tryptophane est l'acide aminé de ET-1 qui est le plus exposé aux conditions acides, lors de la synthèse, à cause de sa localisation C-terminale. Comme il a été démontré que l'élimination du tryptophane résulte en une baisse drastique de l'activité vasoconstrictrice de ET-1, il est essentiel de préserver son intégrité chimique (38).

Nous avons donc initié une nouvelle synthèse peptidique en incorporant à la séquence un résidu de tryptophane protégé par le groupement formyle (For). Le groupement For est stable dans les acides forts (HF, TFA) et est éliminé subséquentement par traitement avec un agent nucléophile ou par traitement basique (83). La synthèse a été réalisée selon la procédure décrite précédemment (section 3.2.2.). Le clivage au HF a été effectué en présence de m-crésol (1mL/mg) seulement, puisque le 1,2-éthanedithiol induit la déformylation du tryptophane dans ces conditions (68,84). Le profil chromatographique de ce produit post-clivage, légèrement différent, est présenté à la figure 13.

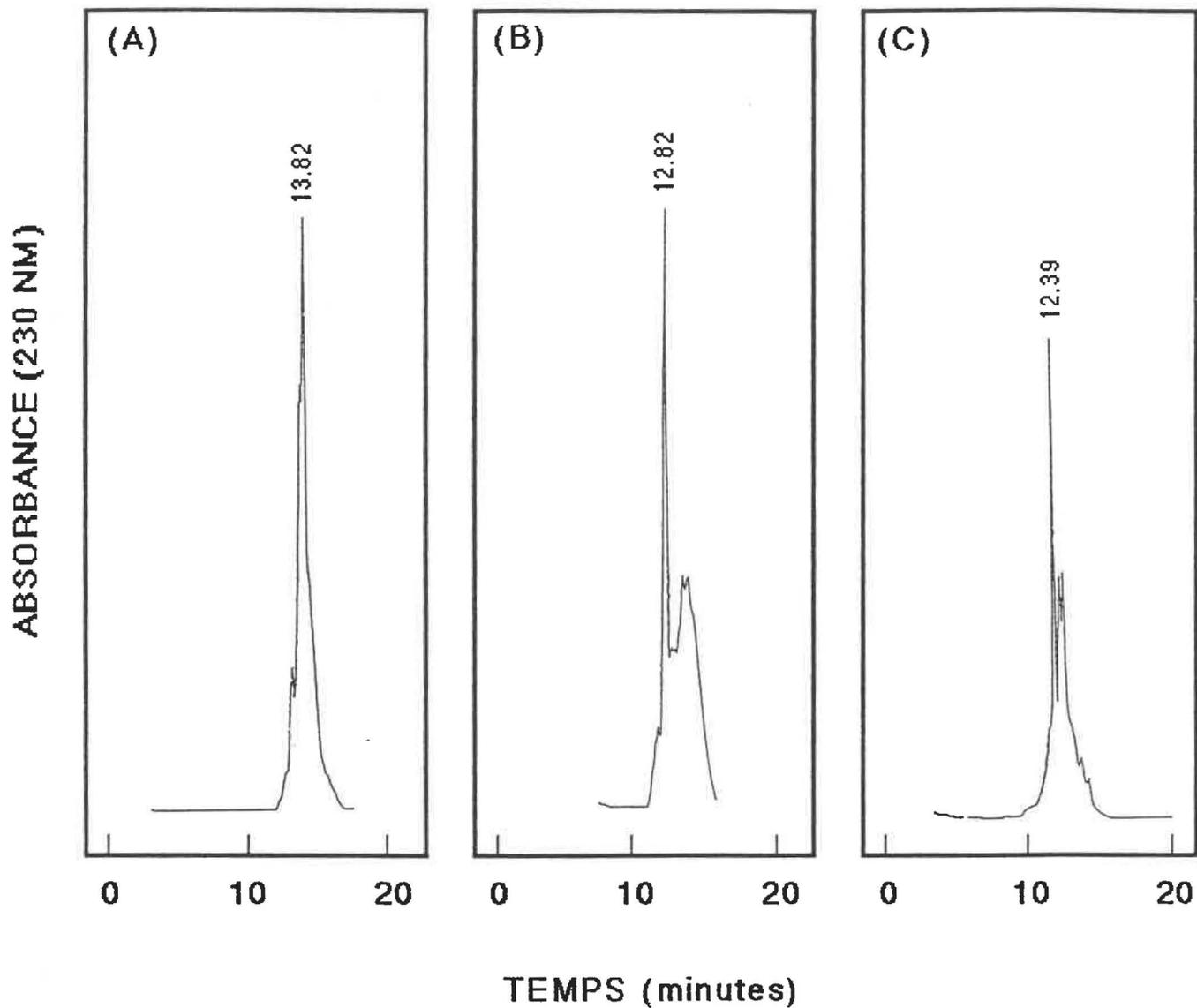


**Figure 13: CLHP analytique de ET-1 post-clivage.**

Conditions: colonne Vydac C<sub>18</sub> (10 μm; 30 x 0,39 cm); Eluants: (A) 0,06 % TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN; gradient linéaire: 20-60 % (B) en 20 min; débit: 1,5mL/min; détection: 230 nm.

La forme réduite de ET-1 a été purifiée puis soumise à la même stratégie oxydative qui a déjà permis la formation des deux ponts disulfures soit: 1) K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (20 équiv.), 20 min 2) purification PR-CLHP et 3) I<sub>2</sub> (15 équiv.) dans l'AcOH 80 %, 24 heures. Cette méthodologie s'est avérée très efficace et reproductible. La formation des cycles 1 et 2 a respectivement provoqué une diminution du Tr de 1,1 min et 0,4 min, comparativement aux formes linéaire et monocyclique de ET-1 (Fig. 14 a,b,c).

A cette étape, nous devons apporté une réponse à la question suivante: la protection N-formyle est-elle toujours effective après les divers traitements effectués lors de la synthèse, du clivage et des protocoles de solubilisation et cyclisation? Dans ce but, trois approches complémentaires ont été investiguées.



**Figure 14: CLHP analytique de (A) ET-1 linéaire (B) [(Cys(Acm)<sup>1,15</sup>, Trp(For)<sup>21</sup>] ET-1 et (C) [Trp(For)<sup>21</sup>] ET-1.**  
 Conditions: colonne Vydac C<sub>18</sub> (10 μm; 30 x 0,39 cm); Eluants: (A) 0,06 % TFA,  
 (B) CH<sub>3</sub>CN; gradient linéaire: 20-60 % (B) en 20 min; débit: 1,5mL/min;  
 détection: 230 nm.

