

50376
1990
21

69572

50376
1990
21

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES
ARTOIS

N° d'ordre 498

TOURNAI

Thèse pour l'obtention du Doctorat en
Chimie Organique et Macromoléculaire

Présentée le 9 Février 1990

par

Jean-Philippe DEFOORT

**ETUDES DE STRUCTURES PEPTIDIQUES MINIMALES
SUSCEPTIBLES D'INTERFERER AVEC L'INFECTION DE LA
CELLULE HOTE PAR *TRYPANOSOMA CRUZI***



Jury: Pr. H. SLIWA (Président, Rapporteur)

Pr. A. TARTAR

Dr. D. BLANOT (Rapporteur)

Dr. H. GRAS-MASSE

Dr A. OUAISSI

Ce travail a été réalisé dans le service de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille (Professeur TARTAR), en collaboration avec le Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille (Professeur CAPRON).

Le financement de ce travail a été assuré par une bourse de type Docteurs-Ingénieurs cofinancée par la Région Nord/Pas-de-Calais et le C.N.R.S.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur A. TARTAR pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir confié ce sujet en me prodiguant conseils et critiques durant ces trois années. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur H. SLIWA, dont j'ai pu apprécier la clarté de l'enseignement lors de la préparation du DEA de Chimie Organique et Macromoléculaire, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je voudrais exprimer le témoignage de ma profonde et amicale gratitude à Madame H. GRAS-MASSE qui a dirigé ce travail de thèse avec une diligente bienveillance.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur D. BLANOT qui m'a fait l'honneur de bien vouloir juger cette thèse.

Je voudrais remercier Monsieur A. OUAISSI qui m'a accueilli chaleureusement dans son laboratoire et m'a constamment fait bénéficier de ces conseils et de ces encouragements tout au long de ce travail.

Ces travaux ont fait l'objet de nombreuses collaborations avec les membres du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille.

J'adresse mes plus vifs remerciements Madame Cornette qui a réalisé les tests de compétition au moyen des peptides analogues du Arg-Gly-Asp-Ser.

Je tiens à remercier Monsieur Loyens pour la production des anticorps monoclonaux.

Mes remerciements s'adressent également à Messieurs Afchain et Caron qui ont mené les études de protection.

Je remercie Monsieur Pestel qui m'a aidé avec bienveillance à étudier la réponse lymphocytaire induite par les peptides.

Je tiens à remercier Monsieur Ricard de l'USTL qui a réalisé les études en spectrométrie de masse FAB.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du Service de Chimie des Biomolécules pour ces trois années passées en leur compagnie.

Enfin, je voudrais remercier Catherine, mes parents, ma famille et mes amis pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté durant ce travail.

Ces travaux ont fait l'objet des communications suivantes:

Use of synthetic peptides in two different approaches to interfere with the host-cell penetration by *Trypanosoma cruzi*.

Ouaissi A., Defoort J.P., Afchain D., Gras-Masse H., Cornette J., Caron H., Tartar A., Capron A.

Dans *Synthetic peptides : approaches to biological problems*, p 43-50, Alan R. Liss, Inc, 1989.

Immunization with a synthetic peptide partially protects mice from lethal infection with *Trypanosoma cruzi*.

Defoort J.P., Ouaissi A., Afchain D., Gras-Masse H., Cornette J., Caron H., Tartar A., Capron A.

Dans *Second Forum on Peptides*. Eds A. AUBRY, M. MARRAUD, B. VITOUX. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, 1989, 174, 515-518.

Abréviations

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

RGD: Arginine-Glycine-Acide aspartique

Fn 80-88C: Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys (Acm)

GPtrypo C63-80: Cys-Asp-Lys-Lys-Glu-Ser-Gly-Asp-Ser-Glu-Asp-
Lys-Lys-Gly-Ser-Gly-Asp-Ser-Glu

| | |
|-------|---|
| AcOEt | : acétate d'éthyle |
| AcOH | : acide acétique |
| Acm | : acétamidométhyle |
| Boc | : tertiobutyloxycarbonyle |
| BOP | : hexafluorophosphate de benzotriazolyl N- oxytrisdiméthylaminophosphonium |
| Bsa | : sérum albumine bovine |
| CHx | : cyclohexyle |
| DCC | : dicyclohexylcarbodiimide |
| DIEA | : diisopropyléthylamine |
| DMF | : diméthylformamide |
| DMSO | : diméthylsulfoxyde |
| Dnp | : dinitrophényle |
| ELISA | : Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| FAB | : Fast Atom Bombardment |

FITC : isothiocyanate de fluorescéine
HF : fluorure d'hydrogène
HOBT : Hydroxybenzotriazole
kDa : kilo dalton
KLH : hémocyanine de patelle
MeOH : méthanol
Ova : ovalbumine
TFA : acide trifluoroacétique
Tos : tosyle
Z : benzyloxycarbonyle

SOMMAIRE

| | |
|---|------|
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | p 1 |
| GÉNÉRALITÉS | |
| A- LA MALADIE DE CHAGAS | p 3 |
| 1- INTRODUCTION | p 3 |
| 2- LE CYCLE EVOLUTIF | p 3 |
| 3- LA PATHOLOGIE | p 4 |
| <u>3. 1- Phase aigue</u> | p 5 |
| <u>3. 2- Phase chronique</u> | p 5 |
| 4- ETUDE DES MECANISME D'ADHESION | p 7 |
| <u>4. 1- Généralités</u> | p 7 |
| <u>4. 2- La fibronectine</u> | p 8 |
| <u>4. 3- Les protéines de surface du trypomastigote</u> | p 11 |
| B- LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE | p 15 |
| 1- INTRODUCTION | p 15 |
| 2- LES SUPPORTS SOLIDES | p 16 |
| 3- LA SYNTHÈSE EN "SACHETS" | p 18 |
| 4- FORMATION DE LA LIAISON PEPTIDIQUE | p 20 |
| <u>4. 1- Activation par les carbodiimides</u> | p 20 |
| <u>4. 2- Le BOP</u> | p 22 |
| 5- CLIVAGE DE LA LIAISON PEPTIDE RESINE | p 23 |
| 6- PURIFICATIONS ET CONTRÔLES | p 24 |
| <u>6. 1- Filtration sur gel</u> | p 25 |
| <u>6. 2- Chromatographie liquide à haute performance</u> | p 26 |
| <u>en phase inverse</u> | |
| <u>6. 3- Contrôles</u> | p 26 |
| 6. 3. 1- Analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale | p 27 |
| 6. 3. 2- Spectrométrie de masse FAB | p 28 |

NOUVELLES STRATEGIES

| | |
|--|------|
| A- RECHERCHES D'ANALOGUES DE ARG-GLY-ASP-SER SPECIFIQUES DU RECEPTEUR PARASITAIRE | p 31 |
| 1- INTRODUCTION | p 31 |
| 2- SYNTHESE DES ANALOGUES DE Arg-Gly-Asp-Ser | p 33 |
| <u>2. 1- Stratégies de synthèse</u> | p 33 |
| 2. 1. 1- Choix des groupes protecteurs | p 34 |
| 2. 1. 1. 1- Arg-Xxx-Asp-Ser | p 34 |
| 2. 1. 1. 2- Arg-Gly-Asp-Xxx | p 37 |
| 2. 1. 1. 3- Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser | p 37 |
| <u>2. 2- Clivage au fluorure d'hydrogène</u> | p 37 |
| <u>2. 3- Purifications et analyses</u> | p 38 |
| <u>2. 4- Résultats</u> | p 39 |
| <u>2. 5- Analyse des problèmes rencontrés</u> | p 40 |
| 3- SYNTHESES DES PEPTIDES ANALOGUES DU Arg-Gly-Asp-Ser AVEC DES ACIDES AMINES DE SERIE D | p 48 |
| <u>3. 1- Stratégie de synthèse</u> | p 49 |
| <u>3. 2- Résultats</u> | p 50 |
| 4- RESULTATS BIOLOGIQUES | p 51 |
| <u>4. 1- Choix des méthodes d'investigations.</u> <u>Adhésion fibronectine-parasite</u> | p 51 |
| <u>4. 2- Résultats</u> | p 53 |
| 4. 2. 1- Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser | p 54 |
| 4. 2. 2- Arg-Gly-Asp-Xxx | p 55 |
| 4. 2. 3- Arg-Xxx-Asp-Ser | p 56 |
| <u>4. 3- Conclusion</u> | p 56 |
| B- CIBLAGE DE DROGUES | p 58 |
| 1- INTRODUCTION | p 58 |
| 2- CHOIX DU PORTEUR | p 59 |
| 3- CHOIX DES DROGUES | p 60 |
| <u>3. 1- Benznidazole</u> | p 61 |
| <u>3. 2- Acridine</u> | p 62 |
| 4- SYNTHESES DES PEPTIDYL-DROGUES | p 63 |
| <u>4. 1- Synthèse des nitro-2 imidazolyl-peptides</u> | p 63 |
| 4. 1. 1- Synthèse de l'acide nitro-2 imidazolyl acétique | p 63 |
| 4. 1. 2- Couplage de l'acide nitro-2 imidazolyl 1- acétique sur les peptidyl-résines | p 64 |
| <u>4. 2- Synthèse des acridinyl-peptides</u> | p 66 |

| | | |
|-----------|--|------|
| 4. 2. 1- | Synthèse de l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9) amino-6 hexasanoïque (I) | p 66 |
| 4. 2. 2- | Couplage de l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9) amino-6 hexasanoïque (I) sur les peptidyl-résines | p 67 |
| 5- | ETUDE DE LA TOXICITE DES DROGUES | p 69 |
| 5. 1- | <u>Choix de la méthode d'investigation</u> | p 69 |
| 5. 2- | <u>Nitro-2 imidazolyl-peptides</u> | p 69 |
| 5. 3- | <u>Acridinyl-peptides</u> | p 70 |
| 5. 4- | <u>Etude de l'affinité des peptidyl-drogues sur les trypomastigotes</u> | p 71 |
| 6- | CONCLUSIONS | p 72 |
| C- | IMMUNOGENES SYNTHETIQUES | p 74 |
| 1- | INTRODUCTION | p 74 |
| 2- | PREPARATION D'IMMUNOGENES: COUPLAGE DE PEPTIDES SUR PROTEINES PORTEUSES | p 76 |
| 2. 1- | <u>Choix de la méthode de couplage</u> | p 77 |
| 2. 1. 1- | Agent homobifonctionnel | p 77 |
| 2. 1. 2- | Les carbodiimides hydro-solubles | p 77 |
| 2. 1. 3- | Agent hétérobifonctionnel | p 78 |
| 2. 2- | <u>Dosage de la quantité de peptide couplé sur la protéine porteuse par analyse d'acides aminés</u> | p 79 |
| 3- | CHIMIE DU PEPTIDE GP 85 trypo C63-80 | p 81 |
| 3. 1- | <u>Synthèse</u> | p 81 |
| 3. 2- | <u>Modifications du peptide GP 85 trypo C63-80</u> | p 82 |
| 3. 2. 1- | Couplage du peptide GP 85 trypo C63-80 sur une colonne de gel Sepharose | p 83 |
| 3. 2. 2- | Marquage du peptide GP 85 trypo 69-80 à la fluorescéine | p 83 |
| 3. 2. 3- | Couplage de GP 85 trypo C63-80 sur protéine porteuse | p 84 |
| 4- | RESULTATS BIOLOGIQUES | p 85 |
| 4. 1- | <u>Le peptide GP 85 trypo C63-80 appartient-il au recepteur parasitaire pour la fibronectine?</u> | p 85 |
| 4. 2- | <u>Effet protecteur du peptide GP 85 trypo 63-80 chez des souris immunisées</u> | p 87 |
| 4. 3- | <u>Influence du peptide GP 85 trypo C63-80 sur les lymphocytes T et B</u> | p 88 |
| 4. 3. 1- | Restimulation des lymphocytes T de souris | p 88 |
| 4. 3. 2- | Stimulation polyclonale B induite par GP 85 trypo C63-80 | p 90 |
| 4. 4- | <u>Conclusions</u> | p 91 |

| | |
|--|-------|
| 5- SYNTHÈSE D'IMMUNOGÈNES CHIMIQUEMENT DÉFINIS | p 94 |
| <u>5. 1- Synthèses des candélabres</u> | p 96 |
| 5. 1. 1- Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre | p 97 |
| 5. 1. 2- Fn 80-89-candélabre | p 98 |
| 5. 1. 3- Nouvelles méthodes | p 98 |
| 5. 1. 3. 1- Synthèse de "candélabre-MC" | p 99 |
| 5. 1. 3. 2- Couplage d'un peptide réduit sur le "candélabre-MC" | p 100 |
| 5. 1. 4- Conclusion | p 101 |
| <u>6- ANTICORPS MONOCLONAL ANTI Arg-Gly-Asp-Ser, RESULTATS</u> | p 103 |

| | |
|---------------------|-------|
| CONCLUSION GÉNÉRALE | p 107 |
|---------------------|-------|

| | |
|----------------------|-------|
| MATÉRIEL et MÉTHODES | p 112 |
|----------------------|-------|

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION GENERALE

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine, due à un protozoaire flagellé, le *Trypanosoma cruzi*, est une endémie qui sévit exclusivement en Amérique du sud. Malgré les efforts développés pour combattre cette parasitose, (éradication de l'hôte vecteur, la réduve, recherche de nouveaux médicaments), elle reste encore un problème majeur dans ces régions.

Les substances actives contre le *Trypanosoma cruzi* ne peuvent être utilisées qu'en phase aiguë de la maladie et pour de courtes périodes en raison de leurs fortes toxicités. Par ailleurs, le caractère auto-immun de la maladie, surtout développé en phase chronique, ne permet pas l'obtention de vaccin "conventionnel" à partir d'extraits totaux de parasites.

La phase d'adhésion du parasite sous forme trypomastigote aux cellules hôtes, indispensable avant l'invasion, constitue une étape cruciale du cycle parasitaire.

Divers études ont permis de montrer que la fibronectine, une glycoprotéine dimère, était impliquée dans les phénomènes d'adhésion, en jouant le rôle d'un pont, entre les trypomastigotes et les cellules hôtes. En effet, la fibronectine, par son site minimum d'attachement cellulaire le tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser, est capable de se fixer sur ces deux types de cellules. Cette fixation, spécifique, peut être déplacée par compétition avec des peptides contenant une telle séquence.

Par ailleurs, la séquence primaire d'un fragment d'une protéine de surface de 85 kDa de la forme invasive du parasite (trypomastigote) impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de pénétration a pu être déterminée.

A partir de ces définitions, à l'échelle submoléculaire, des phénomènes impliqués dans l'adhésion, nous avons envisagé de nouvelles approches susceptibles d'interférer avec le cycle parasitaire:

- par inhibition de la fixation du trypomastigote sur la cellule hôte à l'aide de peptides analogues de Arg-Gly-Asp-Ser. La mise en évidence d'un tel peptide pourrait ensuite permettre d'envisager son utilisation comme porteur en vue du ciblage de drogue sur le trypomastigote afin d'augmenter l'efficacité de cette drogue et de diminuer sa toxicité.

- par neutralisation de l'infectivité du parasite après vaccination au moyen d'immunogène synthétique représentant un fragment de la structure parasitaire impliquée dans ces phénomènes d'adhésion.

Après la description du parasite et des mécanismes d'adhésion mis en jeu au cours de l'infection, nous présenterons les nouvelles techniques que nous avons dû introduire au laboratoire pour l'obtention des peptides: la synthèse multiple en phase solide, l'hydrolyse acide totale en phase gaz, le clivage au fluorure d'hydrogène en multiposte, l'utilisation de la spectrométrie de masse FAB comme outil pour la résolution de certains problèmes inhérents à la synthèse.

Ensuite, nous traiterons les différents résultats obtenus en chimie et en biologie dans trois chapitres concernant la recherche d'analogues de Arg-Gly-Asp-Ser, le ciblage de drogue sur le trypomastigote et les immunogènes synthétiques.

GENERALITES

A- LA MALADIE DE CHAGAS

1- INTRODUCTION.

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine est une parasitose due à un protozoaire flagellé *Trypanosoma cruzi* transmis à l'hôte par un insecte hématophage (réduve). Elle concerne de 10 à 20 millions de sujets et représente un risque pour environ 65 millions de personnes dans les zones d'endémies.

Cette maladie sévit exclusivement sur le continent américain (OMS, 1985). Il existe des vecteurs et des réservoirs sauvages infectés dans le sud des Etats-Unis mais l'infection humaine y est absente à l'exception de rares cas autochtones. Elle se rencontre presque exclusivement du Mexique à l'Argentine et au Chili. Dans ces vastes régions, la majorité des cas se produisent dans les zones rurales et péri-urbaines où la maladie est endémique en raison des conditions socio-économiques de la population et de la nature domestique du porteur.

2- LE CYCLE EVOLUTIF.

La transmission est habituellement assurée par des arthropodes vecteurs, les réduves. Ce sont de gros hémiptères proches des punaises dont ils ont les moeurs. Ils sont hématophages à tous les stades de leur développement (larve, nymphe, adulte) et dans les deux sexes. La piqûre, indolore, ne réveille pas le dormeur. Les réduves se contaminent en prenant leur repas sanguin sur un homme ou un animal parasité. Deux à trois semaines plus tard, ils deviennent infestants et rejettent

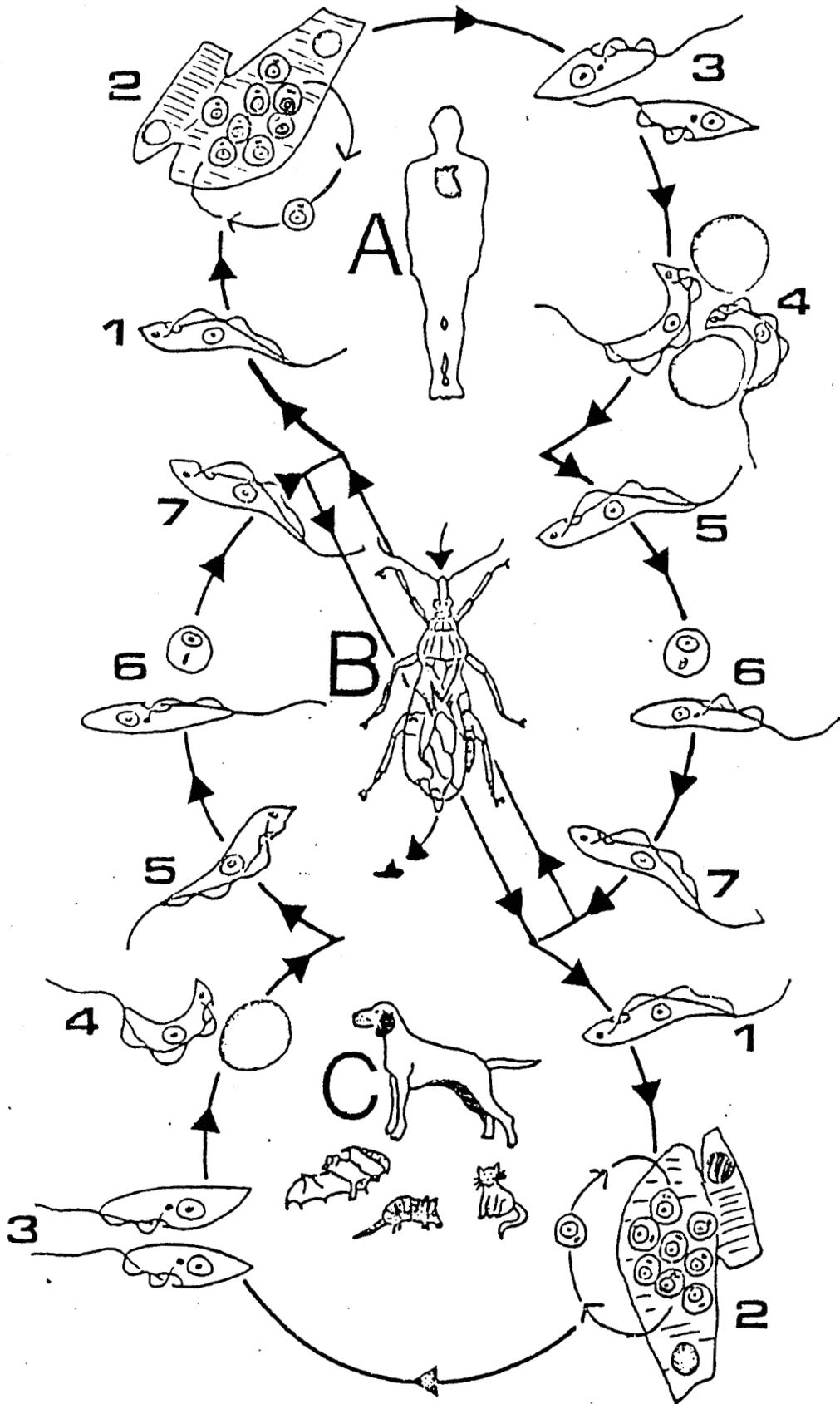


figure 1: cycle évolutif de la maladie de Chagas due à *T. cruzi*. A et C = évolution chez l'homme et le "réservoir de virus" (chien, chat, rongeur,...) : 1) trypanomastigotes métacycliques transmis avec les déjections de la punaise sur la peau ou les muqueuses. 2) phase de multiplication des amastigotes dans les fibres musculaires. 3) épimastigotes. 4) trypanomastigotes dans le sang périphérique. B = évolution dans le tube digestif d'une punaise (*Triatoma*, *Rhodnius*) 5) trypanomastigotes après ingestion. 6) phase de multiplication des amastigotes et des épimastigotes. 7) trypanomastigotes métacycliques dans les déjections de l'insecte vecteur.

de nombreux trypanosomes dans leurs déjections. L'exonération étant contemporaine de la piqûre, les déjections virulentes sont déposées sur les téguments. Les parasites pénètrent dans l'organisme à la faveur d'une excoriation cutanée ou en traversant les muqueuses (figure 1: cycle évolutif)

La forme trypomastigote (ou *Trypanosoma*) se rencontre dans le sang des malades: elle est extracellulaire et mesure environ 20 microns. Son blépharoplaste postérieur est volumineux. Sa membrane ondulante, peu plissée, se prolonge en avant par un flagelle.

La forme amastigote (ou *Leishmania*), phase intracellulaire obligatoire, vit dans les cellules réticulo-histiocytaires et musculaires striées des malades. Elle n'a qu'un appareil flagellaire rudimentaire. Elle est de forme arrondie, de 10 microns de diamètre, et peut être reconnue par son kinétoplaste, volumineux batonnet intracytoplasmique franchement coloré par l'hématoxyline.

Chez les invertébrés, *T. cruzi* habite le tube digestif de l'insecte vecteur. On le trouve sous différentes formes: épimastigotes et trypomastigotes métacycliques.

3- LA PATHOLOGIE.

La maladie évolue en deux phases: aiguë et chronique. Entre ces deux phases, une longue période d'une à plusieurs années peut s'établir. Le diagnostic est évoqué le plus souvent au cours de la phase chronique de la maladie.

3. 1- Phase aiguë

Elle apparait dans 90% des cas chez des sujets jeunes, agés de moins de 15 ans, principalement chez des enfants de moins de 4 ans.

Le début de la phase aiguë est marqué par l'apparition d'une fièvre élevée et par un accident primaire variable avec la porte d'entrée du parasite.

Le taux de mortalité en phase aiguë de la maladie de Chagas est bas chez les humains. Probablement moins de 10% des malades en meurent, et ceux-la sont généralement des enfants qui développent des insuffisances cardiaques ou bronchopneumonies non spécifiques. Dans la majorité des cas, tout semble rentrer dans l'ordre en quelques semaines, bien qu'ils continuent d'être infectés (Andrade, 1983).

3. 2- Phase chronique

Quelques mois ou années après la phase aiguë, peuvent prendre place des manifestations pathologiques comme des troubles cardiaques, atteintes du système nerveux autonome.

Cette phase est caractérisée par une parasitémie très faible. Les parasites intracellulaires étant rares, non décelables morphologiquement, il semble peu probable qu'ils soient responsables des lésions observées. Des mécanismes auto-immuns sont certainement impliqués dans le développement de ces lésions tardives, sans que l'on puisse à l'heure actuelle, attribuer un rôle prépondérant aux cellules cytotoxiques ou aux auto-anticorps.

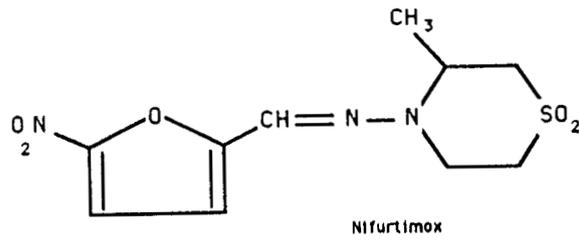
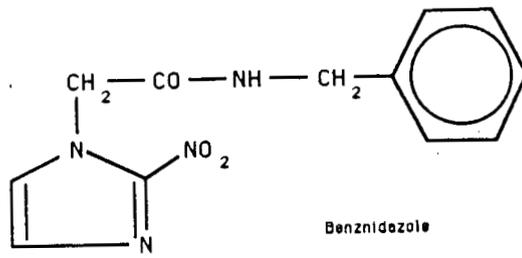


figure 2: formules du Nifurtimox et Benznidazole.

Les moyens à notre disposition à l'heure actuelle pour lutter contre cette maladie sont très limités. En effet, seuls deux médicaments peuvent être utilisés pour l'enrayer. Il s'agit du Benznidazole et du Nifurtimox (figure 2). Ils appartiennent respectivement aux familles des nitro-2 imidazoles et nitro furannes. Il est à noter que ces deux produits ne peuvent être prescrits qu'en phase aiguë de la maladie, pour une courte durée, en raison de leurs fortes toxicités. En phase chronique, seuls les traitements symptomatiques pourront être appliqués pour atténuer les troubles engendrés

En raison du caractère auto-immun de cette pathologie, l'immunisation avec des parasites tués ou provenant de souches non virulantes est alors impossible.

Compte tenu du tableau dressé quant aux possibilités offertes afin de lutter contre cette maladie, ainsi qu'à l'urgence qu'il y a de traiter rapidement après infection avant que ne s'établisse la phase chronique, il convient donc de développer pour cette maladie de nouvelles approches thérapeutiques.

Nous nous sommes alors focalisés sur le stade du cycle nous paraissant le plus important pour la prolifération du trypanomastigote. Il s'agit de l'adhésion du trypanomastigote à la surface des cellules dans lesquelles il pourra se multiplier après transformation en forme amastigote.

En étudiant de façon plus approfondie ce mécanisme, nous verrons quelles nouvelles stratégies de lutte nous pourrions alors développer.

4- ETUDES DES MECANISMES D'ADHESION

4. 1- Généralités

Pour de nombreux parasites, l'un des tous premiers évènements dans le processus d'infection est sa fixation à la surface des cellules hôtes. Cette phase d'adhésion implique habituellement des interactions ligand-récepteur. La compréhension de ces interactions permettra d'envisager de nouveaux moyens de lutte contre cette endémie.

Parmi les différentes formes de *Trypanosoma cruzi*, seule la forme trypomastigote est capable de pénétrer dans des fibroblastes en culture. Le processus d'entrée varie en fonction de la souche de *T. cruzi* ainsi que du type de la cellule utilisée. Ceci montre qu'une certaine spécificité est impliquée dans ce phénomène.

Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que ces interactions spécifiques étaient dues à des composants de surface membranaire des cellules hôtes et des parasites.

Par exemple, quand les fibroblastes sont soumis à une oxydation periodique, une digestion trypsique, ou exposés à différentes substances chimiques destabilisant le cytosquelette cellulaire, ainsi qu'à des traitements avec des lectines, l'attachement et la pénétration des trypomastigotes sont fortement affectés (Henriquez, 1981). Il a été aussi montré que le mannose ou la N acétylglucosamine altéraient les interactions hôte-parasite. (phénomènes observés aussi chez plasmodium).

Toutes ces observations suggèrent la présence, à la surface des parasites matures, de protéines spécifiques apparentées aux

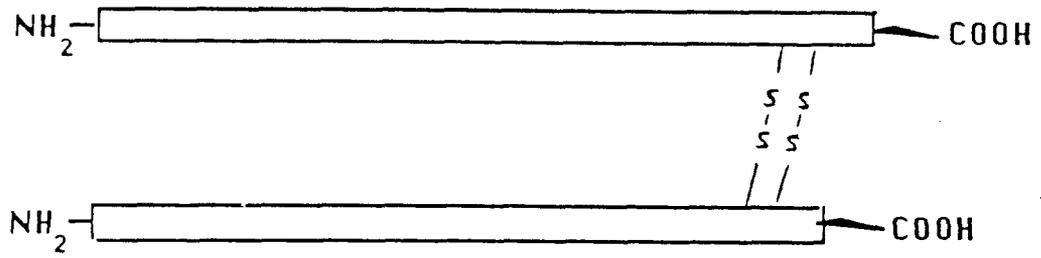


figure 3: schéma de la fibronectine.

lectines, qui favorisent l'adhésion aux fibroblastes, probablement par le biais d'interactions avec les glycoprotéines des cellules hôtes (Boschetti, 1987).

4. 2- La fibronectine

Des recherches se sont développées dans l'étude du rôle que pouvait jouer la fibronectine dans ces interactions hôte-parasite.

La fibronectine est une glycoprotéine de haut poids moléculaire composée de 2 sous unités de 220 kDa. Elles sont reliées entre elles par 2 ponts disulfures situés à l'extrémité C-terminale de ces chaînes (Figure 3). Elle est présente dans le sang, dans la matrice extra-cellulaire et à la surface de nombreuses cellules (macrophages, fibroblastes, ...). La fibronectine ou ses fragments de clivage jouent un rôle dans l'expression de plusieurs fonctions cellulaires. Parmi toutes ces fonctions mettant en jeu la fibronectine, nous trouvons l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la différenciation cellulaire, l'hémostase, etc.

Des études ont montré qu'il existait des interactions entre la fibronectine et certaines formes de parasites telles que le trypomastigote de *Trypanosoma cruzi* (Ouaissi, 1984) et certaines espèces de leishmanies (Wyler, 1985), ainsi qu'avec des bactéries susceptibles de coloniser la sphère oro-pharyngée telles que: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* (Stanislowski, 1985).

Il a d'abord été mis en évidence que la fibronectine s'attachait à la forme trypomastigote (Ouaissi, 1984). Cette fixation est spécifique comme l'indique les tests d'inhibition utilisant plusieurs protéines analogues telles que thyroglobuline, ferritine, catalase, aldolase et serum albumine animale.

De plus, cette fixation est un processus saturable. Une étude de Scatchard a évalué le nombre de récepteurs à fibronectine par trypomastigote à $6,10^4$.

D'autres investigations ont montré que la fibronectine favorisait le passage du trypomastigote dans les macrophages péritonéaux de rat et dans les fibroblastes (Ouaissi, 1985). Lorsque ces cellules sont traitées avec de la fibronectine humaine, lavées et exposées aux parasites à 37°C , une augmentation du nombre de trypomastigotes attachés ou internalisés est observée. Cette même expérience, effectuée à 4°C , a montré une infestation 2 à 3 fois plus forte qu'à 37°C .

Simultanément, d'autres équipes s'intéressaient à la détermination de la structure directement impliquée dans la fixation de la fibronectine aux cellules.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux qui inhibent l'adhérence des cellules à un support solide recouvert de fibronectine a permis d'isoler un fragment peptidique de 11,5 kDa (Pierschbacher, 1984) contenant le site de fixation de la molécule de fibronectine aux récepteurs cellulaires. La séquence de ce domaine a été entièrement déterminée. Elle se situe dans la partie N-terminale de la molécule.

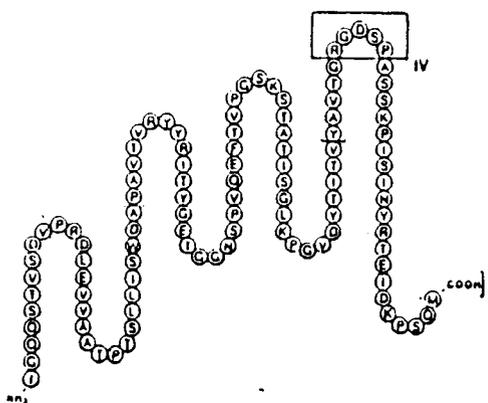


figure 4: Prédiction de la structure secondaire du fragment de 11,5 kDa contenant le site d'attachement cellulaire de la fibronectine. (Schéma d'après Pierschbacher, 1984)

A partir de peptides synthétiques dérivés de ce fragment, l'activité en relation avec l'attachement cellulaire a été localisée dans un segment de 30 acide aminés.

De par son hydrophilie, et la formation possible d'un coude- β , la zone encadrée sur la figure 4 possède une forte probabilité de former une boucle hydrophile à la surface de la molécule, donc capable d'interagir avec les surfaces cellulaires.

De petits fragments ont été synthétisés et immobilisés sur une bille de Sepharose à l'extrémité d'une chaîne en C-6. Il est alors apparu que tous les peptides contenant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser permettaient l'adhérence des fibroblastes aux billes de sépharose qui portent ces mêmes séquences (Pierschbacher, 1984).

Dans le système *Trypanosoma cruzi*, il a aussi été montré que la fixation de la fibronectine au trypomastigote était assurée par ce tétrapeptide représentant le site minimum d'attachement cellulaire.

Trois peptides contenant la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) sont capables d'interférer dans les phénomènes d'invasion des fibroblastes 3T3 par les formes trypomastigotes. L'inhibition de l'invasion de ces cellules est fonction de la dose de peptide utilisée.

Cet effet inhibiteur, dû aux peptides, pouvait indiquer que la séquence RGD se fixait sur les récepteurs parasitaires à fibronectine, ainsi empêchant le trypomastigote de se fixer à la

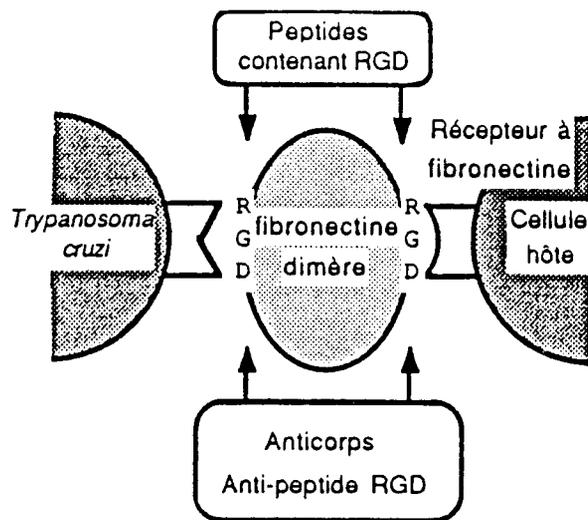


figure 5 : Représentation des interactions hôte-parasite médiées par la fibronectine.

surface cellulaire. Pour examiner cette possibilité, des études de compétitions ont été réalisées.

Quand les trypomastigotes sont incubés avec des peptides contenant la séquence RGD, une inhibition de la fixation de fibronectine marquée à l'iode sur les parasites est observée. Ce phénomène est en relation avec la concentration de peptide utilisée. Des peptides différents d'un acide aminé par rapport à la séquence Arg-Gly-Asp-Ser ainsi que des peptides sans relation ne montrent aucun effet sur la fixation de la fibronectine marquée sur les parasites.

De toute cette série d'expériences, il ressort que la fibronectine joue le rôle d'un pont entre le parasite et la cellule hôte.

Nous pouvons donc représenter les interactions hôte-parasite par la figure 5.

4. 3- Les protéines de surface du trypomastigote

Les trypomastigotes étant les seuls à parvenir à pénétrer dans les cellules hôtes, des études comparatives sur la composition des protéines majeures de surface des différentes formes (épimastigote, amastigote, trypomastigote) ont été réalisées afin de déterminer celles qui étaient spécifiques de la forme invasive et analyser le rôle qu'elles pouvaient jouer dans l'infestation.

Les antigènes étudiés sont les antigènes de surface, c'est à dire ceux qui seront en contact avec les cellules hôtes.

L'étude de ces protéines a pu être réalisée par différentes méthodes reposant sur leurs propriétés propres (masse moléculaire, point isoélectrique), ou mettant à profit des phénomènes d'affinité après marquage à la biotine ou des techniques immunologiques.

L'électrophorèse unidimensionnelle, bien qu'elle soit une méthode très utile, ne permet pas de faire la discrimination entre plusieurs protéines de poids moléculaires identiques. Pour cette raison, M. W. Andrews et coll (Andrews, 1984). ont eu recours à l'électrophorèse en deux dimensions. Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire et leur point isoélectrique. La technique d'électrophorèse, lorsqu'elle est couplée à des méthodes d'immunoprécipitation a permis d'identifier les protéines de surface spécifiques de la forme trypomastigote de *T. cruzi*.

La forme trypomastigote présente plusieurs protéines de surface pouvant être marquées à l'iode 131: protéine 1 (90 kDa, pI 5,5-6,5), 2 (80 kDa, pI 5,3-6,3), 3 (85 kDa, pI 5,5), 4 (85 kDa, pI 5), 5 (85 kDa, pI 6,3-7,5), 6 (100 kDa, pI 6,5), 7 (120 kDa, pI 6,3), 8 (68 kDa, pI 6,7).

Grâce à ces techniques, il a été montré que les protéines 1 et 2 étaient communes aux formes infectieuses (trypomastigotes) et non-infectieuses (épimastigotes), les autres étant spécifiques de la forme infectieuse.

De plus, la plupart de ces protéines, exception faite des protéines 3, 4, et 8, sont détruites par traitement à la trypsine. Il est à noter qu'un tel traitement réduit la capacité d'infecter des cellules en culture par le parasite à 90%.

GLU PHE LEU THR PHE LEU LEU TRP GLY ARG ARG GLY ARG GLN ARG GLN ARG ALA THR LEU²⁰
 THR ASP VAL PHE LEU TYR ASN ARG PRO LEU SER VAL GLY GLU LEU LYS MET ILE LYS GLU⁴⁰
 VAL GLU ASP LYS LYS GLU LYS GLY SER GLY ASP SER GLU ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP⁶⁰
 SER GLU ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP SER GLU ASP LYS LYS GLY SER GLY ASP SER GLU⁸⁰
 ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP SER GLU ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP SER GLU ASP LYS¹⁰⁰
 LYS GLY SER GLY ASP GLY ALA PHE ASN PRO ALA VAL SER ASN ALA THR THR HIS ASP SER¹²⁰
 ARG GLY GLY ASP ARG LYS PRO VAL GLY ILE TRP ASN ILE PHE ASN TYR ARG GLN TYR

figure 6: séquence partielle de la 85 kDa.
 (Schéma d'après Peterson, 1986)

Peterson et coll (Peterson, 1986) ont isolé en utilisant les interactions avidine-biotine des protéines majeures de surface du trypanostigote. Après marquage de la surface du parasite avec de la biotine, les protéines biotinylées sont isolées par passage sur une colonne d'affinité à avidine.

Ainsi deux protéines majeures ont été mises en évidence. Il s'agit de glycoprotéines de 85 et 90 kDa. Des expériences utilisant des anticorps neutralisant indiquent que celle de 85 kDa semble être impliquée dans les mécanismes de pénétration du parasite dans la cellule.

Une partie de la séquence de cette glycoprotéine a été déduite du fragment de DNA codant pour sa synthèse. Il est apparu qu'un nonapeptide y était répété 5 fois (figure 6).

Après avoir montré le rôle que la fibronectine pouvait jouer dans les phénomènes d'invasion du parasite sur des cellules en culture, A. OuaiSSI et coll (OuaiSSI, 1986) ont identifié et isolé une protéine de surface supposée être le récepteur pour la fibronectine.

Cette protéine de surface a été identifiée en utilisant la technique d'immunoprécipitation. Les protéines de surface marquées sont incubées avec de la fibronectine puis des anticorps anti-fibronectine et protéine A-Sepharose.

Le précipité analysé en électrophorèse montre une bande majeure située à 85 kDa. Cette protéine correspond au récepteur pour la fibronectine.

Le récepteur pour la fibronectine ainsi que les anticorps dirigés contre ce récepteur exercent un effet inhibiteur sur l'infection des fibroblastes par le parasite *in vitro*.

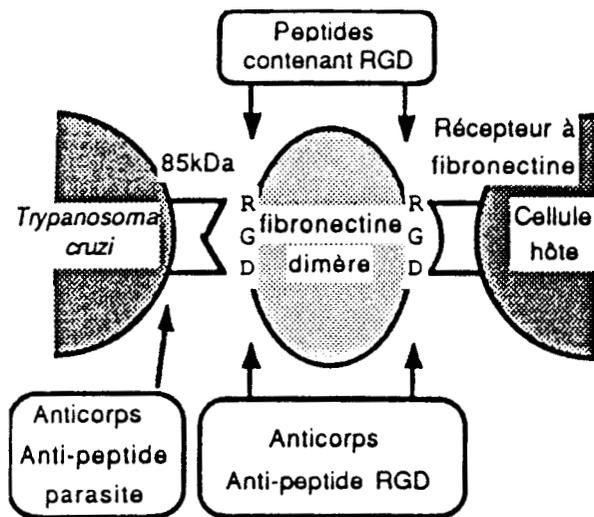


figure 7 : Représentation des interactions hôte-parasite. Nouvelles stratégies envisageables.

A partir de la définition submoléculaire du phénomène d'adhésion, il est possible de concevoir l'utilisation de peptides synthétiques dans le cadre de nouvelles stratégies de lutte contre le parasite (figure 7).

En effet, nous connaissons maintenant par quels biais le parasite adhère aux cellules hôtes (la fibronectine via son site minimum d'attachement cellulaire qui se fixe sur une protéine de surface de la forme trypomastigote). De plus, nous connaissons cette protéine parasitaire impliquée dans les phénomènes d'attachement et de pénétration du parasite dans les cellules.

- La recherche d'analogues du térapeptide Arg-Gly-Asp-Ser pourrait permettre la détermination d'une ou plusieurs structures spécifiques du récepteur parasitaire à fibronectine n'interférant pas avec les fonctions normales de la fibronectine ou avec ses récepteurs cellulaires.

- Ces séquences pourraient ensuite être utilisées comme porteur dans le cadre d'un ciblage spécifique du parasite par une drogue.

- Enfin, des peptides représentant des fragments de protéine de surface du trypomastigote pourraient être utilisés comme immunogènes dans le cadre d'une stratégie vaccinale.

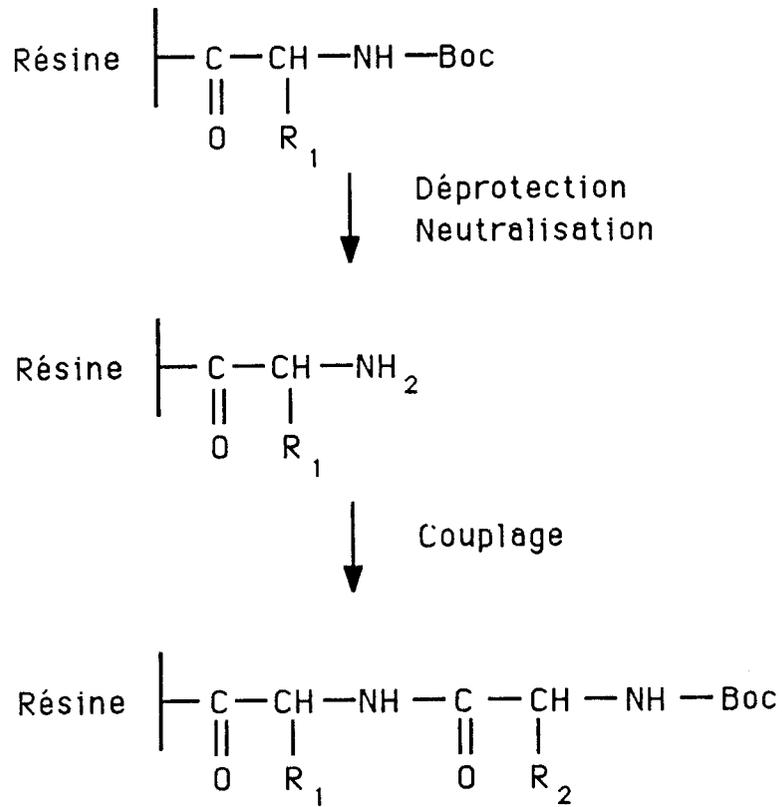


figure 8: Principe de la synthèse peptidique en phase solide.

B- LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE

1- INTRODUCTION

Les différents peptides ont été synthétisés par la méthode en phase solide développée par Merrifield (Merrifield, 1963).

Le principe de la synthèse peptidique en phase solide est d'ancrer l'acide aminé C-terminal par sa fonction carboxylique sur un support insoluble et d'ajouter un acide aminé à la fois, de manière récurrente, en progressant de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. (figure 8).

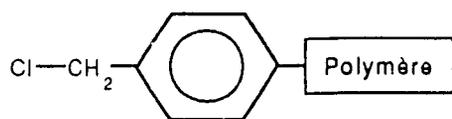
Cette technique présente les avantages de limiter les méthodes de purification intermédiaires à quelques opérations de lavage et de filtration, suffisantes pour éliminer les excès de réactifs et les sous-produits de réaction. De plus, la synthèse présente des rendements élevés puisqu'elle se déroule dans un seul réacteur. Se présentant comme une répétition de cycles, elle peut être aisément automatisée.

Nous avons utilisé la stratégie de synthèse peptidique en phase solide selon le schéma Boc/TFA. Les acides aminés étant des molécules plurifonctionnelles, il faut donc protéger les fonctions que nous voulons non réactives à certains moments de la synthèse.

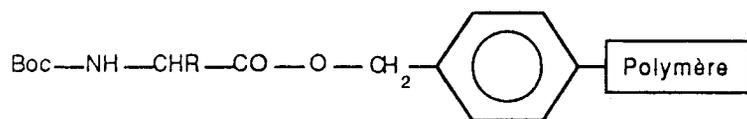
Les chaînes latérales seront protégées de façon permanente et libérées en fin de synthèse (le choix de ces groupements protecteurs sera discuté lors de la description des synthèses).

La fonction α carboxylique sera toujours libre afin de pouvoir être activée et couplée sur la fonction α aminée de l'acide aminé précédent déjà fixé sur la résine.

Résines chlorométhylées



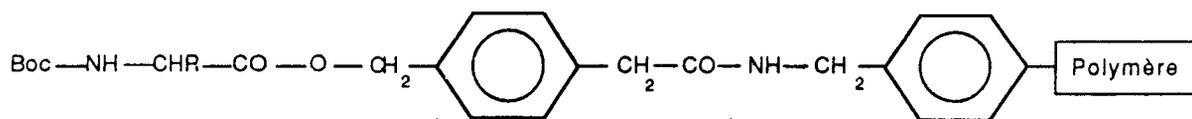
Ancrage du premier acide-aminé par une liaison ester



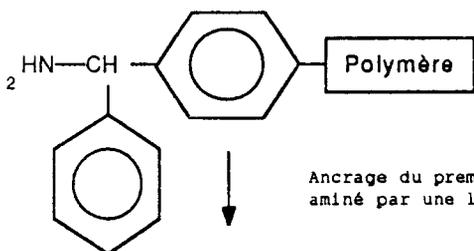
Résines PAM (Phénacylacétamidométhyle)



Ancrage du premier acide-aminé par une liaison ester



Résines Benzhydrylamine



Ancrage du premier acide-aminé par une liaison amide

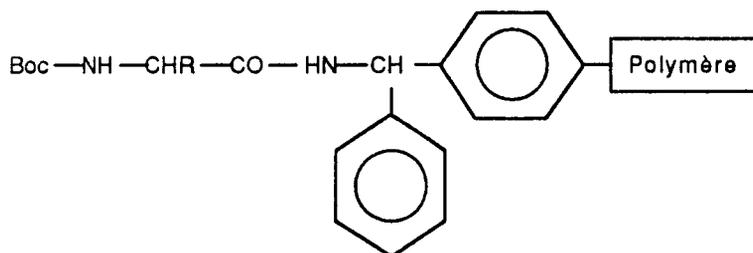


figure 9 : Différentes résines utilisées en synthèse peptidique en phase solide.

Seule la fonction α amine de l'acide aminé sera protégée temporairement. En effet, lors de l'activation d'un acide aminé en vue de son couplage, il faut que sa fonction α amine soit non réactive. Une fois le couplage réalisé, il faudra la déprotéger pour pouvoir poursuivre l'élongation de la chaîne peptidique. La protection temporaire que nous avons utilisée est un groupement de type uréthane, le tertibutyloxycarbonyle (Boc) (Carpino, 1957) qui est clivé de façon sélective par l'acide trifluoroacétique. Après neutralisation par une amine tertiaire comme la diisopropyléthylamine (DIEA), cette fonction se trouve déprotonée et peut ainsi de nouveau réagir avec la fonction α carboxylique de l'acide aminé suivant.

2- LES SUPPORTS SOLIDES (figure 9)

Les peptides ont été ancrés sur une résine de polystyrène réticulée par 1% de divinylbenzène. Ce degré de réticulation permet d'assurer un bon gonflement de la résine tout en lui conférant une résistance mécanique suffisante. Ces copolymères et les polyacrylamides sont les supports insolubles les plus fréquemment employés.

La fonctionnalisation de la résine, permettant l'ancrage du premier acide aminé sur celle-ci, doit être réalisée par une liaison stable dans les conditions usuelles de clivage des groupes protecteurs temporaires en cours de synthèse et clivable en fin de synthèse pour libérer le peptide de son support.

Les résines chlorométhylées permettent la fixation de l'acide aminé par une liaison ester benzylique, réalisée par

substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) du chlore par l'acide carboxylique amené sous forme de son sel de césium (Gisin, 1973).

Cependant, ce type de résine ne convient que pour la synthèse de petits peptides (jusqu'à une vingtaine d'acides aminés). En effet, un clivage de 1 % de la liaison d'ancrage est observé à chaque acidolyse (par l'acide trifluoroacétique à 50 % dans le chlorure de méthylène) du groupement tertibutyloxycarbone protégeant la fonction α aminée. La perte devient dès lors un facteur limitant pour de longues synthèses.

Une augmentation de la stabilité à l'acidolyse des esters benzyliques substitués peut être obtenue par insertion d'un groupe *phénylacétamidométhyle* ("PAM") entre le méthylène et le noyau phényle de l'ester benzylique (Mitchell, 1978). De telles résines peuvent être utilisées sans problème pour de longues synthèses et sont d'ailleurs d'usage courant en synthèse automatique.

Les résines *benzhydrylamines* (Pietta et al., 1974) ont été également utilisées lors de ce travail. Le premier acide aminé, dont la fonction carboxyle a été activée, y est ancré par acylation. Cette liaison amide, bien stable dans les conditions de déprotection du tertibutyloxycarbone (Boc) par l'acide trifluoroacétique, est clivée en fin de synthèse par traitement au fluorure d'hydrogène (HF) et le peptide est libéré sous forme d'amide. Cependant, dans ce cas, de faibles rendements de coupure peuvent être observés dans des conditions normales de coupure (1 heure à 0°C).

3- LA SYNTHÈSE EN SACHETS

Dans le cadre de ces études, nous avons dû introduire de nouvelles techniques dans le laboratoire.

Pour l'obtention de peptides, la méthode de synthèse en phase solide comparativement à la synthèse en phase homogène permet un gain de temps considérable. Ce procédé utilise un réservoir unique contenant un support solide insoluble sur lequel est greffé de façon covalente, par sa fonction carboxylique, l'acide aminé C-terminal du peptide désiré. Toutes les étapes de couplage, déprotection et neutralisation sont réalisées dans ce réacteur. Bien que toutes les étapes soient identiques, exception faite de la réaction de couplage, seul un peptide à la fois peut être produit.

Devant l'augmentation de la demande en peptides et surtout en analogues peptidiques, de nombreux auteurs se sont intéressés à de nouvelles techniques afin de les obtenir facilement et plus rapidement.

Dans le cadre de l'étude des interactions antigène-anticorps, dans un essai de type ELISA, Geysen (Geysen, 1984) a mis au point une technique de synthèse permettant d'obtenir le peptide (antigène) directement fixé sur le support solide et prêt à capter l'anticorps. Bien que cette méthode se soit montrée utile, elle reste néanmoins sujette à plusieurs restrictions:

- la quantité de peptide reste limitée à quelques microgrammes.

- ces peptides ne peuvent pas être libérés de leur support.

-les peptides ainsi obtenus ne sont pas de qualité constante.

-d'importantes variations de fixation de l'anticorps sur des peptides contrôles identiques restent inexplicées.

-de plus cette méthode ne permet pas de faire varier la concentration d'antigène à la surface du support solide.

D'autres méthodes sont également en cours de développement, telle que la synthèse multiple de peptides sur papier de cellulose comme support solide (Eichler, 1988).

La méthode que nous avons employée dans ce travail a été décrite par R.A. Houghten (Houghten, 1985). La particularité du procédé consiste à séparer les résines destinées pour chaque peptide dans des sachets marqués, "Tea bags", perméables aux solvants et solutés. Chaque sachet pourra alors subir soit une opération individuelle, soit être traité en même temps que les autres dans un réacteur commun.

Les sachets ont été réalisés à partir d'un tissu en polypropylène permettant sa fermeture à l'aide de soudures étanches, de trame suffisamment serrée afin de ne pas perdre de résine durant la synthèse et résistant aux solvants employés.

Avant de commencer toute synthèse, nous avons étudié l'efficacité des lavages de la résine lorsqu'elle se trouvait à l'intérieur du sachet. Pour visualiser ce phénomène, nous avons étudié la libération du picrate de diisopropyléthylamine (picrate de DIEA) par lavage avec une solution à 5% de

Do

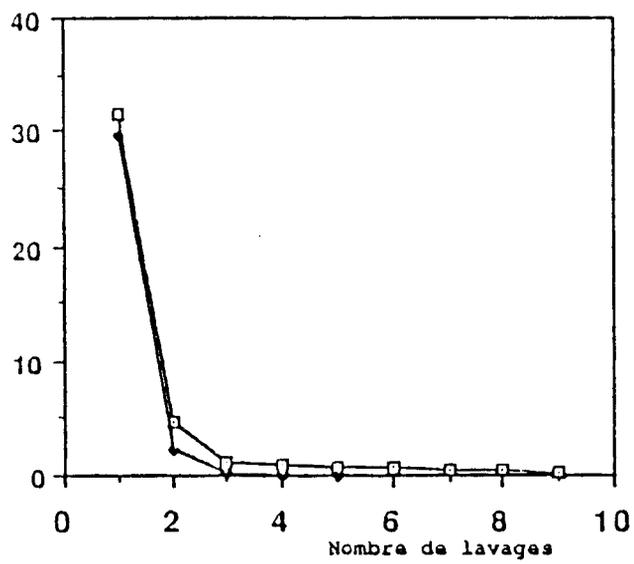


Figure 10: Cinétique d'élimination du picrate de DIEA.

diisopropyléthylamine dans le chlorure de méthylène d'une résine fonctionnalisée par un acide aminé déprotégé sur sa fonction α amine et préalablement traité par une solution d'acide picrique 0,1 N dans la chlorure de méthylène. A chaque cycle de lavage la densité optique de la solution récupérée (volume constant) est mesurée à 358 nm. Sur le graphe, nous avons représenté les densités optiques corrigées en fonction de la dilution. Nous avons constaté une excellente efficacité des premiers lavages mais aussi une cinétique d'élimination plus lente sur les derniers (figure 10). En faisant subir un traitement identique à un sachet vide, nous avons montré en fait qu'il s'agissait de l'adsorption de l'acide picrique sur le polypropylène.

Par contre, une agitation vigoureuse avec un agitateur oscillant (BURELL), maintenue en continu lors du soutirage ou introduction des solvants, nous a permis d'augmenter l'efficacité des lavages des résines. Nous avons choisi de prolonger les étapes de lavages à 5 minutes.

4- FORMATION DE LA LIAISON PEPTIDIQUE

Au cours de ce travail, nous avons eu recours à plusieurs méthodes d'activation de la fonction carboxylique du résidu Boc-acide aminé pour réaliser les couplages.

4. 1- Activation par les carbodiimides (figure 11)

La technique la plus usuelle en synthèse peptidique est l'activation par une carbodiimide, la plus souvent utilisée étant la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Sheehan, 1955).

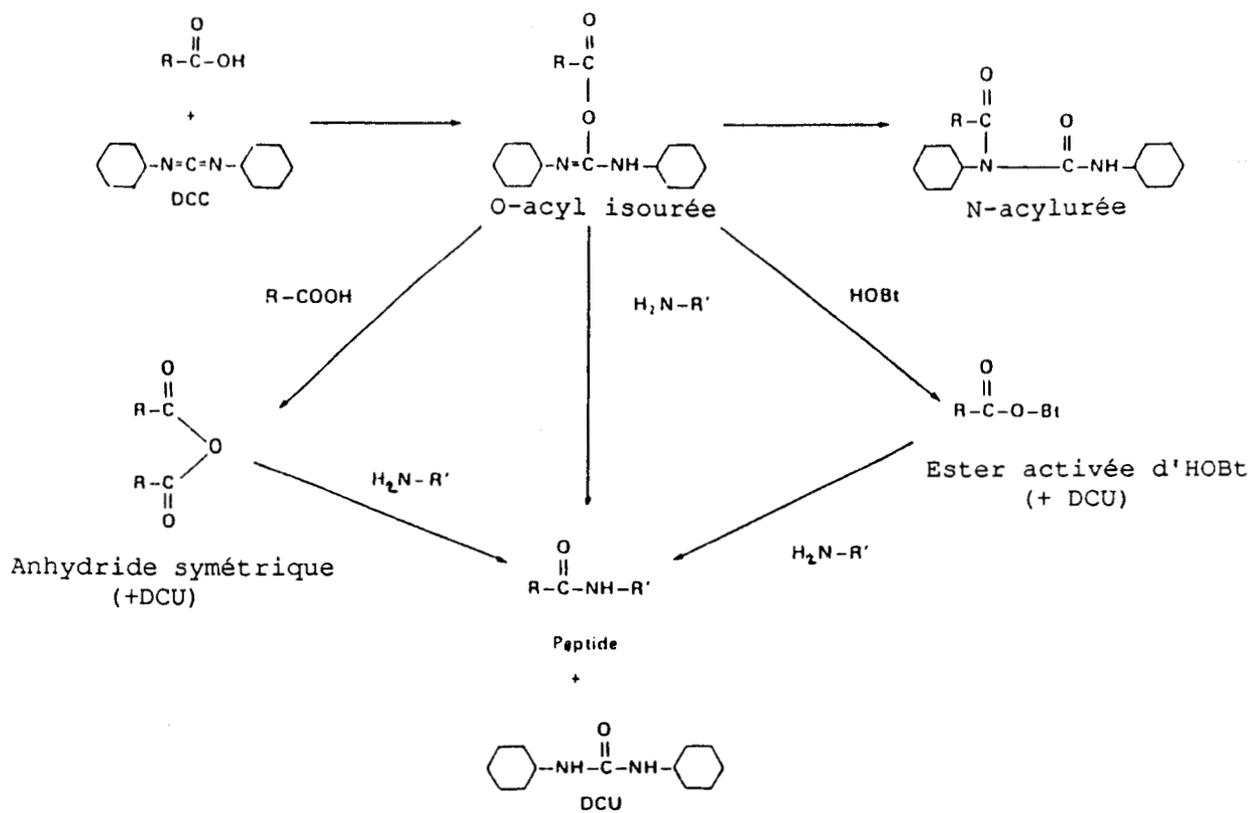


figure 11: Mécanismes d'activation par les carbodiimides.

L'activation résulte de l'addition du carboxyle sur la double liaison de la carbodiimide amenant à une O-acylisourée. La réaction de couplage par attaque du doublet de l' α amine peut cependant être concurrencée par un réarrangement de la O-acylisourée réactive en N-acylurée non réactive.

Afin de limiter cette formation de N-acylurée, une autre technique consiste à ajouter dans le milieu réactionnel de l'hydroxybenzotriazole (HOBt) qui permettra la formation d'un ester activé d'hydroxybenzotriazole, lui-même réactif (Konig, 1970). La formation de cet ester activé d'hydroxybenzotriazole est obtenue lorsque l'on met en contact le résidu Boc-acide aminé, la DCC et l'HOBt en proportions équimoléculaires.

Un autre procédé consiste à mettre en contact deux équivalents de Boc-acide aminé et un équivalent de DCC. Dans ce cas, l'O-acylisourée préalablement formée réagira avec l'excès de Boc-acide aminé pour former un anhydride symétrique qui sera capable de réagir avec la fonction α amine.

Dans le cadre de la synthèse des analogues du Arg-Gly-Asp-Ser, nous avons préféré utiliser la méthode de l'ester activé d'HOBt contrairement à Houghten qui employait la méthode aux anhydrides symétriques. En effet, nous avons considéré que la diffusion de l'espèce activée au sein de la résine lors des couplages sur les résines en sachets ne devait pas être aussi rapide que dans le cas où celles-ci se trouvent directement dans le réacteur. Nous avons donc décidé d'augmenter les temps de couplage dans le but d'optimiser les rendements de couplage. Or, la faible demi-vie des anhydrides symétriques ne permet pas des temps de couplage importants (St Pierre, 1979). Par contre,

l'ester activé d'hydroxybenzotriazole formant une molécule plus stable, nous avons supposé que les rendements de couplage pouvaient alors se trouver ainsi augmentés.

De plus, cette méthode d'activation permet une consommation deux fois moins importante de Boc-acide aminé.

4. 2- Le BOP

L'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthyl-amino-phosphonium (figure 12'), mieux connu sous le nom de BOP ou réactif de Castro, semble particulièrement indiqué comme réactif de couplage en synthèse peptidique.

Préparé pour la première fois par Bertrand Castro (Castro et al, 1975) par réaction de la trisdiméthylaminophosphine avec l'hydroxybenzotriazole en présence de tétrachlorure de carbone et réaction subséquente avec l'hexafluorophosphate de potassium, il a été principalement utilisé en synthèse en phase homogène à ses débuts et progressivement étendu à la synthèse en phase solide.

Ce sel stable, non hygroscopique, est soluble dans la plupart des solvants utilisés lors des synthèses (dichlorométhane, diméthylformamide,...).

Mécanisme de réaction (Hudson, 1988; Le Nguyen et al, 1987)

(figure 12)

La quantité de BOP mise en jeu par rapport à celle du partenaire carboxylique semble être importante pour l'orientation de la réaction. L'activation du carbone de la

fonction carboxylique est réalisée par passage par un intermédiaire acyloxyphosphonium. Avec 0,5 équivalent de BOP par rapport au carboxylate, cet intermédiaire hautement réactif réagit rapidement avec le carboxylate pour former un anhydride symétrique. Avec 1 équivalent de BOP, une seconde phase d'activation, relativement lente, se produit par réaction de l'hydroxybenzotriazole ionisé libéré dans le milieu avec l'anhydride pour former un ester activé d'hydroxybenzotriazole qui va subir lui l'attaque nucléophile du partenaire aminé.

Si de l'hydroxybenzotriazole est ajouté au départ au milieu, celui-ci entre en compétition avec le carboxylate dans la réaction d'attaque du dérivé acyloxyphosphonium et un mélange d'anhydride et d'ester activé est donc obtenu . Quand il y a une quantité de base suffisante pour ioniser 50 % de l'hydroxybenzotriazole ajouté au milieu, la deuxième voie menant à l'ester activé est préférée et donne par ailleurs les meilleurs résultats quant à l'efficacité du couplage.

Le fait d'avoir impérativement à travailler avec l'acide aminé sous forme carboxylate évite de déplacer préalablement les Boc-acides aminés cristallisés ou précipités sous forme de sel de dicyclohexylamine, et évite l'introduction de diisopropyléthylamine pendant le couplage.

5- CLIVAGE DE LA LIAISON PEPTIDE RESINE

Une fois la synthèse terminée, le peptide est simultanément libéré de la résine et déprotégé de ses groupes protecteurs le plus souvent au moyen d'un acide fort. Dans notre étude, nous

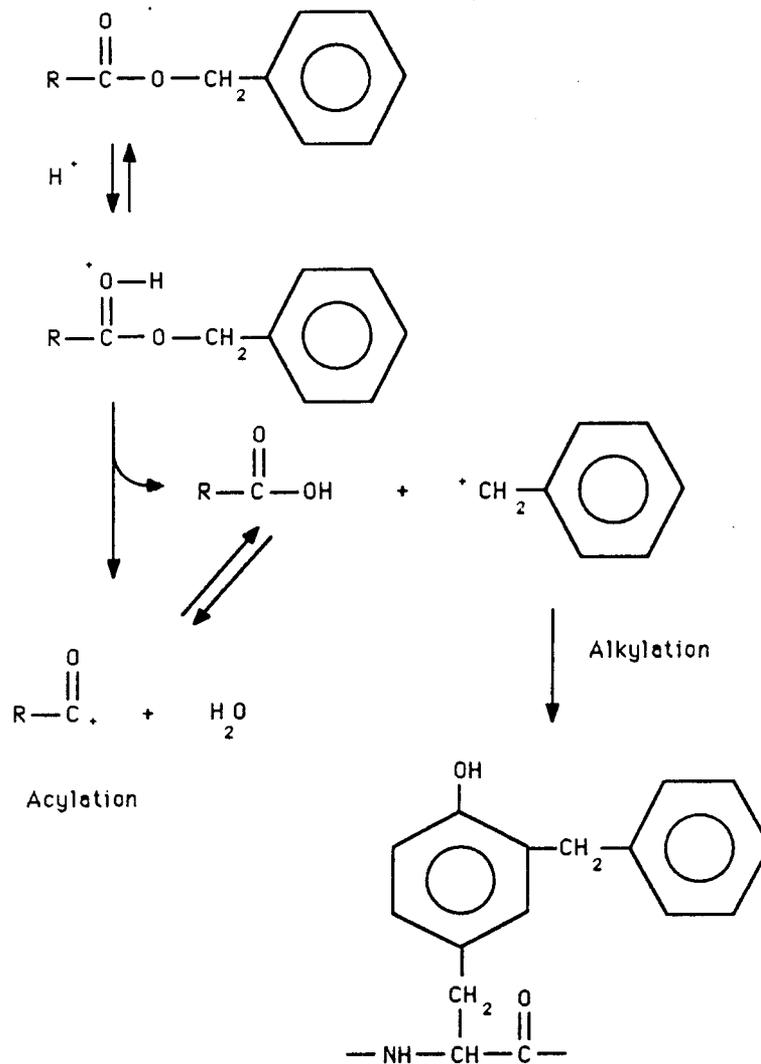


figure 13: Mécanisme de clivage SN1 et réactions secondaires.

avons utilisé le fluorure d'hydrogène anhydre, introduit par Sakakibara (1965).

Dans les conditions usuelles, nous avons travaillé avec une concentration élevée en fluorure d'hydrogène, "High HF". L'acidolyse qui en résulte se fait par un mécanisme réactionnel de type S_N1 donc générateur de carbocations (figure 13). De ce fait, lors du traitement des peptidyl-résines par le fluorure d'hydrogène, on ajoute dans le milieu réactionnel du para-crésol qui joue le rôle de piège à carbocations.

Au cours de ce travail, nous avons à libérer de leur support de nombreux peptides. Le matériel que nous possédions à l'origine nous permettait de réaliser qu'un traitement à la fois. Procéder ainsi aurait été long et fastidieux.

Nous avons donc conçu et fait réaliser un système multiposte permettant la coupure simultanée de 6 peptidyl-résines (figure 14). En procédant de cette façon il était alors possible de séparer de leur résine 12 peptides par jour ce qui représentait un gain de temps considérable.

6- PURIFICATIONS ET CONTROLES

Après clivage des peptides de la résine par le fluorure d'hydrogène, ceux-ci peuvent contenir des impuretés à classer en deux grands groupes :

- des dérivés alkylés générés par les pièges à carbocations utilisés lors de la coupure par le fluorure d'hydrogène.

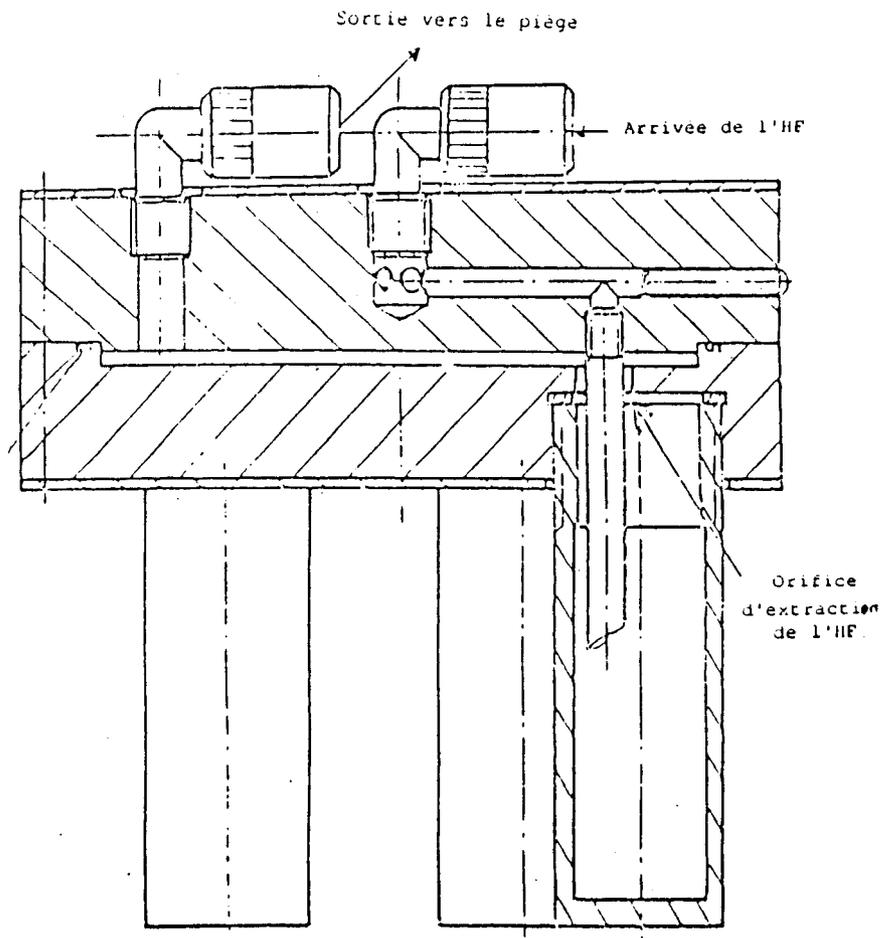


figure 14: Appareil de coupure HF multipostes.

- des peptides ne correspondant pas au peptide désiré (réactions secondaires lors de la synthèse ou de la coupure par le fluorure d'hydrogène).

Ces peptides peuvent alors être séparés de leurs contaminants par des techniques comme la gel-filtration, la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (HPLC phase inverse) et éventuellement par chromatographie d'échange d'ionique.

Les peptides sont alors contrôlés quant à leur pureté et caractérisés par chromatographie sur couche mince, HPLC phase inverse et spectrométrie de masse.

6. 1- Filtration sur gel

La gel filtration ou chromatographie d'exclusion est une technique de séparation des molécules en fonction de leur poids moléculaire. Les molécules les plus grosses sont totalement exclues du gel et sont éluées en premier lieu tandis que les plus petites pénètrent à l'intérieur du gel et sortent avec un certain retard: l'éluion se fait donc dans l'ordre décroissant des masses moléculaires.

Les caractéristiques des gels utilisés sont fonctions non seulement du poids moléculaire du peptide à purifier mais aussi de sa solubilité dans un éluant compatible avec le gel. Nous avons utilisé des gels de Dextran Sephadex G (Pharmacia), Polyacrylamide Biogel P (Biorad) ou encore TSK HW 40 S (Merck).

A condition d'utiliser des gels très fins (< 400 mesh) et des débits optimisés, il est possible d'obtenir par filtration sur gel des produits dont la pureté est suffisante dans

l'optique de l'immunisation d'animaux de laboratoire. La gel filtration est généralement complétée par d'autres techniques plus fines.

6. 2- Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (HPLC phase inverse) est très utilisée tant pour l'analyse que pour la purification des peptides. Ce type de chromatographie, basée sur l'adsorption, permet de séparer les molécules en fonction de leur polarité.

Les gels utilisés dans cette technique sont des gels de silice dont les fonctions silanoles sont greffées par des chaînes carbonées en C 18, C 8 ou C 4.

L'élution est effectuée le plus souvent par un gradient d'acétonitrile à partir de solution d'acide trifluoroacétique à 1/1000 dans l'eau et acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique (600/400/1)

Les peptides sont dans ce cas élués selon un ordre de polarité décroissant.

6.3- Contrôles

Les peptides obtenus après clivage par le fluorure d'hydrogène et purification sont contrôlés par:

-chromatographie couche mince sur silice.

-chromatographie liquide haute performance phase inverse (HPLC phase inverse) en système gradient acétonitrile/eau/tampon phosphate pH 2,5 ou TFA 1/1000

6. 3. 1- Analyse ~~de~~ d'acides aminés après hydrolyse acide totale.

L'identité de ces peptides est confirmée par analyse ~~de~~ d'acides aminés après hydrolyse acide totale.

L'hydrolyse acide totale des peptides ou protéines se fait classiquement par traitement de 24 heures dans l'acide chlorhydrique 6 N en présence de quelques gouttes de phénol sous vide à 110°C.

En raison du grand nombre d'hydrolyses à effectuer avec les séries analogues ~~de~~ de Arg-Gly-Asp-Ser, nous avons adapté une méthode décrite par Meltzer (Meltzer, 1987) permettant d'hydrolyser les peptides dans un même récipient (un dessiccateur hermétiquement clos). Les échantillons seront dans ce cas en contact avec les vapeurs d'acide chlorhydrique et d'acide thioglycolique sous vide à 110°C pendant 24 heures. Par cette méthode, l'hydrolyse est quantitative. Elle présente l'avantage de limiter toutes contaminations pouvant provenir des solutions d'acides.

Cette méthode nous a également permis de réaliser un dosage quantitatif de chaque solution de peptide à analyser.

6. 3. 2- Spectrométrie de masse FAB

La spectrométrie de masse nous a permis de confirmer l'identité des peptides synthétisés mais également la nature des impuretés inhérentes aux réactions secondaires.

En raison du caractère amphotère des peptides et de leur faible volatilité, la caractérisation de ceux-ci par spectrométrie de masse nécessitait, jusqu'il y a quelques temps, leur transformation chimique. Une méthode plus récente, le "FAB" ("Fast Atom Bombardment"), n'implique que l'adsorption de l'échantillon sur une matrice solide (glycérol ou thioglycérol). L'originalité de l'équipement consiste en l'introduction d'un canon d'ions dans la chambre d'ionisation: le bombardement électronique d'atomes d'argon (ou de xénon) fournit des ions Ar^+ qui, accélérés, sont retransformés en atomes d'une énergie équivalente par échange de charges dans le flux d'argon gazeux. Ils provoquent l'expulsion hors de la matrice de la molécule généralement intacte qui est ensuite ionisée en ions $(M+H)^+$ (spectre de masse d'ions positifs) ou $(M-H)^-$ (spectre de masse d'ions négatifs). Ce sont ces ions de molécule intacte, que nous appelons ions moléculaires, qui nous intéressent dans le cadre de la caractérisation de nos produits. Le mécanisme de formation de ces ions, facilité par la nature de la matrice (acidification par TFA à cet effet), est complexe. Les ions ainsi produits sont accélérés par un champ électrique avant d'entrer dans un champ magnétique qui a pour effet de leur imprimer une trajectoire circulaire dont le rayon dépend du rapport M/e des ions et de la force du champ magnétique. Le spectre de masse est donc un enregistrement électronique du signal produit par les ions dont

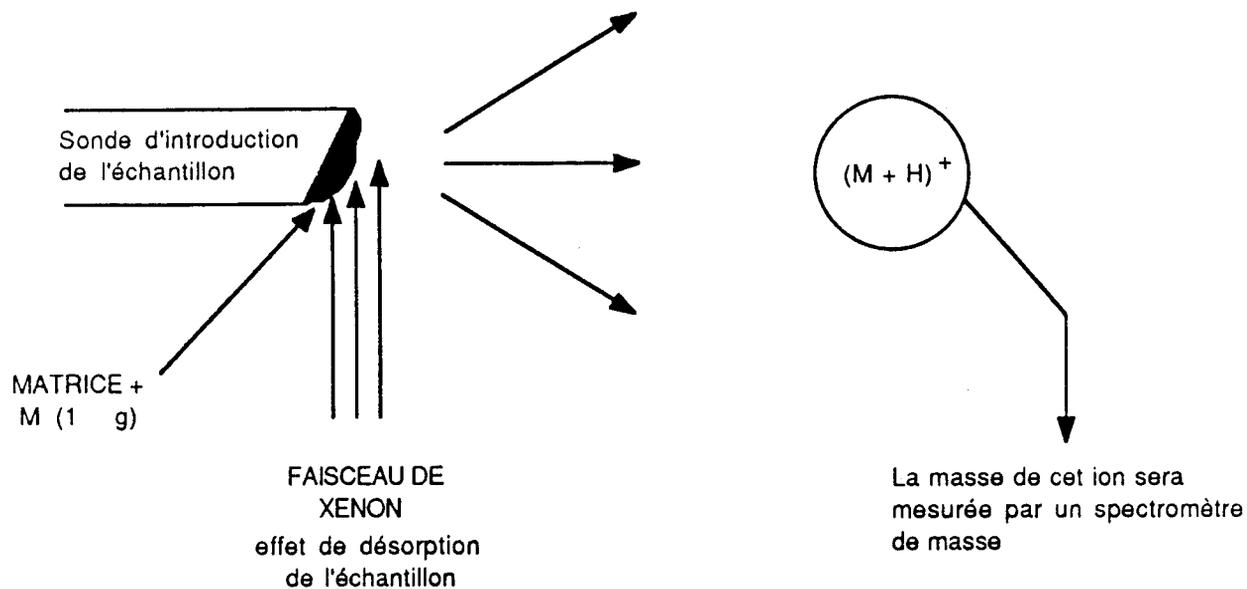


Figure 15: Schéma de la source d'ionisation d'un spectromètre de masse FAB

la charge M/e est telle qu'ils puissent passer au travers de la fente d'un détecteur (figure 15).

L'un des grands succès de cette technique réside dans le fait qu'elle permet d'accéder à la masse moléculaire de produits non volatiles sans qu'il y ait nécessité de les transformer chimiquement avant analyse.

Cette technique permet, dans certain cas, d'obtenir des informations sur la séquence des structures peptidiques par l'analyse des fragments obtenus. Ceci est d'autant plus intéressant qu'elle devient alors complémentaire à la microséquence de protéine et à l'analyse en acide aminé par exemple.

De plus, des échantillons contenant 5 à 10 nanomoles sont suffisants pour des informations interprétables sur la séquence de peptides.

Cette technique permet de déterminer si une fonction N-terminale est bloquée et de quelle manière, ou de déterminer la nature des acides aminés contenus dans une séquence grâce à l'observation des ions immoniums. Il est à noter que ces ions immoniums ne peuvent pas donner de renseignements quantitatifs sur la composition en acide aminé.

Ces informations sur la séquence sont dues aux possibilités de fragmentation au niveau des trois liaisons du squelette peptidique tant du côté C que N-terminal. Dans la figure 16 sont représentées les différentes possibilités de coupure ainsi que la nomenclature alors utilisée.

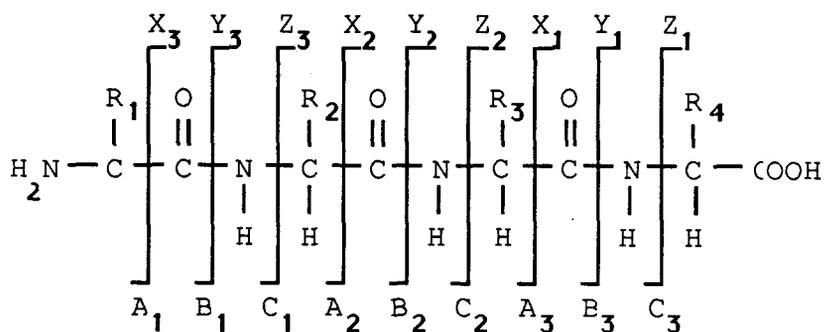


figure 16: Représentation des différentes possibilités de fragmentations en spectrométrie de masse FAB. (Schéma d'après Roepstorff, 1985)

Le nombre d'atomes d'hydrogène ajoutés ou perdus par l'ion fragment, avec comme référence de masse la molécule sous sa forme non chargée, est donné par le nombre d'apostrophe situé à la droite ou à la gauche de chaque lettre.

Des études ont été menées afin de déterminer à quels endroits se faisait préférentiellement les fragmentations. D'après la bibliographie il semble qu'à l'heure actuelle il ne soit pas vraiment possible de faire des généralités. En effet, certains auteurs ont montré que les coupures se faisaient préférentiellement en C'' et Z'' (Williams, 1982), alors que d'autres ont observé des coupures en B et Y'' principalement (Roepstorff, 1985), ou encore en A (Buko, 1983) .

NOUVELLES STRATEGIES

A- RECHERCHE D'ANALOGUES DE ARG-GLY-ASP-SER SPECIFIQUES DU RECEPTEUR PARASITAIRE

1- INTRODUCTION

Il a été démontré qu'il était possible d'interférer sur la pénétration du trypanostigote dans la cellule hôte par l'emploi d'un peptide contenant la séquence Arg-Gly-Asp (appelée RGD en utilisant le code une lettre) (Ouaissi, 1986). Ce peptide se fixe sur le récepteur parasitaire pour la fibronectine et empêche ainsi l'adhésion du parasite sur les cellules.

Dans l'optique d'intervenir sur les relations hôte-parasite, l'utilisation d'un tel peptide *in vivo* peut être remise en question en raison du rôle qu'il est susceptible d'avoir avec les récepteurs d'autres protéines biologiquement actives. Cette séquence se retrouve en fait dans un grand nombre de protéines: 211 dans une recherche effectuée au laboratoire en Décembre 1987 dans la banque de données National Biomedical Research Foundation. Bien que la plupart de ces séquences ne reconnaissent probablement pas les récepteurs cellulaires spécifiques de RGD: les "intégrines", il est bon de noter que le RGD figure dans le site de reconnaissance de plusieurs protéines d'adhésion de la matrice extra-cellulaire et des plaquettes. Ce sont des protéines telles que la fibronectine, vitronectine, le collagène de type I, la thrombospondine et le facteur de von Willebrand. Leurs interactions avec les cellules ont pu effectivement être inhibées par des peptides contenant la séquence RGD (Plow, 1985; Gartner, 1985; Hayman, 1985).

Chez *Trypanosoma cruzi*, la forme trypomastigote possède un récepteur pour la fibronectine (Ouaissi, 1996) ne faisant pas partie de la famille des intégrines. Ces intégrines sont, en effet, généralement constituées de 2 protéines, α et β , de 160 et 140 kDa respectivement, non reliées de façon covalente (Ruoslahti, 1987), alors que le récepteur parasitaire n'est constitué que d'une protéine de 85 kDa.

Les récepteurs cellulaire et parasitaire de la fibronectine ne sont pas organisés de la même façon: il est donc permis de supposer que leur sélectivité ne soit pas identique, et dans ce contexte, qu'il soit possible d'obtenir des analogues de leur ligand commun qui soient plus sélectifs de l'un ou de l'autre.

La substitution des résidus arginine ou acide aspartique du tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser par des résidus "analogues", (lysine pour arginine et acide glutamique pour acide aspartique), entraîne une perte complète de l'activité de ces nouveaux peptides (Pierschbacher, 1984). Il apparaît donc que la conservation de charge ne suffise pas à maintenir une conservation d'activité. Ces deux acides aminés, résidus ioniques, semblent jouer un rôle important dans les interactions ligand-récepteur. Nous avons par conséquent décidé de ne pas modifier ces deux motifs dans le cadre de notre étude.

Les modifications portées sur ce peptide ont été réalisées sur les deux résidus glycine et la sérine du pentapeptide **Gly-Arg-Gly-Asp-Ser** présent dans la fibronectine, Chacun de ces trois acides aminés étant substitué par les 19 autres acides aminés naturels. Nous avons donc synthétisé trois séries de

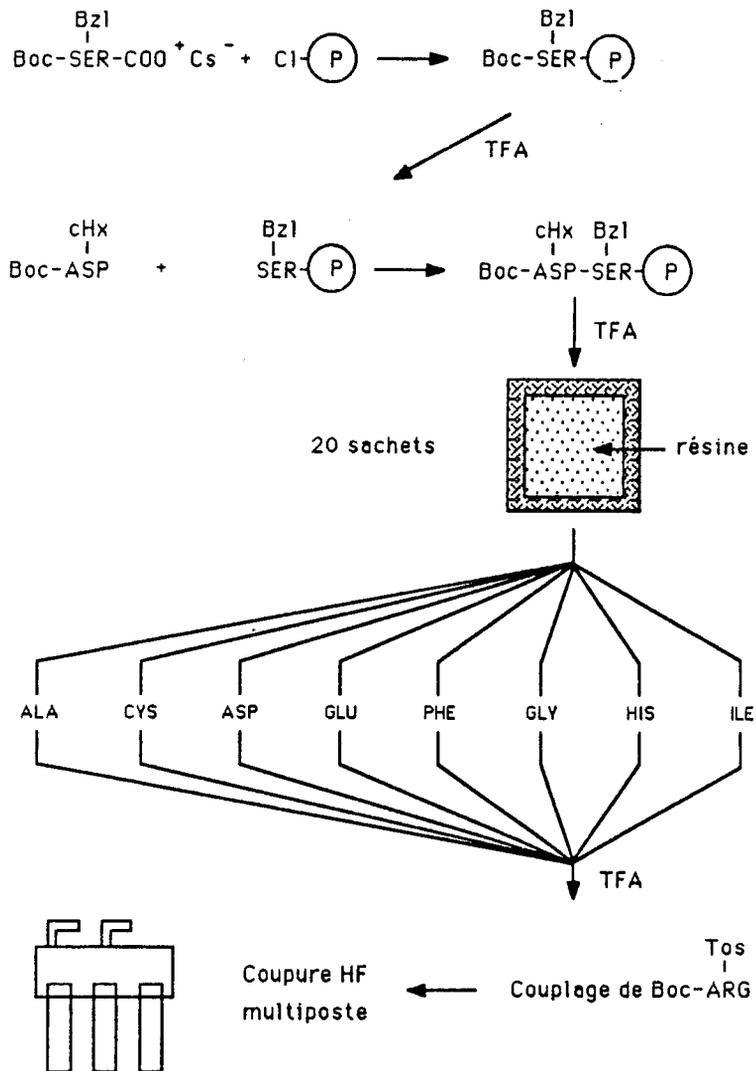


figure 17: Stratégie de synthèse pour la série Arg-Xxx-Asp-Ser

peptides: les Arg-Xxx-Asp-Ser, Arg-Gly-Asp-Xxx et Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser (Xxx représente chacun des 20 acides aminés naturels).

D'autres peptides analogues ont été synthétisés en utilisant des acides aminés de série D.

2- SYNTHÈSE DES ANALOGUES DE Arg-Gly-Asp-Ser.

2. 1- Stratégies de synthèse

A l'occasion de la synthèse des analogues du tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser, nous avons utilisé la technique de synthèse multiple en phase solide, c'est à dire, la synthèse en sachet.

Sur les trois séries de peptides que nous avons synthétisées, Arg-Gly-Asp-Xxx, Arg-Xxx-Asp-Ser et Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser, seules deux ont été réalisées en utilisant cette technique. Il s'agit des séries Arg-Gly-Asp-Xxx et Arg-Xxx-Asp-Ser.

La variation dans la série Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser ne survenant que sur le dernier résidu d'acide aminé, il n'a pas été nécessaire de mettre la résine en sachet. La peptidyl-résine portant le Arg-Gly-Asp-Ser a été séparée en 20 fractions sur lesquelles nous avons greffé le dernier résidu dans des réacteurs séparés.

Pour la série Arg-Xxx-Asp-Ser, la résine a été introduite dans les sachets après le couplage de l'acide aspartique. En effet les 2 premiers acides aminés (acide aspartique et sérine) étant communs pour les vingt analogues, nous avons choisi de faire un seul lot de ce dipeptide avant de fractionner la résine en vingt parts. Le troisième acide aminé a été couplé sur la

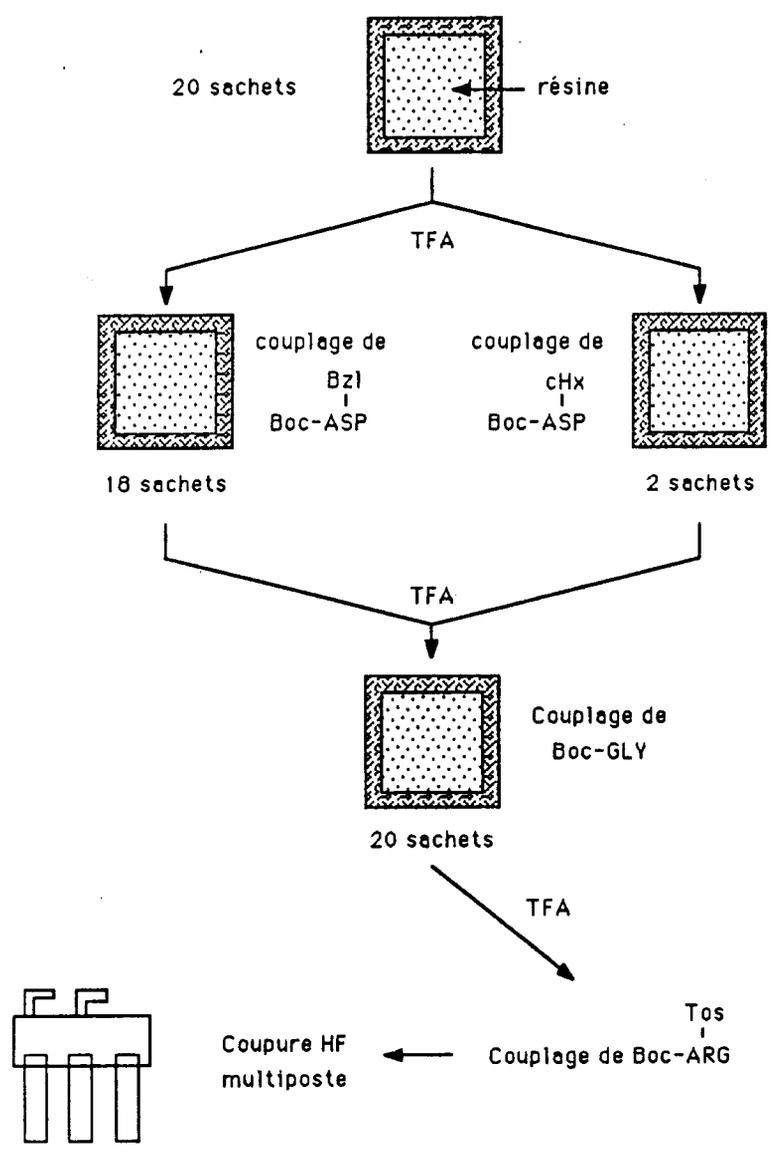


figure 18: Stratégie de synthèse pour la série Arg-Gly-Asp-Xxx

quatrième résidu a été couplé simultanément sur tous les sachets (figure 17).

Pour la série Arg-Gly-Asp-Xxx, la modification survenant dès le premier acide aminé, les résines portant les 20 acides aminés naturels, ont été séparées tout de suite dans vingt sachets. Le couplage des acides aminés suivants a été réalisé simultanément sur tous les sachets. Seuls les sachets contenant les résines portant les résidus sérine et glycine ont été traités à part pour le couplage du résidu acide aspartique. La protection utilisée pour la fonction β carboxylique du résidu de l'acide aspartique étant, dans ces 2 cas, différente des autres amino-acyl résines (figure 18).

2. 1. 1- Choix des groupes protecteurs

2. 1. 1. 1- Arg-Xxx-Asp-Ser

Les groupes protecteurs que nous avons choisi pour ces synthèses sont les suivants:

Les résidus sérine, acide aspartique et arginine ont été protégés respectivement sous forme d'un éther benzylique, d'un ester de cyclohexyle et par un groupe tosyle.

La fonction β carboxylique de l'acide aspartique est protégée, le plus souvent, sous forme d'ester benzylique (OBzl). Cependant, lorsque ce résidu est couplé sur un résidu glycine ou sérine, lors de la déprotection finale au fluorure d'hydrogène, il se produit un réarrangement en succinimide par cyclisation intramoléculaire de l'ester de la chaîne latérale du résidu

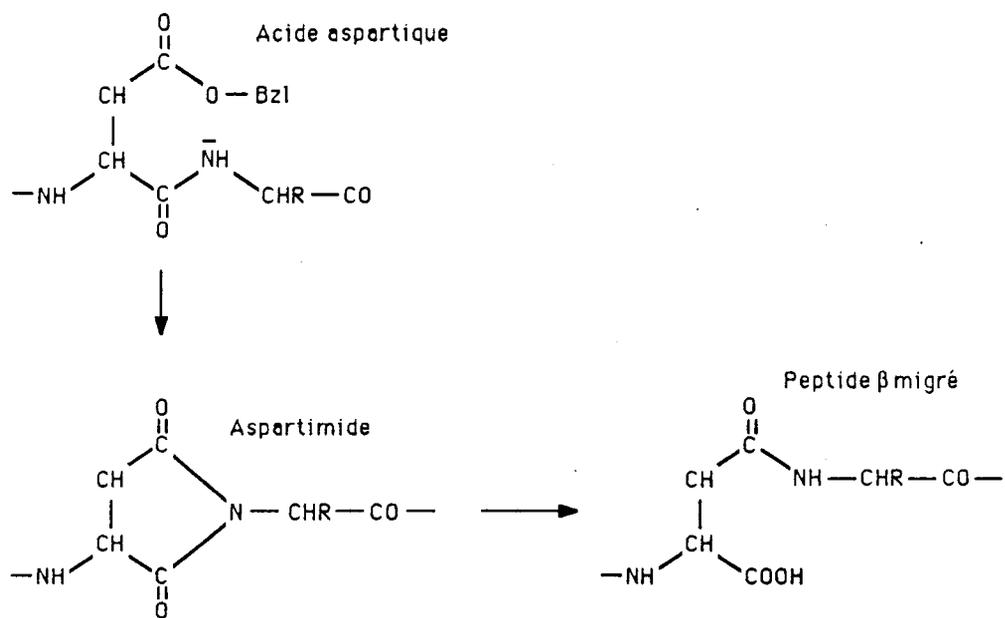


figure 19: β migration.

aspartyle par l'azote de la liaison amide (figure 19). Afin de minimiser ce phénomène, nous l'avons donc protégée sous forme d'ester de cyclohexyle (OcHx) qui permet d'éviter cette réaction intramoléculaire par son encombrement stérique (Tam, 1979).

Les chaînes latérales réactives des acides aminés en position Xxx ont été protégées par les groupes protecteurs classiques:

- Ether benzylique pour les fonctions hydroxyles des résidus sérine, thréonine, tyrosine (choix mal approprié dans le cas de la tyrosine)

- Ester benzylique pour les fonctions carboxyliques β et γ des résidus aspartique et glutamique,

- Dinitrophényle pour l'imidazole du résidu histidine.

- Acétamidométhyle pour la fonction thiol du résidu cystéine.

- Benzyloxycarbonyle (Z) pour la fonction ϵ amine du résidu lysine.

Nous avons décidé d'utiliser ces différents groupes protecteurs pour plusieurs raisons:

La fonction thiol du résidu cystéine a été protégée par un groupement acétamidométhyle, groupement qui est stable lors de la déprotection finale par traitement au fluorure d'hydrogène (Veber, 1972). Cela nous permet d'éviter la formation de peptide dimère par oxydation du résidu cystéine de ce peptide.

Le noyau imidazole de l'histidine a été protégé au cours de nos synthèses par un groupe 2,4 dinitrophényle (Dnp). Il résiste à l'action d'acides forts (HCl 6N à chaud, TFA à 25°C, HF

liquide) mais est, par contre, aisément déplacé par thiolyse (β mercaptoéthanol en milieu basique) (Rivaille, 1972). Son clivage a lieu alors que le peptide est encore ancré sur le support, ceci permet d'éliminer plus facilement les réactifs provoquant cette thiolyse. Ce groupe protecteur a été préféré au tosylo qui n'est pas stable dans les conditions de couplage utilisant la méthode aux esters activés d'hydroxybenzotriazole. En effet, ce groupe est labile en condition faiblement acide, l'hydroxybenzotriazole jouant dans ce cas le rôle de l'acide.

Il ne nous a pas semblé nécessaire de protéger le résidu lysine par un chlorobenzoyloxycarbone (ClZ), groupe plus stable que le benzyloxycarbone à l'acide trifluoroacétique, car il ne restait qu'un cycle de déprotection après cet acide aminé.

La déprotection, survenant après les résidus Xxx, a été réalisée en présence d'éthanedithiol, afin d'éviter les réactions d'alkylation sur les chaînes latérales des résidus méthionine et tryptophane. L'utilisation de ces dérivés sous forme protégée (méthionine sulfoxyde, ou formyl tryptophane) n'était pas nécessaire. En effet, ces résidus n'avaient plus qu'à subir un cycle de couplage et deux de déprotection avant le traitement au fluorure d'hydrogène. La déprotection du groupe tertiobutyloxycarbone, avant clivage par le fluorure d'hydrogène, est préférable de façon à minimiser les réactions d'alkylation au cours de cette étape.

2. 1. 1. 2- Arg-Gly-Asp-Xxx

Les groupes protecteurs des Xxx sont les mêmes que dans la série Arg-Xxx-Asp-Ser sauf pour:

- La fonction ϵ amine du résidu lysine, protégée par le groupe chlorobenzoyloxycarbone.

- La fonction hydroxyle du résidu tyrosine, protégée par un éther dichlorobenzyle.

La fonction β carboxylique du résidu aspartique précédant Xxx a été protégée sous forme d'ester benzylique sauf dans les cas où Xxx est une glycine ou une sérine. Après ces deux résidus, elle a été protégée sous forme d'ester de cyclohexyle.

2. 1. 1. 3- Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser

Les groupes protecteurs sont les mêmes que dans la série Arg-Xxx-Asp-Ser sauf pour la fonction hydroxyle de la tyrosine protégée sous forme d'éther dichlorobenzyle.

Les déprotections communes sur les peptidyl-résines ont été réalisées dans du TFA à 40% dans le chlorure de méthylène en présence d'éthanedithiol afin d'éviter les réactions d'alkylation sur les chaînes latérales des résidus tryptophane et méthionine.

2. 2- Clivage au fluorure d'hydrogène

En raison du grand nombre de peptides à libérer de leur support, nous les avons traités au fluorure d'hydrogène avec

l'appareillage multiposte. Nous avons pu ainsi cliver 12 peptides par jour. Ils ont été traités selon la technique de "High HF" (concentration élevée en fluorure d'hydrogène) en présence de para-crésol comme piège à carbocations. Pour les peptides possédant dans leur structure les résidus tryptophane et méthionine, nous avons ajouté également du diméthylsulfure.

2. 3- Purification et analyse

Afin d'éliminer les traces de crésol résiduelles, il nous était obligatoire de purifier ces peptides. En effet, il a été observé que les trypomastigotes étaient très sensibles au crésol. Ces peptides devant être testés sur des trypomastigotes vivants, il fallait qu'ils soient exempts de toute trace de crésol.

Le procédé classique après clivage au fluorure d'hydrogène est de réaliser une filtration sur gel du peptide brut obtenu. Un tel traitement demande environ 24 heures par peptide, temps trop important pour nos 60 peptides.

Analysés en HPLC phase inverse sur une colonne de gel de silice greffée en C18, la plupart de ces peptides possèdent un temps de rétention relativement faible comparativement à celui du crésol. En raison du comportement de ces peptides, nous avons donc imaginé une méthode permettant de les purifier de façon aisée et rapide.

L'HPLC en phase inverse est basée sur l'adsorption des produits à purifier sur un gel de silice greffée par des chaînes non polaires. Une phase mobile polaire (le solvant) déplace ces

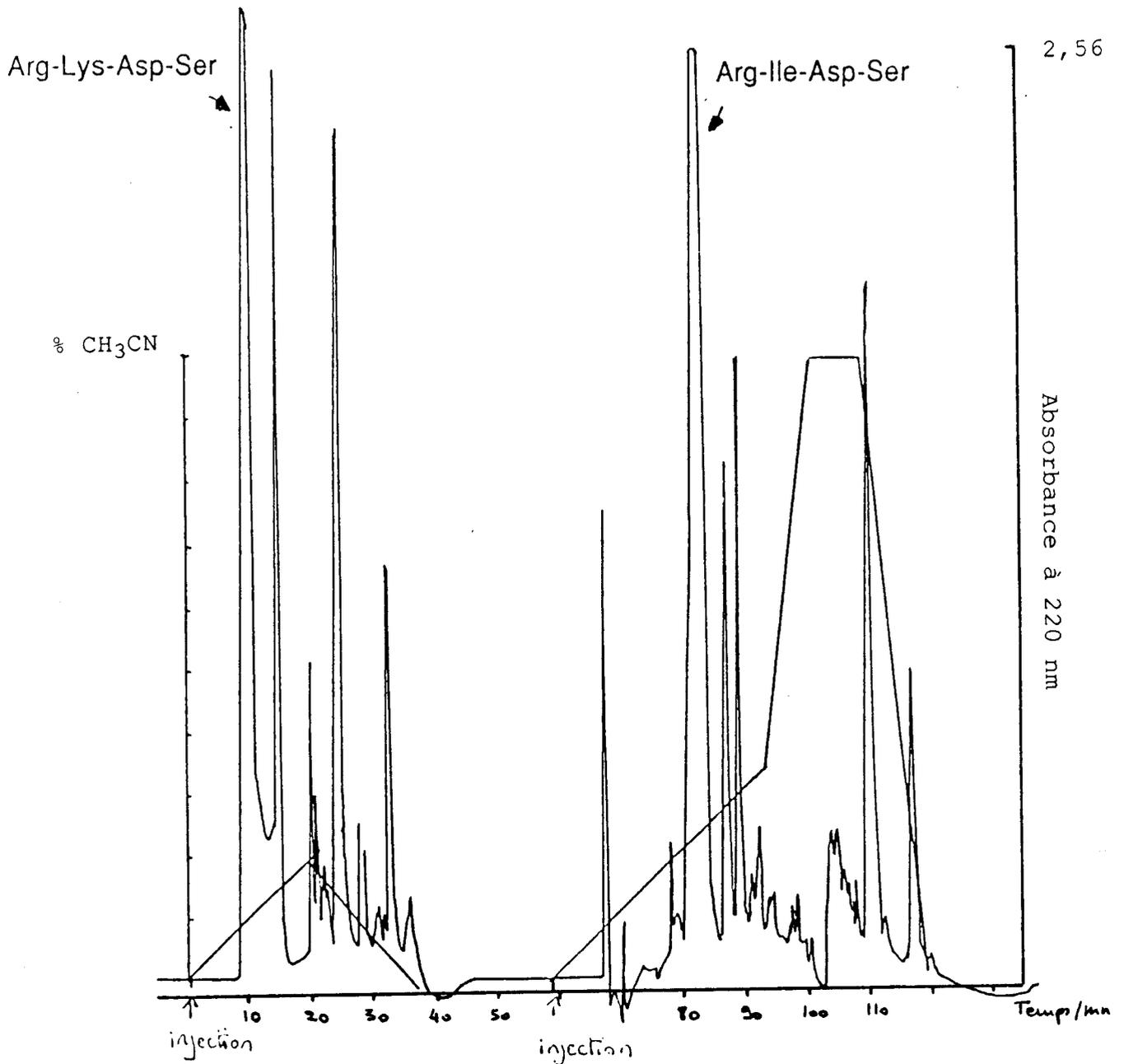


figure 20: Exemple de purification de deux peptides sans lavage intermédiaire de la colonne.