Initialement, nous avons procédé au test qualitatif qui utilise le p-diméthylaminobenzaldéhyde ou réactif de Ehrlich. Celui-ci réagit avec le noyau  $\beta$ -indole pour former un complexe de teinte violette (85), ce qui est empêché par la présence du groupement formyle (86). A cause de l'ambiguïté des résultats obtenus (coloration intermédiaire), il a été impossible de déterminer avec précision si le groupement formyle était toujours présent sur le tryptophane C-terminal de ET-1. Par la suite, un échantillon de notre préparation synthétique a servi à une analyse par spectrométrie de masse (FAB-MS). Les résultats ont clairement confirmé la présence de la protection N-formyle [(M+H)<sup>+</sup> expérimental = 2522, (M+H)<sup>+</sup> théorique = 2522] (Fig. 15).

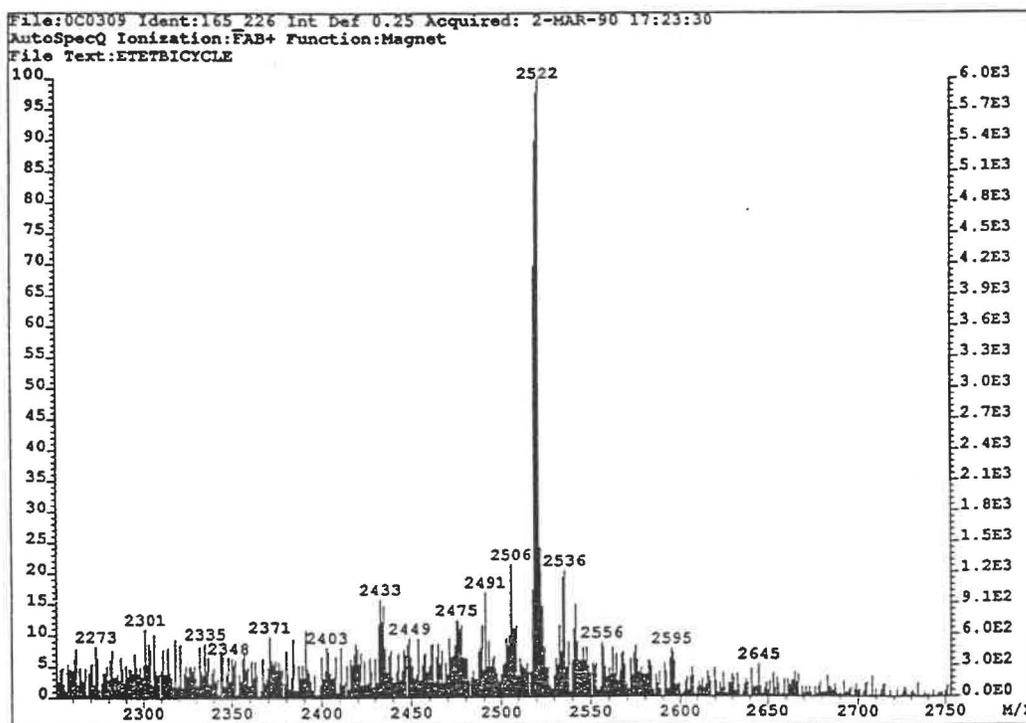


Figure 15: Spectre de masse (FAB-MS) de [Trp(For<sup>21</sup>)] ET-1.

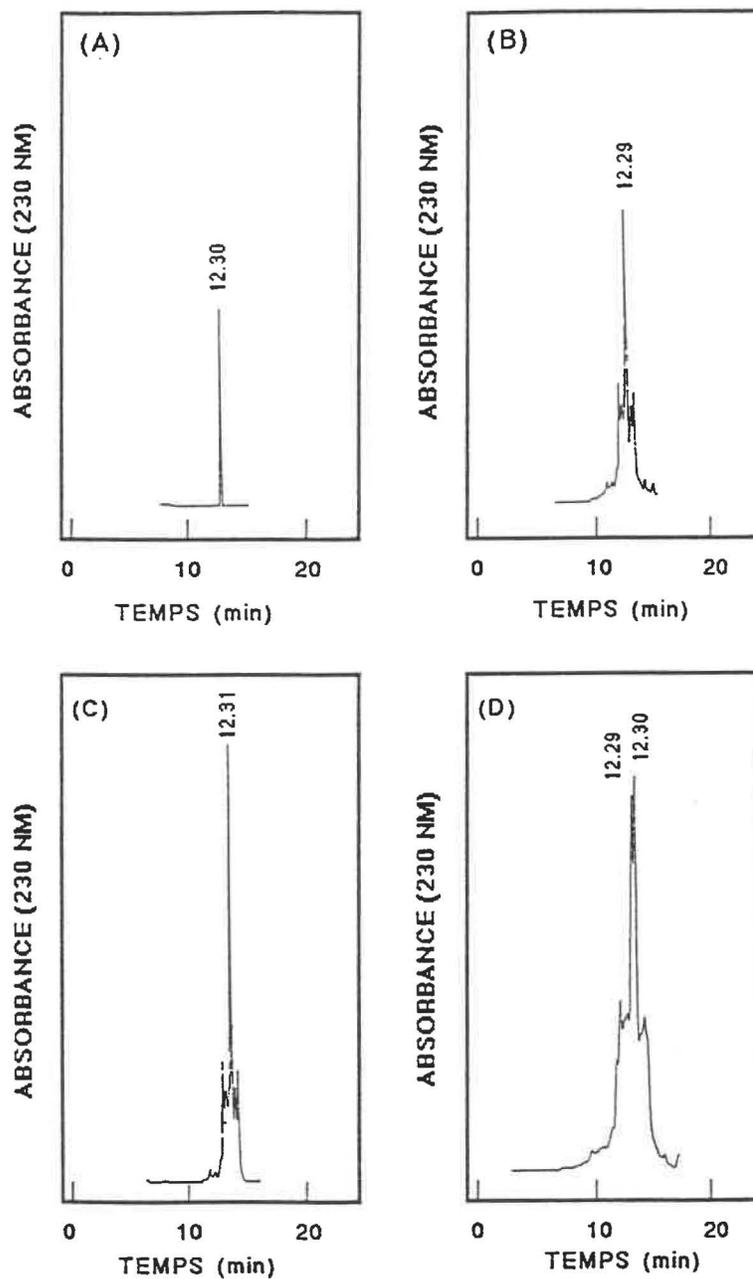
Ainsi, l'étape finale de notre stratégie synthétique consistait à éliminer le groupement protecteur formyle. La littérature scientifique fait mention de plusieurs procédures qui permettent de réaliser la déformylation du tryptophane soit 1) NaOH 0,1 N, 2 °C, 2 min 2) HCl 1 M, 12 h 3) solution aqueuse pH 11,5, 25 °C, 3 min, suivie d'une acidification à pH 4,5 4) pipéridine 0,1 N, 0 °C, 10 min, interruption de la réaction par lyophilisation 5) bicarbonate d'ammonium 0,01 M, pH 9,0, ... (56, 82, 87).