Masse déposée=40 mg; Débit 3 ml/mn
Nucléosil C 18, 9mm/50 cm

produits en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire.

Dans notre cas, l'élution des peptides était réalisée avec de faibles concentrations en solvant organique, conditions dans lesquels le crésol reste bien adsorbé sur la phase stationnaire. Dès la sortie de colonne du peptide, nous revenons dans les conditions initiales de solvant, pour injecter et purifier un second peptide (le crésol s'accumule ainsi en tête de colonne) (figure 20).

En travaillant de cette façon, la colonne n'était lavée qu'une fois sur deux ce qui entraînait de nouveau un gain de temps considérable.

2. 4- Résultats

La pureté des peptides après clivage par le fluorure d'hydrogène s'est montrée satisfaisante pour la plupart des analogues.

Aucune contamination n'a été observée pour chacun des dérivés lors des analyses par HPLC phase inverse et après hydrolyse acide totale des peptides bruts exception faite des peptides Arg-Gly-Asp-Thr et Arg-Gly-Asp-Pro. Les quantités de résine portant ces peptides étaient trop importantes dans les sachets, le gonflement provoqué par le chlorure de méthylène les a fait éclater. La synthèse de ces 2 peptides a néanmoins été menée à terme, leur différence de comportement en HPLC phase inverse permettant de les séparer facilement après libération de leur support.

Les seuls peptides présentant une pureté non satisfaisante après clivage par le fluorure d'hydrogène ne le doivent pas à des problèmes lors de la synthèse mais aux groupes protecteurs choisis ou à des problèmes fonctions de la séquence peptidique.

Les méthodes de couplage que nous avons choisies d'utiliser se sont donc montrées d'une bonne efficacité. Cependant, il serait intéressant d'étudier le temps optimal nécessaire pour un couplage complet afin de réduire le temps de production de ces analogues.

La technique de purification utilisée n'a engendré aucune contamination, des peptides les uns envers les autres, détectable après analyse en acide aminé des produits purifiés.

Nous avons donc montré la faisabilité dans notre modèle de ces différentes méthodes:

- synthèse phase solide en "sachet".
- clivage par le fluorure d'hydrogène avec un appareil multiposte.

2. 5- Analyse des problèmes rencontrés

L'étude des problèmes survenus durant les synthèses s'est trouvée facilitée par le fait que nous avons synthétisé des séries de peptides.

La grande majorité des produits obtenus présentait une pureté satisfaisante (HPLC analytique et analyse d'acides aminés), démontrant ainsi que les anomalies observées n'étaient pas dues à la présence des résidus arginine, glycine et sérine constants dans tous les analogues. L'apparition d'un pic

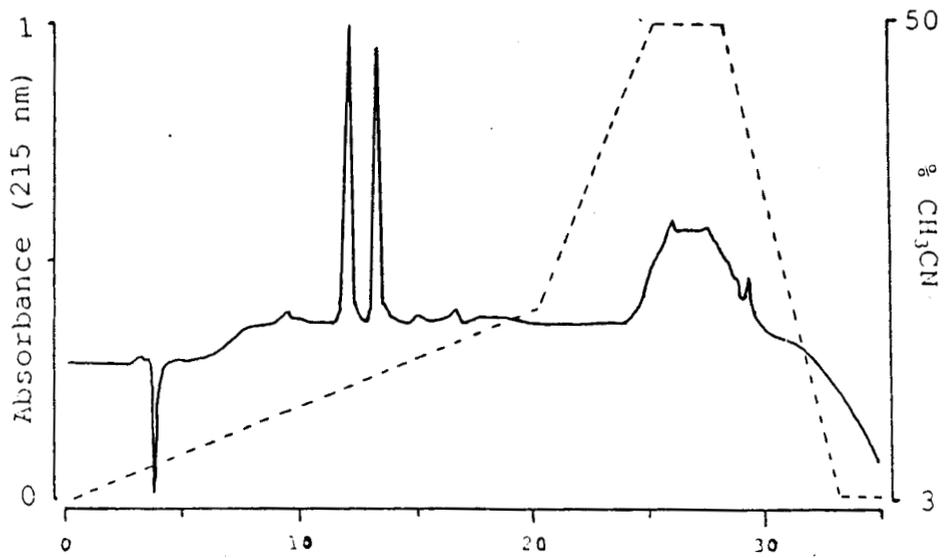


figure 21: HPLC phase inverse analytique du peptide du brut Arg-Met-Asp-Ser

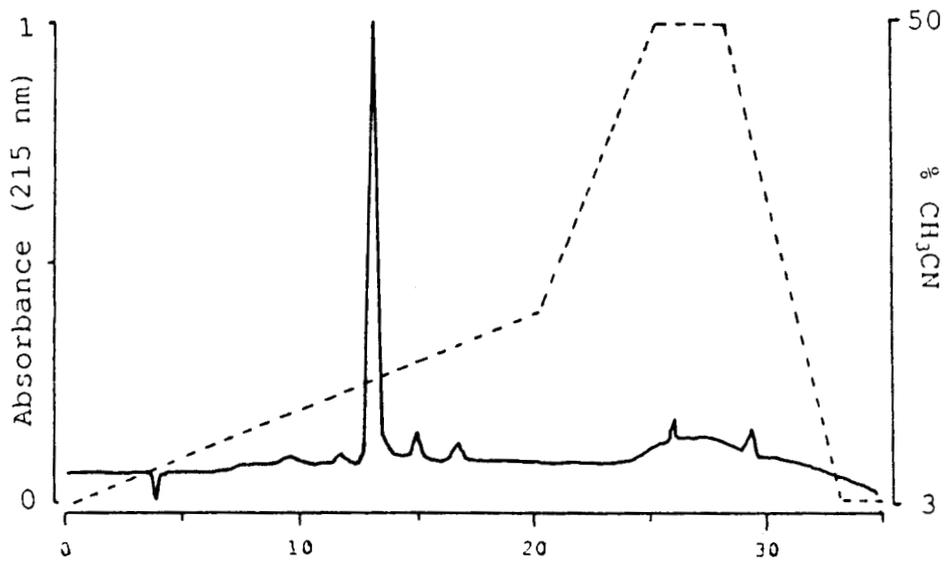


figure 22: HPLC phase inverse analytique du peptide brut Arg-Met-Asp-Ser après chauffage à 50°C dans l'eau

constants dans tous les analogues. L'apparition d'un pic parasite en HPLC phase inverse était donc provoquée par le nouveau résidu introduit dans la séquence.

En fonction de la nature de ce résidu, nous pouvions alors orienter notre recherche afin de déterminer la cause de la réaction secondaire obtenue (choix du groupe protecteur, réarrangement de la séquence, stratégie de synthèse).

- Arg-Met-Asp-Ser.

L'HPLC phase inverse du peptide brut montre la présence de 2 produits ayant des temps de rétention différents (figure 21). L'analyse d'acides aminés de ce peptide montre une composition normale du peptide (la faible valeur de la méthionine peut être due à son oxydation lors de l'hydrolyse).

Le clivage au fluorure d'hydrogène a été réalisé sans déprotection préalable du tertiobutyloxycarbone de la fonction α aminée de l'arginine et en présence de diméthylsulfure. Le mécanisme de libération des groupes protecteurs étant générateur de carbocations, il est alors probable qu'il y ait eu formation du tertiobutylsulfonium de la méthionine malgré la présence du diméthylsulfure.

Cette hypothèse a été confortée par l'analyse en HPLC phase inverse après chauffage du peptide brut dans l'eau à 50°C. En effet dans ces conditions, le second pic disparaît complètement avec génération de la méthionine et libération de tertiobutanol (figure 22).

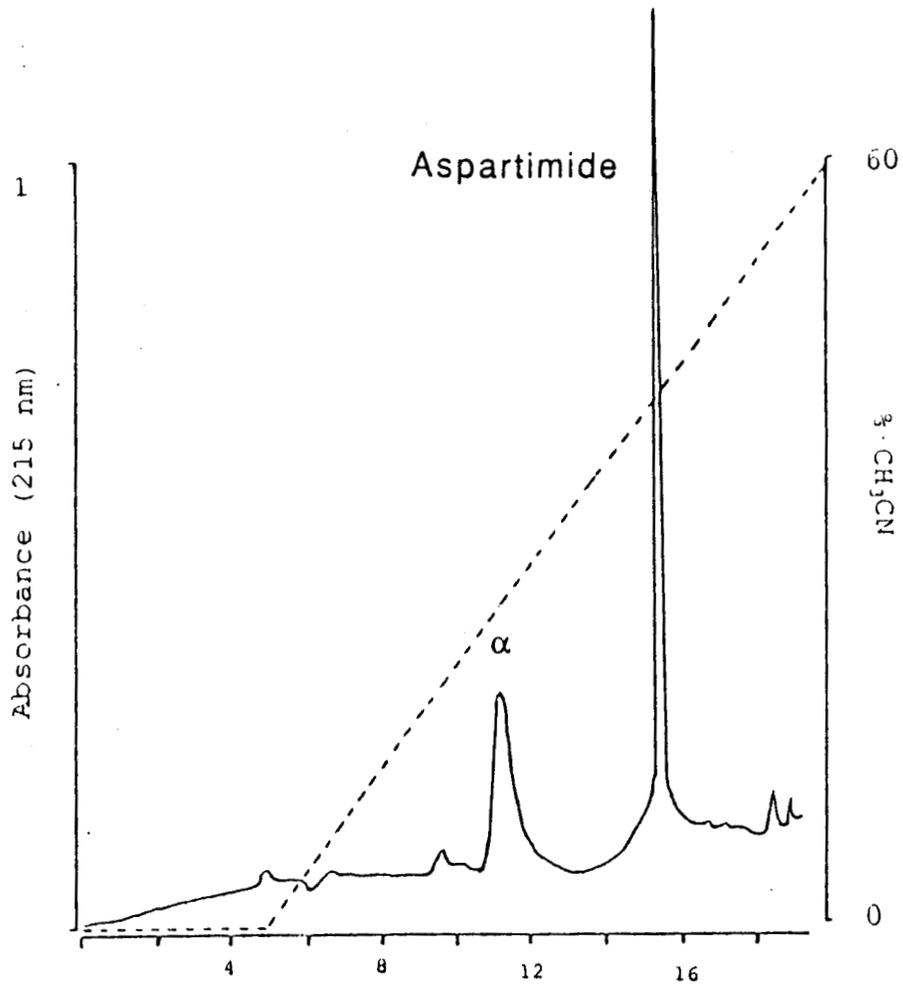


figure 23: HPLC phase inverse analytique du peptide brut Arg-Asp-Asp-Ser

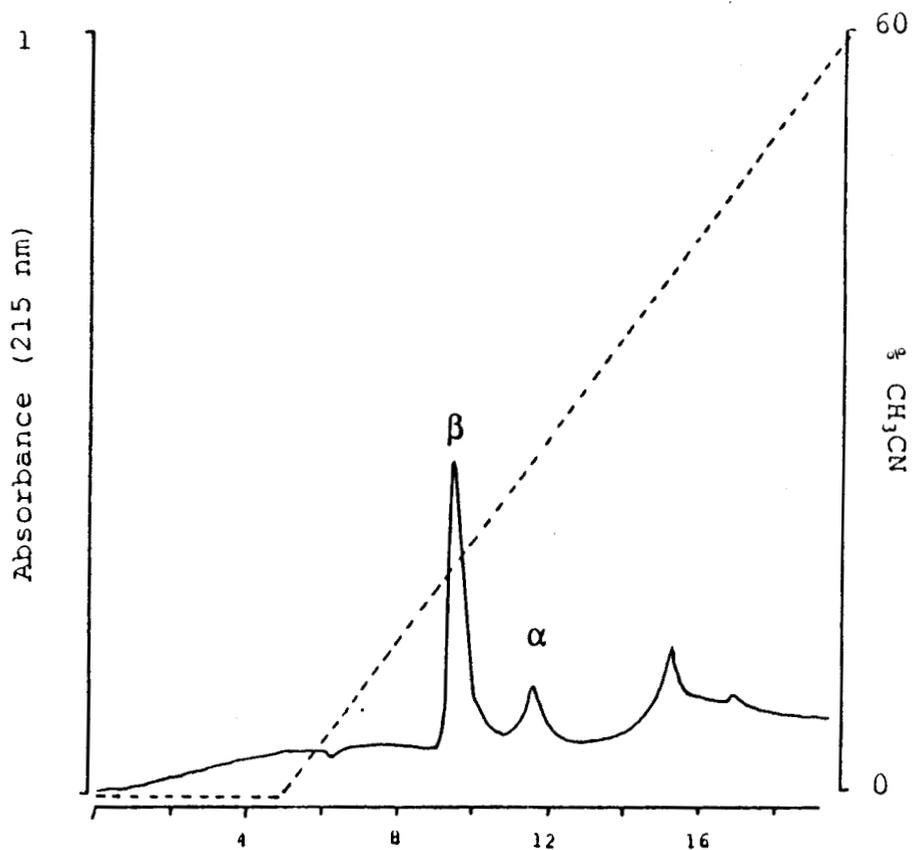


figure 24: HPLC phase inverse analytique de la forme aspartimide du Arg-Asp-Asp-Ser après chauffage en milieu basique

- Arg-Asp-Asp-Ser.

L'HPLC phase inverse du peptide brut montre de nouveau la présence d'une impureté (présence de 2 pics) (figure 23). L'analyse ~~d'~~ acides aminés montre une composition normale du peptide.

Nous pouvons alors supposer qu'il s'agit:

- d'une mauvaise déprotection de l'un des résidus lors du clivage au fluorure d'hydrogène qui est complétée au cours de l'hydrolyse acide totale.
- de la formation d'un peptide β migré.
- de la formation d'un aspartimide, intermédiaire précédant la forme β migrée.

Les analyses en spectrométrie de masse des 2 produits après séparation en HPLC phase inverse préparative a montré une différence de masse de 18. Le premier pic correspond à la masse attendue $(M+H)^+=492$, l'ion moléculaire du second est de $(M+H)^+=474$.

Nous sommes donc en présence de la forme aspartimide. De plus, après chauffage en milieu basique du peptide sous cette forme, nous observons la disparition du pic correspondant à l'aspartimide et apparition d'un nouveau pic devant celui possédant la masse correcte (figure 24). Ce nouveau produit correspond sans doute au β migré. En effet, la forme aspartimide dans de telles conditions se réarrange préférentiellement en β migré (environ 80% de peptide sous forme β et 20% sous forme α) (Tam, 1979).

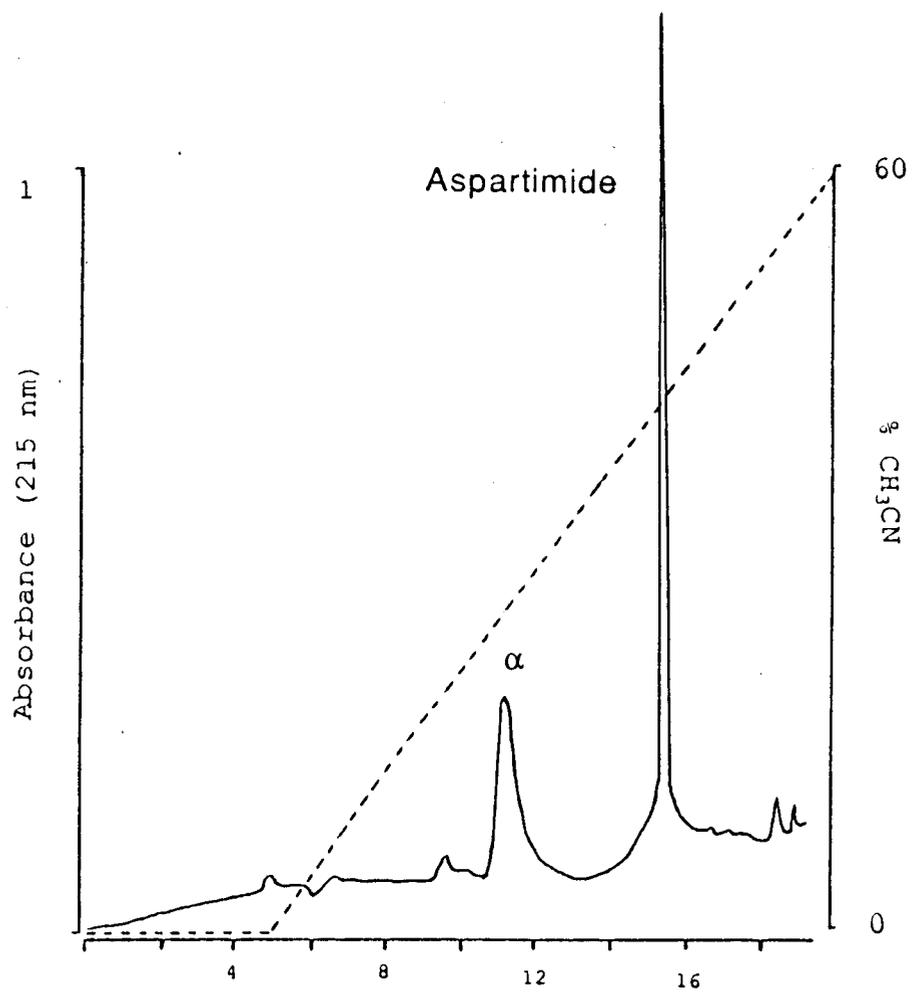


figure 25: HPLC phase inverse analytique du peptide brut Arg-Asp-Asp-Ser protégé durant la synthèse par 2 esters de cyclohexyles

L'obtention de ce peptide sous forme aspartimide reste surprenante. En effet, nous avons protégé l'acide aspartique adjacent à la sérine par un ester de cyclohexyle, groupement recommandé pour éviter la formation de l'aspartimide. D'après les HPLC phase inverse de tous les autres peptides de la série Arg-Xxx-Asp-Ser, il apparait que ce réarrangement est séquence dépendant. En effet, nous n'avons jamais retrouvé d'impureté en quantité si importante pouvant correspondre à cet aspartimide.

Nous avons donc envisagé la synthèse suivant d'autres stratégies de groupes protecteurs et de clivage au fluorure d'hydrogène afin d'obtenir ce peptide avec un minimum de produit secondaire.

Dans toute la série Arg-Xxx-Asp-Ser, seul ce peptide a induit la formation de l'aspartimide dans des proportions très importantes. Le second résidu acide aspartique semble être une cause de cette réaction intramoléculaire.

Nous avons réalisé une nouvelle synthèse en protégeant ces deux résidus par un ester de cyclohexyle, par couplage utilisant la méthode d'activation au BOP et un clivage final par le fluorure d'hydrogène selon la technique du "High HF".

Le choix du couplage par la méthode d'activation au BOP en présence d'une forte concentration en DIEA n'est pas gênant dans ce cas. En effet, il a été montré que le traitement du peptide Glu(OBzl)-**Asp(OCHx)**-Gly-Thr(Bzl) sur résine par la DIEA n'est pas générateur de peptide sous forme d'aspartimide .

Après clivage au fluorure d'hydrogène, l'analyse en HPLC phase inverse met en évidence, une fois de plus, un pourcentage important du peptide sous forme aspartimide (figure 25). Ce

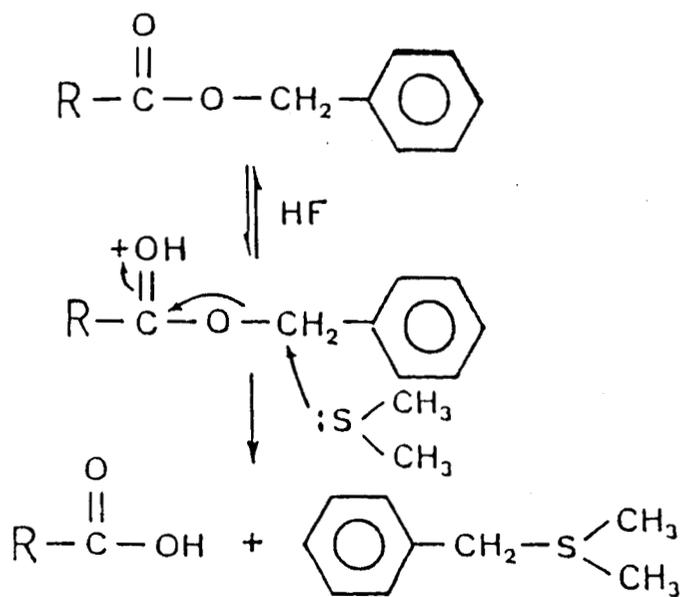


Figure 25' : coupure au fluorure d'hydrogène type $\text{S}_{\text{N}}2$

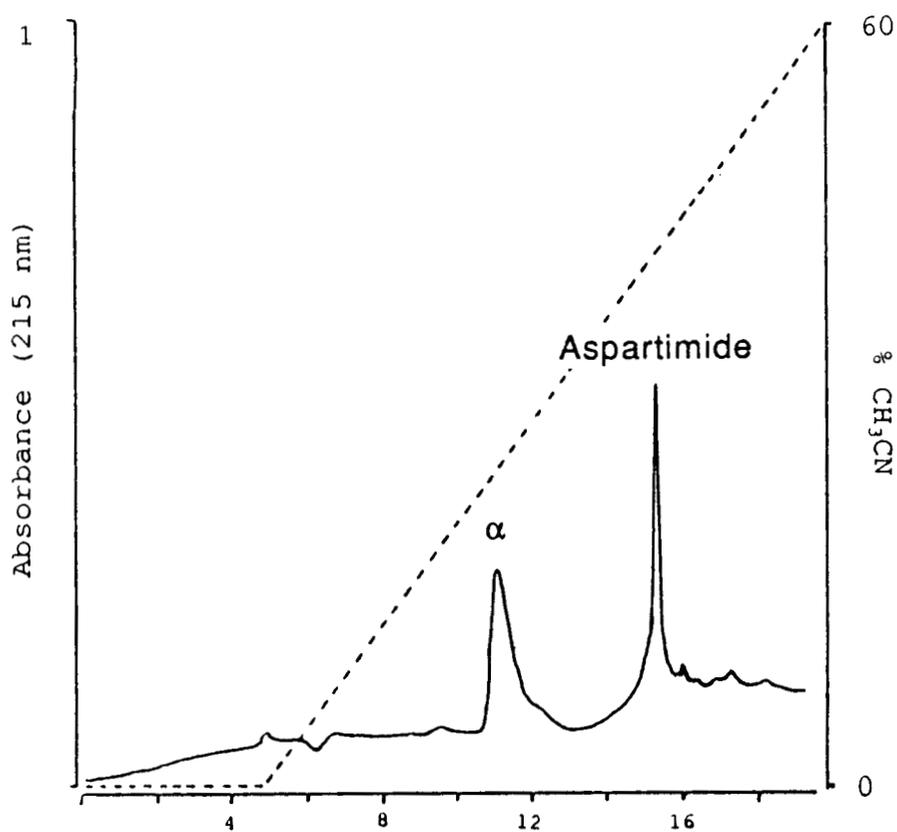


figure 26: HPLC phase inverse analytique du peptide brut Arg-Asp-Asp-Ser protégé durant la synthèse par 2 esters benzyliques

résultat montre qu'il n'est pas possible d'influer sur cette réaction par modification du groupe protecteur sur le deuxième résidu acide aspartique.

Yang et Merrifield (Yang, 1976) minimisent la formation d'aspartimide en protégeant la fonction β carboxylique de l'acide aspartique par un ester phénacylique. La déprotection préalable de ce groupe, (avant clivage par le fluorure d'hydrogène), par un réactif nucléophile comme le thiophénoxyde de sodium réduit notablement la formation de l'imide. Cette étude avait été réalisée d'après les observations faites par Ondetti (Ondetti, 1968) montrant que la réaction de cyclisation catalysée en milieu acide était fortement retardée quand la fonction β -carboxylique du résidu acide aspartique était libre.

Nous avons alors envisagé la synthèse de ce peptide en protégeant les deux résidus acide aspartique par un ester benzylique et en clivant le peptide de la résine par du fluorure d'hydrogène selon le protocole de "Low and High HF".

Le clivage des groupes protecteurs en "Low HF", c'est à dire sous faible concentration en fluorure d'hydrogène en présence de diméthylsulfure (DMS) et de p.crésol (2,5ml/6,5ml/1gr), est obtenu suivant un mécanisme différent du "High HF". En effet, dans ce cas, l'hétérolyse de la plupart des groupes protecteurs est provoquée par un réactif nucléophile, le diméthylsulfure (figure 25'). Le mécanisme mis en jeu est alors de type S_N2 . Après deux heures à 0°C, le fluorure d'hydrogène et le diméthylsulfure sont éliminés par évaporation. On peut alors procéder à un clivage en condition de "High HF". Dans notre

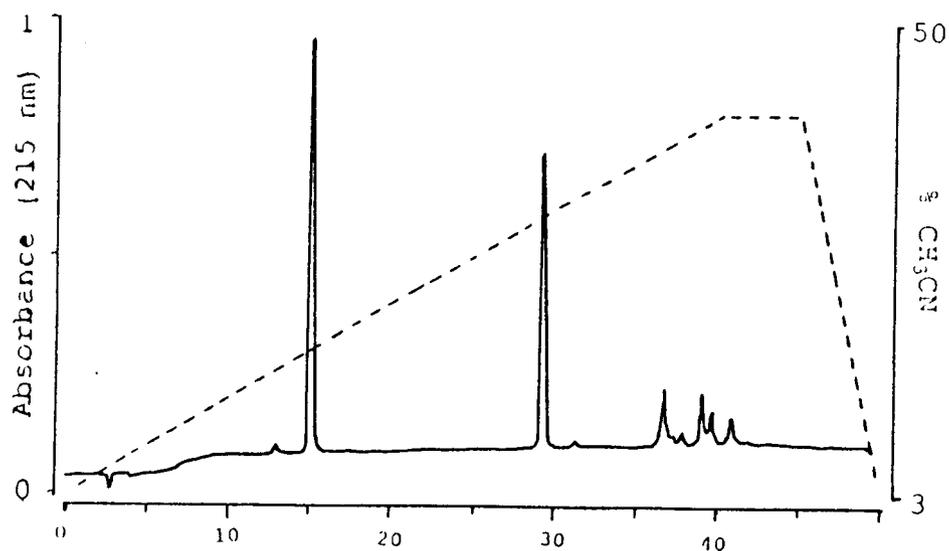


figure 27: HPLC phase inverse analytique du peptide brut Arg-Tyr-Asp-Ser.

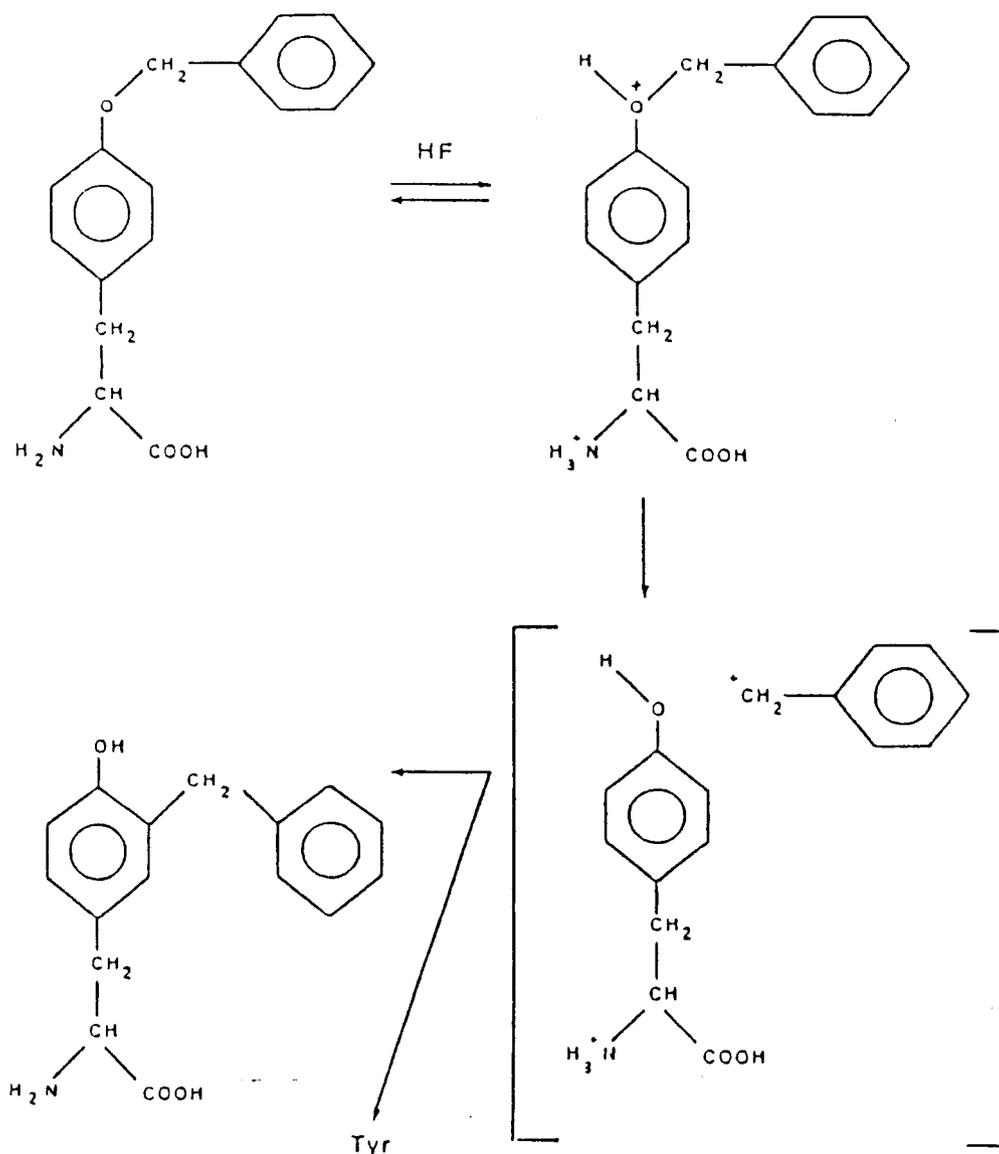


figure 28: Alkylation de la tyrosine suite à la déprotection du groupement benzyle.

étude, cette dernière étape permet de déprotéger le groupement tosyle de l'arginine.

Ainsi, la formation de l'aspartimide pourrait être limitée par compétition entre la cyclisation (induite par l'attaque de l'azote sur la liaison peptidique) et l'hétérolyse (provoquée par le diméthyle sulfure).

Après clivage dans de telles conditions, il semble qu'il y ait une nette amélioration du rendement de produit sous la bonne forme (figure 26). En effet, nous n'obtenons dans ce cas que 25% de peptide sous forme aspartimide alors que précédemment nous en avions 50%.

- Arg-Tyr-Asp-Ser.

Le groupe protecteur que nous avons employé pour protéger la fonction phénol du résidu tyrosine est l'éther benzylique. Après clivage au fluorure d'hydrogène, le produit analysé en HPLC phase inverse montre la présence de 2 produits (figure 27).

Le groupe protecteur utilisé a certainement été à l'origine d'un réarrangement de l'éther benzylique de la tyrosine en benzyl-3 tyrosine (Erickson, 1973) (figure 28) lors de la déprotection.

L'analyse par spectrométrie de masse a montré que la différence de masse entre les 2 produits séparés par HPLC phase inverse préparative correspond effectivement à la masse d'un benzyle $(M+H)^+=540$ et 630 .

L'hypothèse du réarrangement en benzyl-3 tyrosine est d'ailleurs confirmée par les analyses ~~de~~ acides aminés.

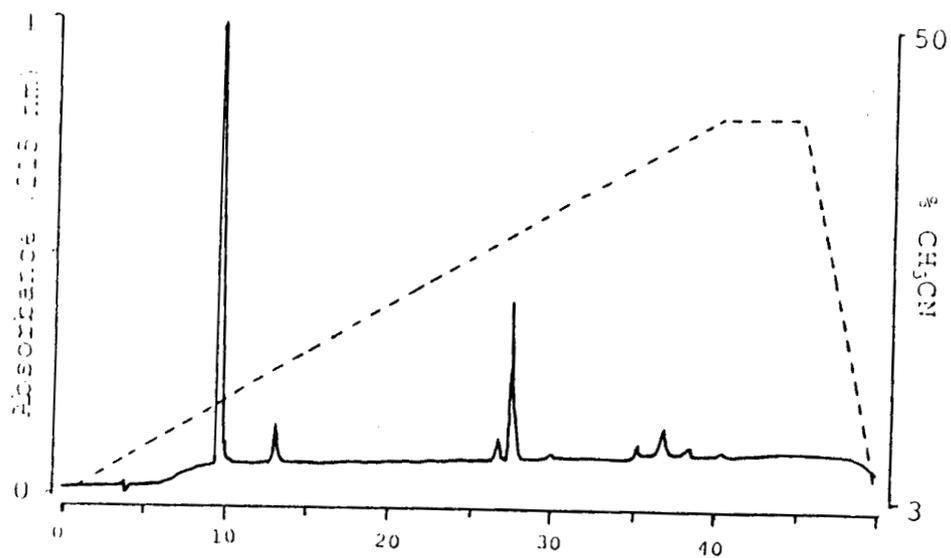


figure 29: HPLC phase inverse analytique du peptide brut Arg-Glu-Asp-Ser

L'analyse ~~de~~ d'acides aminés après hydrolyse totale sur le second dérivé révèle une absence totale de tyrosine et aucun pic parasite. Nous savons que la benzyl-3 tyrosine ne donne pas de pic défini (Erickson 1973). Si une déprotection insuffisante était à l'origine de l'impureté, la tyrosine aurait été visualisée lors de l'analyse ~~de~~ d'acides aminés par déprotection complémentaire de ce résidu lors de l'hydrolyse acide totale.

- Arg-Glu-Asp-Ser.

Le chromatogramme de l'HPLC phase inverse du peptide brut, montre de nouveau deux pics (figure 29). On pourrait s'attendre à obtenir, comme dans le cas précédent, le peptide sous forme normale et sous forme aspartimide. En effet, l'enchaînement Arg-Glu-Asp-Ser ressemble fortement à celui que l'on trouve dans peptide Glu-Asp-Gly-Thr, peptide de référence pour l'étude de la β migration (via l'aspartimide). Cependant, la différence de temps de rétention entre les deux produits semble être trop importante pour que ce soit le cas.

Ces deux dérivés ont été isolés par HPLC phase inverse préparative et analysés en spectrométrie de masse FAB. Les résultats obtenus ont montré que nous étions alors en présence d'un produit possédant la masse attendue $(M+H)^+=506$ (peptide ayant le temps de rétention le plus faible) ainsi que d'un dérivé possédant un excès de masse de 90 $(M+H)^+=596$ (figure 30).

Cette différence de 90 pourrait correspondre à une mauvaise déprotection des fonctions γ carboxylique et hydroxyle respectivement de l'acide glutamique et de la sérine, qui ont été protégées sous forme d'ester benzylique et d'éther

DS90 25JA0004.9 RT= 02:23 +FAB LRP 25-Jan-89 10:39
 TIC= 33222660 100%= 2123072 DEFOORT REDS IMPURETES TG/A1/EAU +VE

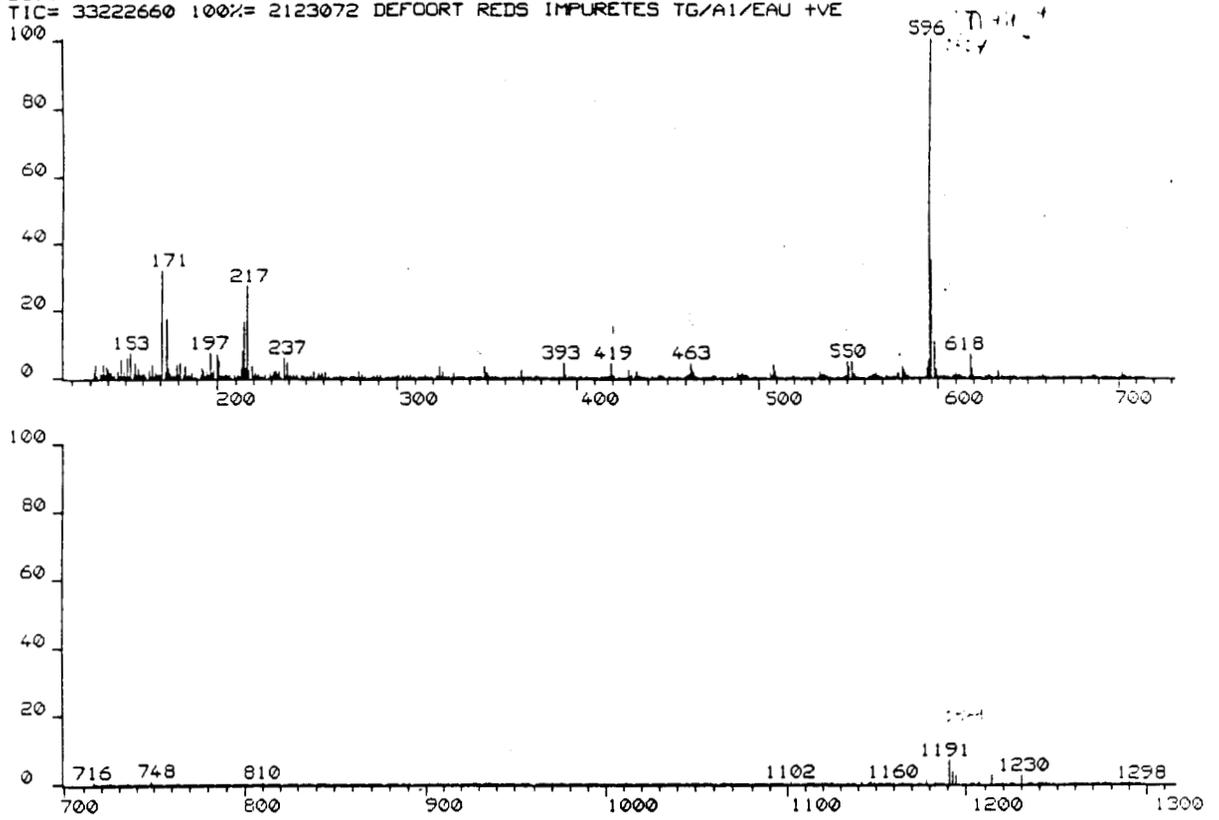
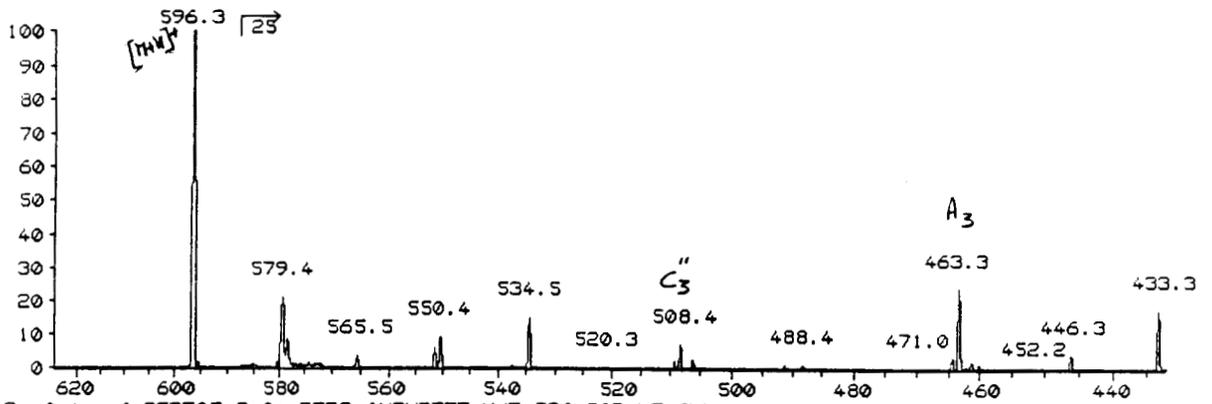


figure 30: Spectre de masse FAB de l'impureté du peptide Arg-Glu-Asp-Ser



Profile of PEPT05.2-0: REDS IMPURETE M/Z 596 CID HE 6KV
 TIC: 32809150 100%: 124361mV Base: 124565mV Mass 25-Jan-89 18:28

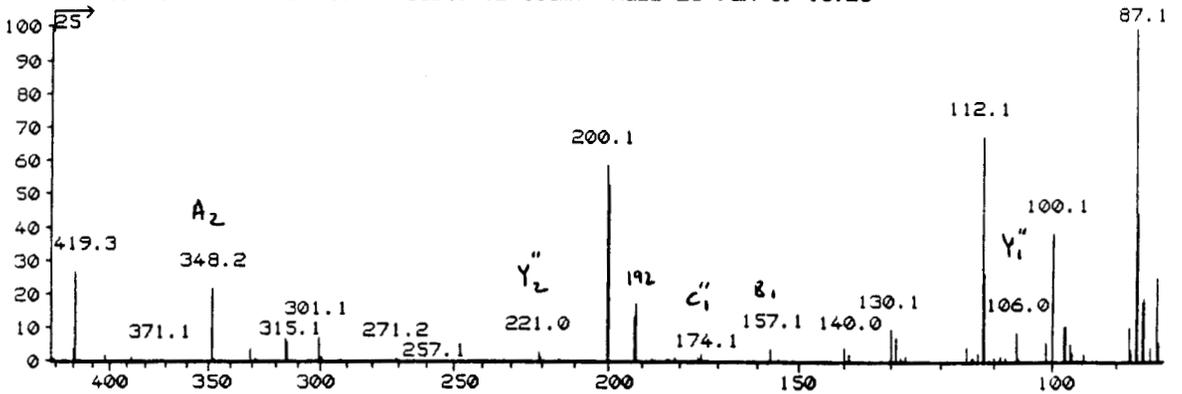


figure 31: Spectre de masse FAB MS-MS de l'impureté du peptide Arg-Glu-Asp-Ser

benzylique. Une autre possibilité serait une réaction de l'acide glutamique avec le crésol. Une telle réaction a en effet déjà été décrite entre l'acide glutamique et l'anisole (Feinberg, 1975).

L'utilisation de la spectrométrie de masse nous a permis de mettre en évidence la localisation de cette masse exédentaire. Sur ce produit a été réalisé un spectre de masse-masse (FAB MS-MS). Après la première ionisation, l'ion moléculaire a été isolé puis de nouveau bombardé de façon à réaliser un deuxième spectre de masse. Cette technique permet d'obtenir alors un signal sans bruit de fond inhérent à d'éventuelles impuretés du produit et de la matrice. Les spectres de FAB MS montrent souvent des pics aux masses 217, 323 qui correspondent à la matrice de thioglycérol.

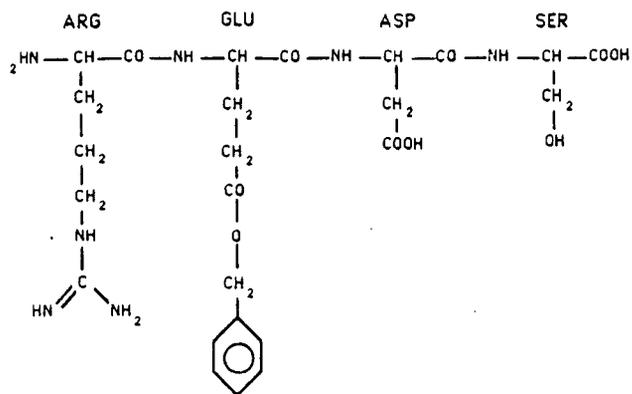
Ainsi, le nouveau spectre de masse effectué sur l'ion moléculaire à 596 montre de nombreux pics de fragmentation (figure 31). A l'aide du programme informatique de prévision de fragmentation réalisé par M. Bossus dans notre laboratoire, nous avons imaginé tous les fragments possibles en considérant un ester benzylique sur l'acide glutamique (figure 32).

Ion moléculaire (M+H)⁺: 596

| | A | B | C'' | X | Y'' | Z' |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 129 | 157 | 174 | 132 | 106 | 89 |
| 2 | 348 | 376 | 393 | 247 | 221 | 204 |
| 3 | 463 | 491 | 508 | 466 | 440 | 423 |

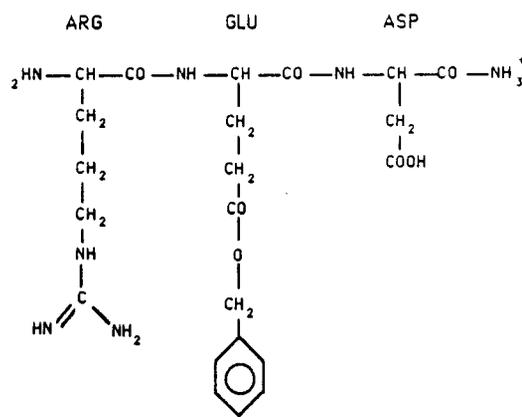
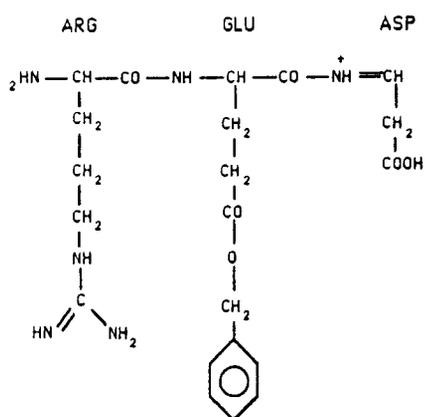
Figure 32

$$(M+H)^+ = 596$$



$$A_3 = 463$$

$$C_3'' = 508$$



$$A_2 = 348$$

$$\text{Ion immonium} = 192$$

$$Y_2'' = 221$$

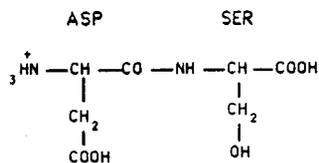
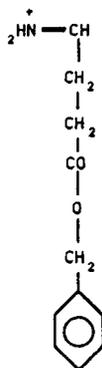
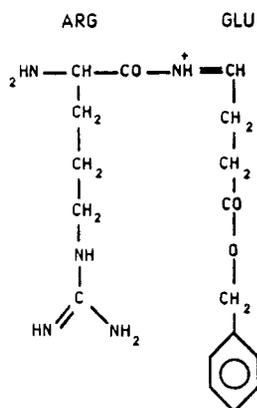


Figure 32': Schéma des principaux fragments observés en FAB MS-MS de l'impureté du peptide Arg-Glu-Asp-Ser

Il s'est alors avéré que nous retrouvions dans ce tableau une masse de 348 qui correspond au fragment A₂ de ce peptide. Il n'y a alors plus aucun doute sur la présence de cette masse excédentaire de 90. Ceci est d'autant plus vrai que nous retrouvons dans ce spectre un ion à 192 qui correspondrait à l'ion immonium de l'ester benzylique de l'acide glutamique (Sur la figure 32' sont représentés les fragments obtenus).

La prévision de fragmentation en considérant un benzyle sur le résidu sérine confirme les résultats précédemment cités (figure 33)

| Ion moléculaire (M+H) ⁺ : 596 | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A | B | C'' | X | Y'' | Z' |
| 1 | 129 | 157 | 174 | 222 | 196 | 179 |
| 2 | 258 | 286 | 303 | 337 | 311 | 294 |
| 3 | 373 | 401 | 418 | 466 | 440 | 423 |

Figure 33

3- SYNTHÈSES DES PEPTIDES ANALOGUES DE Arg-Gly-Asp-Ser AVEC DES ACIDES AMINES DE SÉRIE D.

D'autres analogues ont été synthétisés en substituant les résidus arginine et glycine du tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser par des acides aminés de série D. Ce type de modification présente un double intérêt:

-D'une part, l'introduction d'un résidu acide aminé de série D confère une meilleure résistance à la dégradation protéolytique survenant *in vivo*. En effet, ces systèmes

enzymatiques ne peuvent dégrader que les structures peptidiques constituées de résidus d'acides aminés de série L. Il est à noter que le peptide D-Arg-Gly-Asp-Ser dans le modèle cellulaire conserve son activité inhibitrice de la fixation des cellules sur la fibronectine (Pierschbacher, 1987).

-D'autre part, il était intéressant d'étudier l'influence de la substitution des hydrogènes pro R ou pro S du carbone α du résidu glycine. Des études menées sur la luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) ont montré (Coy, 1976) que la substitution de la glycine, située en position 6 dans ce peptide, par des résidus d'acides aminés de série D permet d'obtenir des agonistes très puissants de cette hormone alors que les substitutions par des analogues de série L entraînaient des pertes d'activité.

Afin d'étudier si de tels résultats pouvaient être retrouvés dans notre modèle, nous avons synthétisé les peptides suivant: D-Arg-Gly-Asp-Ser, Arg-D-Trp-Asp-Ser, D-Arg-Trp-Asp-Ser, Arg-D-Ala-Asp-Ser et D-Arg-D-Trp-Asp-Ser.

3. 1- Stratégie de synthèse

Les groupes protecteurs utilisés pour la réalisation de ces synthèses sont identiques à ceux décrits pour la synthèse de la série Arg-Xxx-Asp-Ser. Les peptides possédant un résidu tryptophane ont subi les cycles de déprotection en présence d'éthanedithiol. Les clivages au fluorure d'hydrogène ont été effectués selon le protocole de "High HF" en présence de

p.crésol et de diméthylsulfure pour les peptides possédant un résidu tryptophane.

3.2- Résultats

En raison des difficultés de reproduction des expériences réalisées, nous avons préféré ne pas présenter dans ce travail les résultats obtenus.

4- RESULTATS BIOLOGIQUES

Le but de cette étude avec les analogues de Arg-Gly-Asp-Ser était de définir une ou plusieurs structures spécifiques du récepteur parasitaire ^{la} par rapport au récepteur cellulaire ^{de la} fibronectine. L'activité de tous ces peptides aurait donc dû être testée dans le modèle parasitaire ainsi que dans le modèle cellulaire. En fait, seuls les résultats obtenus avec les parasites pourront être présentés. Nous n'avons jamais été capables de reproduire les expériences sur les cellules selon les protocoles publiés dans la littérature (Hayman, 1985; Akiyama, 1985).

4. 1- Choix des méthodes d'investigations. Adhésion fibronectine-parasite

L'influence d'un peptide contenant une séquence RGD sur la fixation de la fibronectine sur les parasites a déjà été étudiée à l'Institut Pasteur de Lille dans l'équipe d'A. Ouaiissi. Le principe de ce test consiste en une compétition en solution de la fixation de la fibronectine marquée à l'iode sur le parasite avec le peptide. Après une heure d'incubation, le milieu réactionnel est déposé à la surface d'une solution de RPMI (milieu de culture utilisé pour l'entretien du cycle parasitaire *in vitro*) contenant 20% de sucrose. Par centrifugation, les parasites traversent ce gradient en entraînant la fibronectine fixée à leur surface. La fibronectine libre reste à la surface.

Après élimination du surnageant, les parasites contenus dans le culot sont récupérés puis la radioactivité est déterminée au

moyen d'un compteur gamma afin de quantifier la fibronectine fixée à leur surface.

Au cours d'une étude sur la fixation sur le parasite de peptide marqué à la fluorescéine et contenant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser, A. OuaiSSI et col ont montré que l'expression du récepteur parasitaire ^{pa} pour fibronectine était caractéristique d'un stade particulier de maturation du trypomastigote (A. OuaiSSI, 1988). En effet, seulement 10% des parasites fraîchement libérés des fibroblastes infectés ont la capacité de fixer le décapeptide contenant RGD. Par contre, 85% de ces mêmes parasites peuvent le fixer après 12 heures d'incubation dans un milieu de culture. Ces observations sont en accord avec celles rapportées par Piras (Piras, 1983) qui a montré que les étapes d'adhésion et de pénétration dépendaient des protéines membranaires du parasite qui se découvrent avec la maturation extracellulaire des trypomastigotes.

Pour mener à bien ces expériences, nous avons donc veillé à laisser murer quelques heures les parasites dans le milieu de culture avant de réaliser les tests.

Le témoin 100 % de fixation de fibronectine sur les parasites, est obtenu par simple contact entre la fibronectine marquée et les parasites.

Le témoin 0 % de fixation de fibronectine sur les parasites, est obtenu par contact entre la fibronectine marquée en présence d'un excès de 100 en fibronectine non marquée et les parasites.

En raison du grand nombre de peptides à étudier, il n'a été possible de les tester qu'à une seule concentration.

Cette concentration a été choisie par rapport aux résultats préalablement publiés. La courbe dose réponse présentée (figure

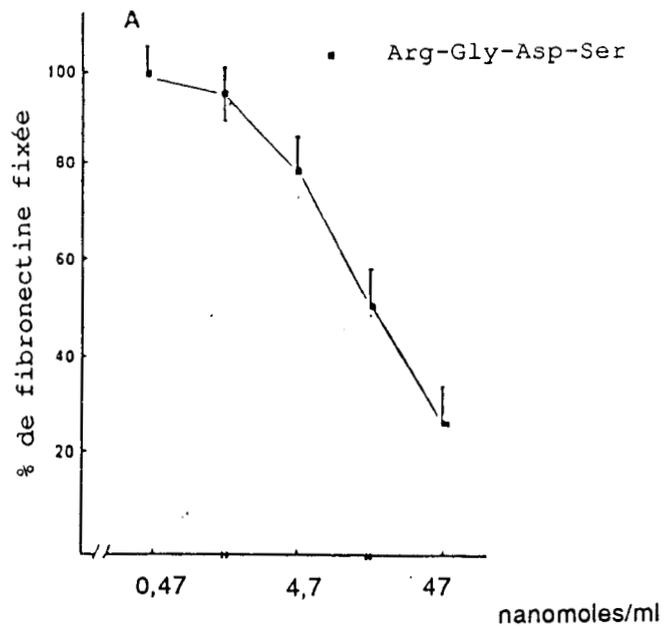


figure 34 : Courbe d'inhibition de la fixation de la fibronectine marquée à l'iode par des peptides à RGD (Courbe d'après Ouaiissi, 1986)

34) nous montre qu'à la concentration de 20 µg/ml de Arg-Gly-Asp-Ser (47 nanomoles/ml), la fixation de la fibronectine sur les trypanostigotes était inhibée à 80 %. Nous voulions, dans cette étude, différencier l'affinité de tous ces peptides pour le récepteur parasitaire et trouver si possible un meilleur inhibiteur que le Arg-Gly-Asp-Ser. Nous avons donc décidé de nous situer à une concentration inférieure afin de mieux discerner un bon inhibiteur d'un inhibiteur moyen.

Compte tenu de toutes ces exigences, nous avons choisi de travailler à la concentration de 10 nmoles/ml qui reste une bonne concentration inhibitrice pour le peptide Arg-Gly-Asp-Ser.

Grâce aux analyses quantitatives réalisées sur les peptides en solution, hydrolyse acide totale en phase gaz suivie de l'analyse ~~de~~ acides aminés, nous avons pu préparer des solutions mères afin de travailler avec des concentrations rigoureusement identiques pour tous les peptides.

4. 2- Résultats

Les résultats précédemment publiés (Ouaissi, 1986) représentaient l'activité inhibitrice des peptides contenant la séquence RGD en pourcentage d'inhibition. Cette valeur était obtenue en appliquant la formule: $\{1 - [A/B]\} \times 100$ ou **A** représente la radioactivité fixée sur les trypanostigotes en présence d'inhibiteur minorée de la radioactivité fixée sur les trypanostigotes en présence d'un excès de 100 en fibronectine froide et **B** représente la radioactivité fixée sur les trypanostigotes en absence d'inhibiteur minorée de la

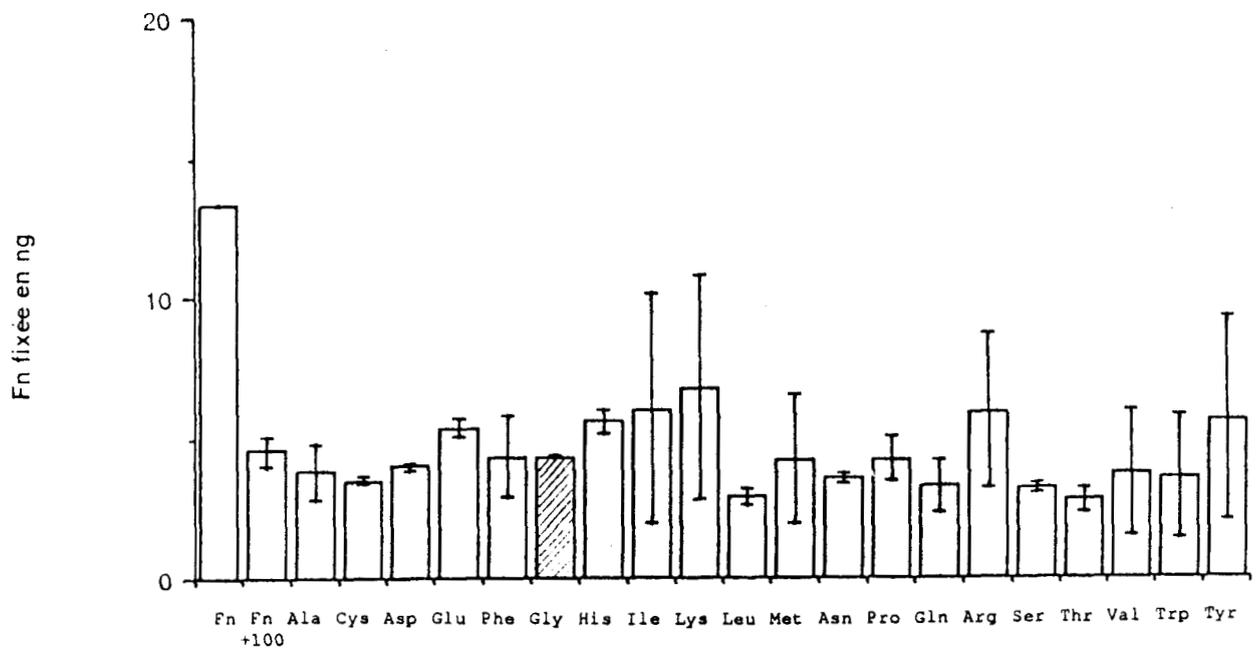


figure 35 : Représentation des moyennes et écart-types sur 2 expériences d'inhibition de la fixation de la fibronectine marquée à l'iode par la série Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser.

radioactivité fixée sur les trypomastigotes en présence d'un excès de 100 en fibronectine froide.

Dans notre étude, nous n'avons pas pu représenter l'activité des peptides testés par un pourcentage d'inhibition en raison d'un phénomène d'amplification de la fixation de la fibronectine sur les trypomastigotes en présence de certains peptides. Nous avons donc choisi de représenter la quantité de fibronectine fixée sur les parasites. En connaissant l'activité spécifique de la fibronectine marquée (exprimée en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), il était alors possible de quantifier la fibronectine fixée.

Les expériences d'inhibition ont été réalisées trois fois. Au cours d'une même expérience, chaque peptide a été testé trois fois à la même concentration. Les résultats présentés ont été calculés sur la base de deux expériences.

4. 2. 1- Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser

Comme nous pouvons l'observer sur la figure 35, il apparaît que tous les peptides de cette série sont inhibiteurs de la fixation de la fibronectine sur les trypomastigotes. L'influence du résidu situé du côté N-terminal de Arg-Gly-Asp-Ser ne semble pas modifier fondamentalement l'interaction de ces peptides avec le récepteur parasitaire à fibronectine.

Toute fois, il n'est pas possible de déterminer s'ils sont meilleurs inhibiteurs car les valeurs auxquelles ils se situent sont proches du 100% d'inhibition.

Afin de mieux différencier l'affinité de tous ces peptides pour le récepteur parasitaire à fibronectine, il faudrait certainement les tester à plusieurs concentrations.

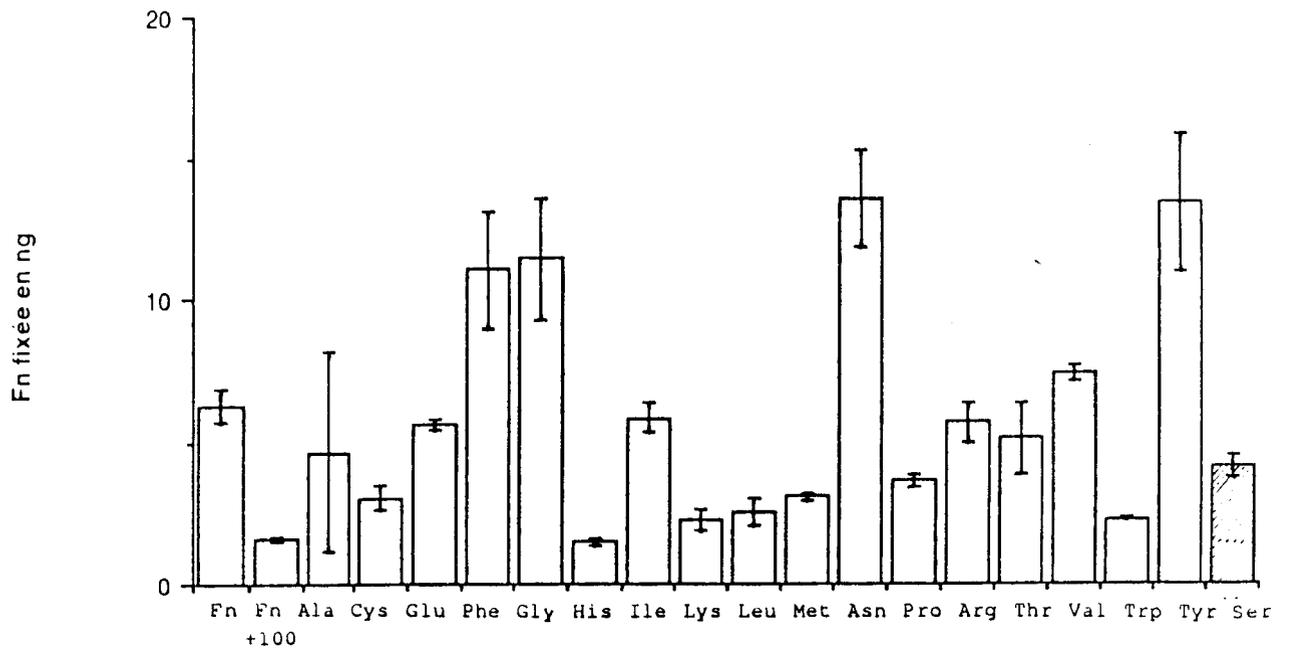


figure 36: Représentation des moyennes et écart-types sur 2 expériences d'inhibition de la fixation de la fibronectine marquée à l'iode par la série Arg-Gly-Asp-Xxx.

4. 2. 2- Arg-Gly-Asp-Xxx

Dans cette série, nous retrouvons un nombre important de peptides qui restent inhibiteurs de la fixation de la fibronectine sur les parasites. En effet, sur les 18 peptides testés, 7 montrent, à la concentration de 10nmoles/ml, un effet inhibiteur sur la fixation de la fibronectine au moins égal à celui du peptide Arg-Gly-Asp-Ser (figure 36).

Cependant, l'analyse du tableau montre que certains peptides non-inhibiteurs provoquent une amplification de la fixation de la fibronectine sur les parasites. Ce phénomène inattendu est particulièrement remarquable pour les peptides Arg-Gly-Asp-Phe, Arg-Gly-Asp-Gly, Arg-Gly-Asp-Asn et Arg-Gly-Asp-Tyr. En effet, ils peuvent entraîner une fixation jusqu'à deux fois plus importante que celle observée normalement dans le témoins 100%.

Afin de déterminer si ce phénomène ne pouvait être dû à une dégradation des peptides en solution, nous avons analysé par HPLC phase inverse le peptide Arg-Gly-Asp-Tyr ayant servi à l'expérience. Cette analyse n'a montré aucune modification.

De plus, nous avons montré que ces peptides ne pouvaient pas être à l'origine de la précipitation de la fibronectine ni de son entraînement avec les parasites lors de la centrifugation sur le gradient de sucrose. L'expérience consistant à mettre en contact la fibronectine et les peptides puis à les passer sur le gradient de sucrose ne met pas en évidence de trace de radioactivité dans les culots de centrifugation.

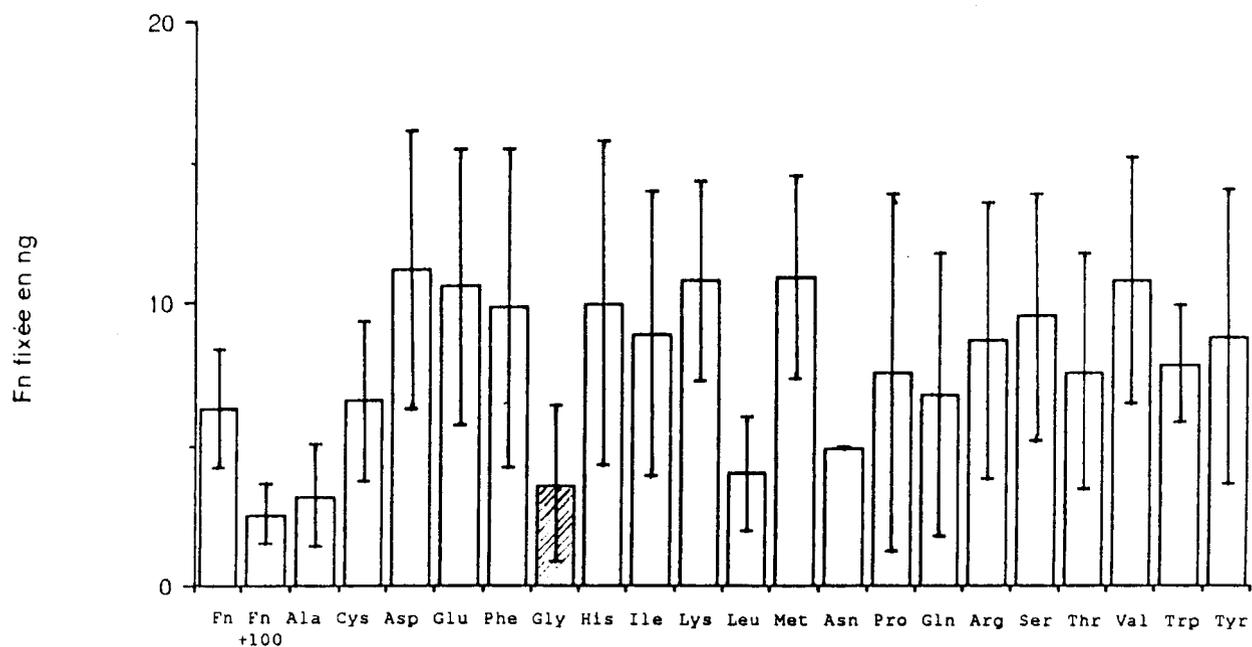


figure 37: Représentation des moyennes et écart-types sur 2 expériences d'inhibition de la fixation de la fibronectine marquée à l'iode par la série Arg-Xxx-Asp-Ser.

4. 2. 3- Arg-Xxx-Asp-Ser

Dans cette série, nous ne trouvons que très peu de peptides inhibiteurs. Il s'agit de Arg-Ala-Asp-Ser, Arg-Asn-Asp-Ser et Arg-Leu-Asp-Ser. Par contre comme dans la série précédente, de nombreux peptides amplifient la fixation de la fibronectine (figure 37).

4. 3- Conclusion

Afin d'étudier la contribution des acides aminés dans et aux alentours de la séquence RGD, nous avons synthétisé et testé trois séries de peptides: les Arg-Gly-Asp-Xxx, Arg-Xxx-Asp-Ser et Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser.

Les résultats obtenus montrent que si une certaine variabilité est permise pour le résidu sérine dans la séquence Arg-Gly-Asp-Ser, les possibilités de remplacement du résidu glycine sont plus restreintes. Par contre, l'introduction d'un acide aminé en position N-terminale du résidu arginine n'interfère pas avec l'inhibition de la fixation de la fibronectine à la surface du parasite.

Au total, seuls quelques peptides, Arg-Ala-Asp-Ser, Arg-Leu-Asp-Ser, Arg-Asn-Asp-Ser, Arg-Gly-Asp-Cys, Arg-Gly-Asp-His, Arg-Gly-Asp-Lys, Arg-Gly-Asp-Leu, Arg-Gly-Asp-Met, Arg-Gly-Asp-Pro et Arg-Gly-Asp-Trp, conservent un pouvoir inhibiteur comparable au Arg-Gly-Asp-Ser.

Par ailleurs, une activité d'amplification de la fixation de la fibronectine est observée dans de nombreux cas, suggérant

l'existence d'un second phénomène dont les résultats pourraient interférer avec le premier. Il est impossible à ce stade d'établir la part de chacun de ces phénomènes, éventuellement superposés, dans les résultats observés.

L'activité d'amplification pourrait s'expliquer par une expression accrue du récepteur de la fibronectine par augmentation de la synthèse protéique. Cette hypothèse est actuellement à l'étude afin de déterminer dans ce cas les mécanismes mis en jeu.

B- CIBLAGE DE DROGUES.

1- INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu, les drogues anti-*T. cruzi* possèdent de nombreux effets secondaires dus à leur faible sélectivité. Afin d'essayer de remédier à ce problème, nous avons entrepris une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de cette maladie par le ciblage de ces drogues sur le parasite.

La possibilité de diriger des drogues sélectivement vers des cellules cibles a été envisagée pour la première fois par Paul Ehrlich en 1906. Il a été le premier à suggérer que des molécules possédant une forte affinité pour certains tissus seraient capables de servir de porteurs d'agents cytotoxiques vers les cellules cibles, permettant ainsi de les concentrer dans leur environnement et d'augmenter leur efficacité. Cependant, c'est seulement depuis une vingtaine d'années que les développements en biologie et en médecine ont incité un nombre croissant de laboratoires à essayer de concrétiser cette théorie.

A l'heure actuelle, la grande majorité des porteurs testés sont de nature macromoléculaire et supposés interagir avec la surface de la cellule. Dans cette catégorie, on trouve, des lectines et des anticorps.

Ces porteurs doivent répondre à plusieurs critères pour être utilisable (Trouet, 1982). ils doivent être:

- sélectifs de la surface de la cellule cible.

- endocytés par cette même cellule et être transférés dans le compartiment lysosomal.
- dégradables.
- non immunogéniques.
- capables de traverser les différentes barrières anatomiques les séparant de la cible.

Une fois l'ensemble drogue-porteur endocyté, la drogue doit également, dans certains cas, être libérée de son porteur sous une forme active afin de pouvoir réaliser son action cytotoxique.

Cette approche thérapeutique a déjà été étudiée dans le traitement des cancers. Le ciblage d'agents anti-tumoraux à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques permet de réduire significativement leur toxicité sur les cellules à développement rapide qui sont principalement touchées lors de tels traitements (Moolten, 1976).

2- CHOIX DU PORTEUR

Avant d'avoir pu déterminer une structure spécifique du récepteur parasitaire à fibronectine, nous avons décidé d'utiliser comme porteur de drogue les peptides Arg-Gly-Asp-Ser et Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys(Acm). Pour faciliter l'écriture, ce peptide sera désigné par "Fn 80-88C". **Fn** désignant la fibronectine, **80-88** parce que ce peptide se situe dans la zone 80-88 du fragment de 11,5 KDa représenté sur la figure 4, et **C** parce que un résidu cystéine a été ajouté en position C-terminale du peptide.

A. Ouaiissi (1988) a montré qu'il était possible de cibler spécifiquement les trypomastigotes par utilisation du peptide Fn 80-88C couplé à la fluorescéine par son extrémité N-terminale. En effet, la fixation de ce peptide marqué à la fluorescéine est inhibée par des peptides contenant la séquence RGD. Il semble donc tout à fait envisageable de cibler spécifiquement d'autres drogues sur le parasite à l'aide de ce porteur peptidique.

Nous avons également considéré cette étude avec le peptide Arg-Gly-Asp-Ser dans un premier temps pour valider le ciblage de drogue avec un peptide de petite taille.

3- CHOIX DES DROGUES

Les drogues utilisées pour ce travail devaient répondre principalement à deux exigences:

- être actives sur la forme parasitaire que nous voulions cibler, c'est-à-dire le trypomastigote de *Trypanosoma cruzi*.
- être compatibles avec les techniques de synthèse employées au laboratoire, tant par la présence de fonctions réactives (carboxylique ou amine) que par leurs stabilités dans les différentes conditions de synthèse.

La plupart des drogues décrites pour la maladie de Chagas sont actives sur la forme trypomastigote. La première exigence ne réduit donc pas le nombre de drogues susceptibles d'être candidates pour le ciblage.

La seconde exigence fut plus restrictive. En effet, aucune des drogues décrites ne possèdent de fonctions carboxyliques ou amines pouvant être utilisables directement pour leur couplage

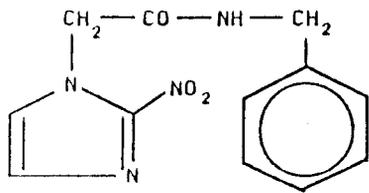
sur des peptidyl-résines. De plus, ces drogues font parties des nitroimidazoles, nitrofurannes ou imidazoles possédant souvent des chaînes latérales très élaborées, difficilement modifiables. Compte tenu de ces premières observations, notre choix s'est alors porté sur des molécules biologiquement actives, aisées à reproduire chimiquement afin d'introduire dans leur structure une fonction réactive.

3. 1- Benznidazole

Nous avons choisi en premier lieu le Benznidazole. Ce dérivé est l'un des deux médicaments utilisés de façon usuelle dans le traitement de la maladie de Chagas. Il fait parti de la famille des nitro-2 imidazoles et reste une molécule de structure relativement simple.

L'effet lytique de cette drogue est dû au nitro-2 imidazole, et la sélectivité sur le trypanostigote de *T. cruzi* à sa chaîne latérale constituée d'un N-benzyl acétamide.

Il est donc très important d'amener sur la peptidyl-résine une structure possédant le nitro-2 imidazole. L'introduction de ce dérivé se fera en fin de synthèse par couplage sur une fonction amine, il n'aura donc pas à subir d'étapes répétitives de couplage et de déprotection. Le seul traitement qui lui sera infligé sera le traitement au fluorure d'hydrogène permettant la libération du peptidyl-drogue de la résine. L'imidazole que l'on retrouve dans la structure du résidu histidine est résistant à un tel traitement tout comme la fonction nitro connue comme étant stable en milieu acide fort. Nous n'aurons donc pas à



BENZNIDAZOLE(Radanil*)

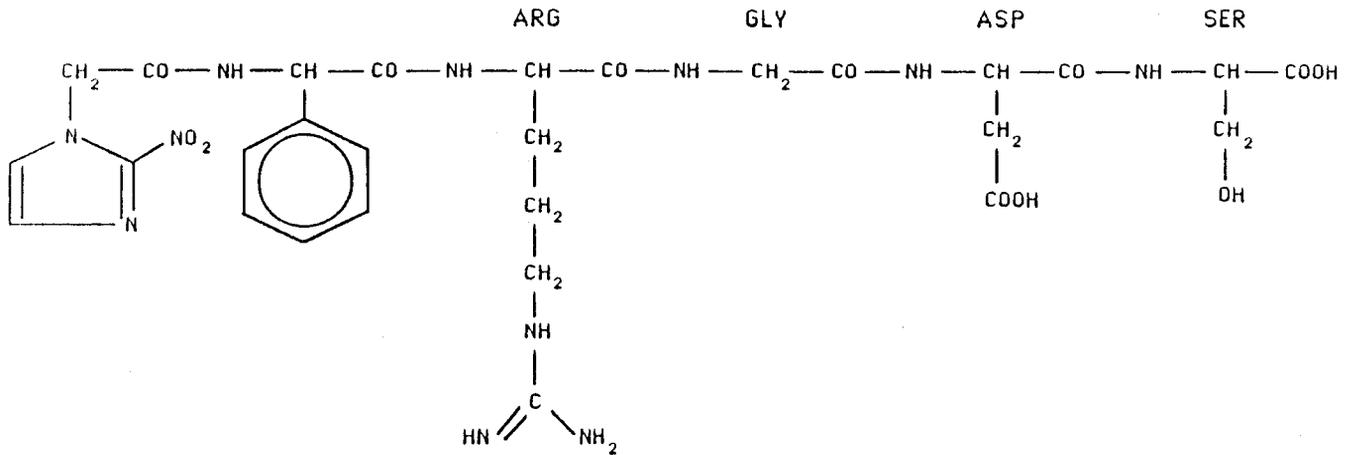


figure 38 : Comparaison Benznidazole et peptidyl -
drogue

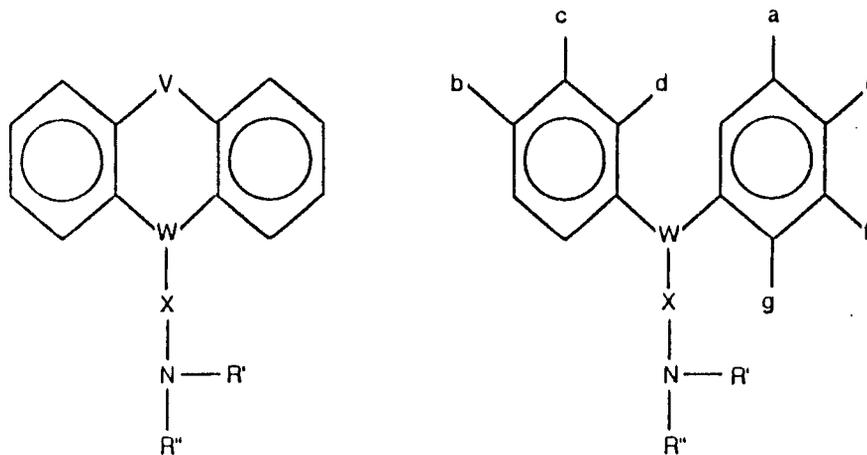


figure 39 : Structures générales des drogues cationiques
amphiphiles.

Les noyaux sont généralement aromatiques et peuvent être substitués en position b, c, d, e, f et g. 'W' peut être un C, N ou O. La chaîne 'X' doit se terminer par une amine primaire, secondaire ou tertiaire. R' et R'' sont généralement des chaînes courtes à groupements neutres. 'V' peut être un atome simple de C, O, S ou N, ou deux atomes dans un chaîne C-O, C-C ou C-S.

prendre de précautions particulières pour réaliser un tel peptide.

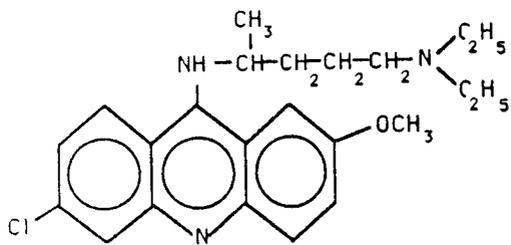
Le Benznidazole est intéressant par le fait qu'il possède dans sa structure une liaison amide facile à reproduire.

De plus, il est remarquable que par le couplage de l'acide nitro-2 imidazolyl-1 acétique sur la phénylglycine (Phg en code trois lettres), nous obtenons une structure très similaire au Benznidazole (figure 38). Les modifications amenées dans cette nouvelle molécule comparativement au Benznidazole sont la substitution d'un hydrogène du groupement méthylène par une fonction carboxamide entraînant la formation d'un carbone asymétrique.

3. 2- Acridine

Les dérivés de l'acridine sont des substances qui peuvent amener à la lyse des trypomastigotes. Ils sont à l'heure actuelle à l'étude en vue d'être utilisés comme additif dans les poches de sang (Hammond, 1985). Ils font partie d'une famille de drogues appelée drogues cationiques amphiphiles. Des études de relations structure activité ont permis d'établir une certaine communauté de structures résumée sur la figure 39.

La lyse induite n'est pas due à l'interférence sur une activité biologique du parasite comme c'est le cas pour le Benznidazole. Elle est due à des phénomènes passifs par action directe avec les phospholipides et destabilisation de la membrane, ou par interférence avec les fonctions membranaires du Ca^{++} . Son activité reste équivalente à 37°C et à 4°C.



Mépacrine

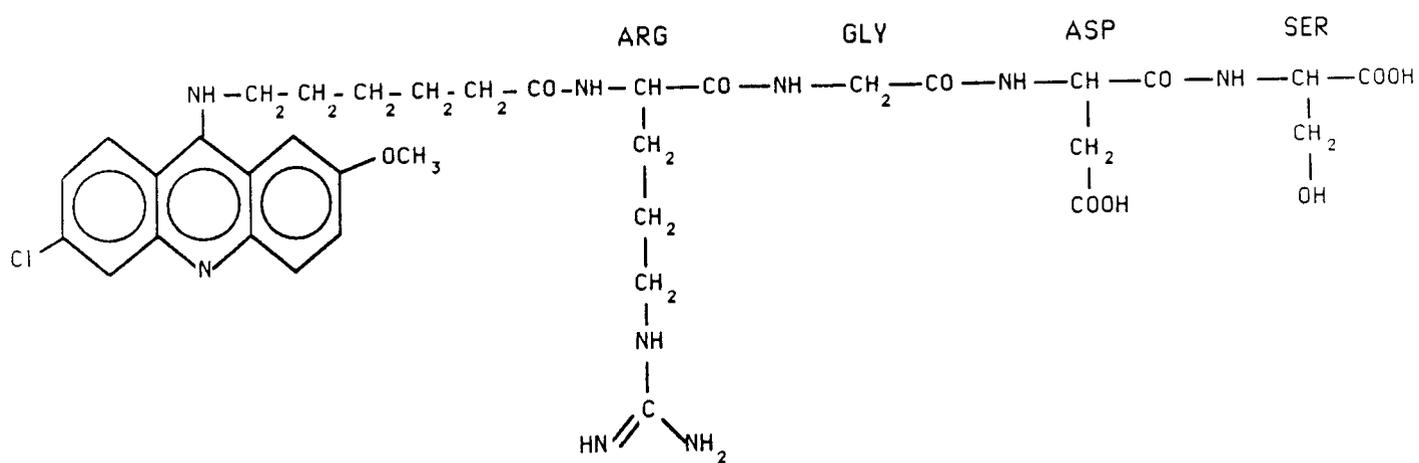


figure 40 : Comparaison Mépacrine et peptidyl -drogue

Comme dans le cas du Benznidazole, les drogues décrites ne possèdent pas de fonction carboxylique directement utilisable.

Nous avons synthétisé un nouveau dérivé pouvant "s'apparenter" à la Mépacrine par le cycle de l'acridine substitué par un atome de chlore et un groupement méthoxy et par la présence d'une fonction amine sur le cycle de l'acridine suivie d'une chaîne carbonée. La fonction basique, présente en bout de chaîne dans la plupart des dérivés actifs, peut être représentée par la fonction guanidine de l'arginine (du peptide Arg-Gly-Asp-Ser) sur laquelle sera couplé le nouveau dérivé (figure 40).

Une telle structure, comme pour le nitro-2 imidazole, ne présente pas de groupes ou fonctions incompatibles avec le traitement par le fluorure d'hydrogène anhydre. Le clivage peptide-résine pourra se faire également sans prendre de précautions particulières.

4- SYNTHÈSES DES PEPTIDYL-DROGUES

4. 1- Synthèses des nitro-2 imidazolyl-peptides

4. 1. 1- Synthèse de l'acide nitro-2 imidazolyl 1-acétique

Afin d'obtenir ces peptides, il fallait tout d'abord synthétiser l'acide nitro-2 imidazolyl-1 acétique (figure 41). Pour réaliser cette molécule, nous avons procédé à une réaction d'alkylation du nitro-2 imidazole par le bromacétate de méthyle. Cette réaction ne s'effectue qu'après transformation du nitro-2

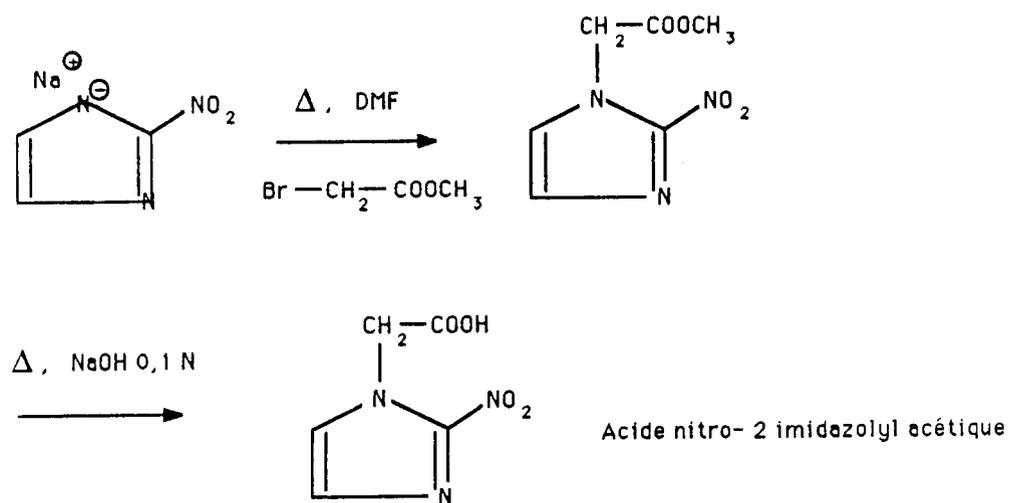


figure 41: Synthèse de l'acide nitro-2 imidazolyl acétique

imidazole sous forme d'un sel de sodium par addition de méthylate de sodium. Sous cette forme, l'azote sera un meilleur nucléophile pour attaquer le carbone portant le brome afin de réaliser la réaction de substitution.

Après élimination du méthanol excédentaire, le bromacétate de méthyle est ajouté et laissé sous agitation à 105-110°C pendant 30 mn.

Le produit extrait après concentration à sec donne une poudre de couleur jaune pâle. L'analyse en Résonance Magnétique Nucléaire a permis de confirmer la bonne composition de l'espèce synthétisée.

La saponification de l'ester est faite par chauffage dans une solution aqueuse de NaOH 0,1 N.

4. 1. 2- Couplage de l'acide nitro-2 imidazolyl 1-acétique sur les peptidyl-résines

Après avoir préparé des peptidyl-résines selon le schéma Boc/TFA portant les séquences D-Phg-Arg-Gly-Asp-Ser et D-Phg-Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys(Acm), nous avons envisagé le couplage de l'acide nitro-2 imidazolyl-1 acétique.

Ce dérivé ne présentant pas de structure réactive particulière contre-indiquée pour l'une des différentes techniques d'activation, nous l'avons couplé par activation au moyen du BOP sur les peptidyl-résines. En raison de la faible quantité de produit que nous avons à notre disposition, et afin d'obtenir un bon rendement, le temps de couplage a été allongé à une nuit.

Les clivages par le fluorure d'hydrogène ont été réalisés sur les deux lots de peptidyl-résines dans les conditions classiques de coupure en présence de fluorure d'hydrogène et de crésol (10/1).

Après purification par filtration sur gel ou HPLC phase inverse préparative afin d'éliminer le crésol résiduel, ces deux peptides ont été analysés en spectrométrie UV pour confirmer la présence du groupement nitro sur l'imidazole.

Les analyses d'acides aminés et la spectrométrie de masse FAB effectuée sur les deux peptides ont confirmé leurs bonnes compositions et par la même occasion la bonne stabilité du groupe nitro imidazole durant le traitement au fluorure d'hydrogène.

Nous avons réalisé la synthèse des deux énantiomères par couplage de la Boc-D-Phénylglycine ou de la Boc-L-Phénylglycine sur benzhydrylamine résine suivi du couplage de l'acide nitro-2 imidazolyl-1 acétique dans les mêmes conditions que précédemment. Le nitro-2 imidazolyl D-Phénylglycine amide et le nitro-2 imidazolyl L-Phénylglycine amide, résultant du clivage par le fluorure d'hydrogène, pourront être testés afin d'évaluer l'importance du carbone asymétrique sur l'activité du produit

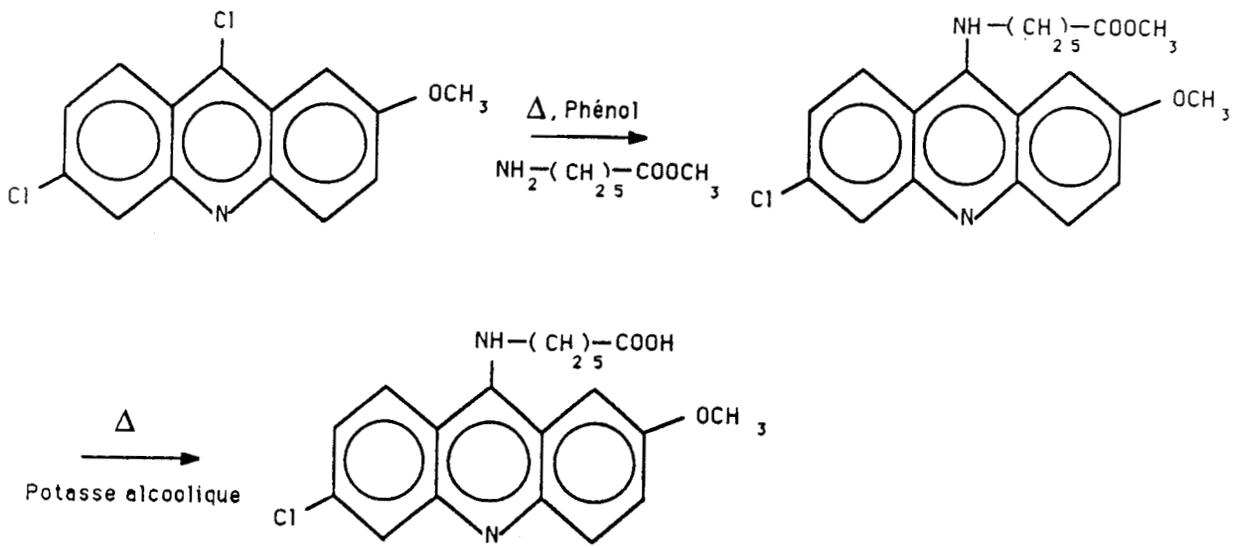


figure 42: Synthèse de l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9) amino-6 hexasanoïque

4. 2- Synthèses des acridinyl-peptides

4. 2. 1- Synthèse de l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9) amino-6 hexasanoïque (I).

Comme dans le cas du nitro-2 imidazole, nous avons synthétisé un nouveau dérivé possédant dans sa structure une fonction carboxylique utilisable pour son couplage sur la peptidyl-résine (figure 42).

Nous avons calqué notre protocole de synthèse sur celui de l'atabrine réalisée en 1943 par Sherndal (Sherndal, 1943).

Ce dérivé utilisé comme antipaludéen a été obtenu par chauffage à reflux dans le phénol de la dichloro-2,9 méthoxy-6 acridine en présence d'une diamine. La première étape de cette réaction est la formation d'un intermédiaire phénoxy obtenu par réaction du phénol sur le chlore situé en position 9 sur le cycle de la dichloro-2,9 méthoxy-6 acridine. Cet intermédiaire réagira ensuite rapidement avec l'amine présente dans le milieu pour donner l'atabrine.

Pour l'obtention de notre dérivé, nous avons d'abord dû synthétiser l'ester méthylique de l'acide tertiobutyloxycarbone ϵ aminocaproïque. Cette réaction s'effectue après avoir transformé l'acide en son sel de césium, puis par contact avec l'iodométhane. Ensuite, après déprotection du groupe tertiobutyloxycarbone par traitement à l'acide trifluoroacétique et neutralisation avec une base tertiaire (la diisopropyléthylamine), l'aminocaproate de méthyle a été mis en

présence de la dichloro-2, 9 méthoxy-6 acridine et chauffé à reflux dans le phénol.

Une heure après, l'analyse du milieu réactionnel en couche mince nous montre une consommation complète de la dichloro-2, 9 méthoxy-6 acridine.

Après extraction en milieu acide pour éliminer l'excès d'aminocaproate de méthyle, le produit a été purifié par chromatographie sur silice. Le produit principal correspondant à l'ester (masse confirmée en spectrométrie de masse FAB) a été saponifié par chauffage dans de la potasse alcoolique.

L'acide obtenu sous forme de cristaux a été utilisé pour le couplage sur les peptidyl-résines portant les séquences Arg-Gly-Asp-Ser et Fn 80-88C.

4. 2. 2- Couplage de l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9) amino-6 hexasanoïque (I) sur les peptidyl-résines

Dans la molécule que nous avons synthétisée, nous pouvons remarquer la présence d'une fonction amine secondaire à proximité du cycle acridine. En raison des faibles quantités de produit obtenues, nous n'avons pas protégé cette fonction. De plus, cette fonction nous semblait peu réactive en raison de son environnement immédiat.

Les couplages ont été réalisés par activation de (I) au moyen du BOP. Après une heure de couplage, le test à la ninhydrine, négatif, a montré une réaction complète.

La libération de la drogue peptide par le fluorure d'hydrogène a été réalisée de façon classique par traitement en milieu fluorure d'hydrogène/crésol (10/1).

L'analyse en HPLC phase inverse montre un produit dont la pureté est de 90%.

Les purifications des deux peptides, Acr-Arg-Gly-Asp-Ser et Acr-Fn 80-88C, ont été réalisées par HPLC phase inverse préparative. Nous avons préféré cette solution à la filtration sur gel, car, de telles structures induisent une adsorption non spécifique sur le gel empêchant l'élution normale de ces produits.

Nous avons eu confirmation de la structure des peptides par spectrométrie de masse FAB. $(M+H)^+$ du peptide Acr-Arg-Gly-Asp-Ser: 788; $(M+H)^+$ du peptide Acr-Fn 80-88C: 1318).

Une impureté isolée après purification du peptide Acr-Arg-Gly-Asp-Ser a donné par spectrométrie de masse FAB la masse suivante: $(M+H)$: 846

Ces résultats montrent dans un premier temps que l'amine secondaire de l'acridine n'a pas réagi avec une autre molécule similaire durant le couplage.

Nous n'avons pas pu identifier l'excédent de masse de 58 de l'impureté du peptide Acr-Arg-Gly-Asp-Ser. Cependant, lors de la synthèse et purification du peptide Acr-Arg-Phe-Asp-Ser, nous avons également isolé une impureté possédant une masse supérieure de 58 unités. Ceci nous laisse donc penser que ce produit provient du dichloro-2,9 méthoxy-6 acridine utilisé dès le début de la synthèse.

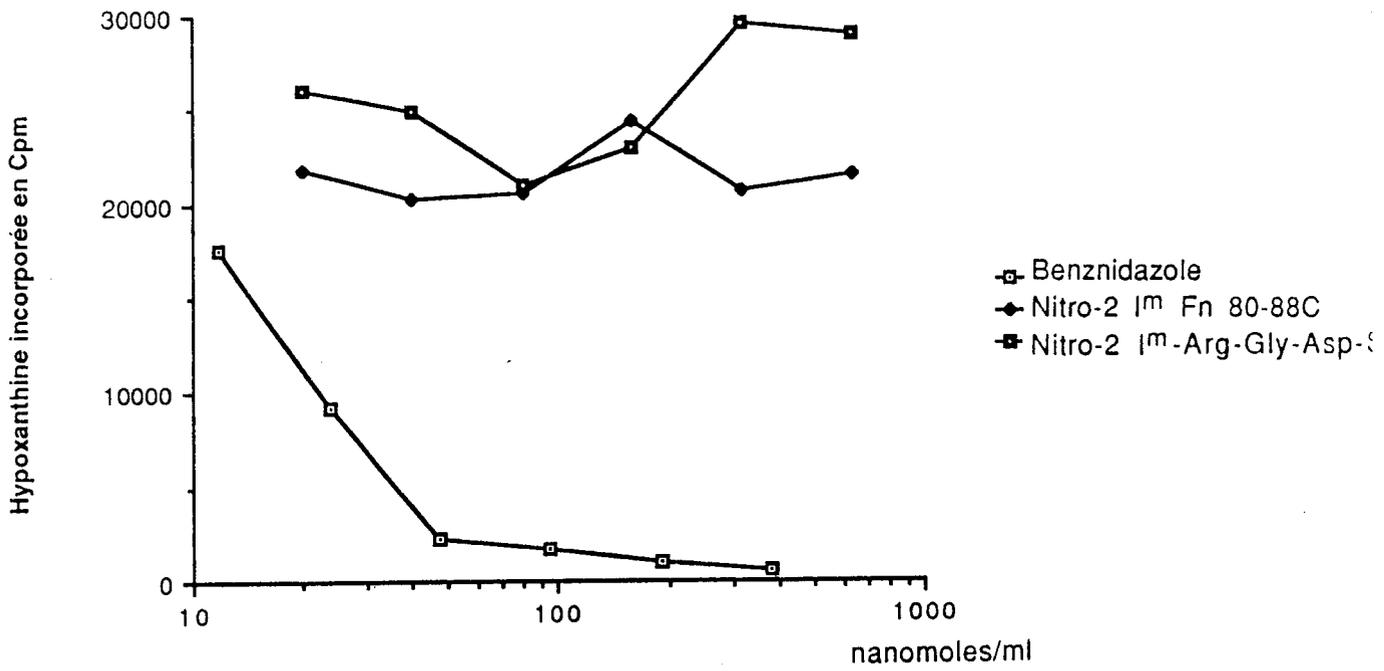


figure 43: Toxicité des nitro-2 imidazolyl - peptides

5- ETUDE DE LA TOXICITE DES DROGUES

5. 1- Choix de la méthode d'investigation

Dans un premier temps, nous avons essayé de mettre en évidence la toxicité des drogues sur les trypomastigotes par l'utilisation d'un colorant vital, l'érythrosine B. Ce produit colore en rose spécifiquement les parasites morts, et laisse intact les parasites vivants. Le dénombrement final entre les parasites morts des parasites vivants se fait par comptage au microscope. Cette technique ne nous a pas permis de réaliser une étude correcte en raison du temps que nécessite chaque lecture et de la présence éventuelle d'agglomérats de parasites rendant impossible une détermination précise du nombre de survivants.

Nous avons donc décidé de mettre en évidence la toxicité des drogues par l'étude de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée par les trypomastigotes. Ceux-ci étant incapables de synthétiser *de novo* les purines ribonucléotides, l'hypoxanthine est un bon marqueur car il sera métabolisé puis incorporé dans le RNA du parasite préférentiellement. Après filtration des milieux de culture sur papier de verre et séchage, la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation liquide afin de quantifier l'incorporation de l'hypoxanthine.

5. 2- Nitro-2 imidazolyl-peptides

Comme nous pouvons l'observer dans la figure 43, les peptidyl-drogues que nous avons synthétisées ne possèdent pas d'activité cytotoxique comparativement au Benzimidazole introduit

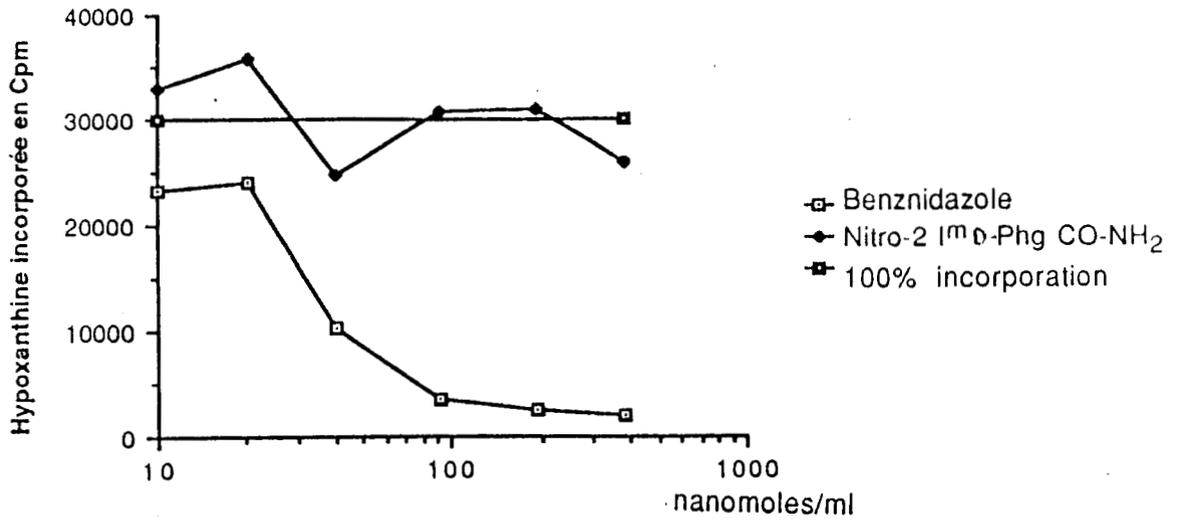


figure 44: Toxicité du nitro-2 imidazolyl-D-Phénylglycine amide

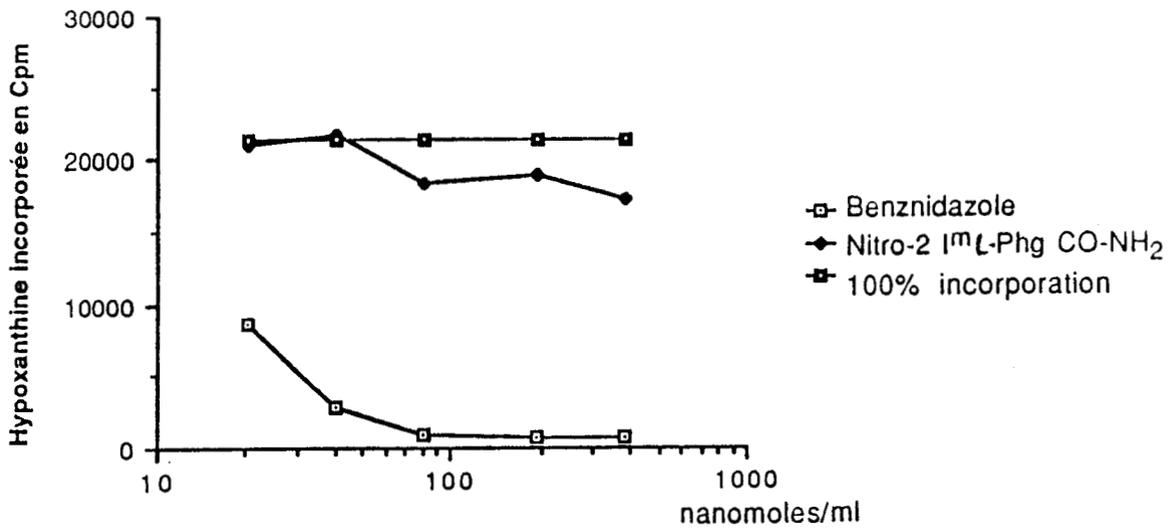


figure 45: Toxicité du nitro-2 imidazolyl-L-Phénylglycine amide

dans l'expérience comme témoin. En effet, quelle que soit la concentration en drogue sur peptide utilisée, après les 28 heures de contact, l'incorporation de l'hypoxanthine reste à son maximum.