Le traitement à la pipéridine a produit les résultats escomptés. Le profil chromatographique qui résulte de la co-injection de ET-1 naturelle (Institut Henri Beaufour) et de notre peptide, traité à la pipéridine, a confirmé la présence d'une seule et même molécule (Fig. 16). De plus, l'impact du traitement à la pipéridine sur ET-1 est clairement démontré à la figure 16 d, où on peut remarquer deux pics distincts (ET-1 (For) et ET-1). Nos résultats confirment l'importance d'assurer la protection optimale du noyau indole du tryptophane lors du processus de synthèse, afin de préserver l'intégrité chimique de cet acide aminé.

Deux autres protocoles de déformylation (NaOH 0,1 M, 2 °C, 2 min et HCl 1 M, 12 h) ont été investigués, mais aucun n'a permis de reproduire les résultats obtenus avec la pipéridine (Fig. 17).

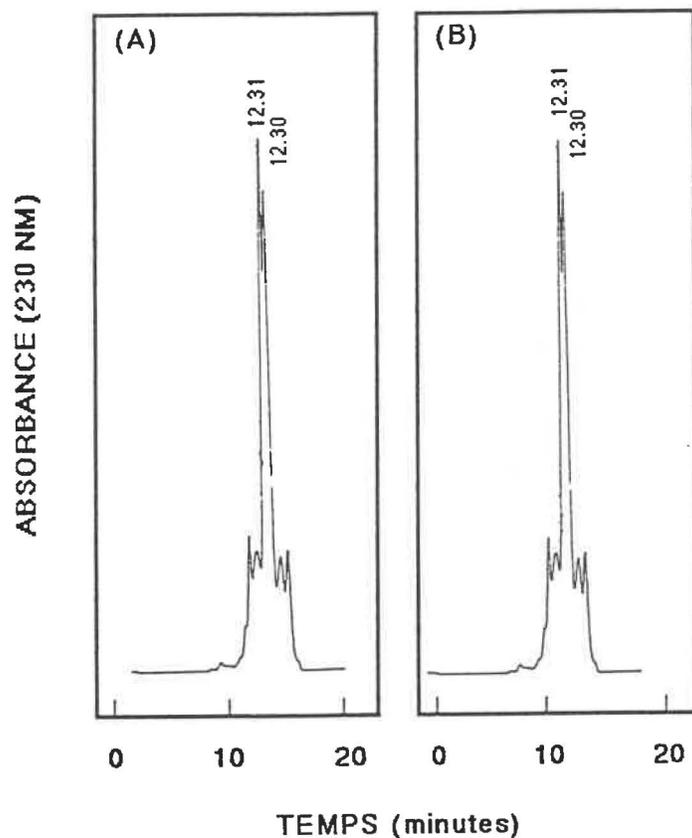
Le transfert du groupement formyle de l'azote du noyau indole à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du peptide peut être causé par certaines méthodes de déformylation. Par exemple, cette réaction secondaire a été quantifiée à près de 50 % avec le bicarbonate d'ammonium 0,01 M, pH 9,0 (85). Il est donc possible

que ce transfert irréversible soit à l'origine des résultats obtenus avec les procédures au HCl et au NaOH.



**Figure 16: CLHP analytique de (A) ET-1 commerciale, (B) ET-1 post-pipéridine, (C) co-injection de (A) et (B), et (D) co-injection de ET-1 pré- et post-pipéridine.**

Conditions: Voir figure 7.