Afin de déterminer la cause de cette absence d'activité, nous avons synthétisé et testé les nitro-2 imidazolyl Phénylglycine amide de série L et de série D. Nous voulions effectivement contrôler l'importance de l'introduction d'un carbone asymétrique dans la molécule apparantée au Benzimidazole ainsi que l'importance de la première modification chimique à savoir le carboxamide.

Des résultats présentés dans les figures 44 et 45, il ressort que ces deux molécules sont aussi totalement inactives.

Les modifications que nous avons apportées à la molécule pour permettre son introduction sur la peptidyle-résine ont donc entraîné une perte totale de l'activité de cette drogue sur le parasite trypomastigote. Nous ne possédons pas de méthode d'investigation pour déterminer à quel niveau se perd l'activité. Il peut s'agir d'une diminution de la pénétration de la drogue dans le parasite ou d'une perte de sélectivité sur les processus biologiques impliqués dans sa toxicité.

5. 3- Acridinyl-peptides

Suite à cet échec, nous avons testé les peptides Acr-Arg-Gly-Asp-Ser et Acr-Fn 80-88C. Cette nouvelle drogue contrairement au nitro-2 imidazole n'interfère pas avec des processus biologiques bien déterminés. Son activité semble être

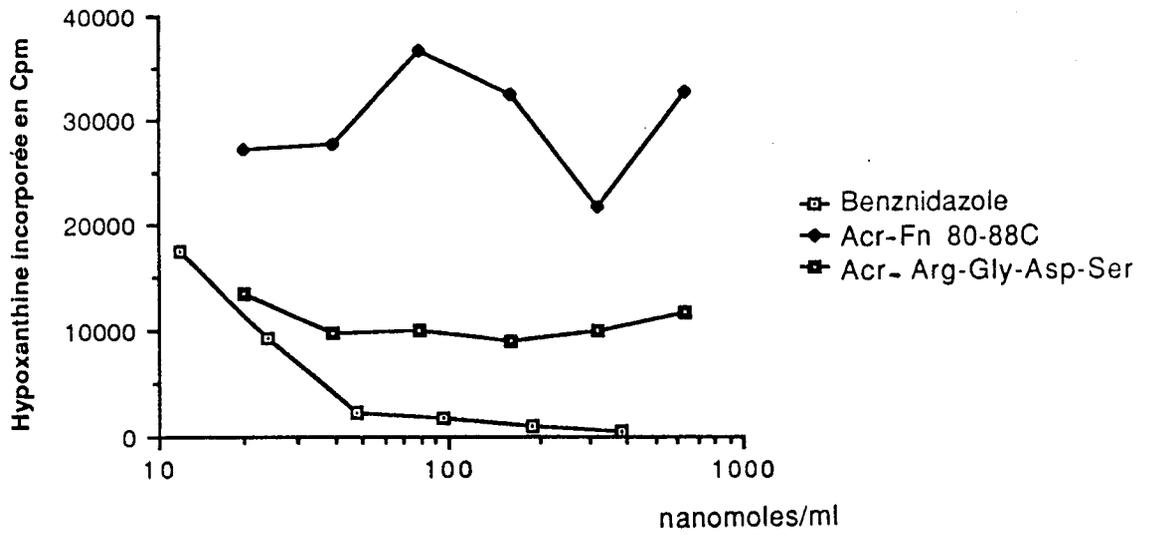


figure 46: Toxicité des Acridinyl-peptides

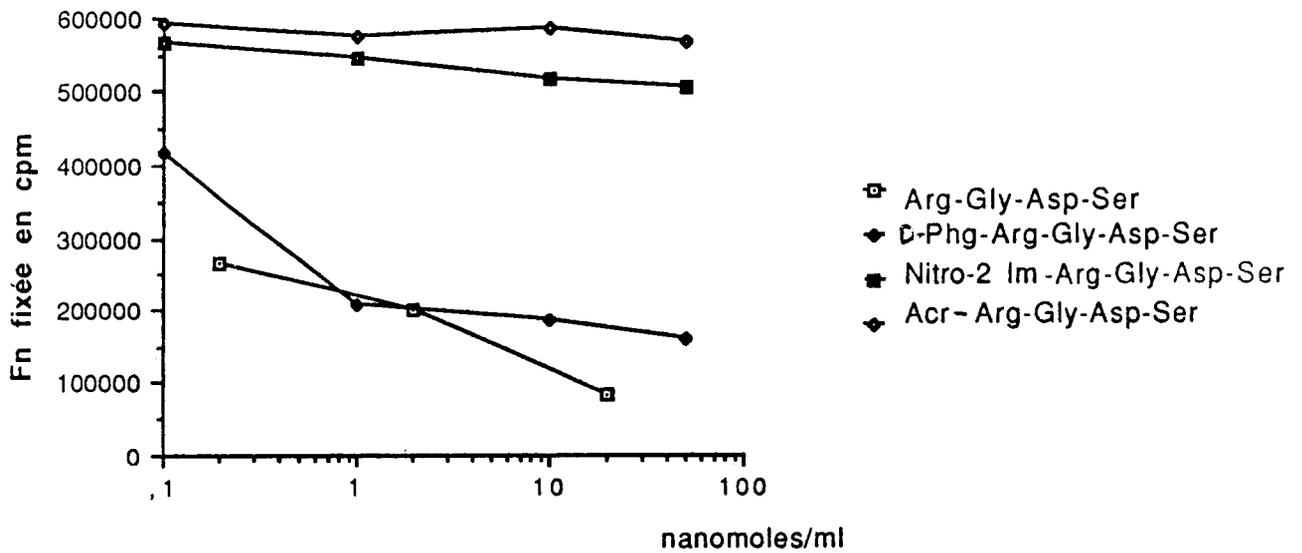


Figure 47: Courbes d'inhibition de la fixation de la fibronectine sur les trypanostigotes par les drogues portées sur Arg-Gly-Asp-Ser

due à des phénomènes passifs comme la destabilisation de la membrane du parasite.

Les résultats présentés dans la figure 46 montrent que seul le peptide Acr-Arg-Gly-Asp-Ser possède une faible activité cytotoxique sur les trypomastigotes. Le peptide Acr-Fn 80-88C reste totalement dépourvu d'effet cytotoxique.

L'activité de l'acridine modifiée (I) n'a pu être déterminée en raison de sa faible solubilité dans le milieu de culture même après l'avoir préalablement mise en solution dans du diméthylsulfoxyde comme cela a été fait pour le Benznidazole.

5. 4- Etude de l'affinité des peptidyles drogues sur les trypomastigotes

Compte tenu de ces résultats, nous avons étudié la capacité de ces peptidyl-drogues à inhiber la fixation de la fibronectine marquée sur les trypomastigotes. Ceci, dans le but de déterminer si la présence de la drogue avait ou non impliqué une modification de l'activité du Arg-Gly-Asp-Ser.

Les résultats présentés dans la figure 47 montrent que les peptidyl-drogues à Arg-Gly-Asp-Ser ont perdu leur capacité inhibitrice de la fixation de la fibronectine sur le parasite. Ces résultats sont surprenants, surtout en ce qui concerne le nitro-2 imidazolyl D-Phg-Arg-Gly-Asp-Ser. En effet, le peptide D-Phg-Arg-Gly-Asp-Ser reste capable d'inhiber cette fixation. L'introduction de l'acide nitro-2 imidazolyl acétique serait donc à elle seule responsable de la perte d'activité.

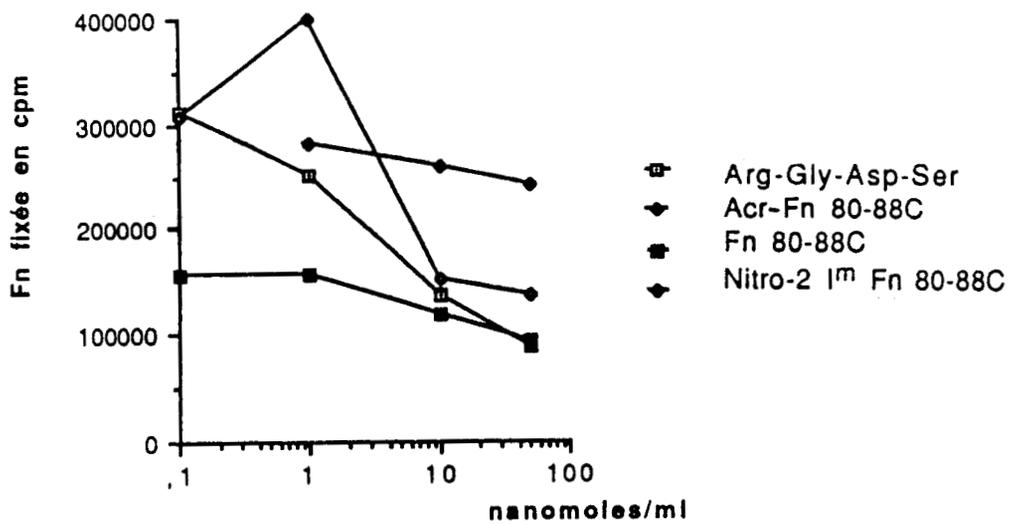


Figure 48: Courbes d'inhibition de la fixation de la fibronectine sur les trypanomastigotes par les drogues portées sur Fn 80-88C

Dans le cas des drogues ciblées par le peptide Fn 80-88C, les résultats obtenus dans les tests d'inhibitions restent encore imparfaits. En effet, ces expériences semblent peu reproductibles. Comme nous pouvons l'observer dans la figure 48, sur les deux peptides témoins testés, les peptides Arg-Gly-Asp-Ser et Fn 80-88C, nous n'obtenons un effet clairement dose dépendant que dans le cas du peptide Arg-Gly-Asp-Ser. Cependant, il semblerait que le peptide Fn 80-88C couplé à l'acide nitro-2 imidazolyl acétique conserve une certaine activité inhibitrice, alors que, quand il est couplé au dérivé de l'acridine, il n'est plus inhibiteur.

6- CONCLUSIONS

Le but du ciblage de drogue sur une population cellulaire est de pouvoir diminuer l'index thérapeutique de la drogue et ainsi d'augmenter son efficacité.

Dans notre étude, nous avons montré que la perte de l'activité cytotoxique du dérivé nitro-2 imidazole était due à la modification nécessaire pour son introduction sur la peptidyl-résine, c'est-à-dire la substitution d'un hydrogène du méthylène du Benznidazole par une fonction carboxylique.

Dans le cas du dérivé à acridine (**I**), nous pouvons être surpris de la perte totale de toxicité du peptide Acr-Fn 80-88C, alors que le peptide Acr-Arg-Gly-Asp-Ser reste partiellement toxique. La différence de toxicité entre ces deux dérivés pourrait être due à la présence dans le peptide Acr-Arg-Gly-Asp-Ser du résidu arginine portant une fonction basique. En effet, l'étude de relation structure activité sur les drogues

cationiques amphiphiles a montré que la chaîne latérale de ces dérivés portait généralement une fonction basique.

En plus de cette perte de cytotoxicité des drogues choisies, nous avons montré dans cette étude que le peptide Arg-Gly-Asp-Ser n'est pas un bon candidat pour le ciblage de drogue sur l'un de ces récepteurs cellulaires.

Les prochains résultats concernant le Fn 80-88C permettront de savoir si ce peptide dans lequel le motif RGD est maintenu à distance de la drogue pourrait constituer une structure de ciblage mieux adaptée.

C- IMMUNOGENES SYNTHETIQUES

1- INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu précédemment, l'obtention d'un vaccin efficace contre la maladie de Chagas à partir d'extrait brut de trypomastigotes n'est pas concevable en raison de la forte composante autoimmune associée à cette pathologie.

Les protéines de surface impliquées dans les phénomènes d'adhésion du trypomastigote à la cellule représentent une cible de choix dans le cadre d'une stratégie vaccinale. En effet, une solution pour la protection contre cette maladie serait la réalisation d'un vaccin synthétique à partir d'une structure biologiquement active et parfaitement définie quant à son rôle.

L'emploi de molécules synthétiques représente un développement récent des recherches dans le domaine de la vaccination: le premier rapport mentionnant l'obtention d'un effet neutralisant *in vivo* a été publié en 1981 (Audibert, 1981). Le principe est d'utiliser un immunogène synthétisé soit par voie chimique soit par génie génétique, et possédant une information suffisante pour susciter une réponse immune protectrice.

Cette approche permet de s'affranchir de l'obtention de pathogènes dangereux et/ou difficiles à cultiver. Un autre avantage est qu'il est ainsi possible d'obtenir une réponse de spécificité prédéterminée par le choix de la structure synthétisée, permettant ainsi un meilleur contrôle du risque de réactions auto-immunes.

La connaissance d'un fragment d'une protéine impliquée dans les phénomènes d'invasion cellulaire par le parasite présente de grands intérêts dans le cadre des recherches sur les immunogènes synthétiques. En effet, il devient alors possible de reproduire chimiquement certains fragments et d'étudier la réponse immune qu'ils induisent.

La seule cible connue actuellement est une protéine de 85 kDa dont il a été montré qu'elle était impliquée dans les phénomènes de pénétration du parasite dans les cellules hôtes.

Une particularité de cette protéine est d'être composée d'un peptide de neuf acides aminés répété consécutivement cinq fois. De telles séquences répétitives sont fréquentes dans les protéines parasitaires. Les plus connues sont celles que l'on peut observer chez *Plasmodium falciparum* (Asn-Pro-Asn-Ala, séquence répétée d'une protéine du circumsporozoïte de *Plasmodium falciparum*).

Le caractère immunodominant de ces épitopes antigéniques, leurs fréquences et la présence de forts titres en anticorps chez les individus encore sensibles à l'infection, a fait dire que ces structures avaient pu être sélectionnées durant l'évolution pour aider le parasite à échapper aux conséquences de la réponse immune. Ceci, peut-être par diversion de cette réponse loin des épitopes importants présents sur d'autres molécules du parasite (Anders, 1986).

Cette hypothèse a été remise en question par le fait que dans le cas de *Plasmodium falciparum*, il a été montré que des anticorps produits contre cette structure répétitive pouvaient

GLU PHE LEU THR PHE LEU LEU TRP GLY ARG ARG GLY ARG GLN ARG GLN ARG ALA THR LEU²⁰
THR ASP VAL PHE LEU TYR ASN ARG PRO LEU SER VAL GLY GLU LEU LYS MET ILE LYS GLU⁴⁰
VAL GLU ASP LYS LYS GLU LYS GLY SER GLY ASP SER GLU ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP⁶⁰
SER GLU ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP SER GLU ASP LYS LYS GLY SER GLY ASP SER GLU⁸⁰
ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP SER GLU ASP LYS LYS GLU SER GLY ASP SER GLU ASP LYS¹⁰⁰
LYS GLY SER GLY ASP GLY ALA PHE ASN PRO ALA VAL SER ASN ALA THR THR HIS ASP SER¹²⁰
ARG GLY GLY ASP ARG LYS PRO VAL GLY ILE TRP ASN ILE PHE ASN TYR ARG GLN TYR

figure 49: Peptide GP 85 tryptophan 63-80 (zone encadrée)

permettre de bloquer l'invasion des sporozoïtes dans des cellules hépatiques humaines (Ballou, 1985).

Dans le cas de *Trypanosoma cruzi*, nous avons réalisé la synthèse d'un peptide représentant deux motifs consécutifs (le second motif présentant une mutation observée dans ces zones répétitives) afin d'étudier la protection pouvant être induite par la production spécifique d'anticorps, ainsi que son rôle au niveau de la réponse immunitaire T et B (figure 49).

Nous donnerons à ce peptide le nom: **GP 85 trypo C63-80**. En effet, il provient d'une glycoprotéine (GP) de 85 kDa de la forme trypomastigote de *Trypanosoma cruzi*, la structure reproduite se situe dans la zone 63-80 du fragment séquencé et C parce qu'une cystéine a été introduite en position N-terminale du peptide.

2- PREPARATION D'IMMUNOGENES SYNTHETIQUES: COUPLAGE DE PEPTIDES SUR PROTEINES PORTEUSES

Les peptides synthétiques sont souvent utilisés pour la production d'anticorps spécifiques. Cependant, les peptides de petite taille sont considérés comme haptènes c'est-à-dire capables d'agir comme épitopes mais incapables d'induire par eux-mêmes une réponse anticorps (en raison de l'absence d'épitope T dans leurs structures). Leur couplage sur une protéine porteuse est alors nécessaire pour les rendre immunogènes. Le porteur stimule les lymphocytes T qui aident ensuite à la réponse anti-haptène (Mitchison, 1971).

Les protéines porteuses utilisées couramment au laboratoire sont l'anatoxine tétanique, l'hémocyanine de patelle, la sérum albumine bovine et l'ovalbumine. Suivant l'étude que nous désirons effectuer avec ces peptides, nous possédons différentes techniques de greffage du peptide sur la protéine porteuse par des liaisons covalentes.

2. 1- Choix de la méthode de couplage

2. 1. 1- Agent homobifonctionnel

Le glutaraldéhyde, agent homobifonctionnel, permet le couplage du peptide par ses fonctions α ou ϵ amines sur les fonctions amine de la protéine (Avrameas, 1969). Le couplage se fera principalement par condensation de l'aldéhyde avec une fonction amine du peptide ou de la protéine résultant ainsi à la formation d'une imine.

Cette méthode sera préférentiellement employée si nous désirons obtenir une réponse anticorps contre la partie C-terminale du peptide. En effet, les fonctions carboxyliques du peptide ne seront jamais mises en jeu par cette technique.

2. 1. 2- Les carbodiimides hydro-solubles

Les carbodiimides solubles (Goodfriend, 1964) peuvent aussi bien induire après activation la liaison du peptide par ses fonctions carboxyliques que par ses fonctions amines sur la protéine. Cependant, si nous désirons obtenir une réponse anticorps principalement contre la partie N-terminale du

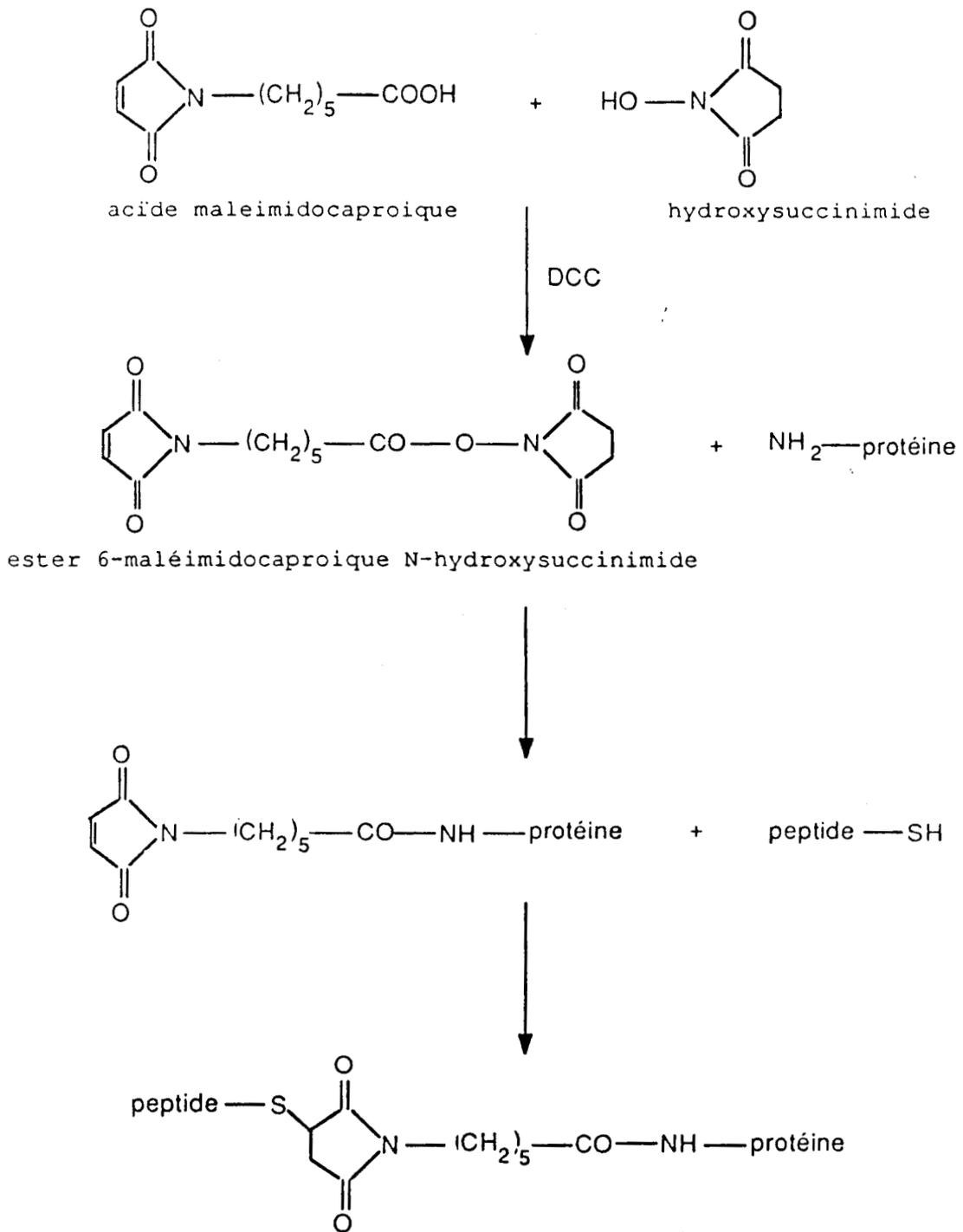


figure 50: Couplage peptide protéine porteuse par l'ester 6-maléimidocaproïque N-hydroxysuccinimide

peptide, nous préférons alors cette méthode de couplage à celle utilisant le glutaraldéhyde.

2. 1. 3- Agent hétérobifonctionnel

La dernière technique employée au laboratoire est la méthode utilisant un agent hétérobifonctionnel tel que l'acide maléimidocaproïque (Lee, 1980). Cet agent permet la fixation du peptide sur la protéine par un seul point d'ancrage: la fonction thiol d'une cystéine. Ceci représente un avantage comparativement aux deux techniques précédemment décrites qui peuvent diminuer le nombre de degrés de liberté des chaînes par ancrage multiple sur la protéine. De plus, suivant la partie que l'on veut exposer principalement au système immunitaire, on pourra introduire de façon artificielle une cystéine en position N ou C-terminale lors de sa synthèse.

L'acide maléimidocaproïque est dans un premier temps activé puis couplé sur la protéine porteuse. Après élimination de l'excès de réactif, par dialyse le plus souvent, nous faisons réagir sur cette protéine "activée" un peptide possédant dans sa séquence un résidu cystéine sous forme thiol.

Classiquement, le couplage de l'acide maléimidocaproïque sur la protéine se fait par l'intermédiaire de l'ester activé d'hydroxysuccinimide. Cet ester activé est obtenu par réaction de l'acide maléimidocaproïque avec l'hydroxysuccinimide en présence de dicyclohexylcarbodiimide (figure 50). Cette activation demandant une longue préparation et pouvant donner de mauvais rendements par précipitation de la protéine avec la

dicyclohexylurée résiduelle provenant de l'activation, nous avons alors envisagé d'activer l'acide maléimidocaproïque au moyen du BOP avant de le coupler sur la protéine.

L'activation se fait dans le DMF en présence d'un équivalent de DIEA pour amener l'acide maléimidocaproïque sous forme de carboxylate et d'un équivalent de BOP. Après dix minutes, l'espèce activée est mise en contact avec la protéine préalablement solubilisée dans un tampon phosphate pH 7 contenant 20% de DMF. Le couplage se fait sous agitation à température ambiante durant 12 heures. Après dialyse, le peptide est amené sous forme réduite. La quantité de peptide greffé sur la protéine est ensuite évaluée.

2. 2- Dosage de la quantité de peptide couplé sur la protéine porteuse par analyse d'acides aminés

La quantité de peptide couplé à la protéine peut être évaluée par analyse d'acides aminés .

Pour ceci, des quantités connues de protéine témoin et de conjugué sont hydrolysées. Cette hydrolyse acide totale est le plus souvent réalisée par la technique d'hydrolyse en phase gaz permettant de travailler sur de petites quantités de matériel.

Après l'analyse des hydrolysats sur l'analyseur d'acides aminés, en faisant le rapport des valeurs des acides aminés stables absents du peptide entre les deux analyses, nous pouvons alors ramener les valeurs de l'analyse de la protéine témoin à une concentration en protéine identique à celle présente dans le conjugué.

| | I | II | III | IV |
|------------|--------------------|----------|--------------------------|----------------------|
| | anatoxine seule | conjugué | anatoxine x rapport R | différence II-III |
| Asp | 17,77 | 12,09 | 8,88 | <u>3,21</u> |
| Thr | 5,85 | 3,15 | 2,93 | 0,22 |
| Ser | 7,25 | 5,84 | 3,62 | <u>2,22</u> |
| Glu | 10,79 | 7,38 | 5,39 | <u>1,99</u> |
| Pro | 7,19 | 4,05 | 3,59 | 0,46 |
| Gly | 7,15 | 5,60 | 3,57 | <u>2,03</u> |
| Ala | 5,85 | 3,40 | 2,92 | 0,48 |
| Val | 4,94 | 2,37 | 2,47 | -0,10 |
| Met | 2,24 | 1,24 | 1,12 | 0,12 |
| Ile | 8,15 | 4,07 | 4,07 | 0,00 |
| Leu | 9,48 | 5,11 | 4,74 | 0,37 |
| Tyr | 4,78 | 2,58 | 2,39 | 0,19 |
| Phe | 4,35 | 2,38 | 2,17 | 0,21 |
| His | 0,53 | 0,30 | 0,26 | 0,04 |
| Lys | 5,61 | 4,82 | 2,80 | <u>2,02</u> |
| Arg | 2,66 | 1,41 | 1,33 | 0,08 |

L'analyse d'acides aminés sur "différence II-III" donne la composition du peptide:

| | Trouvée | Théorique |
|-----|---------|-----------|
| Asp | 4,86 | 4 |
| Ser | 3,36 | 4 |
| Glu | 3,01 | 3 |
| Gly | 3,07 | 3 |
| Lys | 3,06 | 4 |

0,66 nanomole de GP 85 trypto 63-80C pour 6,25 µg d'anatoxine

Figure 50': Mise en évidence du couplage d'un peptide sur protéine porteuse par analyse d'acides aminés

Ensuite, par différence entre les valeurs de ces deux analyses, nous faisons apparaître les acides aminés constitutifs du peptide. Les valeurs des acides aminés absents du peptide issues de cette différence doivent alors être proches de zéro.

L'illustration de ce type de calcul est représentée sur la figure 50'. Il s'agit du couplage du peptide GP 85 trypto C63-80 sur l'anatoxine tétanique par la méthode utilisant l'acide maléimidocaproïque comme agent hétérobifonctionnel. Celui-ci a été couplé sur la protéine après activation au moyen BOP.

50 mg d'anatoxine ont été hydrolysés ainsi qu'une aliquote de conjugué. Le 1/4 des hydrolysats sont analysés. Les valeurs obtenues sont reproduites dans les colonnes I et II.

Le rapport R a été calculé sur la base des quantités des acides aminés Ile, Leu et Val (la valeur moyenne obtenue est de 0,5).

La colonne III ramène les quantités des acides aminés de l'analyse de l'anatoxine à une concentration identique à celle du conjugué.

Par différence, dans la colonne IV, nous faisons alors apparaître les acides aminés constitutifs du peptide.

Le traitement de ces valeurs permet de retrouver une composition correcte du peptide. Nous pourrions ensuite déterminer la quantité exacte de peptide couplé sur la protéine.

3- CHIMIE DU PEPTIDE GP 85 trypto C63-80

3. 1- Synthèse

Nous avons choisi de synthétiser un peptide de séquence: Asp-Lys-Lys-Glu-Ser-Gly-Asp-Ser-Glu-Asp-Lys-Lys-Gly-Ser-Gly-Asp-Ser-Glu. De façon à pouvoir le coupler sur une protéine porteuse par la méthode utilisant un agent hétérobifonctionnel, nous avons introduit en position N-terminale un résidu cystéine.

Il a été synthétisé, suivant le schéma Boc/TFA, à deux reprises. La première fois, sur un synthétiseur semi-automatique, la seconde fois sur un synthétiseur automatique (Applied Biosystem 430A).

Au cours de la première synthèse, des prélèvements de résine ont été effectués régulièrement afin d'étudier l'épitope minimum nécessaire à une réponse cellulaire ou immune.

Les groupes protecteurs utilisés au cours de ces deux synthèses ont été identiques sauf pour le résidu cystéine situé en position N-terminale du peptide.

Les résidus sérine ont été protégés sous forme d'éther benzylique, les résidus acide aspartique et glutamique sous forme d'ester de cyclohexyle s'ils venaient après un résidu sérine, sinon sous forme d'ester benzylique. La fonction ϵ amine des résidus lysine par un groupe chlorobenzoyloxycarbonyle.

Dans la première synthèse, le résidu cystéine était protégé par un groupement acétamidométhyle, protection stable au fluorure d'hydrogène. Sa déprotection est obtenue par traitement au moyen d'acétate mercurique afin de libérer la fonction thiol.

Pour la seconde synthèse, la chaîne latérale du résidu cystéine a été protégé par un groupement méthyl-4 benzyle qui est clivé pendant le traitement final au fluorure d'hydrogène en présence de crésol et de thiocrésol. Dans ce cas, le thiocrésol est indispensable pour obtenir une déprotection complète de la chaîne latérale du résidu cystéine (Heath, 1986). Le peptide obtenu se trouve directement sous forme réduite (la chaîne latérale du résidu cystéine est sous forme de thiol) et pourra être utilisé directement pour son couplage sur protéine porteuse préactivée par l'acide maléimidocaproïque.

Après clivage du peptide de son support et filtration sur gel, la pureté de celui-ci, évaluée par HPLC phase inverse, a été considérée suffisante pour mener à bien nos études (>80%).

3. 2- Modifications du peptide GP 85 trypan C63-80

Cette séquence peptidique fait partie d'une protéine de surface de 85 KDa appartenant au trypanostigote. Cette protéine, décrite par Peterson et al. (Peterson, 1985) est impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de pénétration du parasite. D'autre part, A. Ouaiissi et al ont démontré que le récepteur parasitaire pour la fibronectine était représenté par une protéine de surface de masse moléculaire identique.

En premier lieu, nous avons donc essayé de déterminer si le peptide répété dans la séquence en acides aminés de la protéine 85 KDa pouvait correspondre à une partie du récepteur directement impliquée dans la liaison de la fibronectine et, éventuellement en conserver l'activité. Dans ce but, nous avons

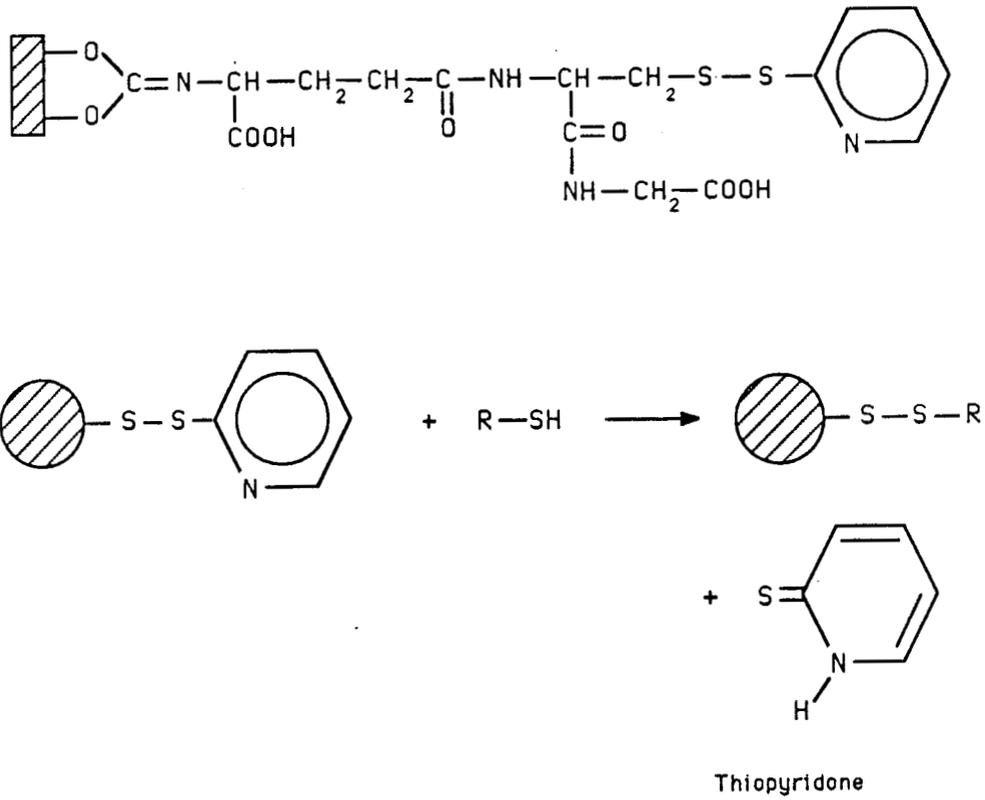


figure 51: Couplage de peptide sur un gel d'agarose au soufre activé

envisagé de procéder par chromatographie d'affinité et par marquage du peptide à l'isothiocyanate de fluorescéine.

3. 2. 1- Couplage du peptide GP 85 trypto C63-80 sur une colonne de gel Sepharose

Après déprotection du groupe acétamidométhyle du résidu cystéine de GP 85 trypto C63-80, le peptide a été greffé sur du gel Sépharose de type "Thiolactivated Sepharose 4B". Ce gel se compose d'un groupement pyridyl dithioglutathion couplé à une Sépharose 4B activée au moyen du bromure de cyanogène. Le couplage du peptide se réalisera alors par sa fonction thiol (figure 51). Ce procédé permet un contrôle quantitatif de la réaction par détection spectrophotométrique à 343 nm de la thiopyridone formée. Le coefficient d'absorption à cette longueur d'onde étant de $8,08 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Cette technique, facile à mettre en oeuvre si l'on prend soin de travailler sous azote, permet la fixation du peptide par un seul point d'ancrage.

3. 2. 2- Marquage du peptide GP 85 trypto 69-80 à la fluorescéine

Toujours dans l'objectif de déterminer si ce peptide pouvait représenter le recepteur parasite pour la fibronectine, nous l'avons marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine pour étudier son éventuelle fixation à la surface de cellules telles que les macrophages ou les fibroblastes.

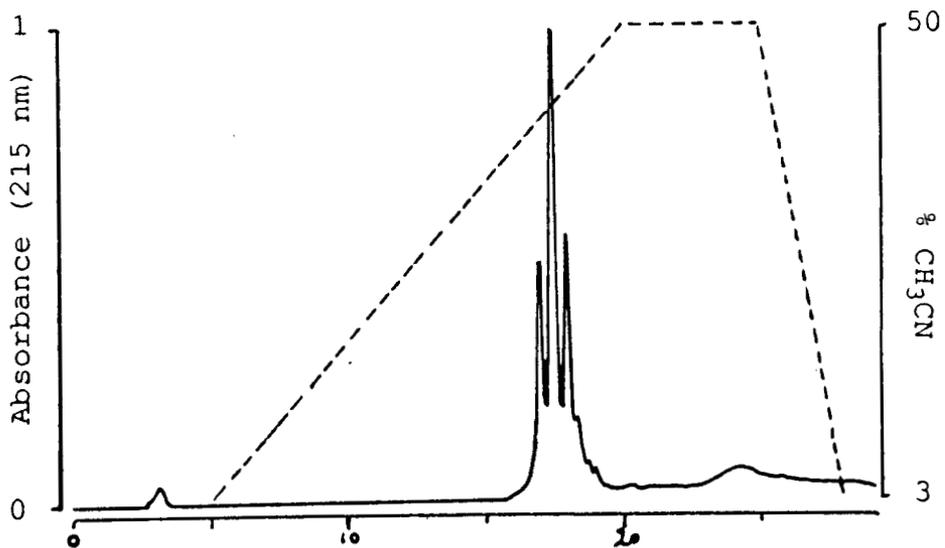


Figure 51': HPLC phase inverse analytique du peptide GP trypto 69-80 marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine après HPLC préparative.

En raison du grand nombre de fonctions amine sur GP 85 trypto C63-80, nous avons choisi de marquer le peptide de 12 acides aminés appelé GP 85 trypto 69-80 dont la séquence est: Asp-Ser-Glu-Asp-Lys-Lys-Gly-Ser-Gly-Asp-Ser-Glu. Ce peptide représente le motif modifié plus 3 acides aminés, il possède dans sa structure trois fonctions amine au lieu de 5 pour GP 85 trypto C63-80 .

Le couplage a été réalisé en milieu basique dans un mélange pyridine/eau en présence de 1,1 équivalent d'isothiocyanate de fluorescéine. Après extraction de l'excès de réactif, nous avons purifié par HPLC phase inverse le milieu réactionnel (figure 51'). Les trois pics que l'on peut observer sur le chromatogramme correspondent au peptide GP 85 trypto 69-80 marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine sur ces différentes fonctions amine. En raison des conditions de pH, maintenu entre 8 et 10, pour favoriser la réaction de couplage, le marquage ne s'est pas uniquement effectué sur la fonction amine N-terminale du peptide mais également sur les fonctions ε amine des résidus lysine.

3. 2. 3- Couplage de GP 85 trypto C63-80 sur protéine porteuse

Le couplage de GP 85 trypto C63-80 sur protéine porteuse a été décrit dans la partie précédente.

Il faut toutefois noter que les immunisations en vue de protéger les souris contre une inoculation massive de parasites

ont été réalisées avec ce peptide couplé sur anatoxine tétanique au moyen d'un agent hétérobifonctionnel.

Les expériences pour l'étude de la stimulation lymphocytaire T ont été menées avec ce peptide couplé sur l'ovalbumine par le glutaraldéhyde ou sur sérum albumine bovine par une carbodiimide soluble.

4- RESULTATS BIOLOGIQUES

4. 1- GP 85 trypo 63-88 appartient-il au récepteur parasitaire pour la fibronectine?

Le peptide appartient à une séquence répétitive d'une glycoprotéine de 85 kDa de surface du trypomastigote et semble représentatif d'une partie importante de cette molécule. Nous avons donc voulu étudier s'il pouvait représenter le récepteur parasitaire pour la fibronectine.

Nous avons essayé dans un premier temps d'étudier la fixation de la fibronectine marquée à l'iode sur GP 85 trypo C63-80 préalablement couplé à un gel de Sepharose. La protéine et le gel ont été incubés ensemble sous agitation pendant une heure. La séparation de la fibronectine non fixée a été réalisée de deux façons différentes. Soit par lavages successifs après centrifugation et élimination du surnageant, soit par centrifugation du milieu réactionnel sur un gradient de sucrose à 20% dans le RPMI. A la suite de ces opérations, la quantité de fibronectine fixée est déterminée par comptage gamma.

D'autres expériences ont été menées avec GP 85 trypo 69-80 marqué à la fluorescéine. Nous avons essayé de mettre en évidence sa fixation sur des cellules telles que les macrophages, les fibroblastes (qui sont des cellules recouvertes de fibronectine dimère) et d'inhiber cette fixation à l'aide de peptide contenant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser. Après lavage, le pourcentage de cellules marquées à la fluorescéine de celles non marquées est déterminé par cytofluorométrie de flux.

Ces deux types d'expériences, ne nous ont pas permis de démontrer que les peptides GP 85 trypo C63-80 et GP 85 trypo 69-80 étaient susceptibles de se fixer à la fibronectine.

En effet, nous n'avons jamais mis en évidence la fixation spécifique du peptide GP 85 trypo 69-80 à la surface des cellules types macrophages ou fibroblastes, ni la fixation de la fibronectine sur GP 85 trypo C63-80 couplé au gel de sépharose.

Bien évidemment, ces résultats n'excluent pas pour autant l'appartenance de ce peptide au récepteur parasitaire pour la fibronectine.

En effet, d'après les résultats d'immunoprécipitation obtenus avec des sérums de souris immunisées avec GP 85 trypo C63-80 couplé sur l'anatoxine tétanique au moyen d'un agent hétérobifonctionnel, nous pouvons dire qu'il fait probablement partie du récepteur. Les anticorps obtenus contre cette séquence reconnaissent en effet trois protéines de surface du trypomastigote les 68, 85 et 160 KDa.

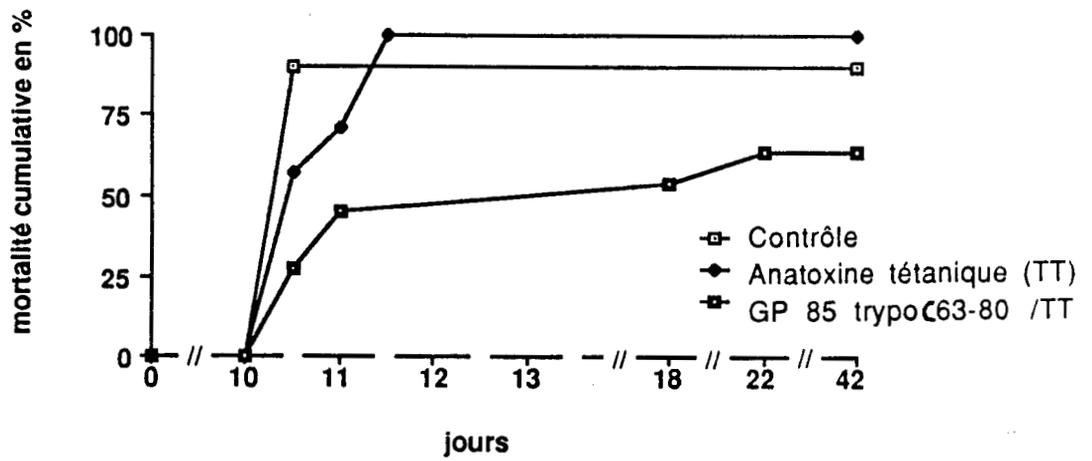


figure 52: Tableau de la mortalité cumulative de souris immunisées avec GP 85 trypanoC63-80

4. 2- Effet protecteur du peptide GP 85 trypo C63-80
chez des souris immunisées

Les souris immunisées avec GP 85 trypo C63-80 couplé sur anatoxine tétanique développent une importante réponse anticorps dirigée à la fois contre le peptide et contre des antigènes solubles de trypomastigotes. Ce phénomène a été démontré par une technique d'analyse immunoenzymologique, l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). La production d'anticorps permet à ces souris de résister à une infection d'épreuve avec une dose létale de trypomastigotes sanguicoles de souches Y.

Comme le montre la figure 52, l'immunisation avec GP 85 trypo C63-80 permet une protection partielle des souris infectées. En effet, 42 jours après l'infestation, on observe que 40% des souris immunisées avec le peptide sont toujours en vie. Par contre, la mortalité est de 100% pour le groupe de souris immunisées avec l'anatoxine tétanique, et 90% pour le groupe de souris n'ayant subi aucune injection. Il est à signaler que dans ce lot contrôle, une souris est rentrée en phase chronique de la maladie.

Cette expérience montre donc que par l'induction d'anticorps anti-peptide GP 85 trypo C63-80, il est possible de limiter la prolifération parasitaire; l'interaction du parasite avec la cellule-hôte étant empêchée par les anticorps anti-peptide qui se fixent probablement au niveau de la protéine de 85 kDa.

Ces résultats montrent ainsi pour la première fois dans le modèle *Trypanosoma cruzi*, qu'un peptide synthétique mimant une structure du parasite et utilisé comme immunogène, est capable d'induire une protection partielle chez la souris.

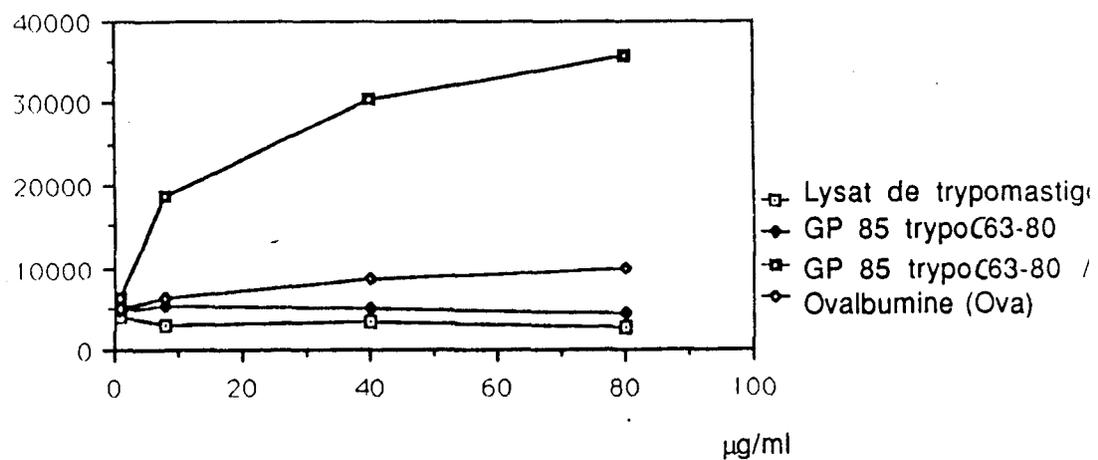


figure 53: Test de prolifération de cellules T sensibilisées par GP 85 trypanoC63-80 couplé sur ovalbumine vis-à-vis de différents antigènes.

4. 3- Influence du peptide GP 85 trypto C63-80 sur les cellules immunitaires T et B

Suite à l'obtention de ces résultats montrant une protection partielle chez la souris, nous avons voulu étudier l'implication que pouvait avoir ce peptide dans le système immunitaire, en particulier au niveau des cellules T et B.

4. 3. 1- Restimulation des lymphocytes T de souris

Cette étude a été réalisée selon le protocole décrit par Corradin et al. (Corradin, 1976). 10 à 12 jours après sensibilisation des cellules lymphocytaires de souris par injection de l'antigène à la base de la queue en présence ou non d'adjuvant complet de Freund, les ganglions inguinaux et périaortiques sont récupérés stérilement. Les cellules ganglionnaires obtenues sont ensuite réparties en boîtes de culture à fond plat, et mises en contact avec divers antigènes à différentes concentrations durant 5 jours. 18 heures avant la fin de la culture, de la thymidine tritiée est additionnée. L'incorporation de la thymidine permettra de quantifier l'intensité de prolifération des cellules.

Les résultats obtenus montrent (figure 53) que les cellules lymphocytaires sensibilisées par GP 85 trypto C63-80 couplé sur ovalbumine en présence d'adjuvant complet de Freund sont restimulées de façon spécifique par cette même préparation antigénique. Cette restimulation n'est pas le fait du porteur utilisé. En effet, la prolifération de ces cellules n'est pas

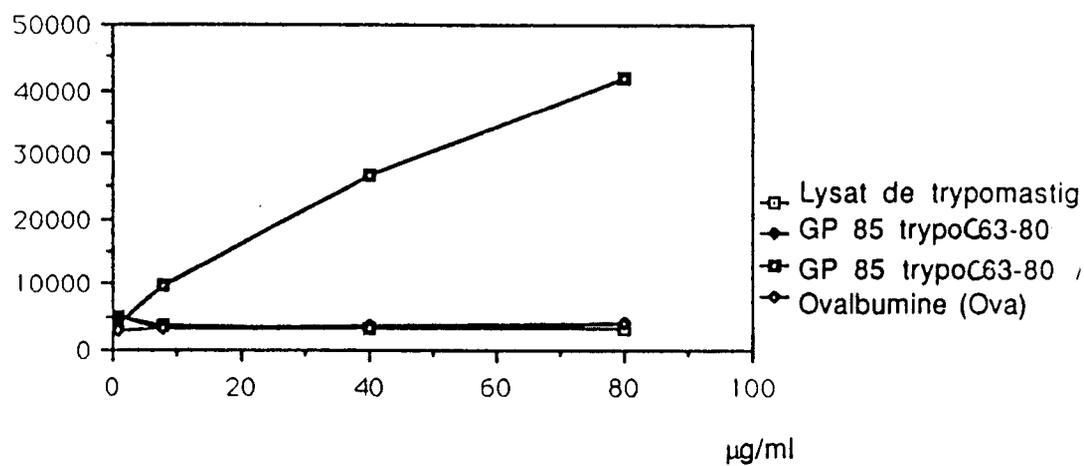


figure 54: Test de prolifération de cellules T sensibilisées par l'adjuvant complet de Freund vis-à-vis de différents antigènes.

observée lorsqu'elles sont mises en contact avec de l'ovalbumine seule. De plus, nous avons pu également observer une restimulation de ces cellules par contact avec GP 85 trypto C63-80 couplé sur sérum albumine bovine au moyen d'une carbodiimide hydro-soluble. Ceci indique que la spécificité de restimulation est liée à GP 85 trypto C63-80 et non au porteur ou à l'agent de couplage.

La restimulation des cellules lymphocytaires sensibilisées au peptide GP 85 trypto C63-80 couplé sur ovalbumine n'a jamais été observée par action du lysat total de trypomastigotes.