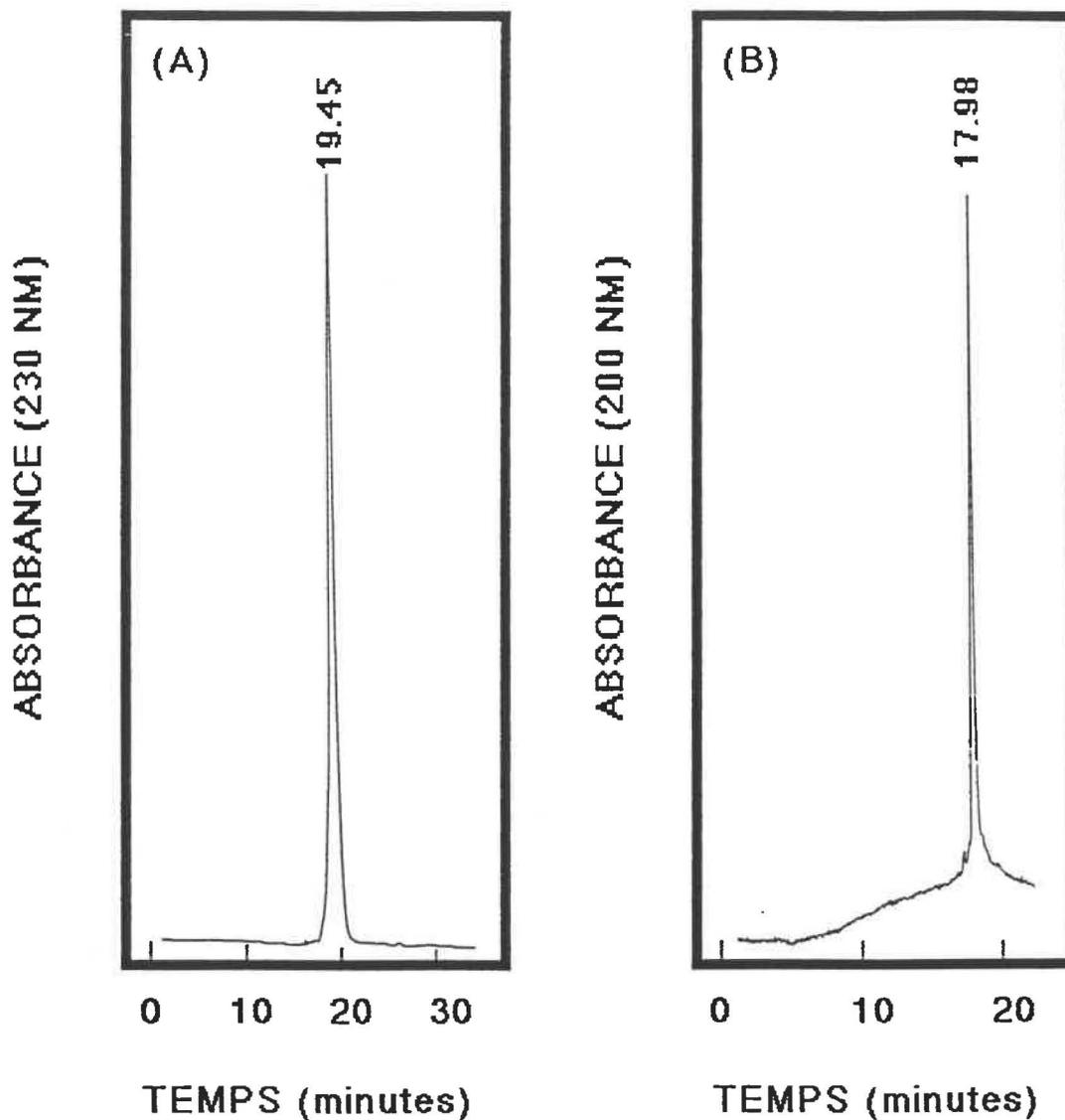


**Figure 17: CLHP analytique de ET-1 commerciale co-injectée avec (A) ET-1 post-NaOH et (B) ET-1 post-HCl.**

Conditions: Voir figure 7.

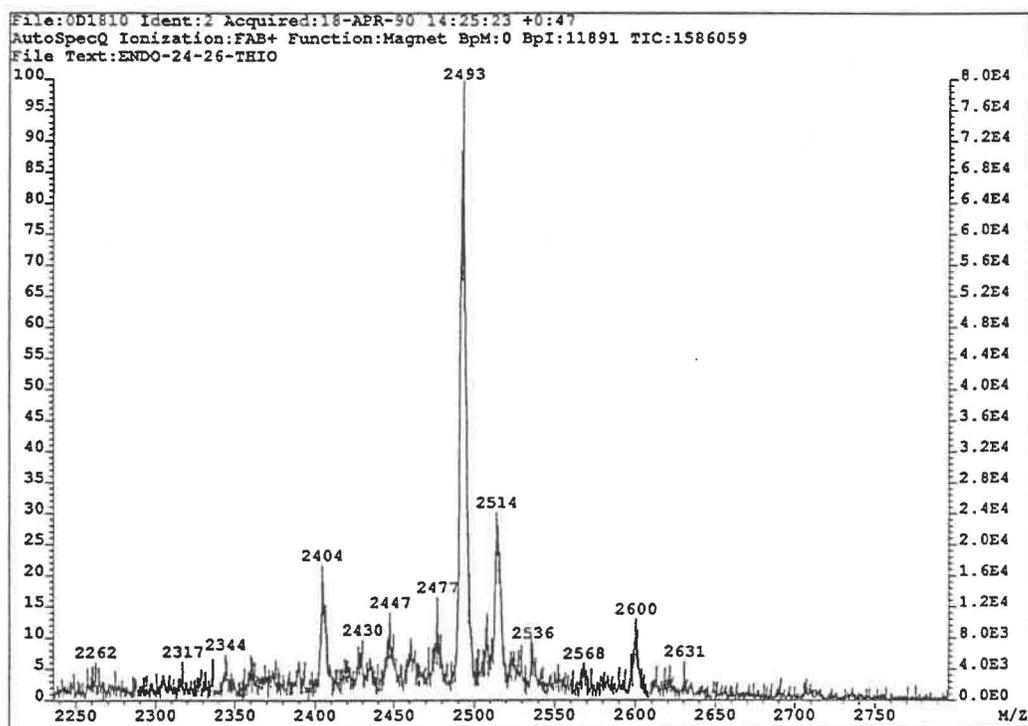
Finalement, l'endothéline déformylée à la pipéridine a été purifiée et sa pureté (> 98 %) a été confirmée par PI-CLHP et par électrophorèse capillaire (EC) (Fig. 18).

Un échantillon de ET-1 a été soumis à l'hydrolyse acide (HCl 6N, phénol 0,1 %, 110 °C, 24 h). Après l'étape de dérivation au PITC, l'analyse d'acides aminés a donné des résultats compatibles avec les valeurs théoriques.



**Figure 18: CLHP analytique et électrophorèse capillaire (EC) de ET-1.** CLHP conditions: colonne Vydac C<sub>18</sub> (5 μm; 30 x 0,39 cm); Eluants: (A) 0,06 % TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN; gradient linéaire: 20-50 % (B) en 30 min; débit: 1,0 mL/min; détection: 230 nm. Conditions EC: tampon citrate de sodium 20 mM pH 2,5. Temps d'injection: 1 sec. Tension: 20 KV. Dimensions du capillaire: (45 cm x 50 μm). Température: 30 °C. Détection: 200 nm.

De plus, le poids moléculaire expérimental obtenu par FAB-MS [(M+H)<sup>+</sup>=2493] s'est avéré identique à la valeur théorique de ET-1.



**Figure 19: Spectre de masse (FAB-MS) de ET-1.**

Afin de compléter la caractérisation de ET-1, nous avons procédé à deux essais biologiques, soit 1) évaluation de l'effet provoqué sur la pression artérielle du rat (Fig. 20) et 2) évaluation de l'effet vasoconstricteur produit au niveau de la trachée du cobaye (Fig. 21).