Cependant, nous avons pu constater que les cellules lymphocytaires sensibilisées par l'adjuvant complet de Freund, pouvaient être restimulées par action du peptide GP 85 trypto C63-80 couplé sur ovalbumine (figure 54). Une communauté antigénique entre ce peptide et certains déterminants des mycobactéries constituant de l'adjuvant complet de Freund aurait pu être responsable de ce phénomène. Cette hypothèse semble exclue: en effet, les cellules provenant d'animaux sensibilisés par d'autres antigènes sans adjuvant complet de Freund ou en présence de d'adjuvant incomplet de Freund sont également restimulées par GP 85 trypto C63-80 couplé à un porteur.

Ces résultats suggèrent donc que GP 85 trypto C63-80, reproduisant une séquence d'une protéine parasitaire, peut amplifier la réponse proliférative de lymphocytes T déjà préactivés. Cette préactivation qui peut être directe (par les antigènes) ou indirecte (par des cytokines) apparaît indispensable pour l'observation du phénomène. En effet, des

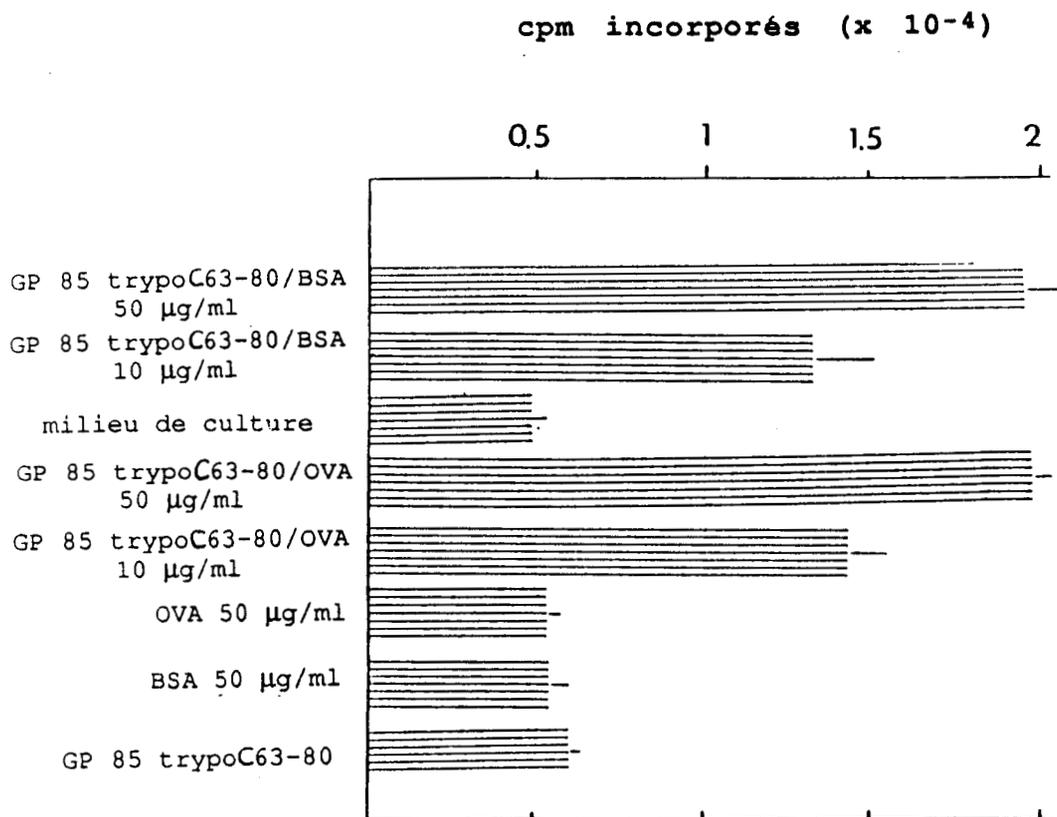


figure 55: Test de prolifération de cellules T humaines vis-à-vis de GP tryptoc63-80 en présence de PHA.

cellules de souris saines (non immunisées) ne présentent aucune réponse au contact de GP 85 trypan C63-80.

Afin de confirmer ces observations, d'autres études ont été menées sur la réponse proliférative de cellules T humaines n'ayant pas eu de contact avec le parasite. Il a été observé que ces cellules T, préactivées par des doses suboptimales de mitogène (PHA 10^{-5} M), avaient une réponse proliférative lors du contact avec GP 85 trypan C63-80 couplé sur porteur (figure 55). En absence de mitogène, aucune prolifération n'a pu être induite.

4. 3. 2- Stimulation polyclonale B induite par GP 85 trypan C63-80

L'immunisation de souris par GP 85 trypan C63-80 couplé sur l'anatoxine tétanique au moyen de l'acide maléimidocaproïque a induit la production d'anticorps dirigés contre ce peptide et les antigènes solubles libérés par les trypanostigotes. Ces anticorps ont été détectés à l'aide d'une méthode immunoenzymatique type ELISA. De plus, ces anticorps sont capables d'immunoprécipiter 3 protéines de surface du trypanostigote dont une protéine de 85 kDa (figure 56).

Cependant, au cours d'autres tests ELISA réalisés avec ces mêmes sérums, il a pu être mis en évidence des anticorps dirigés contre des antigènes sans relation avec le parasite tels que la sérum albumine bovine, l'ovalbumine, l'hémocyanine de patelle et la fibronectine. Cette production d'anticorps non spécifiques

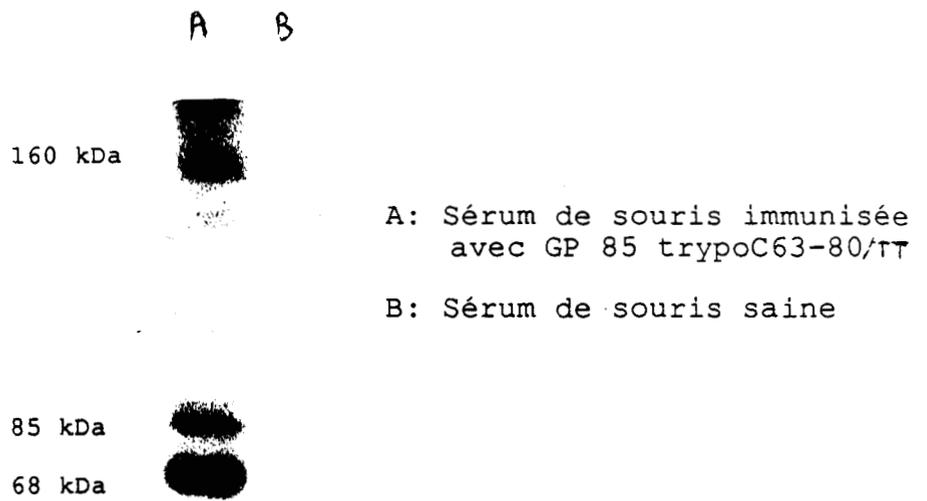


Figure 56: Profil du gel d'immunoprécipitation des antigènes de surface de trypomastigotes par les anticorps anti-GP 85 trypo C63-80

montre que le peptide induit une stimulation polyclonale des lymphocytes B chez la souris.

Il faut cependant noter que cette stimulation polyclonale des lymphocytes B n'a pas été mise en évidence chez le lapin. En effet, les anticorps produits après immunisation avec GP 85 trypto C63-80 couplé sur anatoxine tétanique au moyen du glutaraldéhyde ne reconnaissent que ce peptide et les antigènes solubles de trypomastigotes.

4. 4- Conclusions

Dans le cadre des études sur les vaccins synthétiques, le but est de déterminer une structure suffisante capable d'induire une protection efficace contre le pathogène à combattre.

L'utilisation en tant qu'immunogène du peptide GP 85 trypto C63-80 représentant deux séquences répétées se trouvant dans la glycoprotéine de surface de 85 kDa a montré qu'il était capable d'induire une protection partielle chez la souris après infestation. Bien qu'une protection ait également pu être obtenue après immunisation avec un peptide représentant le site minimum d'attachement cellulaire de la fibronectine, c'est la première fois, dans ce modèle, qu'un effet protecteur est obtenu après immunisation avec un peptide mimant une structure de surface du parasite.

Les investigations menées ensuite afin d'étudier le rôle que pouvait avoir ce peptide sur le système immunitaire ont montré

qu'il était capable d'induire une stimulation polyclonale des lymphocytes T et B.

Les études précédentes menées sur cette maladie avaient pu mettre en évidence, aussi bien chez l'homme que chez l'animal d'expérience, l'existence de signes de stimulation polyclonale. En effet, Minoprio et al. (Minoprio, 1986) ont montré qu'il était possible de trouver un grand nombre de lymphocytes T activés, chez des souris, en phase aiguë de la maladie. De plus, il a été montré que des souris infectées avec *Trypanosoma cruzi* présentaient une activation polyclonale de leurs cellules B se traduisant par une augmentation très importante du nombre des cellules productrices d'anticorps (Ortiz-Ortiz, 1980; D'Imperio, 1985). Cette stimulation polyclonale peut être mise en évidence par l'analyse de la production spontanée de plage de lyses, par la technique des plages d'hémolyses, ainsi que par l'observation d'une réponse anticorps spécifiques d'antigènes sans relations avec le parasite.

Il faut également préciser que c'est surtout au cours de la phase chronique que les manifestations autoimmunes sont les plus marquées. L'existence de substances à activité immunosuppressive pourrait alors réduire les mécanismes de défense de l'hôte et laisser l'autoimmunité se développer. L'effet de stimulation polyclonale de la protéine contenant GP 85 trypo C63-80, libérée par les quelques parasites encore présents en phase chronique, pourrait entretenir les manifestations autoimmunes amorcées en phase aiguë.

Bien qu'une protection ait pu être mise en évidence après immunisation et infestation avec une dose létale de parasites,

le peptide GP 85 trypan C63-80 ne s'avère pas un bon candidat pour la stratégie vaccinale que nous avons envisagée à l'origine de ce travail.

Ceci montre que, si les peptides sont les outils idéals dans le cadre de la vaccination à partir d'immunogènes synthétiques afin de mieux cibler la réponse produite, ils peuvent induire des désordres immunologiques similaires à certaines manifestations observées lors de la maladie.

Nous avons cependant montré que la production d'anticorps contre cette protéine de 85 kDa à partir du peptide GP 85 trypan C63-80 influait sur la pénétration du parasite dans la cellule du fait de la protection induite. Le choix d'un autre peptide dans cette séquence pourrait probablement permettre l'obtention d'une protection similaire ou supérieure.

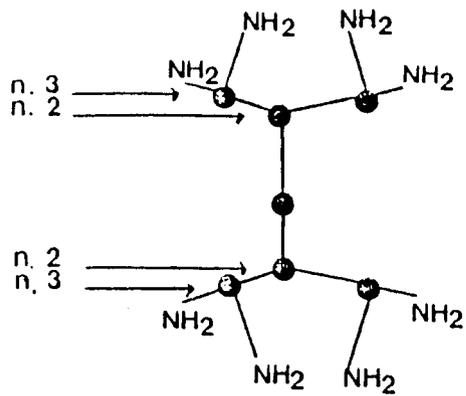
5- SYNTHÈSE D'IMMUNOGÈNES CHIMIQUEMENT DÉFINIS

De plus en plus, les peptides synthétiques sont utilisés dans le domaine de la vaccination humaine. Il devient alors obligatoire d'éviter l'utilisation des protéines porteuses classiques.

En effet, celles-ci ne sont pas de qualité égale d'un lot à l'autre, les conjugués obtenus après couplage sont de nature très hétérogènes. Le manque de caractérisation de ces structures n'est pas admissible en thérapie humaine. De plus, ces protéines peuvent être à l'origine d'effets secondaires indésirables. Des phénomènes de tolérance vis-à-vis de ces grosses molécules amènent à une diminution de la réponse immunitaire contre l'haptène (Herzenberg, 1980). Enfin, des anticorps anti-agents de couplage ont déjà été mis en évidence avec le glutaraldéhyde et les maléimides (Edwards, 1989; Briand, 1985).

La fraction antigénique peptidique représente dans la plupart des cas une fraction mineure de la masse totale du conjugué porteur-peptide. Les anticorps recherchés ne constituent parfois qu'une faible partie des anticorps produits, surtout quand le pouvoir immunogène du porteur est supérieur à celui du peptide conjugué (ceci, s'est par exemple avéré être le cas du peptide GP 85 trypto C63-80).

Pour ces raisons, d'autres alternatives au couplage de peptide sur porteur ont été imaginées. La première fut de conjuguer le peptide sur lui-même par polymérisation (DiMarchi, 1986; Jolivet, 1987). Cependant, les techniques utilisées pour y parvenir risquent d'altérer l'immunogénicité efficace du peptide



Caracterisation d'un Candelabre

n : niveaux

2^n : valence

figure 57: Candélabre: représentation simplifiée

d'une part, et d'autre part, les réactifs utilisés pour ces couplages peuvent être eux-mêmes immunogènes.

Un nouveau système de présentation multiple de l'antigène, le "MAPs" ("multiple antigen presentation system"), proposé par Tam et col. (Tam, 1988, Posnett 1988, Tam 1989) contient une matrice de résidu lysine (n niveaux) donc, $2n$ copies de l'antigène et permet d'obtenir une présentation sous forme de macromolécule chimiquement définie, à haute densité en antigène peptidique (plus de 90% de la masse) et dont la masse moléculaire dépasse souvent 10000. Nous avons dénommé la matrice polylysine sur laquelle sont ancrés les antigènes peptidiques "candélabre" (figure 57).

Le candélabre octavalent (3 niveaux) semble présenter le maximum d'efficacité. Cependant, d'autres configurations peuvent être envisagées. Il permet la production, d'anticorps polyclonaux qui peuvent réagir avec le peptide aussi bien sous forme monomère que polymère et peu d'anticorps dirigés contre le porteur lysine.

De plus, il est possible d'obtenir, après immunisation avec de telles construction, des anticorps monoclonaux spécifiques du peptide.

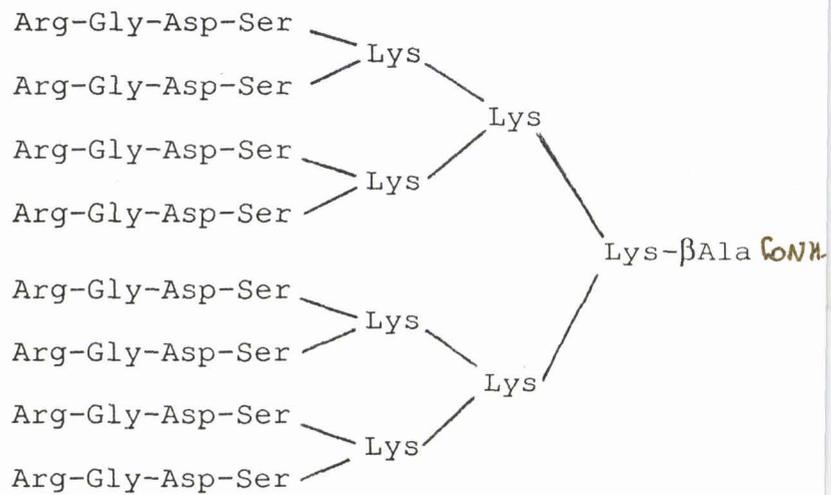
Dans le cadre des études sur le RGD, nous voulions obtenir un anticorps monoclonal spécifique de cette séquence. L'échec subi pour la production d'anticorps monoclonal, avec GP 85 trypto C63-80 couplé sur protéine porteuse en raison des trop nombreux clones réagissant contre le porteur, nous a encouragé à synthétiser un candélabre portant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser

pour être utilisé comme immunogène. Nous avons tout d'abord synthétisé Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre. Avec une structure d'aussi petite taille, nous voulions étudier s'il était possible d'obtenir des anticorps polyclonaux et éventuellement un anticorps monoclonal spécifique. Nous avons également synthétisé un autre candélabre portant le peptide Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala (Fn 80-89).

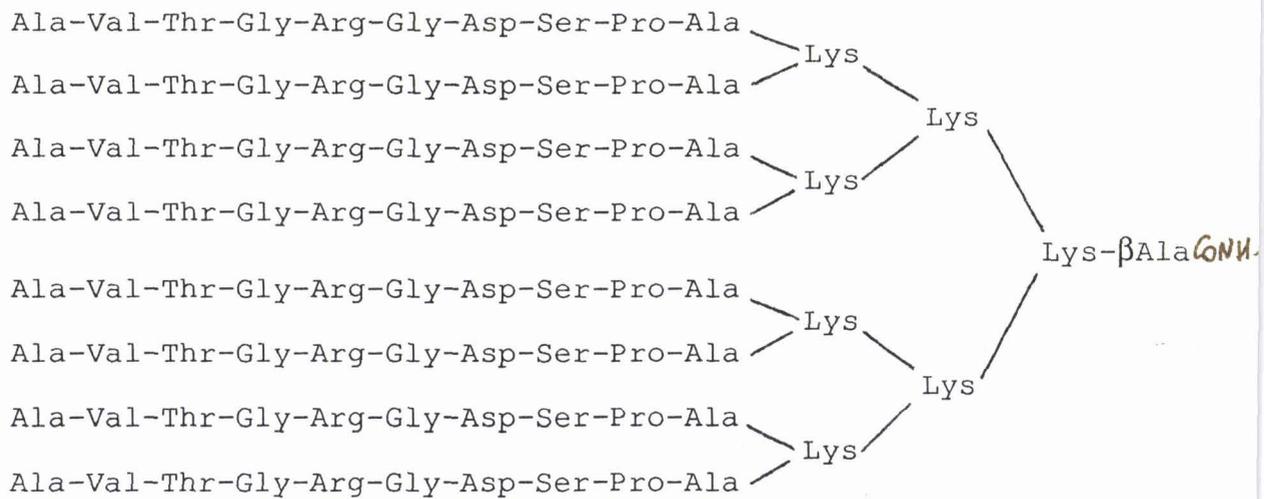
5. 1- Synthèses des candélabres

La première étape dans ce travail fut le choix d'une résine compatible pour ce type de synthèse. Les synthèses réalisées par Tam et col. ont été faites sur une résine de type phénacylacétamido-méthyle. L'avantage de cette résine est qu'elle ne subit pas de perte de peptide à chaque étape de déprotection par l'acide trifluoroacétique (voir la partie générale). Au laboratoire, nous avons choisi une résine de type benzhydrylamine qui offrait le double avantage de ne pas subir de perte de peptide à chaque cycle de déprotection et d'être facilement modulable quant à sa charge.

Dans un premier temps, nous avons greffé comme premier acide aminé la Boc- β alanine. L'utilisation de cet acide aminé comme étalon interne après l'analyse d'acides aminés d'un peptide candélabre s'est montré peu satisfaisant. En effet, il apparaît dans une zone difficile à calibrer sur le chromatogramme obtenu après analyse, et, est souvent contaminé par les résidus d'hydrolyse incomplète. Nous avons donc décidé d'utiliser pour les prochaines synthèses la norleucine en remplacement de la β alanine. Cet acide aminé non naturel ne sera jamais retrouvé



Représentation schématique de
Arg-Gly-Asp-Ser-Candélabre



Représentation schématique de
Fn 80-89-Candélabre

dans la séquence de peptide biologiquement actif et sera un étalon interne de choix parfaitement défini sur le chromatogramme obtenu après analyse d'acides aminés .

Après avoir greffé l'acide aminé étalon, nous avons couplé les trois rangs de résidus lysine par couplage successif de diBoc-lysine. Celle-ci, sous forme de son sel de dicyclohexylamine (DCHA) a été couplée après activation au moyen du BOP. Ce mode d'activation évite d'avoir à déplacer préalablement le sel.

5. 1. 1- Arg-Gly-Asp-Ser-Candélabre

Les couplages des acides aminés correspondants au peptide à synthétiser ont été réalisés après formation de l'ester activé d'HOBt, sur une résine benzhydrylamine portant, (Lys)₇-βAla. Aucun problème particulier n'a été rencontré durant cette synthèse.

La purification de Arg-Gly-Asp-Ser-Candélabre après clivage par le fluorure d'hydrogène a été réalisée par gel filtration plutôt que par dialyse en raison de sa bonne solubilité dans l'acide acétique à 5%.

L'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale, montre une composition correcte de tous les acides aminés hormis la sérine. La faible valeur de la sérine est imputable aux conditions d'hydrolyse qui dégradent de façon importante cet acide aminé.

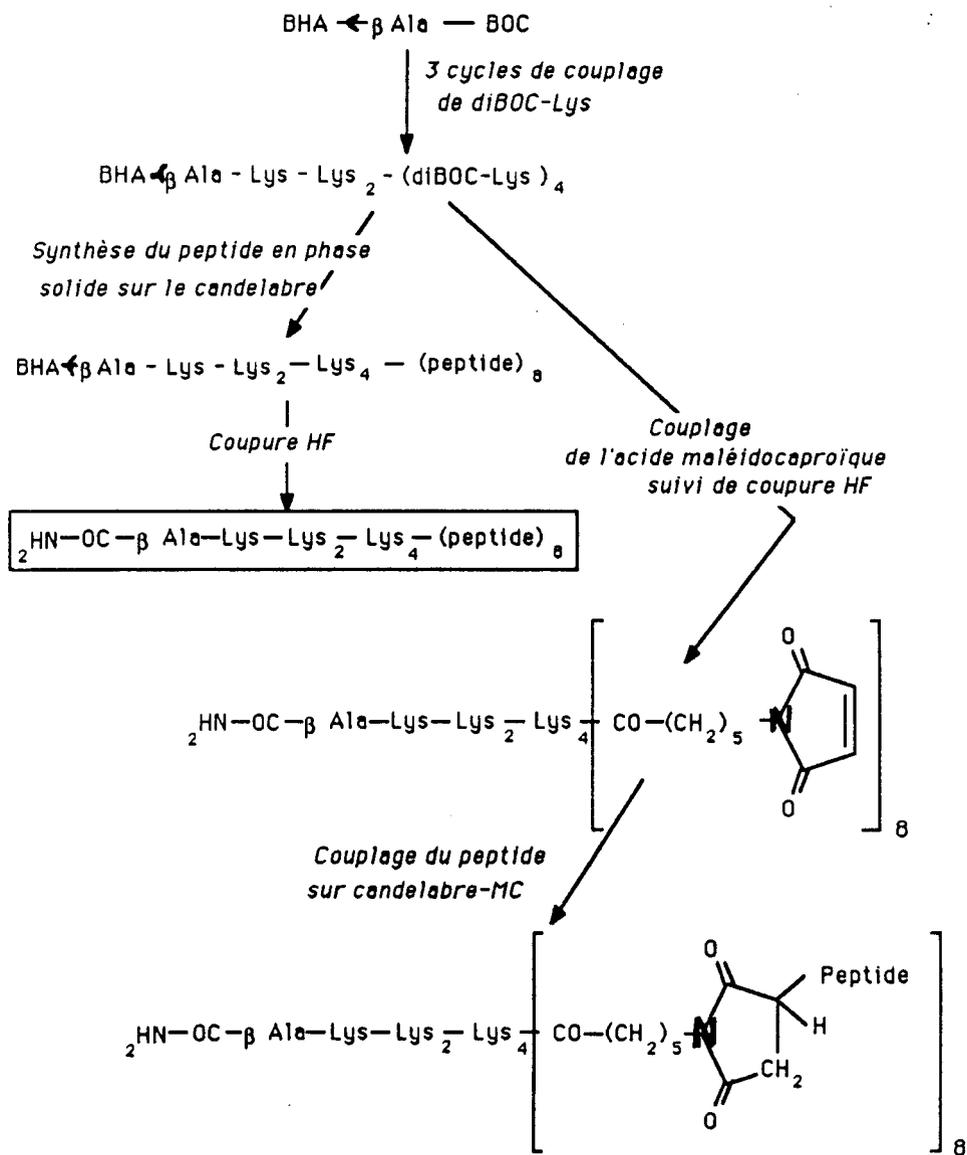


figure 58: Schéma représentant deux voies possibles pour la construction d'un peptidyl-candelabre

5. 1. 2- Fn 80-89-Candélabre

La synthèse de ce nouveau candélabre a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le Arg-Gly-Asp-Ser-Candélabre et sur le même type de résine.

Le faible rendement observé après clivage par le fluorure d'hydrogène (46,3%) pourrait être imputé en partie à la nature de la résine (benzhydrylamine). En effet, la cinétique de libération du peptide sur ce type de résine est moins rapide qu'avec les autres résines habituellement utilisées.

La composition de cette structure après analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale était satisfaisante. Une gel-filtration s'est avérée néanmoins nécessaire pour éliminer les traces de p-crésol résiduelles provenant du clivage par le fluorure d'hydrogène.

5. 1. 3- Nouvelles méthodes

Il est aussi intéressant de posséder le peptide sous forme monomère. Il serait donc intéressant d'avoir accès plus rapidement à une construction type "candélabre" sans avoir à refaire une synthèse complète du peptide.

Nous avons alors envisagé une stratégie permettant d'obtenir une telle construction à partir de la forme monomère et d'une matrice polylysine activée.

L'idée est de synthétiser une structure polylysine identique à celle de Tam mais fonctionnalisée après la troisième rangée de lysine par un agent hétérobifonctionnel qui sera ensuite capable

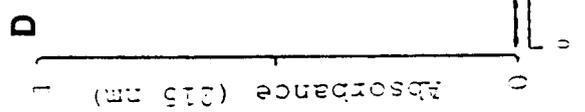
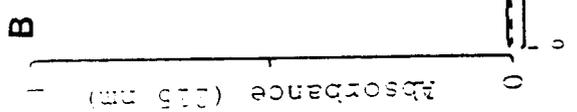
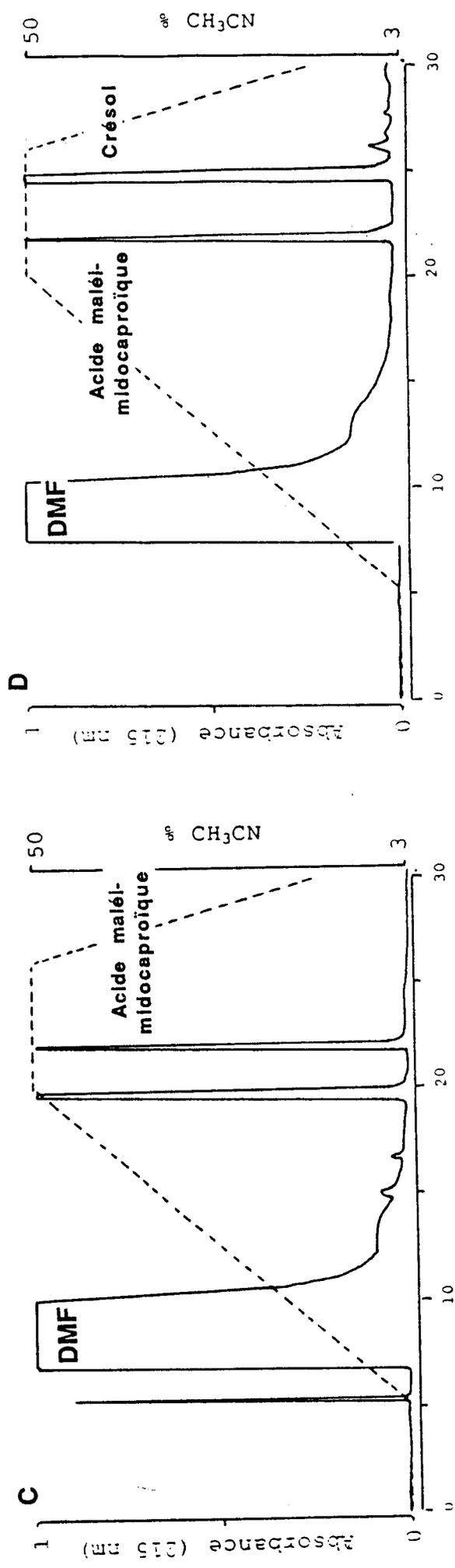
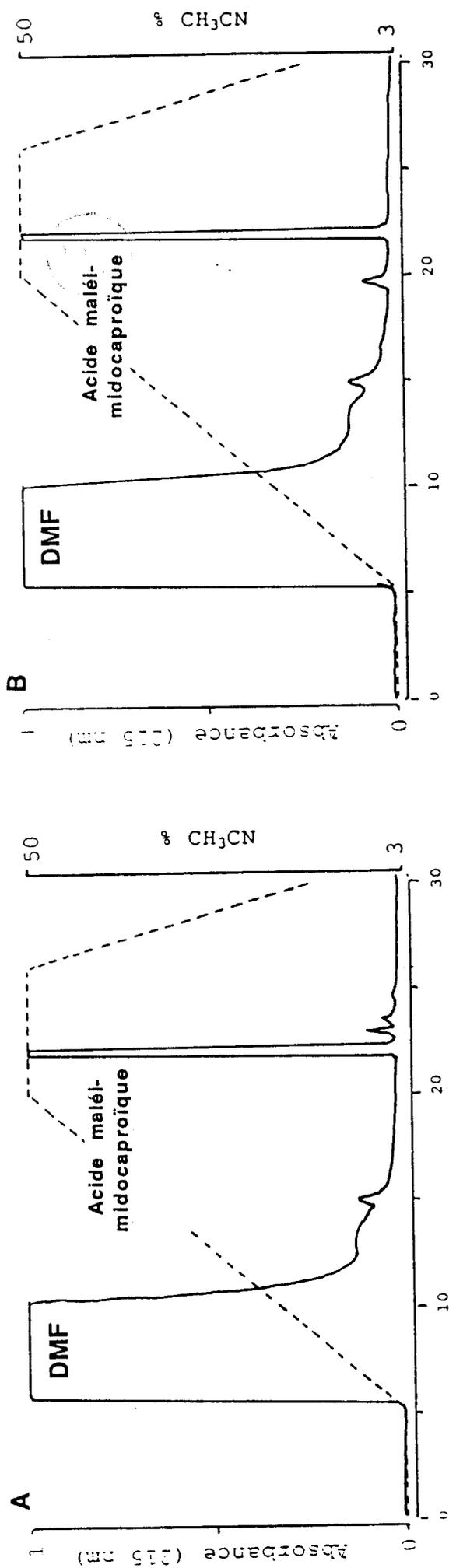


figure 59: Chromatogrammes des RP-HPLC analytiques de l'acide maléilmidocaproïque (MC) A) dans DMF (témoins) B) dans DMF/DIEA C) dans DMF/DIEA/H₂O D) après coupure HF

de réagir avec un peptide préparé indépendamment et muni d'une fonction capable de réagir avec l'agent hétérobifonctionnel (figure 58).



Nous avons donc envisagé coupler un peptide par sa fonction thiol sur la structure polylysine ($\text{Lys}_7\text{-}\beta\text{Ala}$) par l'intermédiaire de l'acide maléimidocaproïque (MC). Une telle structure sera appelée "candélabre-MC".

5. 1. 3. 1- Synthèse de "candélabre-MC"

La synthèse de "candélabre-MC" a été réalisée par couplage de l'acide maléimidocaproïque au moyen du BOP sur une résine benzhydrylamine portant $(\text{Lys})_7\text{-}\beta\text{Ala}$ suivi du clivage par le fluorure d'hydrogène.

Nous avons voulu d'abord étudier le comportement de l'acide maléimidocaproïque dans les conditions de couplage utilisées (DIEA) et après traitement au fluorure d'hydrogène. Il ressort des HPLC phase inverse A et B (figure 59) que l'acide maléimidocaproïque ne subit qu'une faible dégradation en milieu DMF/DIEA par rapport à celle que l'on observe en milieu H_2O /DIEA (HPLC phase inverse C, figure 59). Le produit formé résulte probablement de l'ouverture du cycle maléimide par hydrolyse (Keller, 1980). De plus, l'acide maléimidocaproïque ne subit de dégradation suite à son traitement par le fluorure d'hydrogène (HPLC phase inverse D, figure 59); cependant, si l'HPLC phase inverse ne semble pas un moyen idéal pour étudier quantitativement la destruction de la molécule, l'analyse par Résonance Magnétique Nucléaire nous a permis de confirmer la

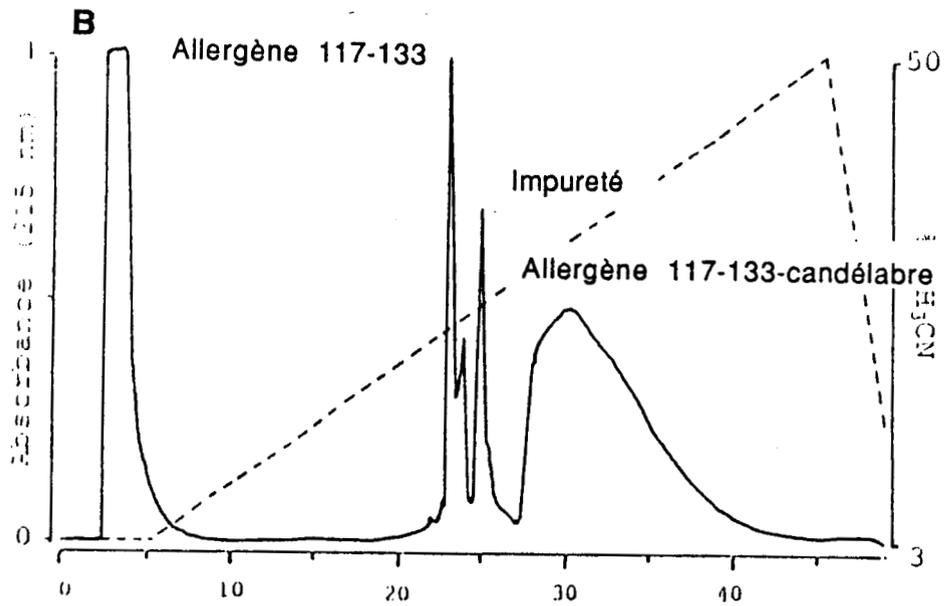
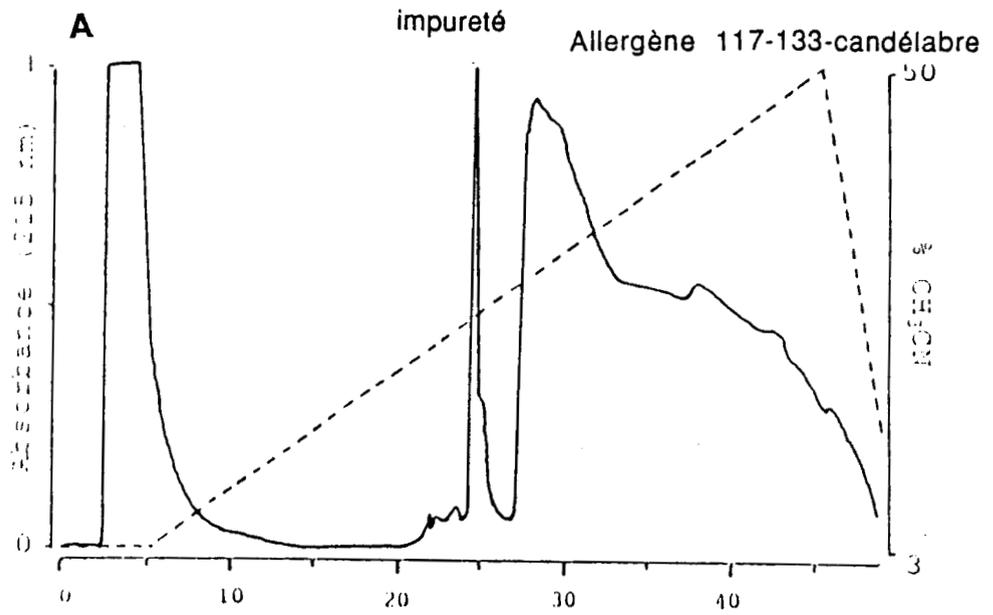


figure 60: HPLC phase inverse analytiques pendant le couplage du peptide Allergène 117-133 sur le candélabre-MC

A: Après avoir ajouté du peptide en défaut
 B: Après avoir ajouté du peptide en excès

bonne stabilité de l'acide maléimidocaproïque après traitement par le fluorure d'hydrogène.

Après la synthèse de la polylysine sur la résine benzhydrylamine chargée à 0,6 méq/g, nous n'avons jamais pu coupler quantitativement l'acide maléimidocaproïque sur le dernier rang de lysine. Cette non-saturation a été confirmée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale de la résine ayant été préalablement traitée en milieu basique (ceci permet de libérer plus rapidement l'acide ε-aminocaproïque). Dès lors, nous sommes repartis d'une résine portant un résidu β-Ala moins chargée (0,28 méq/gr) pour construire un "candélabre-MC" sur lequel tout l'acide maléimidocaproïque semble couplé (test de Christensen). Après clivage par le fluorure d'hydrogène nous obtenons le "candélabre-MC".

5. 1. 3. 2- Couplage d'un peptide réduit sur le "candélabre-MC"

Nous avons réalisé le couplage du peptide Allergène 117-133 (peptide correspondant à un allergène majeur de *Dermatophagoïdes pteronyssinus*) possédant dans sa séquence un résidu cystéine. 1,5 équivalent de peptide ont été utilisés par rapport au "candélabre-MC". Une impureté du peptide semblant ne pas contenir de cystéine, a servi de référence pour observer la disparition du peptide Allergène 117-133 (couplage au candélabre) de façon concomitante à l'apparition d'un massif caractéristique du candélabre (figure 60). Après isolement du candélabre-MC-(peptide Allergène 117-133) par gel-filtration, et

analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale, un rendement de couplage de 50 % a pû être déterminé.

5. 1. 4- Conclusion

La synthèse de peptide sur candélabre s'est montrée être une technique très facile à mettre en oeuvre. Pour les peptides que nous avons synthétisés de cette façon, la seule exigence importante à respecter est la charge initiale de la résine. En effet, une charge trop importante de la résine portant Lys7- β Ala rend le couplage des acides aminés suivant plus difficile.

En ce qui concerne le "candélabre-MC" que nous avons synthétisé en vue de coupler un peptide possédant une cystéine, les résultats restent encore imparfaits. En effet, nous n'avons pas réussi à coupler sur ce nouveau type de candélabre les 8 chaînes peptidiques prévues.

La non saturation du "candélabre-MC par le peptide pourrait correspondre à une difficulté d'accessibilité des fonctions maléimides par le peptide ou encore à une modification de ces fonctions (ouverture).

Un phénomène d'encombrement stérique au niveau de cette molécule semble peu probable. En effet, la construction du modèle moléculaire ne montre pas l'apparition de gênes stériques importantes.

La structure synthétisée n'est que partiellement soluble dans les conditions de couplage (DMF/H₂O 50%). La consommation

incomplète de thiol pourrait donc aussi provenir de ce phénomène.

L'introduction d'une fonction permettant une meilleure solubilisation amènerait peut-être à une amélioration des rendements. Cette fonction pourrait être une fonction amine permettant une solubilisation à pH inférieur à 7 de façon à protéger le cycle maléimide qui est sensible au pH basique.

6 - ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-Arg-Gly-Asp-Ser, RESULTATS

Le but de ce travail était la production d'un anticorps monoclonal spécifique de la séquence RGD. La possession d'un tel anticorps serait d'une grande utilité pour la mise en évidence de façon indirecte de séquences RGD constitutives des protéines de surface de cellules humaines ou de microorganismes. Il pourrait être utilisé comme sonde spécifique.

Après immunisation de souris avec Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre et contrôle des titres anticorps contre la fibronectine et Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre, ces souris ont été sacrifiées afin de récupérer les lymphocytes spléniques. Ceux-ci sont alors fusionnés avec des cellules provenant de myélomes.

Les clones résultants de cette fusion, sont sélectionnés après analyse des surnageants de culture par la technique ELISA. Celle-ci permet la mise en évidence des anticorps anti-fibronectine et anti-Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre.

Les premiers clones positifs dans cette recherche ont répondu envers Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre. La suite de cette sélection a donc été poursuivie par contrôle sur cet antigène.

L'anticorps monoclonal obtenu a été caractérisé comme étant une immunoglobuline de classe IgG1. Nous l'appellerons pour faciliter l'écriture: Ac III D4.

Cependant, cet Ac III D4 n'est pas capable de reconnaître en méthode ELISA (reconnaissance de l'antigène immobilisé sur un support solide par l'anticorps en solution) d'autres antigènes

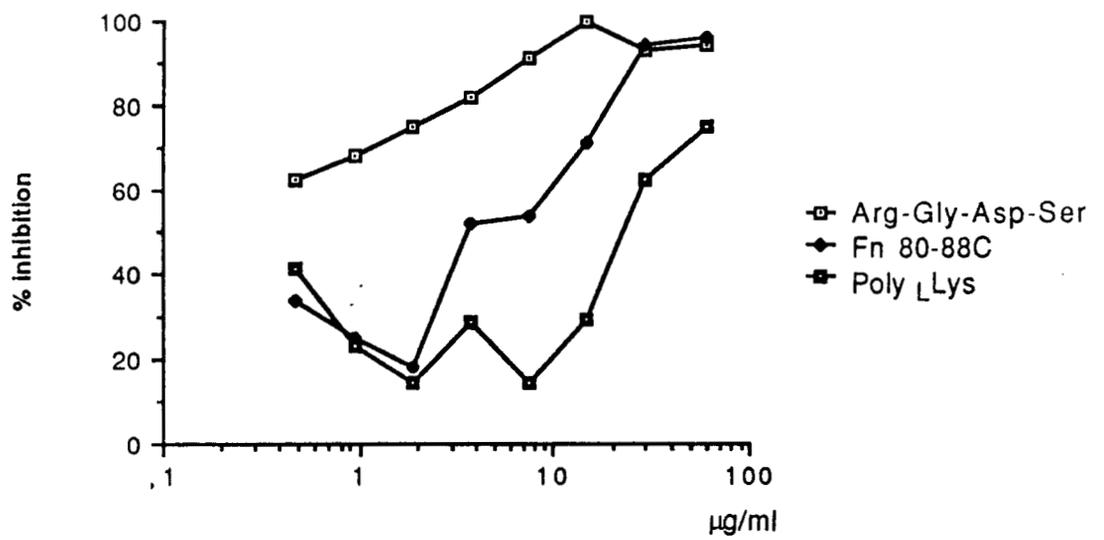


figure 61: Tests d'inhibition ELISA.

portant la séquence RGD que le Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre. C'est ainsi qu'il répond négativement contre Fn 80-88C (peptide représentant la séquence entourant et contenant RGD dans la fibronectine native), Arg-Gly-Asp-Ser, la fibronectine, la laminine, le collagène de type III, le C 3 et les peptides FMDV, Pep 63 (peptides contenant une séquence RGD).

Ce manque de réactivité vis-à-vis d'autres séquences contenant RGD pourrait être dû au fait que cet anticorps monoclonal ne reconnaisse que le motif Arg-Gly-Asp-Ser dans l'environnement qu'il possède au sein du candélabre.

Des expériences de compétition en ELISA ont montré que Fn 80-88C amené en solution en même temps que l'anticorps Ac III D4 est capable d'inhiber la fixation de cet anticorps sur le Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre immobilisé sur support insoluble (figure 61)

Bien que la polylysine, porteur du peptide, ait été décrit comme non génératrice d'anticorps, il semble que dans notre cas il joue un rôle. En effet, seule, elle est capable d'inhiber la fixation de l'anticorps monoclonal Ac III D4 sur le Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre.

Nous avons peut-être atteint la taille minimum de peptide sur candélabre pour l'obtention d'un anticorps monoclonal antipeptide. La séquence reconnue par un tel anticorps devant être constituée d'un enchaînement de plusieurs acides aminés (supérieur à 4), le Ac III D4 doit reconnaître Arg-Gly-Asp-Ser dans une présentation très particulière faisant intervenir les résidus lysine.

La synthèse d'un autre candélabre portant la séquence Fn 80-89 devrait très certainement permettre d'obtenir un anticorps de meilleure spécificité. La sélection des clones au cours de ces prochaines expériences devra se faire préférentiellement à l'aide du peptide Fn 80-88C et de la fibronectine.

Dans le cadre d'immunisation d'animaux avec des peptides couplés sur protéines porteuses, on considère souvent que la protéine permet d'amener des épitopes T nécessaires à la production d'anticorps contre l'haptène, et d'augmenter la demi-vie du peptide *in vivo*. Le système de candélabre ne constitue pas un porteur classique, cependant, il a été montré comme étant hautement immunogène. Ce paradoxe peut être expliqué si le peptide contient dans sa séquence un épitope T ou si le candélabre agit comme un antigène T-indépendant. Ces candélabres pourraient ressembler aux antigènes T-indépendants qui sont souvent représentés comme étant de grosses molécules polymérisées aux déterminants antigéniques répétitifs.

Cependant, la réponse induite par de tels antigènes est très généralement de type IgM même en réponse secondaire. Dans l'étude de Posnett et al. (Posnett, 1988), la réponse observée était principalement de type IgG1. Ceci montre la présence d'un épitope T dans la structure de la molécule. Compte tenu de la longueur du peptide, il est fort probable que cet épitope soit situé dans le peptide. En effet, on considère la longueur minimale d'un épitope T comme étant de 6 à 7 résidus d'acides aminés.

Dans notre étude, l'anticorps obtenu après hybridation est de type IgG1 et non de type IgM. Ceci montre que dans la

structure Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre, utilisée en tant qu'immunogène, devait également se trouver un épitope T impliqué pour la production d'anticorps antipeptide.

CONCLUSION GENERALE

Afin de lutter contre la maladie de Chagas, nous avons envisagé la mise en oeuvre de nouvelles stratégies basées sur la compréhension des mécanismes d'adhésion des parasites sur les cellules hôtes.

Pour réaliser ces études, nous avons été amenés à synthétiser de nombreux peptides, surtout en ce qui concerne les analogues du tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser, et de ce fait à introduire de nouvelles techniques au laboratoire.

La synthèse multiple en phase solide, décrite la première fois par Houghten, s'est montrée tout à fait performante pour ce genre d'étude. Nous avons pu synthétiser, en environ deux mois, 40 analogues de Arg-Gly-Asp-Ser correspondants aux séries Arg-Xxx-Asp-Ser et Arg-Gly-Asp-Xxx. Les peptides obtenus après clivage par traitement par le fluorure d'hydrogène dans un appareillage multiposte se sont montrés d'une pureté tout à fait satisfaisante. Les analyses d'acides aminés après hydrolyse acide totale en phase gaz n'ont montré aucune contamination des peptides entre eux, risque majeur par la combinaison de ces deux techniques (synthèse multiple en phase solide et clivage en multiposte). Les problèmes rencontrés au cours de ces synthèses ont toujours été fonctions des groupes protecteurs ou de la séquence peptidique. Dans le cas du peptide Arg-Asp-Asp-Ser par exemple, une importante proportion de peptide sous forme d'aspartimide a été formée lors du clivage par traitement par le fluorure d'hydrogène.

Les études menées sur ce peptide ont montré qu'il était possible de minimiser cette réaction secondaire par modification

du choix des groupes protecteurs et du traitement final par le fluorure d'hydrogène. Cependant, des études complémentaires devraient permettre d'améliorer encore les résultats obtenus.

La spectrométrie de masse utilisant l'ionisation de type FAB ("Fast Atom Bombardment") nous a également fourni des renseignements très précieux pour l'élucidation des réactions secondaires survenues. Dans le cas de Arg-Asp-Asp-Ser, l'impureté correspondant à l'aspartimide a pu ainsi être rapidement mise en évidence.

Concernant le peptide Arg-Glu-Asp-Ser, la spectrométrie de masse nous a permis de confirmer la présence d'un ester benzylique résiduel sur l'acide glutamique.

Cette méthode d'analyse nous a permis également de confirmer la structure des peptidyl-drogues que nous avons synthétisées dans le cadre de l'étude du ciblage de drogue sur le parasite.

Nous avons élaboré plusieurs immunogènes synthétiques destinés à la vaccination contre le *Trypanosoma cruzi* par association du peptide sur protéine porteuse suivant différentes méthodes. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la technique utilisant un agent de couplage hétérobifonctionnel, l'acide maléimidocaproïque, que nous avons couplé sur protéine après activation au moyen du BOP.

Dans le but d'obtenir un anticorps monoclonal contre le tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser, nous avons synthétisé des antigènes de composition chimiquement définie type "candélabre". La réalisation de tels immunogènes s'est montrée facile à mettre en oeuvre et présentera certainement un essor considérable ces prochaines années.

Les résultats d'inhibition de fixation de la fibronectine sur les trypomastigotes n'ont pas permis de mettre en évidence de meilleurs inhibiteurs que le peptide Arg-Gly-Asp-Ser et susceptibles d'être utilisés *in vivo*. L'étude réalisée avec les peptides analogues de Arg-Gly-Asp-Ser devait permettre de différencier l'affinité de ces peptides envers les récepteurs parasitaire et cellulaire de la fibronectine. Il n'a pas été possible de mener les expérimentations que dans le modèle parasitaire. En effet, nous n'avons jamais été capables de reproduire les expériences sur les fibroblastes ou les macrophages.

Les modifications induites par l'introduction d'un acide aminé en position N-terminale de Arg-Gly-Asp-Ser n'ont pas modifié de manière sensible l'affinité de cette série de peptides (Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser) pour le récepteur parasitaire pour la fibronectine. Cependant, pour les deux autres séries de peptides, Arg-Xxx-Asp-Ser et Arg-Gly-Asp-Xxx, les modifications induites sont plus conséquentes. Seuls quelques peptides possèdent une activité inhibitrice de la fixation de la fibronectine sur les trypomastigotes. Des études complémentaires restent cependant à réaliser afin de déterminer s'ils sont meilleurs inhibiteurs que Arg-Gly-Asp-Ser.

Des phénomènes d'amplification de fixation de la fibronectine à la surface des trypomastigotes, qui restent encore inexplicables, ont été mis également en évidence.

Les études de ciblage de drogues sur les trypomastigotes n'ont pas permis d'augmenter la toxicité des drogues utilisées.

En effet, les modifications nécessaires pour leur couplage sur les peptides contenant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser ont eu comme effet leur détoxification. Malgré ces résultats, nous avons voulu confirmer le rôle du porteur au cours de ces études. Nous avons été alors surpris d'observer une perte de l'affinité de la peptidyl-droque sur le parasite lorsque le porteur est le tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser. Ces résultats étaient d'autant plus surprenant que tous les peptides de la série Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser restaient inhibiteurs de la fixation de la fibronectine sur le trypomastigote. Les résultats obtenus avec les drogues couplées sur le peptide Fn 80-88C semblent montrer que le nitro-2 imidazolyl-Fn 80-88C conserve une affinité quoique faible pour le parasite.

L'utilisation de peptide comme immunogène synthétique dans le modèle *Trypanosoma cruzi* a permis de montrer une fois de plus la validité du concept de vaccin synthétique. Nous avons pu obtenir, après immunisation de souris de laboratoire avec un peptide représentant un fragment d'une protéine de surface de la forme trypomastigote, une protection partielle contre l'inoculation d'une dose léthale de trypomastigotes.

Cependant, nous avons également montré que ce peptide était à l'origine d'une production polyclonale d'anticorps et d'une stimulation polyclonale de lymphocytes T. De tels phénomènes ont été mis en évidence au cours de l'infection humaine et animale, et seraient probablement responsables du développement de l'autoimmunité caractéristique de la maladie de Chagas en phase chronique.

Cependant, si dans ce modèle, le peptide étudié s'avère difficilement utilisable, on retiendra que la protéine sélectionnée semble elle être une bonne cible dans la stratégie vaccinale. Le choix d'une autre séquence de cette protéine permettrait probablement d'obtenir également un effet protecteur tout en évitant l'activité de stimulation polyclonale.

MATERIEL
et
METHODES

A- PRINCIPES GENERAUX.

1- ELIMINATION DES FINES PARTICULES

Un lot de 25 gr de résine est mis en suspension dans un litre de méthanol, les particules les plus fines remontent à la surface et sont éliminées avec l'excès de solvant. Cette opération est répétée 3 fois, puis la résine est transférée dans une ampoule à décanter et lavée par du chlorure de méthylène. Après décantation, les particules fines de la phase inférieure sont éliminées. L'opération est répétée 3 fois.

2- FIXATION DU PREMIER ACIDE AMINE

Le Boc-acide aminé est mis en solution dans un mélange éthanol/eau: 5/1. Une solution de carbonate de césium est ajoutée goutte à goutte jusqu'à obtention d'un pH égal à 7. La solution est évaporée à sec à 40°C. Le résidu huileux est repris dans du DMF. Après avoir ajouté la résine chlorométhylée, le mélange est maintenu sous agitation à 50°C pendant 24 heures.

La résine est ensuite filtrée et lavée par du DMF (x3), DMF/eau: 1/1 (x3), DMF/éthanol: 1/1 (x1), éthanol (x3), méthanol (x2).

La Boc-peptidyl-résine est récupérée et séchée dans un dessiccateur.

La charge de la résine peut être calculée: soit par dosage des ions chlorures (méthode de Charpentier-Volhard) ou dosage des fonctions amines (méthode de Gisin).

3- DETERMINATION DE LA CHARGE DE LA PEPTIDYL-RESINE

3. 1- Méthode de Charpentier-Volhard

Les 7 premiers filtrats de lavage sont récupérés et concentrés à sec. Le résidu est repris dans un volume connu d'eau déminéralisée.

A une aliquote nous ajoutons:

- 25 ml d'AgNO₃ 0,05N
- 10 ml d'HNO₃ 6N
- 5 ml de nitrobenzène
- 4/5 gouttes d'une solution d'alun de fer ammoniacal

Un dosage en retour de l'excès de nitrate d'argent est effectué par une solution de KSCN 0,05N.

3. 2- Méthode de Gisin

Après déprotection et neutralisation, 100 à 200 mg de résine pesés avec précision subissent le traitement suivant:

- | | |
|---|----------|
| - CH ₂ Cl ₂ | 2 x 2' |
| - DIEA 5% | 3 x 2' |
| - CH ₂ Cl ₂ | 2 x 2' |
| - IPrOH | 2 x 2' |
| - CH ₂ Cl ₂ | 3 x 2' |
| - Acide picrique 0,1N dans CH ₂ Cl ₂ | 3 x 2' |
| - CH ₂ Cl ₂ | 3 x 2' |
| - DIEA 5% | 3 x 2' * |
| - CH ₂ Cl ₂ | 2 x 2' * |

Les filtrats marqués du symbole *, sont recueillis et dosés spectrophotométriquement. La densité optique mesurée à 362 nm (picrate de DIEA: $\epsilon_{\text{max}} = 15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) permet de calculer la charge par gramme de peptidyl-résine.

4- ELONGATION DE LA CHAÎNE PEPTIDIQUE

Toutes les synthèses réalisées au cours de ce travail ont été effectuées selon la stratégie Boc/TFA. Elle consiste en une succession de cycles de déprotection, neutralisation, couplage (suivant différentes procédures) avec des étapes de lavages intermédiaires. Après chaque cycle, un contrôle est effectué afin de confirmer le bon déroulement des opérations par un test de Kaiser ou Christensen.

Nous avons travaillé suivant le protocole:

| | | |
|---------------------|-----------------------------------|---------|
| déprotection | - CH ₂ Cl ₂ | 2 x 2' |
| | - TFA 50% dans | 1 x 2' |
| | CH ₂ Cl ₂ | 1 x 20' |
| | - CH ₂ Cl ₂ | 3 x 2' |

| | | |
|-----------------------|-----------------------------------|--------|
| neutralisation | - DIEA 5% dans | 3 x 2' |
| | CH ₂ Cl ₂ | |
| | - CH ₂ Cl ₂ | 3 x 2 |

test de Kaiser ou Christensen

couplage

| | | |
|---|-----------------------------------|--------|
| lavages après couplage | - DMF | 3 x 2' |
| | - CH ₂ Cl ₂ | 3 x 2' |

test de Kaiser ou Christensen

Si le test reste positif (ou douteux) après plusieurs couplages, les fonctions amines libres restantes seront acylées de façon permanente par acétylation selon le protocole suivant:

| | | |
|--------------------|--|---------|
| acétylation | - CH ₂ Cl ₂ | 2 x 2' |
| | - AcOAc 5% dans CH ₂ Cl ₂ contenant | 1 x 10' |
| | 2,5% DIEA | |
| | - CH ₂ Cl ₂ | 3 x 2' |

5- METHODES DE COUPLAGE DE L'ACIDE AMINE

Les couplages sont effectués généralement avec 2,5 équivalents de Boc-acide aminé et d'agent activateur de la fonction carboxylique par rapport à la charge de la résine.

5.1- Ester activé d'HOBt

Le Boc-acide aminé est introduit dans le réacteur contenant la résine. On ajoute une solution de DMF contenant 2,5 équivalents d'HOBt. Après une première agitation, de courte durée, une solution de DMF contenant 2,5 équivalents de DCC est ajoutée. Le volume de réaction peut être complété avec du CH₂Cl₂ ou du DMF afin d'avoir une agitation efficace tout en restant suffisamment concentré.

5.2- Anhydride symétrique

Une solution de 2,5 équivalents de DCC dans CH₂Cl₂, refroidie à 0°C, est ajoutée à une solution préalablement refroidie à 0°C

de 5 équivalents de Boc-acide aminé dans CH_2Cl_2 . Après 10 minutes d'incubation à 0°C , la dicyclohexylurée formée est éliminée par filtration, l'éluat est évaporé à sec et repris dans du DMF avant d'être introduit dans le réacteur.

5.3- BOP

2,5 équivalents de Boc-acide aminé et de BOP sont mis en solution dans CH_2Cl_2 , ou DMF, avec parfois présence de NMP ou DMSO. A cette solution, sont ajoutés 7,5 équivalents de DIEA. Après quelques minutes d'agitation l'ensemble est introduit dans le réacteur contenant la peptidyl-résine.

6- CONTROLES APRES DEPROTECTION OU APRES COUPLAGE

6.1- Mise en évidence des fonctions amines primaires

Test de Kaiser

A quelques milligrammes de peptidyl-résine sont ajoutées 3 gouttes des solutions suivantes:

- A: 80g de phénol dans 20 ml d'éthanol qualité UV.
- B: 2 ml d'une solution de KCN 0,001N dans 100 ml de pyridine bidistillée.
- C: 500 mg de ninhydrine dans 10 ml d'éthanol qualité UV.

Après incubation pendant 5 minutes à 110°C , l'observation de la coloration bleue des grains de résine et de la solution

indique la présence de fonctions amines primaires (le test est positif). Par contre, une solution restée jaune ainsi que des grains incolores témoignent de l'absence de fonctions amines réactives. (test négatif).

Le test doit être positif après déprotection et négatif après couplage.

6.2- Mise en évidence des fonctions amines secondaires

Test de Christensen

A quelques milligrammes de peptidyl-résine, sont ajoutés

- 200 μ l d'acétone.
- 50 μ l d'une solution saturée de 2,3,5,6-tétrachloro-1,benzoquinone (chloranil) dans le toluène.

Après agitation à température ambiante pendant 5 minutes, la coloration des grains de résine est observée. Elle doit être bleue-verte dans une solution restée jaune si des fonctions amines secondaires sont présentes (test positif). Par contre l'absence de coloration révèle la disparition des fonctions amines secondaires.

7- CLIVAGE DU PEPTIDE PAR LE FLUORURE D'HYDROGENE

- "HIGH HF"

Le clivage est réalisé dans une installation en téflon située sous une hotte ventilée.

Le fluorure d'hydrogène (HF) est distillé à partir d'une bouteille-réserve dans un premier réacteur mis sous vide et plongeant dans de l'azote liquide. Après liquéfaction par réchauffement, l'HF est distillé dans un second réacteur plongeant dans de l'azote liquide où se trouve la peptidyl-résine et les pièges à carbocations. 10 ml d'HF/ 1gr de peptidyl-résine/ 1 gr de para crésol/ 1 gr de diméthyl sulfure.

Après une heure d'agitation à 0°C, l'HF est évaporé sous vide, le mélange peptide résine est lavé sur fritté n°4 par de l'éther qui permet l'élimination du para crésol et des groupements protecteurs libérés. Le peptide est ensuite solubilisé dans des solutions aqueuses d'acide acétique à 5% puis à 50%.

Ces solutions sont congelées et lyophilisées.

Le principe du clivage par le fluorure d'hydrogène en appareil multiposte est identique. Seul le matériel change. A savoir que le premier réacteur d'HF peut contenir un volume important, et que l'appareil multiposte permet de réaliser 6 clivages peptide-résine, simultanément dans 6 réacteurs. La distillation du premier réacteur vers les 6 autres se fait de façon homogène. Nous n'avons pas observé de variation.

8- HYDROLYSE ACIDE TOTALE-ANALYSE D'ACIDES AMINES

8. 1- Hydrolyse en phase liquide

A 1 mg de peptide, placé dans un tube à hydrolyse, 1 ml d'acide chlorydrique 6N et quelques gouttes d'une solution de

phénol à 5% sont ajoutés. L'hydrolyse est effectuée sous vide à 110°C pendant 24 ou 72 heures suivant la séquence du peptide.

8.2- Hydrolyse sur résine

A 2 ou 3 mg de peptidyl-résine, dans un tube à hydrolyse, 1 ml d'acide chlorydrique 12N et 1 ml d'acide propionique sont ajoutés. La solution est dégazée par un rapide courant d'azote. Le tube est placé à 130°C pendant 2 heures s'il s'agit d'une résine chlorométhylée, ou 16 heures s'il s'agit d'une benzhydrylamine résine.

8. 3- Hydrolyse en phase gaz

Un micro-tube en pyrex préalablement pyrolisé contenant une solution de 10 à 20 nanomoles de peptide et 10 µl de phénol à 5% est mis à sec puis placés dans un dessiccateur dans lequel se trouve un becher contenant 2 ml d'HCl 6N et 140 µl d'acide thioglycolique. Le dessiccateur, sous vide, est placé dans une étuve chauffée à 110°C pendant 24 heures.

8. 4- Analyse d'acides aminés

Après hydrolyse acide totale, l'échantillon est analysé sur un appareil Beckman system 7300. Les acides aminés sont quantifiés après séparation sur une colonne échangeuse d'ions et détection post-colonne par coloration à la ninhydrine.

9- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les solutions de peptide sont déposées sur des couches mince de silice sur plaque d'aluminium.

Après migration dans un système de solvants approprié, les plaques sont révélées par un réactif à la ninhydrine (spécifique des fonctions amines primaires), puis par la technique de Reindel-Hoppe (révélateur des liaisons peptidiques)

9. 1- Révélation à la ninhydrine

Les plaques sont aspergées par une solution de:

- ninhydrine : 1 gr
- éthanol : 375 ml
- acide acétique: 75 ml
- collidine : 15 ml

puis chauffées une minute à l'étuve à 110°C.

9. 2- Révélation par le réactif de Reindel-Hoppe (Von Arx, 1976)

Après décoloration par l'hypochlorite de sodium à 8% et acidification par une solution d'acide acétique à 20% dans l'eau, les plaques sont séchées une minute à 110°C puis révélées par un mélange à volume égal des solutions suivantes:

- 25 gr de tétraméthyl-diaminodiphénylméthane dans 500 ml d'acide acétique à 20%
- 5 gr d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau

10- SYNTHÈSE DE BOC-AMINO-ACIDES

30 mmoles d'acide aminé non protégé sont dissoutes dans 30 ml de KHCO_3 1 N et 35 ml d'alcool tertibutylique. A cette solution, sont ajoutés 2,5 excès de N terbutyl dicarbonate. Le pH est ajusté entre 8 et 9 au moyen d'une solution de Na_2CO_3 1 N dans les premières heures de réaction. La cinétique de couplage se contrôle par chromatographie sur couche mince.

Une fois la réaction terminée, l'alcool tertibutylique est évaporé sous vide. La phase aqueuse est acidifiée par une solution d'HCl 1N. Le Boc-amino-acide est extrait par de l'acétate d'éthyle (AcOEt). La phase organique est lavée par de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis concentrée à sec. Une huile est obtenue.

Soit le produit cristallise sous cette forme, soit après formation de son sel de dicyclohexylamine (DCHA).

Pour former le sel de DCHA, l'huile est remise en solution dans de l'éther, à laquelle est ajoutée 1,2 excès de dicyclohexylamine. Après 5 mn d'agitation, le produit cristallise de lui-même, il est lavé sur fritté avec du pentane.

11- COUPLAGE DE PEPTIDE SUR UNE PROTEINE PORTEUSE

Les protéines employées de façon courante au laboratoire sont: la sérum albumine bovine (BSA), l'anatoxine tétanique (TT), l'ovalbumine (OVA) et l'hémocyanine de patelle (KLH).

Avant couplage ou activation de la protéine, il convient de les mettre en solution dans un tampon adapté. Pour la BSA et l'OVA, que l'on dispose sous forme lyophilisée il n'y a qu'à les

solubiliser dans ce tampon. Pour la TT et KLH, commercialisés en solution, il faut les dialyser préalablement contre le tampon de couplage. Dans ce dernier cas, il faudra ensuite réaliser un dosage de protéine selon la méthode de Folin afin de déterminer la quantité de protéine obtenue.

11. 1- Couplage par le glutaraldéhyde

Cette réaction, qui met en jeu les fonctions amines du peptide à coupler ainsi que celles de la protéine, est réalisée avec 3 meq amine de peptide pour 1 meq amine de la protéine. En règle générale, on considère que les différentes protéines utilisées possèdent 250 nmoles de fonctions amines par mg.

La protéine et le peptide sont mis en solution dans un tampon pH 8-9 avant addition du glutaraldéhyde en solution aqueuse à 2,5%.

Le glutaraldéhyde est additionnée en plusieurs fois, sur une période de 2 à 3 jours, et correspond à 2 fois le nombre de meq amine mis en jeu par le peptide. La réaction se fait à l'abri de la lumière.

Le mélange est ensuite dialysé par ultrafiltration contre du sérum physiologique afin d'éliminer les sels et réactifs (peptide ou glutaraldéhyde) n'ayant pas réagi. La quantification du peptide couplé sur la protéine est faite par comparaison des analys d'acides aminés du conjugué et de la protéine de départ.

11. 2- Couplage au moyen d'une carbodiimide hydro-soluble

Cette réaction qui met en jeu les fonctions carboxyliques du peptide à coupler et les fonctions amines de la protéine est réalisée avec 3 meq carboxylique de peptide pour 1 meq amine de la protéine. La carbodiimide est ajoutée en excès de 3 par rapport au peptide.

La carbodiimide que nous avons utilisée est le chlorure de la (N(3diméthylaminopropyl)-N'-éthyl)carbodiimide.

Le peptide et la protéine sont mis en contact dans un tampon phosphate 0,1M pH 5,6 puis la carbodiimide solubilisée dans ce même tampon est ajoutée en une fois. Après une nuit à température ambiante sous agitation à l'abri de la lumière, le mélange est dialysé par ultrafiltration contre du sérum physiologique. La quantification du peptide couplé sur la protéine est faite par comparaison des analyses d'acides aminés du conjugué et de la protéine de départ.

11. 3- Couplage au moyen d'un agent hétérobifonctionnel

Cette méthode permet le greffage du peptide par un seul point d'ancrage sur la protéine. Avec l'acide maléimidocaproïque couplé sur la protéine par sa fonction carboxylique, il sera ensuite possible d'y greffer un peptide possédant dans sa séquence une fonction thiol. Cette technique se fait en 2 étapes: couplage de l'acide maléimidocaproïque après activation sur la protéine, puis couplage du peptide contenant un résidu cystéine réduit sur la protéine "activée".

11. 3. 1- Couplage de l'acide maléimidocaproïque
après activation sur la protéine

*Activation de l'acide maléimidocaproïque au moyen
de l'hydroxysuccinimide*

Les différents réactifs sont ajoutés dans des proportions équimoléculaires

L'acide maléimidocaproïque et l'hydroxysuccinimide sont dissouts dans du DMF, la dicyclocarbodiimide est également dissoute dans du DMF mais séparément. Les 2 solutions sont placées à 0°C pendant 10 mn.

Elles sont ensuite réunies, maintenues à 0°C durant 2 heures puis une nuit à température ambiante sous agitation. Avant son addition à la protéine, l'urée formée est éliminée par centrifugation ou simple filtration sur laine de verre.

*Activation de l'acide maléimidocaproïque au moyen du
BOP*

Cette méthode nécessite la préactivation de l'acide maléimidocaproïque dans le DMF au moyen du BOP en présence de DIEA. BOP, DIEA et l'acide maléimidocaproïque sont solubilisés en proportions équimoléculaires dans le DMF. L'activation est faite pendant 10 mn à température ambiante.

L'acide maléimidocaproïque activé est ensuite ajouté à la protéine mise en solution dans un mélange tampon phosphate 0,1 M

pH 7/ DMF, de façon à obtenir une concentration finale en DMF d'environ 20%.

L'acide maléimidocaproïque est introduit en excès de 5 par rapport au nombre de fonctions amines accessibles sur la protéine.

Le temps de couplage est généralement de 12 H.

Le mélange est dialysé par ultrafiltration contre du tampon phosphate 0,1 M pH 7 pour éliminer l'excès de réactif.

La quantité de protéine récupérée est évaluée par un dosage de Folin.

La capacité de fixation des résidus cystéine par la protéine peut être évaluée par un dosage d'Ellman.

11. 3. 2- Couplage du peptide sur la protéine "activée"

Le peptide est utilisé en excès de 3 par rapport à la charge de la protéine. La réaction de couplage se déroule à pH 7, une nuit à température ambiante. L'excès de peptide est éliminé par ultrafiltration contre du sérum physiologique.

Avant couplage le peptide est préalablement réduit soit au moyen du dithiothréitol puis gelfiltré, soit par réduction au moyen de la tributyl phosphine.

La quantification du peptide couplé sur la protéine est faite par comparaison des analyses d'acides aminés du conjugué et de la protéine de départ.

12- DOSAGE DE PROTEINE (FOLIN). (Lowry, 1951)

L'étalon est constitué d'une solution de BSA à 1 mg/ml.

Les concentrations de la gamme étalon sont, 10, 25, 50, 75, 100 µg.

Chaque point de la gamme étalon, chacun des échantillons et le "blanc" sont amenés à un volume de 1 ml avec de l'eau distillée.

A ces solutions sont ajoutés 3 ml d'une solution composée de 50 ml de solution B et 1 ml de solution A.

Solution A: - CuSO₄ 100 mg
 - H₂SO₄ 1 goutte
 - Eau distillée qsp 100 ml

Solution B: - Na₂CO₃ anhydride 2 gr
 - Tartrate Na et K 20 mg
 - NaOH 0,1 N qsp 100 ml

Après 10 mn, 0,3 ml d'une solution diluée au 1/2 du réactif de Folin est ajouté. Après 30 mn à l'obscurité, l'absorbance est lue spectrophotométriquement à $\lambda=750\text{nm}$.

13- DOSAGE DES THIOLS LIBRES (METHODE D'ELLMAN)

Cette méthode permet de vérifier la réduction du peptide, ou le dosage de la consommation de cystéine par la protéine "activée".

L'étalon est constitué d'une solution de chlorhydrate de cystéine $2 \cdot 10^{-3}$ M préparée extemporanément avec de l'eau dégazée et saturée en azote (35,04 mg/100ml).

Les points de la gamme étalon se situent entre 0 et 200 nmoles de cystéine-SH pour un volume de 100 μ l.

Pour évaluer la consommation de cystéine par la protéine activée, 200 nmoles de cystéine-SH sont ajoutées à 250 nmoles de protéine activée.

A chaque échantillon à doser et aux points de la gamme étalon sont ajoutés:

-300 μ l de tampon Tris 0,2 M pH 8,2 (24,2 gr/ l de Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane ajusté au pH 8,2 par HCl 1 N)

-20 μ l d'une solution d'acide dithio-5,5' bis (nitro-2 benzoïque) (79,2 mg/20 ml d'éthanol)

-méthanol qsp 2 ml

Après 30 mn, la densité optique est lue au spectrophotomètre à 412 nm. La différence de densité optique entre le point à 200 nmoles de la gamme étalon et l'échantillon de la protéine activée permet de calculer la consommation de cystéine et donc le nombre de résidus maléimidocaproïques réactifs par ml de solution de protéine "activée".

B- SYNTHESSES

1- SYNTHESSES DE BOC-AMINO-ACIDES

1. 1- Boc- β Ala-OH

La réaction est réalisée sur 33,7 mmoles de β Ala-OH en présence de 84,25 mmoles de N terbutyl carbonate. Après une nuit sous agitation, le produit est extrait et cristallisé sous forme Boc- β Ala-OH.

CCM: CHCl₃-AcOH 95-5. Rf: 0,3. Pf: 81. Rdt:66%. PM: 189.

1. 2- (Boc)₂-Lys,DCHA

La réaction est réalisée sur 72,6 mmoles de lysine monochlorohydrate en présence de 363 mmoles de N terbutyl carbonate. Après une nuit sous agitation, le produit est extrait et cristallisé sous forme de son sel de DCHA.

CCM: CHCl₃-AcOH 95-5. Rf: 0,4. Pf: 133-134. Rdt: 91%. PM: 526.

1. 3- Boc-D-Phg,DCHA

La réaction est réalisée sur 20 mmoles de Phénylglycine en présence de 50 mmoles de N terbutyl carbonate. Après une nuit sous agitation, le produit est extrait et cristallisé sous forme de son sel de DCHA.

CCM: CHCl₃-MeOH 2-1. Rf: 0,55. Pf: 159-160 . Rdt: 62%. PM: 430.

2- SYNTHESSES DES ANALOGUES DE Arg-Gly-Asp-Ser

2. 1- Obtention des sachets

Le tissu utilisé pour la fabrication des sachets devait répondre à certaines exigences.

-solidité et possibilité de soudures étanches.

-résistance aux divers solvants utilisés pendant la synthèse tels que TFA, chlorure de méthylène et DMF.

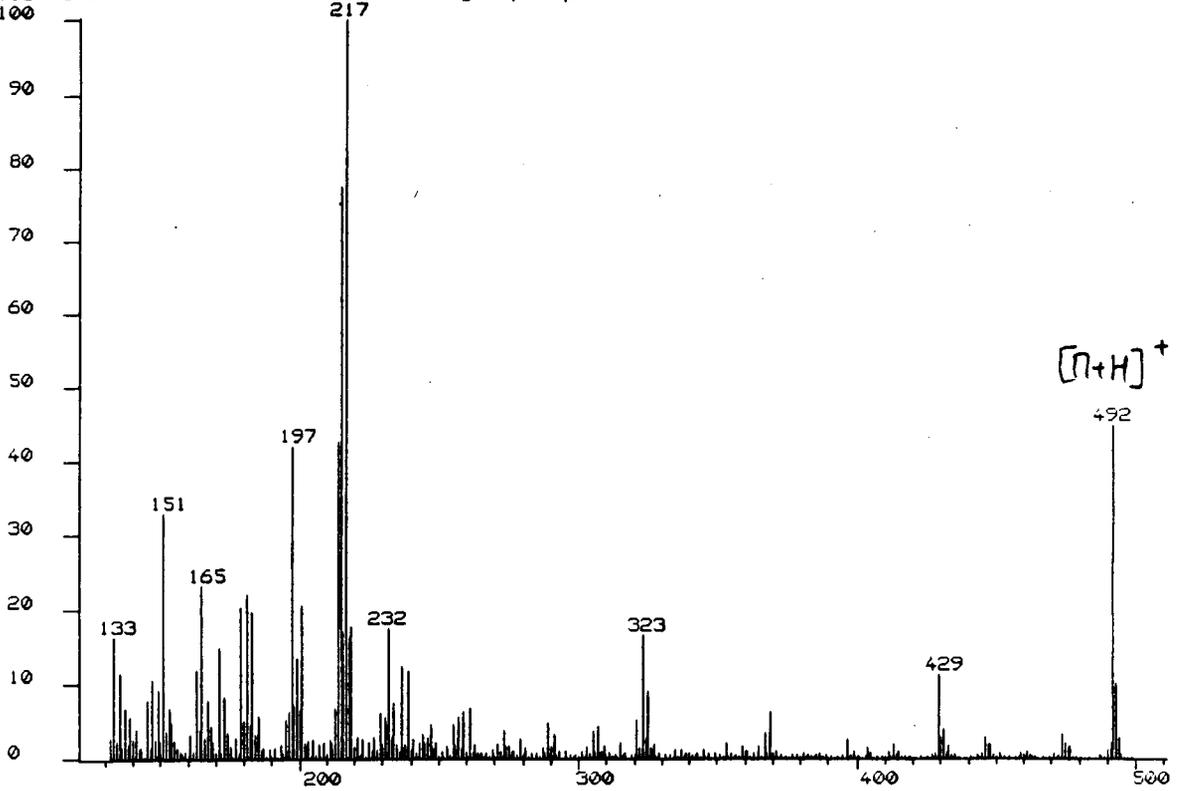
Le polypropylène répondait à toutes ces conditions. Nous nous sommes alors procurés du tissu en polypropylène à ouverture de maille de 45 μ m et 30 μ m.

Le tissu d'ouverture de maille de 45 μ m a été utilisé pour contenir la résine de forte granulométrie 100-200 mesh, celui de 30 μ m pour la résine classiquement utilisée de 200-400 mesh.

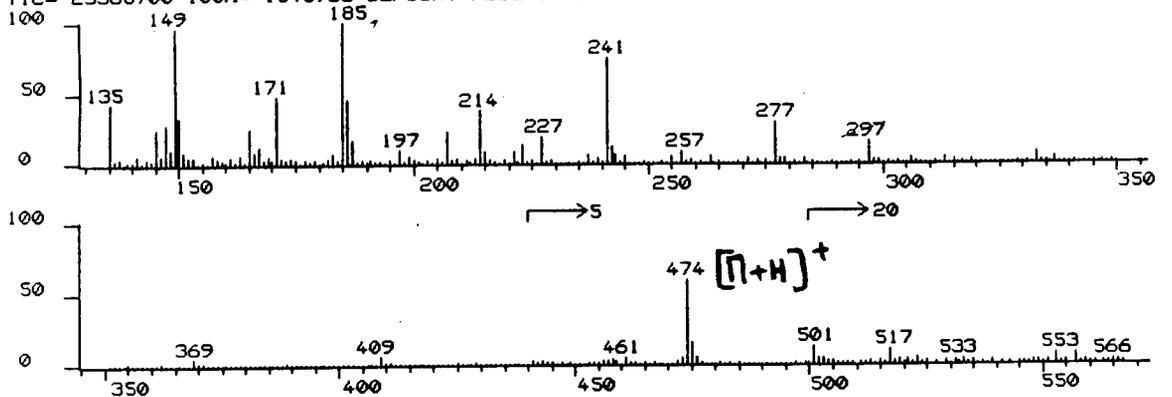
Dans le cas de la synthèse des Arg-Gly-Asp-Xxx, nous avons utilisé les 20 résines portants Xxx préparées au laboratoire à partir d'une résine chlorométhylée de granulométrie 200-400 mesh. Nous avons donc utilisé le tissu d'ouverture de maille de 30 μ m.

Dans le cas de la synthèse des Arg-Xxx-Asp-Ser, nous avons fonctionnalisé une résine de 100-200 mesh avec de la Boc-Ser(Bzl). Elle a ensuite été répartie dans le tissu d'ouverture de maille de 45 μ m.

DS90 10JAN0019.3 RT= 01:03 +FAB LRP 10-Jan-89 17:12
TIC= 58840060 !00%= 1840128 RDDS (Arg-Asp-Asp-Ser) m/z 491 DEFOORT J P



DS90 14NOV0007.6 RT= 01:05 +FAB LRP 14-Nov-89 15:18
TIC= 23368700 !00%= 1548736 DEFOORT RDDS IMPURETES M473 G/TF2/EAU +VE



Spectre de masse FAB du peptide Arg-Asp-Asp-Ser
sous forme aspartimide

2. 2- Série Arg-Xxx-Asp-Ser

2. 2. 1- Synthèses

Ces peptides ont été réalisés selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 9 gr de Boc-Ser peptidyl-résine chargée à 1 meq/gr.

Après déprotection, 2 excès de Boc-Asp(OcHx) sont couplés pendant 120 mn par la méthode à l'ester activé d'HOBt.

Cette résine a ensuite été fractionnée en 17 parts de 600 mg (soit 0,5 meq) et mise en sachets. Les couplages suivants ont été réalisés avec un excès de 3 en acide aminé à incorporer par la méthode à l'ester activé d'HOBt. Un couplage de 12 heures est effectué, systématiquement suivi d'un recouplage de 4 heures.

Le troisième acide aminé a été couplé séparément sur les résines contenues dans les sachets. L'ester activé de chaque acide aminé est réalisé *in situ* sauf pour les résidus Arginine, Asparagine et Glutamine qui sont préincubés à 0°C.

Après un lavage individuel grossier, les sachets sont réunis et les peptidyl-résines lavées de façon plus approfondie.

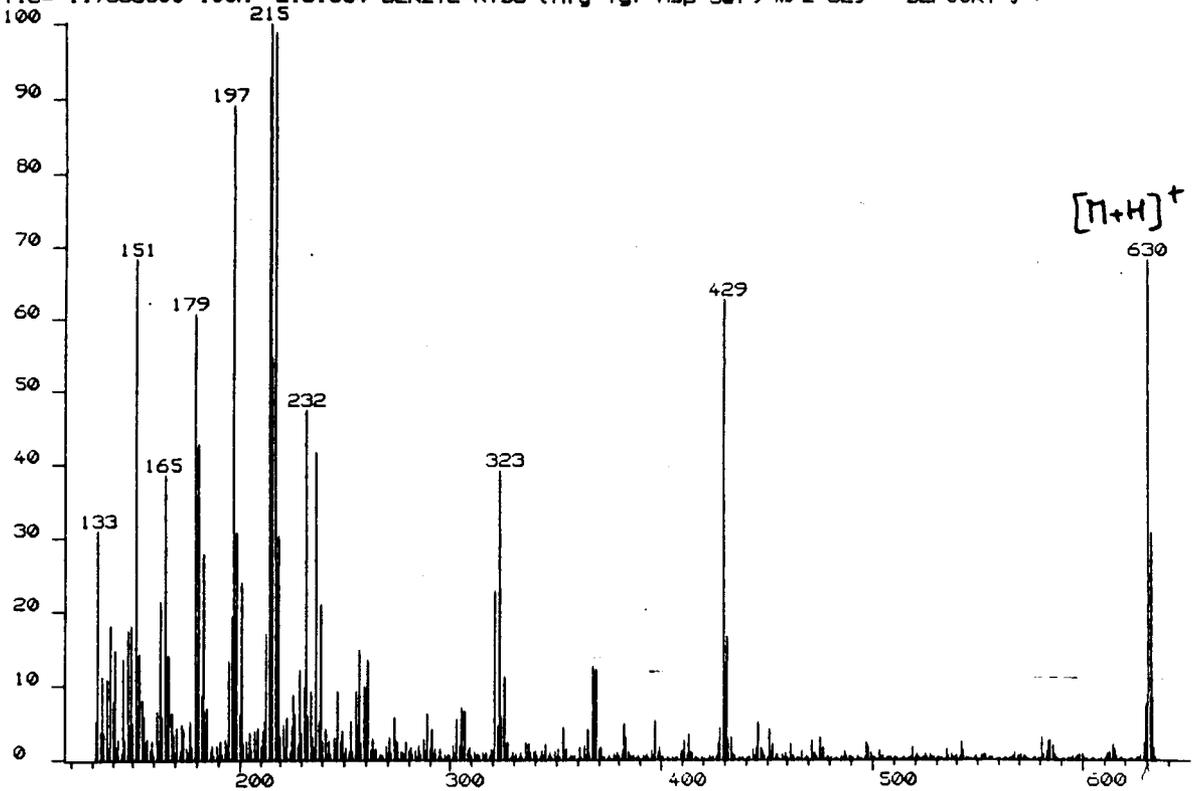
Le quatrième acide aminé, la Boc(Tos)Arginine, est couplé sur tous les sachets réunis dans un même réacteur, après préactivation à 0°C

Deux couplages de 12 et 4 heures sont réalisés.

2. 2. 2- Clivage par le fluorure d'hydrogène dans un appareil multiposte

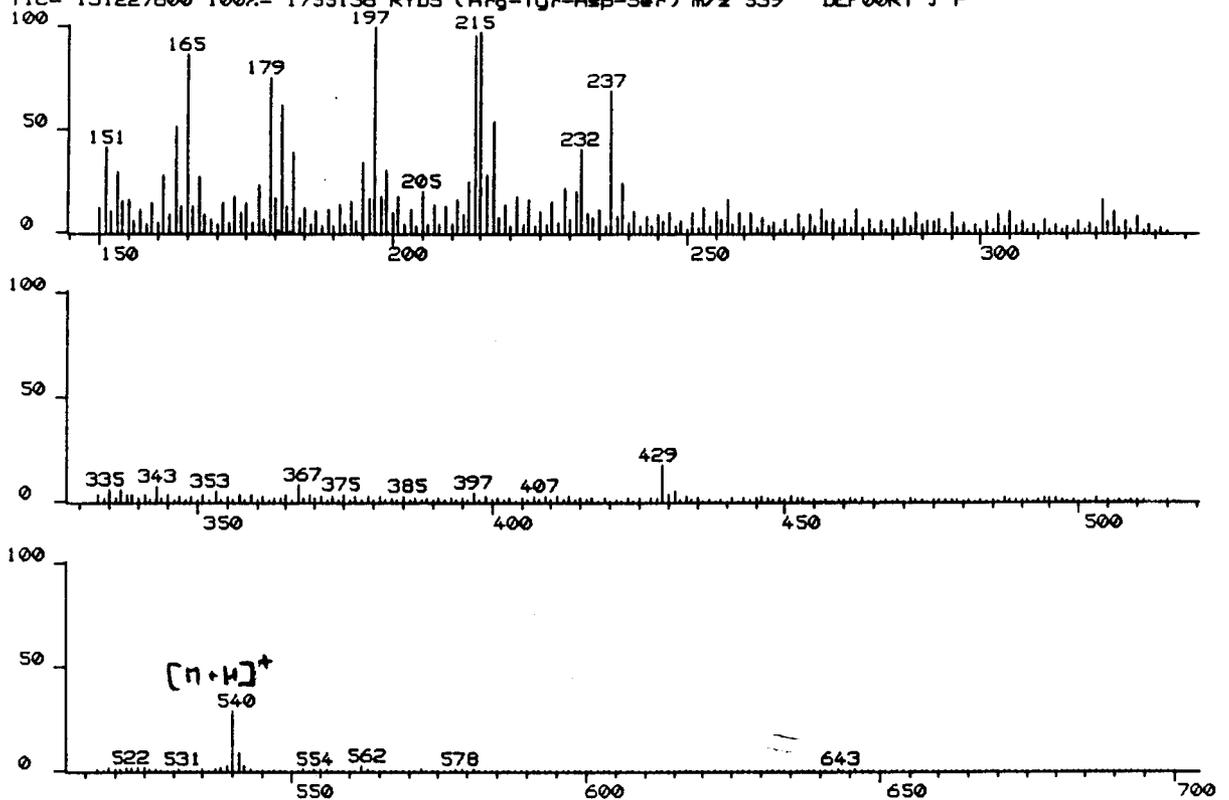
Déprotection préalable du Dnp du peptide à histidine.

DS90 10JAN0018.4 RT= 01:33 +FAB LRP 10-Jan-89 16:52
TIC= 117366800 100%= 2131584 BENZYL-RYDS (Arg-Tyr-Asp-Ser) m/z 629 DEF00RT J P



Spectre de masse FAB de l'impureté
du peptide Arg-Tyr-Asp-Ser

DS90 10JAN0017.9 RT= 04:08 +FAB LRP 10-Jan-89 16:26
TIC= 131227600 100%= 1755136 RYDS (Arg-Tyr-Asp-Ser) m/z 539 DEF00RT J P



Spectre de masse FAB du peptide Arg-Tyr-Asp-Ser

Du diméthyl sulfure a été ajouté dans les réacteurs pour les peptides contenant des résidus tryptophane et méthionine.

| Arg-Xxx-Asp-Ser | PM | Pureté | Rendement |
|-----------------|-----|--------|-----------|
| Ala | 447 | 90,3% | 83% |
| Cys | 651 | 72,9% | 63% |
| Asp | 491 | 27,0% | 71% |
| Glu | 505 | 48,2% | 68% |
| Phe | 523 | 87,0% | |
| Gly | 433 | 97,6% | |
| His | 513 | 74,9% | 100% |
| Ile | 489 | 77,1% | 100% |
| Lys | 504 | 78,3% | 75% |
| Leu | 489 | 76,9% | 95% |
| Met | 507 | 44,5% | 81% |
| Asn | 490 | 68,7% | 58% |
| Pro | 473 | 83,0% | 81% |
| Gln | 504 | 79,3% | 73% |
| Arg | 532 | 82,9% | 98% |
| Ser | 463 | 66,2% | 100% |
| Thr | 477 | 92,4% | 68% |
| Val | 475 | 80,0% | 63% |
| Trp | 562 | 81,0% | 99% |
| Tyr | 539 | 43,0% | 86% |

2. 2. 3- Purifications

Compte tenu des hydrophilies relatives des peptides et du crésol (nos peptides étant très peu retenus sur la phase de silice greffée en C 18 comparativement au crésol), nous avons pu faire des HPLC phase inverse préparatives en "séries". Une fois sur deux seulement, nous avons effectué le lavage de la colonne pour éliminer le crésol sans contamination du second peptide par le précédent.

2. 2. 4- Hydrolyses acide totale suivies de
l'analyse d'acides aminés quantitatives

Les produits lyophilisés sont remis en solution dans l'eau. Ces solutions sont ensuite dosées de façon quantitative par hydrolyse acide totale en phase gaz. A partir de ces solutions "mères", nous avons pu préparer des solutions à 1 μ moles/ml qui ont été analysées quantitativement.

Résultats des analyses d'acides aminés:

| | Arg | Xxx | Asp | Ser |
|-----|------|------|------|------|
| Ala | 1,08 | 1,00 | 1,00 | 0,84 |
| Cys | 0,95 | | 1,00 | 0,87 |
| Asp | 1,02 | 1,00 | 1,00 | 0,84 |
| Glu | 1,02 | 1,03 | 1,00 | 0,91 |
| Phe | 1,03 | 1,02 | 1,00 | 0,81 |
| GLy | 1,01 | 0,98 | 1,00 | 0,82 |
| His | 0,99 | 0,93 | 1,00 | 0,79 |
| Ile | 0,89 | 0,86 | 1,00 | 0,85 |
| Lys | 0,99 | 1,02 | 1,00 | 0,88 |
| Leu | 0,94 | 0,95 | 1,00 | 0,85 |
| Met | 0,97 | 0,72 | 1,00 | 0,90 |
| Asn | 1,14 | 1,00 | 1,00 | 0,94 |
| Pro | 1,04 | 0,98 | 1,00 | 0,83 |
| Gln | 1,03 | 0,94 | 1,00 | 0,82 |
| Arg | 2,02 | | 1,00 | 0,85 |
| Ser | 1,00 | | 1,00 | 1,69 |
| Thr | 1,03 | 0,95 | 1,00 | 0,86 |
| Val | 0,97 | 0,91 | 1,00 | 0,84 |
| Trp | 0,99 | | 1,00 | 0,84 |
| Tyr | 0,92 | 0,88 | 1,00 | 0,86 |

2. 2. 5- Autres synthèses de Arg-Asp-Asp-Ser

2. 2. 5. 1- Synthèses avec des esters benzyliques
comme protection des résidus acides aspartiques

La synthèse a été réalisée selon la stratégie Boc/TFA à partir de 0,4 gr de résine chlorométhylée fonctionnalisée par la Boc(Bzl)Ser chargée à 1 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| BocAsp(OBzl) | DCC/HOBt | 60 mn |
| BocAsp(OBzl) | DCC/HOBt | 60 mn |
| BocArg(Tos) | DCC/HOBt | 60 mn |

Le clivage le fluorure d'hydrogène a été réalisé selon le protocole de "Low and High HF". 400 mg de résine ont été mis en présence de 6,5 ml de diméthyl sulfure, 2,5 ml d'HF et 1 gr de p-crésol pendant 2 heures à 0°C. Après élimination du diméthyl sulfure par évaporation à sec, la résine et le p-crésol sont mis en présence de 10 ml d'HF et traités 1 heure à 0°C. Le peptide brut est ensuite précipité par de l'éther, extrait avec une solution d'acide acétique à 5% dans l'eau puis lyophilisé.

2. 2. 5. 2- Synthèses avec des esters de cyclohexyles comme protection des résidus acides aspartiques.

La synthèse a été réalisée selon la stratégie Boc/TFA à partir de 0,4 gr de résine chlorométhylée fonctionnalisée par la Boc(Bzl)Ser chargée à 1 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| BocAsp(OcHx) | BOP | 60 mn |
| BocAsp(OcHx) | BOP | 60 mn |
| BocArg(Tos) | BOP | 60 mn |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 166 mg de résine en présence de 500 mg de crésol et 6 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 40 mg de peptide brut dans la fraction AcOH 5%.

2. 3- Série Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser

2. 3. 1- Synthèses

La modification n'intervenant que sur le dernier acide aminé, nous n'avons pas eu besoin de mettre la résine en sachet.

La synthèse a été réalisée selon la stratégie Boc/TFA à partir de 10 gr de résine chlorométhylée fonctionnalisée par la Boc(Bzl)Ser chargée à 1 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| BocAsp(OcHx) | DCC/HOBt | 120 mn |
| Boc-Gly | DCC/HOBt | 30 mn |
| BocArg(Tos) | DCC/HOBt | 30, 30 mn |

La résine a ensuite été fractionnée en 20 parts et mise dans des erlens pour le couplage de Xxx. Le couplage a été réalisé avec un excès de 2.

2. 3. 2- Clivage par le fluorure d'hydrogène dans un appareil multiposte

Déprotection préalable du Dnp du peptide à histidine et du Boc du peptide à méthionine et tryptophane.

Du diméthyl sulfure a été ajouté dans les réacteurs pour les peptides contenant des résidus tryptophane et méthionine.

| Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser | PM | Pureté | Rendement |
|---------------------|-----|--------|-----------|
| Ala | 504 | 86,0% | 78% |
| Cys | 709 | 86,7% | 83% |
| Asp | 548 | 78,5% | 84% |
| Glu | 562 | 87,6% | 82% |
| Phe | 580 | 87,7% | 68% |
| Gly | 490 | 87,8% | 68% |
| His | 570 | 89,1% | 100% |
| Ile | 546 | 80,6% | 71% |
| Lys | 561 | 85,8% | 100% |
| Leu | 546 | 84,0% | 39% |
| Met | 564 | 88,1% | 94% |
| Asn | 547 | 63,3% | 46% |
| Pro | 530 | 90,2% | 93% |
| Gln | 561 | 66,2% | 78% |
| Arg | 589 | 89,1% | 73% |
| Ser | 520 | 90,3% | 87% |
| Thr | 534 | 88,4% | 75% |
| Val | 532 | 80,1% | 100% |
| Trp | 619 | 93,2% | 100% |
| Tyr | 596 | 80,7% | 70% |

Les purifications et les analyses quantitatives d'acides aminés après hydrolyse acide totale ont été réalisées de façon similaire à la série Arg-Xxx-Asp-Ser.

Les produits lyophilisés sont remis en solution dans l'eau. Ces solutions sont ensuite dosées de façon quantitative par hydrolyse acide totale en phase gaz. A partir de ces solutions "mères", nous avons pu préparer des solutions à 1 μ moles/ml qui ont été analysées quantitativement.

Résultats des analyses d'acides aminés:

| | Xxx | Arg | Gly | Asp | Ser |
|-----|------|------|------|------|------|
| Ala | 1,00 | 1,06 | 1,00 | 1,00 | 0,75 |
| Cys | | 0,99 | 0,99 | 1,00 | 0,76 |
| Asp | 2,00 | 1,02 | 1,00 | | 0,71 |
| Glu | 0,95 | 1,03 | 1,05 | 0,97 | 0,80 |
| Phe | 1,00 | 1,02 | 1,02 | 1,00 | 0,74 |
| Gly | 1,92 | 1,03 | | 1,00 | 0,72 |
| His | 0,99 | 1,02 | 1,03 | 1,00 | 0,76 |
| Ile | 0,65 | 0,68 | 0,96 | 1,00 | 0,71 |
| Lys | 1,00 | 1,03 | 1,02 | 1,00 | 0,75 |
| Leu | 1,02 | 1,03 | 1,01 | 1,00 | 0,76 |
| Met | 0,92 | 1,03 | 1,02 | 1,00 | 0,74 |
| Asn | 1,72 | 1,02 | 1,00 | | 0,71 |
| Pro | 1,10 | 1,04 | 1,02 | 1,00 | 0,70 |
| Gln | 1,01 | 1,04 | 1,01 | 1,00 | 0,73 |
| Arg | 2,00 | | 0,99 | 1,00 | 0,75 |
| Ser | 1,34 | 1,06 | 1,01 | 1,00 | |
| Thr | 1,05 | 1,05 | 1,00 | 1,00 | 0,79 |
| Val | 0,72 | 0,78 | 1,01 | 1,00 | 0,72 |
| Trp | | 0,98 | 0,98 | 1,00 | 0,71 |
| Tyr | 1,04 | 0,95 | 0,98 | 1,00 | 0,72 |

2. 4- Série Arg-Gly-Asp-Xxx

2. 4. 1- Synthèses

Dans ce cas, les 20 résines ont été mises tout de suite en sachets, les couplages suivants étant communs à tous les peptides. Dans chaque sachet est disposée une quantité de résine correspondante à 0,3 mmole. Les couplages et recouplages de 12 et 4 heures sont réalisés avec un excès de 3. Les déprotections sont effectuées avec du TFA 40% dans le CH₂Cl₂ en présence de 2% d'éthane dithiol.

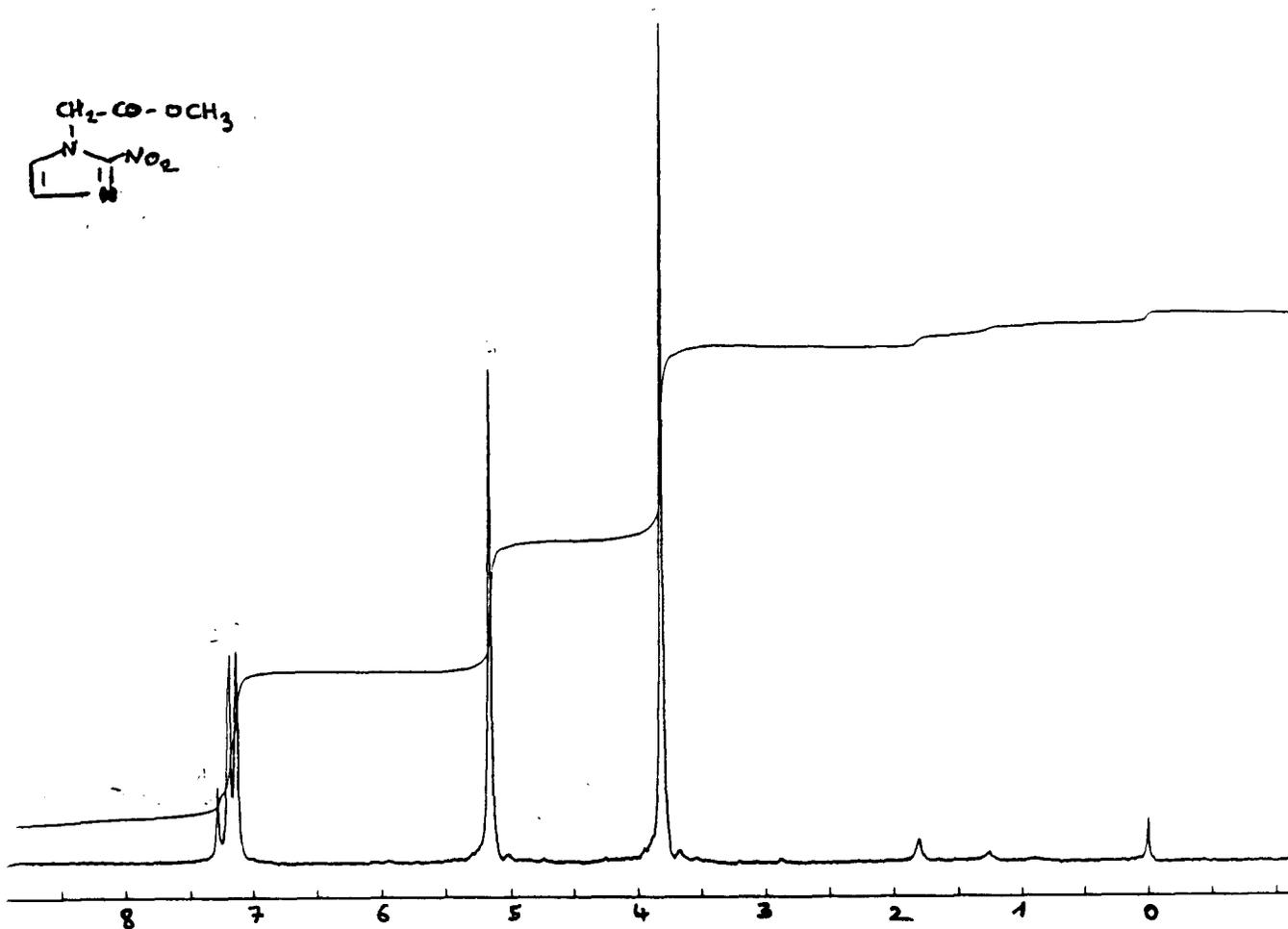
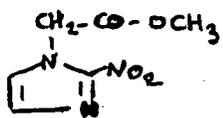
Les clivages par le fluorure d'hydrogène et les analyses d'acides aminés quantitatives après hydrolyse acide totale ont été réalisés de façons identiques aux **Arg-Xxx-Asp-Ser** et **Xxx-Arg-Gly-Asp-Ser**. Les contrôles après coupure n'ont été

réalisés qu'en couche mince (l'injecteur automatique ne fonctionnait plus à ce moment).

| Arg-Gly-Asp-Xxx | PM | Rendement |
|-----------------|-----|-----------|
| Ala | 417 | 100% |
| Cys | 521 | 94% |
| Asp | | 51% |
| Glu | 475 | 92% |
| Phe | 493 | 100% |
| Gly | 403 | 100% |
| His | 483 | |
| Ile | 459 | 100% |
| Lys | 474 | 69% |
| Leu | 459 | 74% |
| Met | 477 | 100% |
| Asn | 460 | 78% |
| Pro | 443 | |
| Gln | 474 | |
| Arg | 502 | 76% |
| Thr | 447 | |
| Val | 445 | 96% |
| Trp | 532 | 100% |
| Tyr | 509 | 97% |

Résultats analyses d'acides aminés:

| | Arg | Gly | Asp | Xxx |
|-----|------|------|------|------|
| Ala | 1,10 | 1,04 | 1,00 | 0,99 |
| Cys | 1,12 | 1,08 | 1,00 | |
| Asp | 0,87 | 0,85 | 2,14 | |
| Glu | 1,12 | 1,00 | 0,81 | 1,07 |
| Phe | 1,07 | 1,00 | 0,95 | 0,98 |
| Gly | 1,06 | 2,00 | 0,94 | |
| His | 1,05 | 1,02 | 0,99 | 0,94 |
| Ile | 1,06 | 0,99 | 0,95 | 1,00 |
| Lys | 1,03 | 1,00 | 0,96 | 1,01 |
| Leu | 1,06 | 1,00 | 0,94 | 1,00 |
| Met | 1,04 | 1,01 | 0,96 | 0,51 |
| Asn | 1,12 | 1,05 | 1,83 | |
| Pro | 0,96 | 1,05 | 1,04 | 0,95 |
| Gln | 1,05 | 0,97 | 0,98 | 1,00 |
| Arg | 2,07 | 1,00 | 0,93 | |
| Thr | 1,06 | 0,99 | 0,95 | 0,78 |
| Val | 1,05 | 1,01 | 0,96 | 0,97 |
| Trp | 1,16 | 1,11 | 0,73 | |
| Tyr | 1,06 | 1,00 | 0,94 | 0,97 |



Spectre RMN de l'ester méthylique de l'acide (nitro-2 imidazolyl) acétique

3- SYNTHÈSES DES PEPTIDYL-DROGUES

3. 1- Nitro-2 imidazolyl peptides3. 1. 1- Synthèse de l'ester méthylique de l'acide
(nitro-2 imidazolyl) acétique

200 mg (1,76 mmoles) de nitro-2 imidazole sont mis en suspension dans 1 ml de DMF. Une solution concentrée de méthylate de sodium est ajoutée jusqu'à obtention d'une coloration orangée (indication de la transformation complète du nitro-2 imidazole en sous sel de sodium). L'addition de nitro-2 imidazole permet d'éliminer l'excédent de méthylate de sodium).