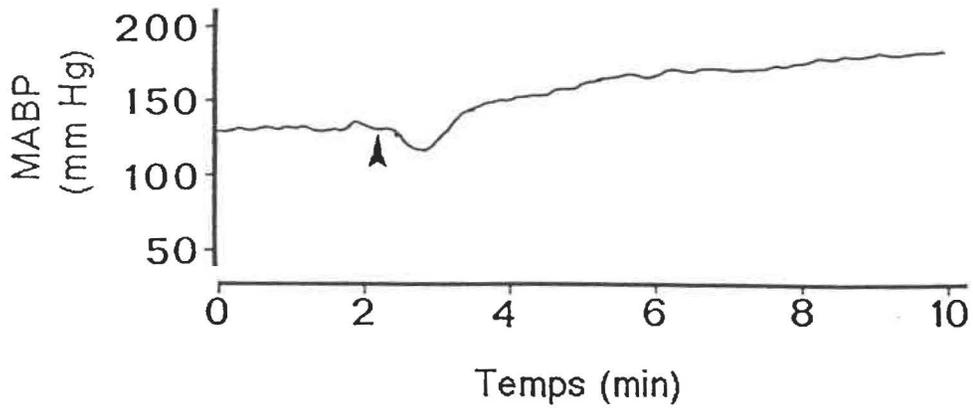


Figure 20: Effet biphasique produit par ET-1 (2 nmole/Kg) sur la pression artérielle (MABP) du rat. Conditions: voir p.47.

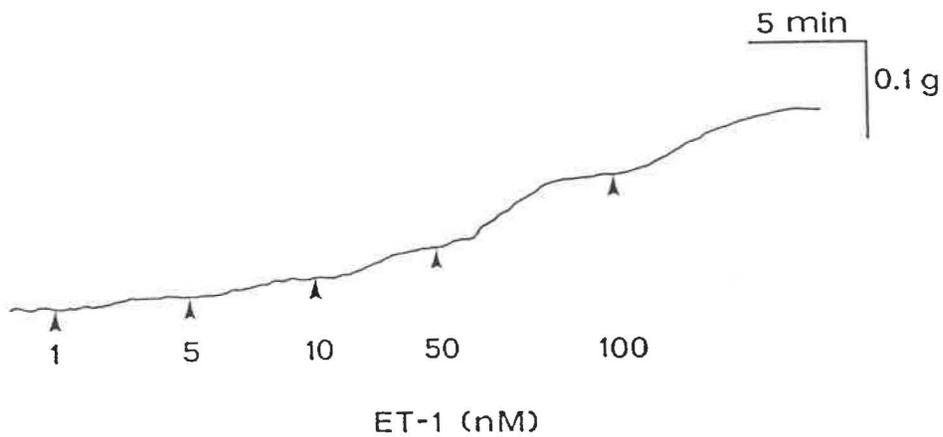
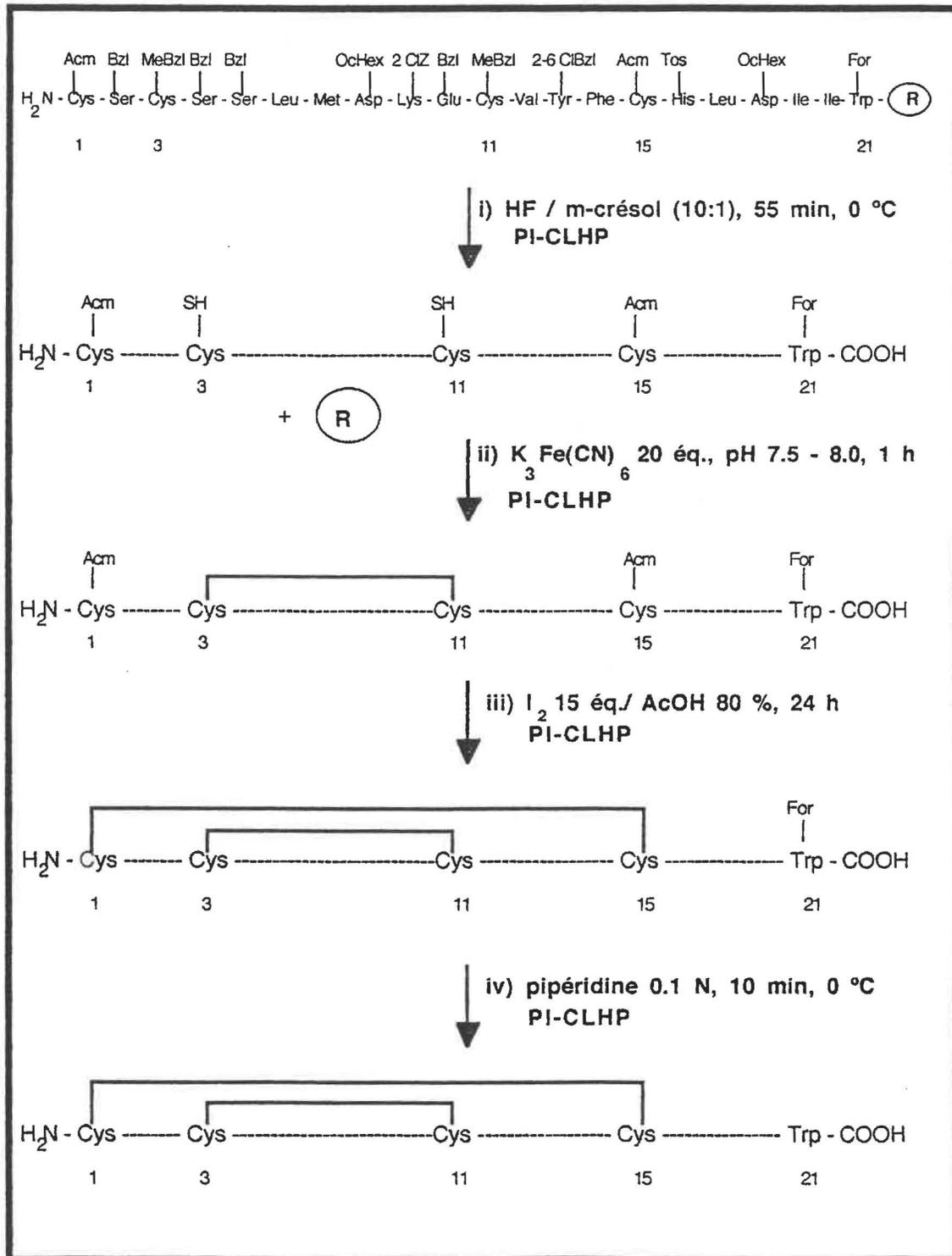


Figure 21: Réponse contractile induite par des doses cumulatives de ET-1 (1-100 nM) administrées au niveau de la trachée du cobaye. Conditions: voir p.47.

La réponse biphasique qui a été observée avec notre préparation synthétique est typique et bien documentée avec l'endothéline (1, 21, 88-90). L'effet initial est une baisse transitoire de la pression artérielle qui survient à l'intérieur de la première minute. Selon De Nucci *et al.* (21), cet effet peut être attribué à la libération d'éicosanoïdes et/ou d'EDRF par les cellules endothéliales. Par la suite, ET-1 (2 nmoles/Kg) produit une élévation significative de la pression ( $\approx 50$  mm de Hg) qui persiste pendant plus d'une heure.

Ces résultats, combinés à la réponse contractile induite par ET-1 sur la trachée isolée du cobaye, confirment l'intégrité moléculaire de notre peptide et valident notre stratégie de synthèse, présentée dans le tableau V.

Tableau V. Schéma de synthèse de ET-1



## CONCLUSION

Différentes approches ont été investiguées afin de réaliser la synthèse de l'endothéline par la méthode dite en phase solide. Les résultats obtenus, à partir de différentes procédures rapportés dans la littérature, nous ont amenés à modifier celles-ci et à développer un protocole de synthèse unique de ET-1. La stratégie retenue permet la formation régiosélective des deux ponts disulfures puisque les groupes S-protecteurs acétamidométhyle et méthylbenzyle possèdent des niveaux de stabilité chimique différents. Ainsi, les ponts disulfures (Cys 3 -11 et Cys 1-15) ont été respectivement formés par oxydation au ferricyanate de potassium et par traitement à l'iode. L'élimination de la protection formyle du tryptophane C-terminal a été réalisée par traitement à la pipéridine et le peptide a été purifié par PI-CLHP.

L'intégrité chimique du peptide, déterminée par PI-CLHP analytique, électrophorèse capillaire, analyse d'acides aminés, FAB-MS et son activité biologique évaluée par deux essais biologiques témoigne de l'excellence de notre préparation synthétique. Dorénavant, ce schéma de synthèse facilitera la réalisation d'études pharmacologiques de ET-1, pourra être adapté à la synthèse d'analogues pour des études de relation structure- activité et, finalement, pourra s'appliquer à la synthèse d'autres molécules caractérisés par des ponts disulfures multiples.

## BIBLIOGRAPHIE

1. YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASKI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K., MASAKI, T., A novel potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells, Nature, 1988, **332**, 411-415.
2. YANAGISAWA, M., MASAKI, T., Endothelin, a novel endothelium-derived peptide, Biochem. Pharmacol., 1989, **38**, 1877-1883.
3. MONCADA, S., RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M. J., Endothelium-derived relaxing factor: Identification as nitric oxide in the control of vascular tone and platelet function, Biochem. Pharmacol., 1988, **37**, 2495-2501.
4. MARGULIES, K. B., HILDEGRAND, F. L., LERMAN, A., PERRELLA, M. A., BURNETT, J. C., Increased endothelin in experimental heart failure, Circulation, 1990, **82**, 2226-2230.
5. CERNACEK, P., STEWART, D., Immunoreactive endothelin in human plasma: Marked elevations in patients in cardiogenic shock, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, **161**, 562-567.
6. MIYAUCHI, T., YANAGISAWA, M., TOMIZAWA, T., SUGISHITA, Y., SUZUKI, N., FUJINO, M., AJISAKA, R., GOTO, K., MASAKI, T., Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction, Lancet, 1989, **2**, 53-54.
7. SAITO, T., YANAGISAWA, M., MIYAUCHI, T., SUZUKI, N., MATSUMOTO, H., FUJINO, M., MASAKI, T., Endothelin in human circulating blood: Effects of major surgical stress, Jpn. J. Pharmacol., 1989, **49**, 215P.

8. LERMAN, A., TEXTOR, S. C., WIESNER, R., BURNETT, J. C., Activation of endothelin following orthotopic liver transplantation, Clin. Res., 1989, **37**, 940A.
9. FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, Nature, 1980, **288**, 373-376.
10. MONCADA, S., VANE, J. R., Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin, Pharmacol. Rev., 1979, **30**, 293-331.
11. DEMEY, J. G., VANHOUTTE, P. M., Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium, Circ. Res., 1982, 439-447.
12. HOLDEN, W. E., McCALL, E., Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium, Expl. Lung. Res., 1984, **7**, 101-112.
13. DALY, R. N., HIEBLE, J. P., Neuropeptide Y modulates adrenergic neurotransmission by an endothelium dependant mechanism, Eur. J. Pharmacol., 1987, **138**, 445-446.
14. RUBANYI, G. M., VANHOUTTE, P. M., Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium, J. Physiol., 1985, **364**, 45-46.
15. DEMEY, J. G., VANHOUTTE, P. M., Anoxia and endothelium-dependant reactivity of the canine femoral artery, J. Physiol., 1983, **335**, 65-74.
16. TAKASAKI, C., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., GOTO, K., MASAKI, T., Similarity of endothelin to snake venom toxine, Nature, 1988, **335**, 303.
17. INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K., MASAKI, T., The human endothelin family: Three structurally

- and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, **85**, 2863-2867.
18. KIMURA, C., ITOH, Y., OHKUBO, S., OGI, K., ONDA, H., FIJINO, M., Cloning and sequencing of a canine gene segment encoding mature endothelin, Nucleic. Acids. Res., 1989, **17**, 3290.
  19. JONES, C. R., HILEY, C. R., PELTON, J. T., MOHR, M., Autoradiographic localisation of endothelin binding sites in kidney, Neurosci. Lett., 1989, **97**, 276-279.
  20. FINK, G. D., PAWLOSKI, C. M., KAWAGY, N. L., MORTENSEN, L. H., Central effect of endothelin on blood pressure in conscious rats, Faseb. J., 1989, **3**, A236.
  21. DE NUCCI, G., THOMAS, P. R., D'ORLEANS-JUSTE, P., ANTUNES, E., WALDER, C. D., WARNER, T. D., VANE, J. R., Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, **85**, 9797-9800.
  22. JONES, C. R., HILEY, C. R., PELTON, J. T., MOHR, M., Autoradiographic localisation of endothelin binding sites in kidney, Neurosci. Lett., 1989, **97**, 276-279.
  23. KOSEKI, C., IMAI, M., HIRATA, Y., YANAGISAWA, M., MASAKI, T., Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide?, Am. J. Physiol., 1989, **256**, R858-R866.
  24. STASCH, J. P., STEINKE, W., KAZDA, S., NEUSER, D., Autoradiographic localization of <sup>125</sup>I-endothelin in rat tissues, Arzneim. Forsch., 1989, **39**, 59-61.
  25. KOSUKA, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, **159**, 317-323.

26. LAGENTE, V., CHABRIER, P. E., Pharmacological modulation of the bronchopulmonary action of the vasoactive peptide, endothelin, administered by aerosol in the guinea pig, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, **158**, 625-632.
27. ISHIKAWA, T., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., GOTO, K., MASAKI, T., Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria, Am. J. Physiol., 1988, **255**, H970-H973.
28. FUKUDA, Y., HIRATA, Y., YOSHIMI, H., KOJIMA, T., KOBAYASKI, Y., YANAGISAWA, M., MASAKI, T., Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cathetered rat atrial myocytes, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1988, **155**, 167-172.
29. RAKUGI, H., NAKAMARU, M., SAITO, H., HIGAKI, J., OGIHARA, T., Endothelin inhibits renin release in isolated rat glomeruli, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1988, **155**, 1244-1247.
30. ZEIDEL, M. L. et al., J. Vasc. Med. Biol., ( sous presse).
31. GOETZ, K. et al., Proc. Soc. Eup. Biol. Med., (sous presse).
32. KOMURO, I., KURIHATA, H., SUGIYAMA, T., TAKAKU, F., YAZAKI, Y., Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle, FEBS. Lett., 1988, **238**, 249-252.
33. SIMONSON, M. S., WANN, S., MENE, P., DUBYAK, G.R., KESTER, M., DUNN, M.J., Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells, J. Clin. Invest., 1989, **83**, 708-712.
34. TAKUWA, N., TAKUWA, J., YANAGISAWA, M., YAMASHITA, K., MASAKI, T., A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenic effect of serotonin in rat renal mesangial cells, J. Biol. Chem., 1989, **264**, 7856-7861.

35. TABUCHI, Y., NAKAMARU, M., RAKUGI, H., NAGAMO, M., Endothelin inhibits presynaptic adrenergic neurotransmission in rat mesentery artery, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, **161**, 803-808.
36. COZZA, E. N., GOMEZ-SANCHEZ C.E., Effects of endothelin-1 on its receptor concentration and thymidine incorporation in calf adrenal zona glomerula cells: a comparative study with phorbol esters, Endocrinology, 1990, **127**, 549-554.
37. YOSKIZAWA, T. et al., Neurosci. Lett., (sous presse).
38. JONES, C.R., HILEY, C.R., PELTON J.T., MILLER, R.C., Autoradiographic localisation of the binding sites for <sup>125</sup>I-endothelin in rat and human brain, Neurosci. Lett., 1989, **97**, 276-279.
39. KUMAGAYE, S., KURODA, H., NAKAJIMA, K., WATANABE, T. X., KIMURA, T., MASAKI, T., SAKAKIBARA, S., Synthesis and disulfide structure determination of porcine endothelin: an endothelium-derived vasoconstricting peptide, Int. J. Pept. Protein. Res., 1988, **32**, 519-526.
40. KIMURA, S., KASUYA, Y., SAWAMURA, T., SHINMI, O., SUGITA, Y., YANAGISAWA, M., GOTO, K., MASAKI, T., Structure-activity relationships of endothelin: Importance of the C-terminal moiety, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1988, **156**, 1182-1186.
41. NAKAJIMA, K., KUBO, S., KUMAGAYE, S.I., NISHIO, H., TSUNEMI, M., INUI, T., Structure-activity relationships of endothelin: Importance of charged groups, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, **163**, 424-429.
42. KASKIWABARA, T., INAGAKI, Y., OHTA, H., Putative precursors of endothelin have less vasoconstrictor activity in vitro but a potent effect in vivo, FEBS. Lett., 1989, **247**, 73-76.
43. RASMUSSEN, H., BARRETT, P. Q., Calcium messenger system: an integrated view, Physiol. Rev., 1984, **64**, 3, 938-984.

44. REYNOLDS, E. E., MOK, L. L. S., KUROKAWA, S., Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, **160**, 2, 868-873.
45. GOTO, K., KASUYA, Y., MATSUKI, N., TAKUWA, Y., KURIHARA, H., KIMURA, S., YANAGISAWA, M., MASAKI, T., Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependant, Ca<sup>++</sup> channel in vascular smooth muscle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, **86**, 3915-3918.
46. SILBERBERG, S. D., PODER, T. C., LECERDA, A. E., Endothelin increases single-channel calcium currents in coronary arterial smooth muscle cells, FEBS. Lett., 1989, **247**, 68-72.
47. VAN RENTERGHEM, C., VIGNE, P., BARHANIN, J., SCHMID-ALLIANA, A., FRELIN, C., LAZDUNSKI, M., Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1988, **157**, 977-985.
48. AUGUET, M., DELAFLOTTE, S., CHABRIER, P. E., PIROTSKY, E., CLOSTRE, F., BRAQUET, P., Endothelin and Ca<sup>++</sup> agonist BAY K8644: different vasoconstrictive properties, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1988, **156**, 186-192.
49. OHLSTEIN, E. H., HOROHONICH, S., HAY, D. W., Cellular mechanisms of endothelin in rabbit aorta, J. Pharm. Exp. Therap., 1989, **250**, 2, 548-555.
50. KLOOG, Y., AMBAR, I., SOKOLOVSKY, M., KOCHVA, E., WOLLBERG, Z., BOOLAH, A., Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: Phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain, Science, 1988, **242**, 268-270.
51. RESINK, T. J., SCOTT-BURDEN, T., BUHLER, F. R., Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1988, **157**, 1360-1368.

52. TAKUWA, N., TAKUWA, Y., YANAGISAWA, M., YAMASHITA, K., MASAKI, T., J. Biol. Chem., (sous presse).
53. MIASIRO, N., YAMAMOTO, H., KANAIDE, H., NAKAMURA, M., Does endothelin mobilize calcium from intracellular store sites in rat aortic vascular smooth muscle cells in primary culture?, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1988, **156**, 312-317.
54. PARK, S., RASMUSSEN, H., Carbachol-induced protein phosphorylation changes in bovine tracheal smooth muscle, J. Biol. Chem., 1986, **261**, 15734-15739.
55. MERRIFIELD, R. B., Solid-phase peptide synthesis, J. Am. Chem. Soc., 1963, **85**, 2149-2154.
56. STEWART, J. M., YOUNG, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 1984, 2e edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.
57. KENT, S. B. H., Chemical synthesis of peptides and proteins, Ann. Rev. Biochem., 1988, **57**, 957-989.
58. TAM, J. P., WONG, T. W., RIEMEN, M. W., TJOENG, F. S., MERRIFIELD, R. B., Cyclohexyl ester as a new protecting group for aspartyl peptides to minimize aspartimide formation in acidic and basic treatments, Tetrahedron Lett., 1979, 4033-4036.
59. YAJIMA, H., TAKEYAMA, M., KANAOKI, J., NISHIMURA, O., FUJINO, M., Chem. Pharm. Bull., 1978, **26**, 3752-3757.
60. SHEEHAN, J. C., HESS, G.P., Forming peptide bonds, J. Am. Chem. Soc., 1955, **77**, 1067.
61. CASTRO, B., DORMOY, J. R., EVIN, G., SELVE, C., Peptide coupling reagents, Tetrahedron Lett., 1975, 1219-1222.

62. FOURNIER, A., WANG, C. T., FELIX, A. M., Application of BOP reagent in solid phase synthesis, Int. J. Peptide Protein Res., 1988, **31**, 86-97.
63. CASTRO, B., DORMOY, J. R., EVIN, G., SELVE, C., Peptide coupling reagents: Part VII, J. Chem. Res., 1977, (S), 182.
64. KLOPMAN, G., J. Am Chem. Soc., 1968, **90**, 223.
65. UEMURA, S., TANAKA, S., OKANO, M., The efficient oxidation of thiols to disulfides with thallium acetate, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1977, **50**, 220.
66. KAISER, E., COLESCOTT, R. L., BOSSINGER, C. D., COOK, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase spps, Anal. Biochem., 1970, **34**, 595-598.
67. FOREST, M., FOURNIER, A., BOP reagent for the coupling of pGlu and Boc-His(Tos) in solid phase peptide synthesis, Int. J. Peptide Protein Res., 1989, **33**, 2135-2141.
68. TAM, J. P., HEATH, W. F., MERRIFIELD, R. B., SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: Evidence and application in Peptide synthesis, J. Am. Chem. Soc., 1983, **105**, 6442-6455.
69. YAJIMA, H., FUNAKOSHI, S., WATANABE, T., MURAYAMA, E., OTAKA, A., New strategy for the chemical synthesis of proteins, Tetrahedron, 1988, **44**, 3, 805-819.
70. PHOTAKI, I., Topics in Sulfur Chemistry, Stuttgart, G. Thieme, (Senning, A. ed.), 1976, vol 1, 111-183.
71. HISKEY, R. G., The Peptides, New York, Academic Press, (Gross, E., Meienhofer, J. ed.), 1981, vol 3, 137-167.

72. VAN RIETSCHOTEN, J., PEDROSO, E., GRANIER, C., Peptides: Proceedings of the fifth. American Peptide Symposium, New York, John Wiley & Sons, (Goodman, M., Meienhofer, J. ed.), 1977, 522-524.
73. NUTT, R. F., BRADY, S. F., LYLE, T. A., CICCARONE, T. M., Protides of the Biological Fluids, Oxford, Pergamon Press, (Peeters, H. ed.), 1986, 34, 55-58.
74. FUJII, N., FUNAKOSHI, S., KOIDE, T., MASUDA, M., OTAKA, A., Faculté de pharmacologie, Université Kyoto, Sakyo-ku, kyoto 606, Japon, 1990, (sous presse).
75. RIVIER, J., BRAZEAU, P., VALE, W., GUILLEMIN, R., Somatostatin analogs. Relative importance of the disulfide bridge and of the Ala-Gly side chain for biological activity, J. Med. Chem., 1975, **18**, 123-126.
76. KAMBER, B., RITTEL, M., Cystine peptide synthesis, Helv. Chim. Acta, 1971, **54**, 927.
77. FUJII, N., OTAKA, S., WATANABE, T. OKAMICHI, A., TAMAMURA, H., Silver trifluoromethanesulphonate as an S-protecting reagent for the synthesis of cystine peptides, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1989, 283-284.
78. FUJII, N., OTAKA, S., FUNAKOSHI, S., BESSHO, K., YAJIMA, J., New procedure for the synthesis of cystine-peptides by oxydation of S-substituted cysteine peptides with thallium trifluoroacetate, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1987, 163.
79. MORIMOTO, H., FUJII, N., OTAKA, A., KURAMOCHI, K., YAJIMA, H., Silver trifluoromethanesulphonate as a S- ACM deprotecting reagent and its application to the synthesis of endothelin and endothelin-derived peptide, Peptide Chemistry, 1988, 211-214.

80. LANDINI, D., MODENA, G., MONTANARI, F., SCORRANO, G., Reduction and racemization of sulfoxides by halide ions in aqueous perchloric acid, J. Am.Chem. Soc., 1970, **92**, 7168.
81. BODANSKY, M., MARTINEZ, J., Side Reactions in Peptide Synthesis, New York, G. Thieme, 1981, 333-356.
82. BARANY, G., MERRIFIELD, R. B., Peptides: Analysis Synthesis Biology vol II. Special Methods in Peptide Synthesis Part A., Toronto, Academic Press, (Gross, E. and Meinhofer, J. ed.), 1980, 3-284.
83. OHNO, M., TSUKAMOTO, S., MAKISUMI, S., IZUMIYA, S., Improved solid-phase synthesis of tryptophan-containing peptides 1., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1972, **45**, 2852-2855.
84. MATSUEDA, G. R., Deprotection of Nin-formyl tryptophan using 1-2 ethanedithiol in liquid hydrogen fluoride, Int. J. Pept. Protein Res., 1982, **20**, 26-34.
85. SPIES, J.R., CHAMBERS, D.C., Anal. Chem., 1950, **22**, 1209-1210.
86. OHNO, M., TSOKAMOTO, S., SATO, S., IZUMIYA, N., Improved solid-phase synthesis of tryptophan-containing peptides, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1973, **46**, 3280-3285.
87. YAMASHIRO, D., LI, C.H., Protection of tryptophan with the formyl group in peptide synthesis, J. Org. Chem., 1973, **38**, 2594-2597.
88. YANAGISAWA, M., INOUE, A., ISHIKAWA, T. KASUYA, Y., KIMURA, S., KUMAGAYE, S., Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, as endothelium-derived vasoconstricting peptide, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, **85**, 6964-6967.

89. WRIGHT, C. E., FOZARD, J. R., Regional vasodilatation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anesthetized, spontaneously hypertensive rats, Eur. J. Pharmacol., 1988, **155**, 201-203.
  
90. KASHIWABARA, T., INAGAKI, Y., OHTA, H., Putative precursors of endothelin have less vasoconstrictor activity in vitro but a potent pressor effect in vivo, Febs. Lett., 1989, **247**, 73-76.