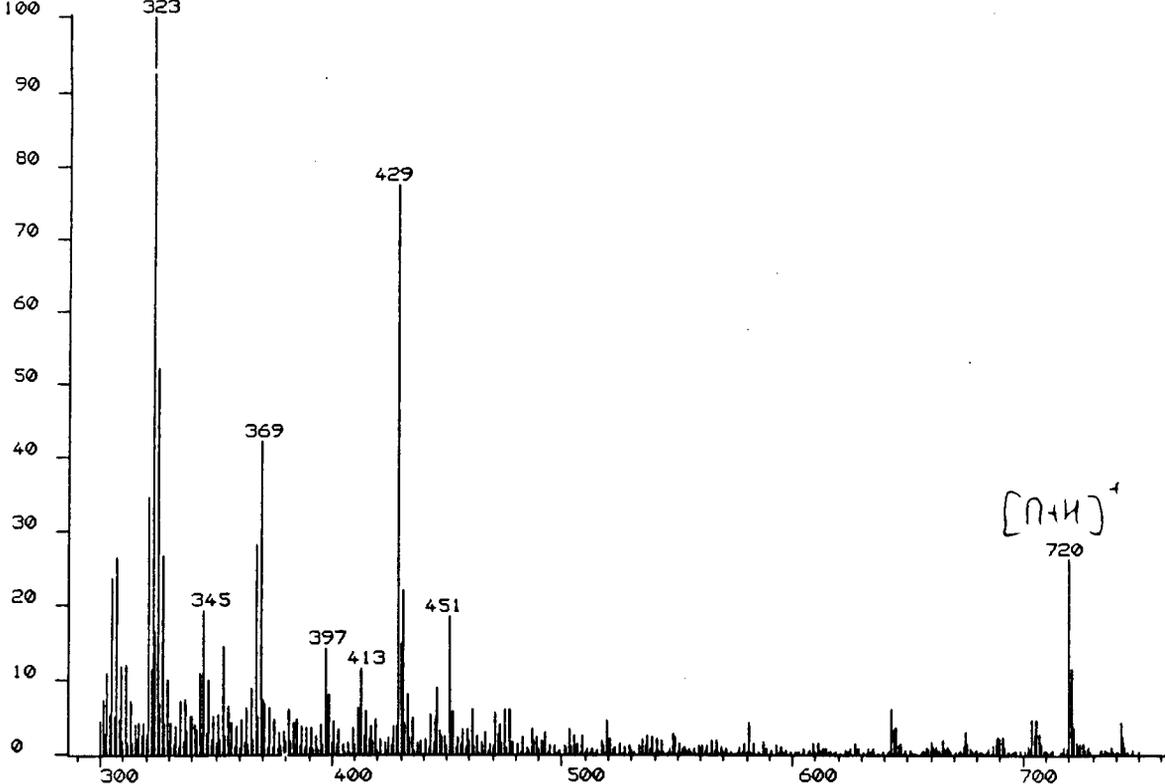
Un chauffage à 110°C permet d'éliminer le méthanol en excès. La solution est refroidie et 291 μ l (3,08 mmoles) de méthylbromacétate sont additionnés. Le mélange est de nouveau porté à 105-110°C pendant 45 mn. Ensuite, la solution est concentrée à sec, reprise par une solution aqueuse pH 1,5 et extraite par du CHCl_3 . La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée à sec.

309 mg d'ester méthylique de l'acide (nitro-2 imidazolyl) acétique sont obtenus.

CCM: AcOEt. Rf: 0,55. Rdt: 94%. Pf: 92-94°C. PM: 185.

δ (ppm) = 3,81 (-CH₃), 5,16 (-CH₂-), 7,16 (-CH=CH-).

DS90 10JAN0021.7 RT= 03:06 +FAB LRP 10-Jan-89 18:23
TIC= 76382210 100%= 297520 2 nitroimidazole-phenylglycine-RGDS m/z 718 DEFOORT J P
100



Spectre de masse FAB du peptide
nitro-2 I^m DPhg-Arg-Gly-Asp-Ser

3. 1. 2- Synthèse de l'acide (nitro-2 imidazolyl) acétique

309 mg de l'ester méthylique de l'acide (nitro-2 imidazolyl) acétique sont mis en contact de 6 ml d'une solution aqueuse de NaOH 0,1N et chauffés à reflux pendant 20 mn.

La cinétique de la réaction est suivie par CCM. Après refroidissement, le pH est diminué à 1,5 avec de l'acide chlorhydrique (50 μ l d'HCl 12N dans 1,95 ml d'eau). Après extraction par l'acétate d'éthyle, la phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et concentrée à sec.

205 mg d'acide (nitro-2 imidazolyl) acétique sont obtenus.

Rdt: 72%. Pf: à 154°C le produit se décompose violemment.
PM: 171.

3. 1. 3- Synthèses des nitro-2 imidazolyl peptides

Dans cette série, nous avons synthétisé:

- a-** Nitro-2 imidazolyl D-Phg-Arg-Gly-Asp-Ser
- b-** Nitro-2 imidazolyl D-Phg Fn 80-88C
- c-** Nitro-2 imidazolyl D-Phg-Arg-Phe-Asp-Ser
- d-** Nitro-2 imidazolyl D-Phg CO-NH₂
- e-** Nitro-2 imidazolyl _LPhg CO-NH₂

a- a été réalisé manuellement, selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 350 mg de peptidyl-résine portant préalablement la séquence Arg-Gly-Asp-Ser, chargée à 0,461 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage | Prélèvement |
|-----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| Boc-D-Phe, DCHA | BOP | 120 mn | 200 mg |
| Acide nitro-2imidazol | BOP | 18 H | |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 170 mg de résine en présence de 300 mg de crésol et 3 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 30 mg de peptide dans la fraction AcOH 5%.

Une purification par gel filtration (G 10) du peptide brut a permis d'obtenir une pureté supérieure à 80%. On obtient 22 mg de peptide **a**. (Temps de collecte/tube=10 mn)

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Rdt | Fraction | Pureté |
|---------------|------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----|----------|--------|
| 30 mg | G 10 | 2,5x40 | AcOH 5% | 240 | 30 ml/h | 73% | 22-26 | 94% |

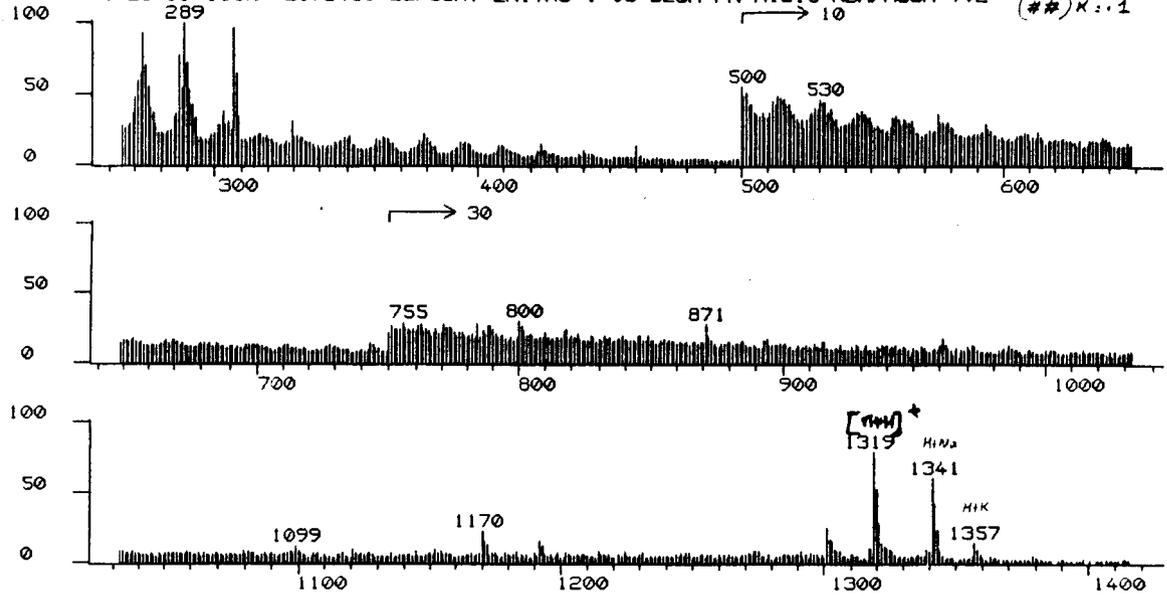
Résultat de l'analyse d'acides aminés: Asp: 0,98; Ser: 0,75; Gly: 1,02; Arg: 0,8

FAB-MS (MH)⁺ calculé: 720; trouvé: 720.

b- a été réalisé manuellement dans les mêmes conditions de synthèse que pour **a**, à partir de 0,25 gr de peptidyl-résine portant préalablement la séquence Fn 80-88C, chargée à 0,125 meq/gr.

DS90 9DE0007.3 RT= 00:27 +EI LRP 9-Dec-89 16:06
TIC= 285425700 100%= 2076480 DEFOORT 2NITRO I 0G-DECA FN M1318 NBA/ACOH +VE

G=10⁶ 10⁵/d 1kHz
M₀ = 2100 1
z = 7φ H = 6φ M =
(**)K : .1



Spectre de masse FAB du peptide
nitro-2 I^m DPhg Fn 80-88C

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|-----------------------|---------------------|-------------------|
| Boc-D-Phe, DCHA | BOP | 60 mn |
| Acide nitro-2imidazol | BOP | 120 mn |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 240 mg de résine en présence de 400 mg de crésol et 4 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 33 mg de peptide **b** dans la fraction AcOH 5%.

Une purification HPLC phase inverse préparative, sur gel de silice greffée en C 18, du peptide brut a permis d'obtenir une pureté supérieure à 80%.

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Rdt | Fraction | Pureté |
|---------------|------|-----------------|---|-----------------|-----------|-----|----------|--------|
| 20 mg | C 18 | 1x40 | H ₂ O CH ₃ CN TFA | 313 | 1,5 ml/mn | 40% | 18 | 100% |

Résultat de l'analyse d'acides aminés: Asp: 1,03; Thr: 0,91; Ser: 0,77; Pro: 1,54; Gly: 1,97; Ala: 0,99; Val: 0,99; Arg: 1,02
FAB-MS (MH)⁺ calculé: 1319; trouvé: 1319.

c- a été réalisé manuellement dans les mêmes conditions de synthèse que pour **a**, à partir de 0,5 gr de peptidyl-résine portant préalablement la séquence Arg-Phe-Asp-Ser, chargée à 0,5 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage | Prélèvement |
|-----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| Boc-D-Phg, DCHA | BOP | 1 nuit, 60 mn | 380 mg |
| Acide nitro-2imidazol | BOP | 2x18 H | |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 110 mg de résine en présence de 300 mg de crésol et 3 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 44 mg de peptide **c** dans la fraction AcOH 50%.

Une purification par gel filtration (TSK HW 40S) du peptide brut a permis d'obtenir 7,5 mg de peptide **c**. (Temps de collecte/tube= 10 mn)

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Rdt | Fraction | Pureté |
|---------------|-------------|-----------------|----------|-----------------|---------|-----|----------|--------|
| 44 mg | TSK HW 40 S | 2,5x80 | AcOH 50% | 254 | 40 ml/h | 17% | 39 | 91% |

d- a été réalisé manuellement, selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 200 mg de benzhydrylamine chargée à 0,77 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|-----------------------|---------------------|-------------------|
| Boc-D-Phg, DCHA | BOP | 60 mn |
| Acide nitro-2imidazol | BOP | 12 H |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 216 mg de résine en présence de 300 mg de crésol et 3 ml d'HF. Après

lyophilisation, nous récupérons 17 mg de peptide dans la fraction AcOH 5%.

La purification a été effectuée par HPLC phase inverse préparative.

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Rdt | Fraction | Pureté |
|---------------|------|-----------------|---|-----------------|---------|-----|----------|--------|
| 10 mg | C 18 | 1x40 | H ₂ O CH ₃ CN TFA | 254 | 2 ml/mn | 77% | 23-24 | 100% |

e- a été réalisé manuellement, selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 128 mg de benzhydrylamine chargée à 0,6 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|-----------------------|---------------------|-------------------|
| Boc-L-Phe, DCHA | BOP | 60 mn |
| Acide nitro-2imidazol | BOP | 12 H |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 127 mg de résine en présence de 200 mg de crésol et 2 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 11,5 mg de peptide dans la fraction AcOH 5%.

La purification a été effectuée par HPLC phase inverse préparative.

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Rdt | Fraction | Pureté |
|---------------|------|-----------------|---|-----------------|---------|-----|----------|--------|
| 8,5 mg | C 18 | 1x40 | H ₂ O CH ₃ CN TFA | 220 | 2 ml/mn | 64% | 26-28 | 100% |

3. 2- Synthèses des acridinyl-peptides

3. 2. 1- Boc- ϵ aminocaproate de méthyle

5,2 g (12,68 mmoles) d'acide Boc- ϵ aminocaproïque sous forme de son sel de DCHA sont repris en milieu acide (KHSO₄ 5%) et extrait par l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et concentrée à sec.

La formation du sel de césium de l'acide Boc- ϵ aminocaproïque est réalisée par addition de 6,3 mmoles de carbonate de césium en milieu éthanol/eau 80%. Après concentration à sec, reprise par du dioxanne puis de nouveau une concentration à sec, une huile est obtenue.

Cette huile est reprise dans 5 ml de DMF avant addition de 941 μ l (15,21 mmoles) d'iodométhane. Après agitation une nuit à température ambiante, cette solution est concentrer à sec. Le Boc- ϵ aminocaproate de méthyle est extré en milieu basique par del'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau.

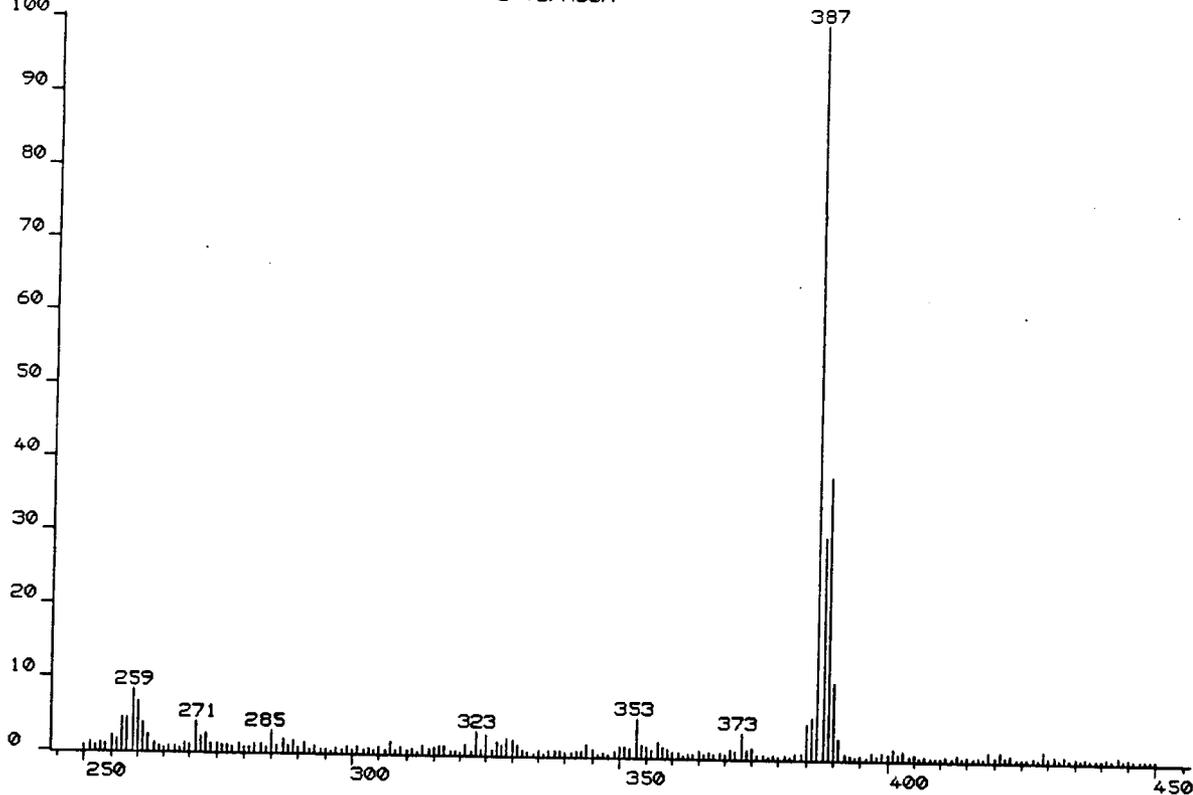
On obtient 2,8 g de Boc- ϵ aminocaproate de méthyle.

PM: 245. Rdt: 90%.

3. 2. 2- Ester méthylique de l'acide ϵ aminocaproïque

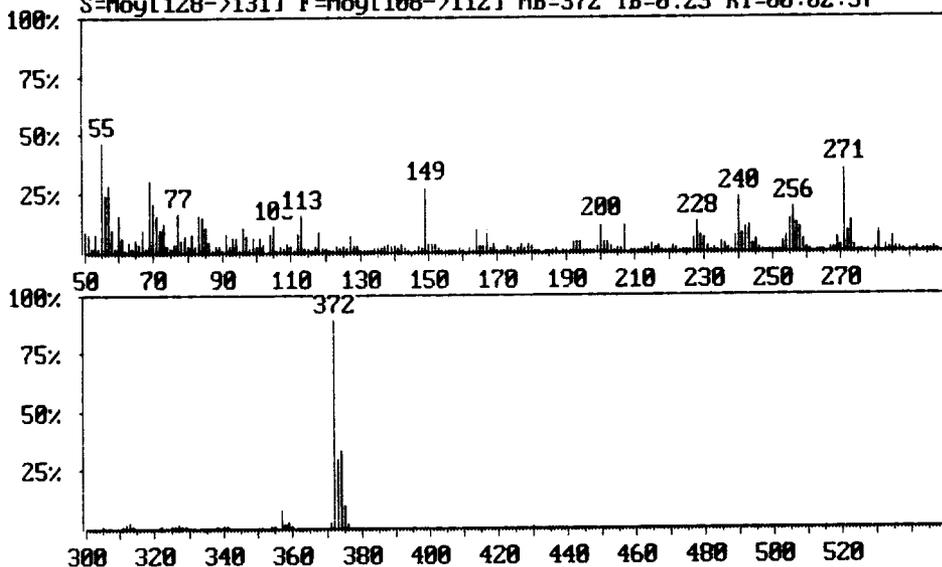
Le groupe tertibutyloxycarbonyle du Boc- ϵ aminocaproate de méthyle est déprotégé au moyen d'une solution de TFA à 50% dans le chlorure de méthylène pendant 45 mn. Après concentration à sec, le résidu est repris par l'éther et de nouveau concentré (2 fois).

DS90 23JUN0015.6 RT= 01:28 +FAB LRP 23-Jun-89 15:26
TIC= 11304190 100%= 778352 PRODUIT JPD TG/ACOH



Spectre de masse de l'ester méthylique de
l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9)
amino-6 hexanoïque

DEFOORT ACRIDINECOOH M372 LID/IE 10/1089
Fichier: DEF03.DAT Date 10-10-89 Heure 12:04:01
S=Moy[128->131] F=Moy[108->112] MB=372 IB=0.23 RT=00:02:57



DS=50 FS=450 DA=50 FA=460 N=0 Z=2 S=0.0 Fact[->] *1
Liste Spectres > S=Moy[128->131] F=Moy[108->112] Pos=3 Tot=3

Spectre de masse de l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2
acridinyl-9) amino-6 hexanoïque

L'huile est reprise dans un mélange éthanol/eau à 80% et le pH est ajusté à 7 avec de la DIEA. Après concentration à sec, le résidu est repris dans de l'AcOEt, séché sur Na₂SO₄ et concentré à sec.

3. 2. 3- Synthèse de l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9) Éamino-6 hexasanoïque

Sur la totalité de l'ester méthylique de l'acide Éaminocaproïque, 705 mg (2,536 mmoles) de dichlorométhoxyacridine sont couplés. 8 g de phénol anhydre sont ajoutés et l'ensemble est chauffé à reflux. En 60 mn, toute la dichlorométhoxyacridine est consommée.

Par concentration à sec sous vide poussé, on élimine le maximum de phénol .

L'excès d'ester méthylique de l'acide Éaminocaproïque est extrait extraction en milieu acide par l'AcOEt.

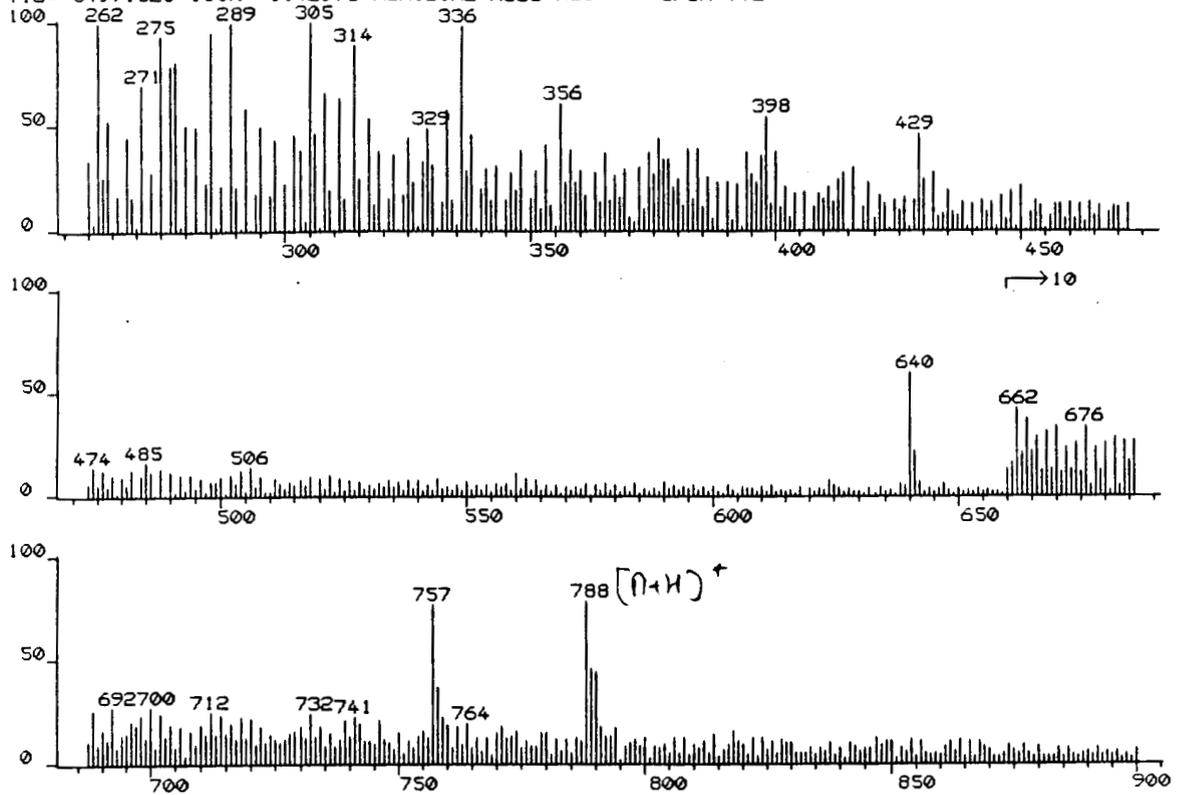
Purification sur une colonne de silice 80g, 40cm, 2 cm ϕ .

CCM: CH₂Cl/MeOH 5/1. Rf: 0,33.

FAB-MS (MH)⁺ calculé: 387; trouvé: 387.

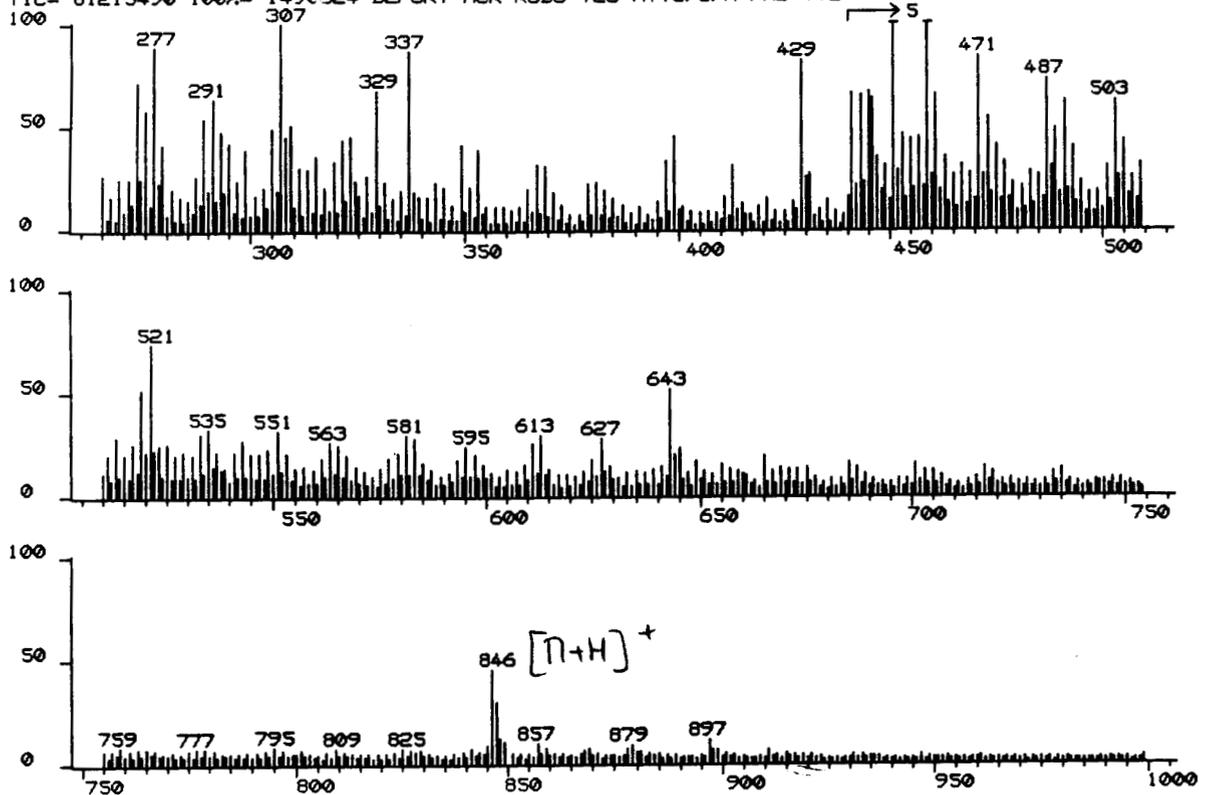
La totalité de la fraction enrichie en produit est mise en solution dans 30 ml de méthanol. A cette solution, on ajoute 10 ml d'une solution de KOH/MeOH (10 g/100 ml). Après chauffage à reflux pendant une heure, le méthanol est éliminé par concentration. L'acidification du milieu est réalisée par de l'HCl 1N. Un précipité se forme alors. Il est récupéré par filtration, lavé par de l'eau distillée, repris dans du MeOH, séché sur Na₂SO₄, et concentré à sec. ce précipité correspond à

DS90 SJUL0004.6 RT= 02:18 +FAB LRP 5-Jul-89 11:14
TIC= 84971520 100%= 1142976 ACRIDINE RGDS MEDH G/OX +VE



Spectre de masse FAB du peptide
Acridinyl-Arg-Gly-Asp-Ser

DS90 160C0020.5 RT= 02:02 +FAB LRP 16-Oct-89-19:40
TIC= 81215490 100%= 1490624 DEFORT ACR-RGDS T23 M?TG/G/A FAB +VE



Spectre de masse de l'impureté du peptide
acridinyl-Arg-Gly-Asp-Ser

l'acide N-(chloro-6 méthoxy-2 acridinyl-9) Éamino-6 hékanoïque.
On obtient 223 mg de produit.

CCM: CHCl₃/MeOH 2/1. Rf: 0,43. Rdt: 23%.

FAB-MS (MH)⁺ calculé: 372; trouvé: 372

3. 2. 4- Synthèse des acridinyl-peptides

Dans cette série nous avons synthétisé:

a- Acr-Arg-Gly-Asp-Ser

b- Acr-Fn 80-88C

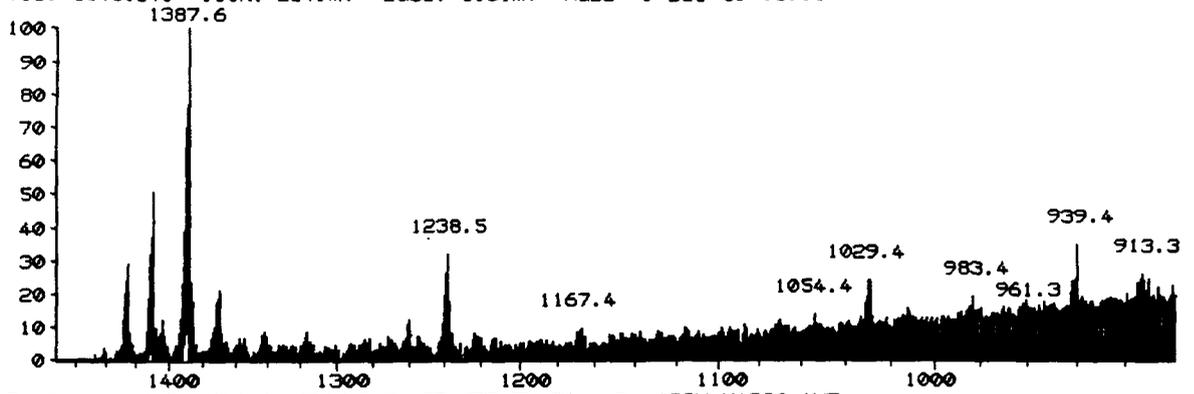
c- Acr-Arg-Phe-Asp-Ser

a- a été réalisé manuellement, selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 50 mg de peptidyl-résine portant préalablement la séquence Arg-Gly-Asp-Ser, chargée à 0,461 meq/gr.

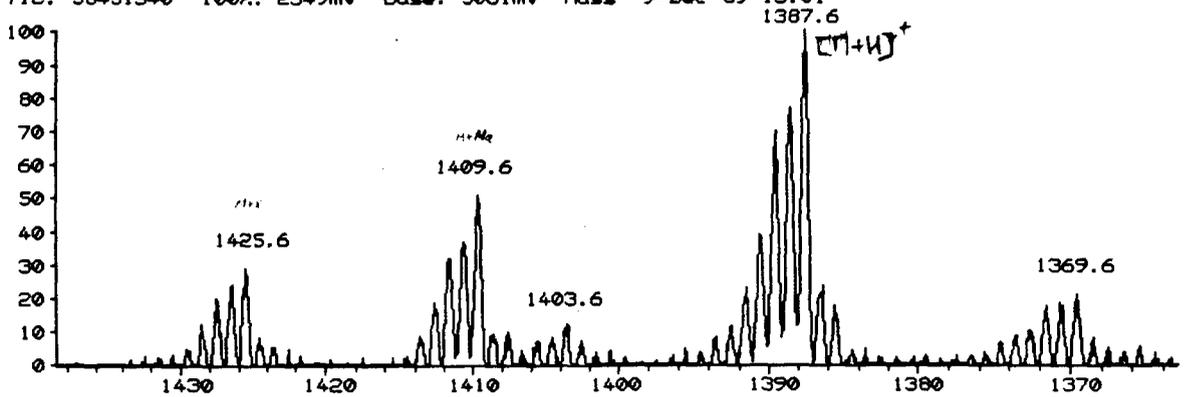
| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| Acridine | DCC BOP | 60 mn une nuit |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 61 mg de résine en présence de 510 mg de crésol et 5 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 12,5 mg de peptide dans la fraction AcOH 5%.

Profile of 9DE005.3-9: DEFOORT ACR-DECAFN RAW NBA/ACOH M1386 +VE
TIC: 58451340 100%: 2349mV Base: 5061mV Mass 9-Dec-89 13:01



Profile of 9DE005.3-9: DEFOORT ACR-DECAFN RAW NBA/ACOH M1386 +VE
TIC: 58451340 100%: 2349mV Base: 5061mV Mass 9-Dec-89 13:01



Spectre de masse FAB du peptide
Acridinyl-Fn 80-88C

La purification a été effectuée par HPLC phase inverse préparative.

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Rdt | Fraction | Pureté |
|---------------|------|--------------------|---|--------------------|---------|-----|----------|--------|
| 12 mg | C 18 | 1x40 | H ₂ O CH ₃ CN TFA | 215 | 2 ml/mn | 40% | 20-22 | 94% |

Résultat de l'analyse d'acides aminés: Asp: 1,01; Ser: 0,78;
Gly: 1,02; Arg: 0,96

FAB-MS (MH)⁺ calculé: 788; trouvé: 788.

b- a été réalisé manuellement, selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 250 mg de peptidyl-résine portant préalablement la séquence Fn 80-88C et chargée à 0,125 meq/gr.

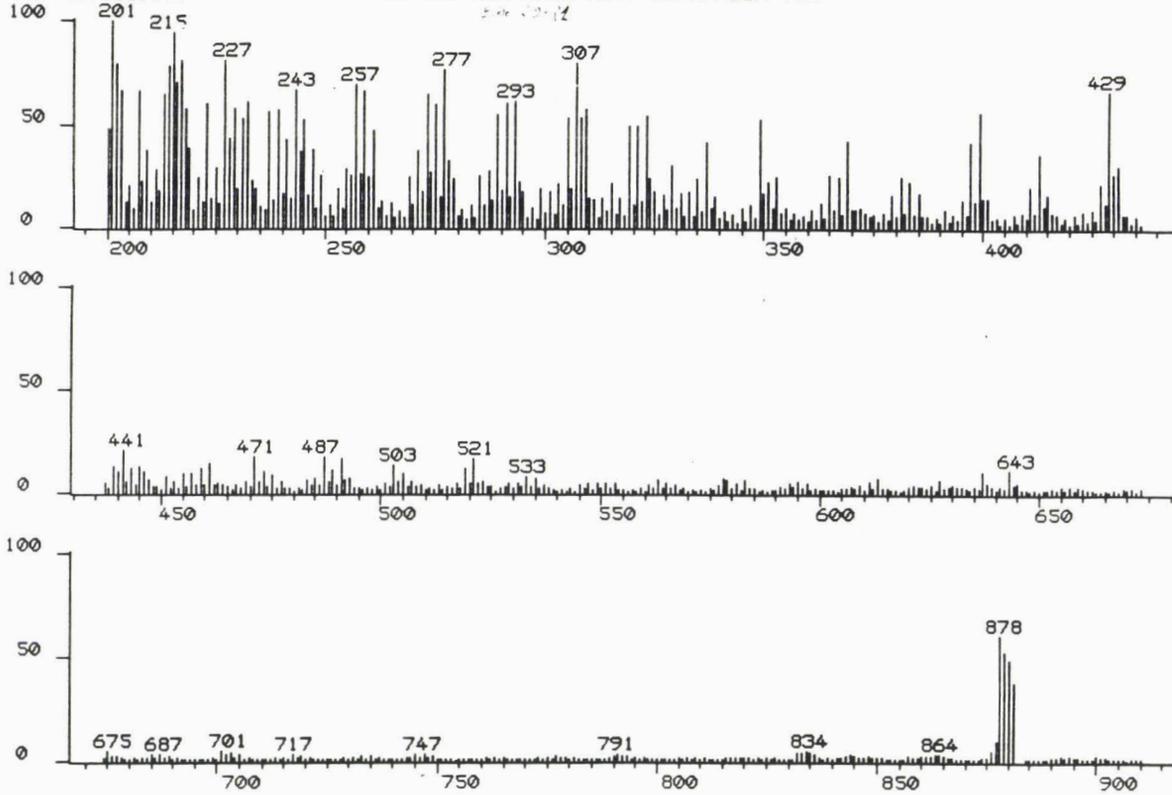
| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| Acridine | BOP | 120 mn |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 255 mg de résine en présence de 400 mg de crésol et 4 ml d'HF.

La purification a été effectuée par HPLC phase inverse préparative sur la fraction AcOH 5%.

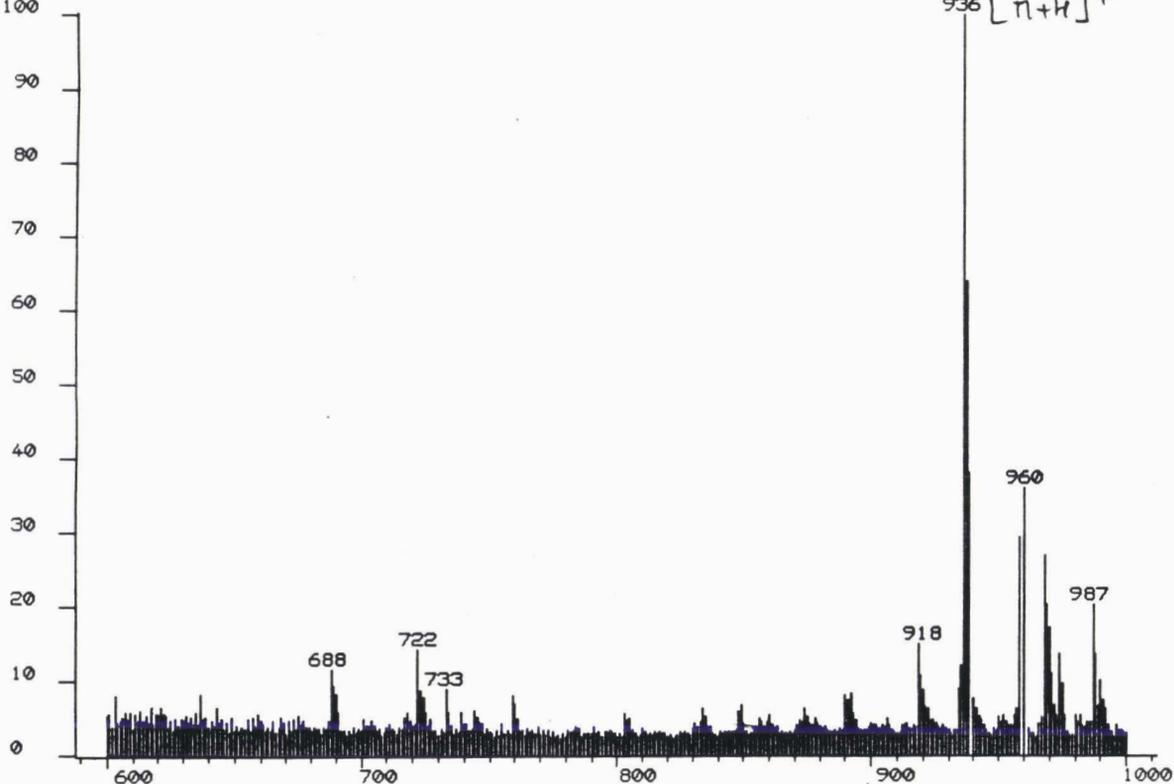
| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Fraction | Pureté |
|---------------|------|--------------------|---|--------------------|-----------|----------|--------|
| | C 18 | 1x40 | H ₂ O CH ₃ CN TFA | 215 | 1,5 ml/mn | 24-29 | 100% |

DS90 160C0014.6 RT= 02:33 +FAB LRP 16-Oct-89 18:02
TIC= 210669600 100%:= 1973440 DEFORT ACR-RFDS M877 TG/G/ACOH +VE



Spectre de masse du peptide
acridinyl-Arg-Phe-Asp-Ser

DS90 160C0019.4 RT= 01:31 +FAB LRP 16-Oct-89 19:25
TIC= 77500420 100%:= 705120 DEFORT ACR-RFDS T22-23 TG/G/A M? +VE



Spectre de masse de l'impureté du peptide
acridinyl-Arg-Phe-Asp-Ser

Résultat de l'analyse d'acides aminés: Asp: 1,03; Thr: 0,9; Ser: 0,79; Pro: 1,55; Gly: 1,98; Ala: 0,99; Val: 0,98; Arg: 1,03
 FAB-MS (MH)+ calculé: 1387; trouvé: 1387.

c- a été réalisé manuellement, selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 100 mg de peptidyl-résine portant préalablement la séquence Arg-Phe-Asp-Ser et chargée à 0,5 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| Acridine | BOP | 120 mn |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 116 mg de résine en présence de 300 mg de crésol et 3 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 30 mg de peptide dans la fraction AcOH 5% et 17,5 mg dans la fraction AcOH 50%.

La purification a été effectuée par HPLC phase inverse préparative sur la fraction AcOH 5%.

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Rdt | Fraction | Pureté |
|---------------|------|-----------------|---|-----------------|---------|-----|----------|--------|
| 30 mg | C 18 | 1x40 | H ₂ O CH ₃ CN TFA | 215 | 2 ml/mn | | 20-21 | 100% |

FAB-MS (MH)+ calculé: 720; trouvé: 720.

4- SYNTHÈSE DU PEPTIDE GP 85 TRYPO C63-80

La synthèse de ce peptide a été réalisée selon le schéma BOC/TFA. 1,5 gr de Boc-Glu(OBzl)-résine chlorométhylée chargée à 1,14 meq/gr ont été mis en jeu en début de synthèse. Des prélèvements de résine ont été réalisés en cours de synthèse de façon à obtenir les peptides de 9, 12 et 20 acides aminés (GP 85 trypo 71-80, GP 85 trypo 69-80, GP 85 trypo C63-80).

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------------|
| Boc-Ser (Bzl) | DCC/HOBt | 120 mn |
| Boc-Asp (OCHx) | DCC/HOBt | 120 mn |
| Boc-Gly | DCC/HOBt | 30, 30 mn, Ac |
| Boc-Ser (Bzl) | DCC/HOBt | 30 mn |
| Boc-Gly | DCC/HOBt | 30, 30 mn |
| Boc-Lys (ClCbz) | DCC/HOBt | 30 mn, Ac |
| Boc-Lys (ClCbz) | DCC/HOBt | 600 mn |
| Boc-Asp (OBzl) | DCC/HOBt | 600, 200, 120 mn |
| | | Prélèvement |
| Boc-Glu (OBzl) | DCC/HOBt | 600, 120 mn |
| Boc-Ser (Bzl) | DCC/HOBt | 600, 120 mn |
| Boc-Asp (OCHx) | DCC/HOBt | 90, 600, 60, 60 mn |
| | | Prélèvement |
| Boc-Gly | DCC/HOBt | 900, 30, 30 mn, Ac |
| Boc-Ser (Bzl) | DCC/HOBt | 30, 30 mn |
| Boc-Glu (OBzl) | DCC/HOBt | 90, 120, 90 mn |
| Boc-Lys (Cbz) | DCC/HOBt | 90, 120, 60 mn |
| Boc-Lys (Cbz) | DCC/HOBt | 120, 120, 60, 60 mn, Ac |
| Boc-Asp (OBzl) | DCC/HOBt | 100, 100, 60 mn |

En fin de synthèse, la résine est de nouveau fractionnée en plusieurs lots. Sur un quart de cette résine, un résidu tyrosine

est couplé, sur un autre quart, un résidu Boc-cystéine Acm est couplé.

4. 1- GP 85 trypo 69-80

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 500 mg de résine en présence de 500 mg de p.crésol et 5 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 400 mg de peptide dans la fraction AcOH 5%. Le peptide GP 85 trypo 69-80 a été purifié par filtration sur gel. (Temps de collecte/tube=20mn)

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Fraction |
|---------------|-----|-----------------|---------|-----------------|--------|----------|
| 200 mg | P 2 | 2,5 x 40 | AcOH 5% | 237 | 12ml/H | 53-67 |

Résultat de l'analyse d'acides aminés: Asp: 2,84; Ser: 2,56; Glu: 2,03; Gly: 2,14; Lys: 1,36.

La faible valeur de la lysine est due à la mauvaise intégration du pic lui correspondant.

4. 2- GP trypo C63-80

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 350 mg de résine en présence de 500 mg de p.crésol et 5 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 200 mg de peptide dans la fraction AcOH 5%. Le peptide GP 85 trypo C63-80 a été purifié par filtration sur gel. (Temps de collecte/tube=30mn)

| Masse déposée | Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Fraction |
|---------------|-----|-----------------|---------|-----------------|--------|----------|
| 100 mg | P 2 | 2,5 x 40 | AcOH 5% | 237 | 30ml/H | 34-39 |

4. 3- Couplage de la fluorescéine sur le peptide GP 85 trypto 69-80

6,7 mg (5,15 μ moles) de GP 85 trypto 69-80 sont mis en solution dans 100 μ l d'eau. A cette solution, on ajoute 200 μ l de pyridine et 2,2 mg (5,66 μ moles) de FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Le pH est contrôlé régulièrement et maintenu à 8-9 avec du NaHCO_3 . Après 20 heures d'agitation, le système ne semble plus évoluer d'après les contrôles réalisés par analyse en couche mince. L'excès de FITC est éliminé par extraction à l'AcOEt. La phase aqueuse est lyophilisée. Le milieu réactionnel est ensuite purifié par HPLC phase inverse préparative sur C18. Après lyophilisation, nous obtenons 0,9 mg de peptide marqué.

4. 4- Couplage du peptide GP trypto C63-80 sur un gel de type "Sepharose Thioactivated 4B"

Le peptide utilisé au cours de cette expérience provenait de la synthèse dans laquelle le résidu cystéine était protégé par une fonction acétamidométhyle. Nous avons dû déprotéger la cystéine par traitement à l'acétate mercurique.

4. 4. 1- Déprotection d'un groupement acétamido-méthyle d'une cystéine

6,2 mg (2,5 μ moles) de GP 85 trypto C63-80 et 0,8 mg (2,5 μ moles) d'acétate mercurique sont mis en solution dans 0,4 ml d'eau dégazée acidifiée à pH 3,1 par de l'acide acétique. On laisse sous agitation pendant 20 heures.

Le milieu réactionnel est ensuite dilué 10 fois avec de l'eau dégazée avant de précipiter le mercure sous forme de sulfure mercurique par barbotage d' H_2S , filtré sur filtre Millipore 0,22 μ m puis lyophilisé après élimination de l' H_2S par barbotage d'azote.

Le dosage de thiol par la méthode d'Ellmann a permis de déterminer la présence de 1595,7 nmoles de peptide GP 85 trypto C63-80 sous forme SH (Rdt= 63,8%).

4. 4. 2- Couplage du peptide réduit sur le gel de "Sépharose-Thioactivated 4B"

300 mg de gel de Sépharose ont d'abord été mis en suspension dans de l'eau dégazée pendant deux heures, puis lavés trois fois par un tampon d'acétate d'ammonium pH 4,77.

Ce gel essoré est ensuite mis en contact avec 2 ml de tampon. Le peptide GP 85 trypto C63-80 réduit est amené dans 1 ml d'eau dégazée. Le couplage a été réalisé sous agitation pendant 40 heures.

Après lavage du gel avec de l'eau dégazée. La densité optique de l'éluat est mesurée au spectrophotomètre à 343 nm.

Nous avons pu ainsi déterminer que 0,38 μ mole de peptide GP 85 trypto C63-80 était fixée sur la Sépharose (Rdt=36%).

5- SYNTHÈSES DES CANDELABRES

5. 1- Synthèse de la polylysine-résine

Sur 5 gr de résine benzhydrylamine préalablement neutralisée, on couple 236 mg (1,25 mmoles) de Boc- β Ala sous forme d'ester activé d'HOBt pendant une nuit.

Après lavage, 100 mg de résine sont acétylés (2 fois) au moyen d'anhydride acétique en présence de DIEA. Après clivage du groupement tertiobutyloxycarbonyl, la charge de la résine est déterminée par la méthode de Gisin. Nous trouvons une charge de 0,28 meq/gr.

L'acétylation est effectuée sur le reste de la résine.

Les couplages de la DiBoc-Lysine ont été ensuite réalisés avec un excès de 2,5 par rapport à la charge de la résine. La charge est considérée comme doublant à chaque étape.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|-----------------------------|---------------------|-------------------|
| (Boc) ₂ Lys,DCHA | BOP | 60 mn |
| (Boc) ₂ Lys,DCHA | BOP | 60 mn |
| (Boc) ₂ Lys,DCHA | BOP | 60 mn |

En fait, la charge réelle de la résine portant les 7 résidus lysines est de 1,38 meq/g.

Par la suite un autre arbre Lysine a été synthétisé sur benzhydramine suivant le même protocole. La Boc- β Ala étant remplacée par une Boc-norleucine. La charge de cette résine est de 1,05 meq/g.

5. 2- Synthèse de Arg-Gly-Asp-Ser-candélabre

Il a été réalisé manuellement, selon la stratégie de synthèse Boc/TFA à partir de 150 mg de polylysine-résine chargée à 1,38 meq/gr.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| Boc-Ser(OBzl) | DCC/HOBt | 2 x 60 mn |
| | BOP | 60 mn |
| Boc-Asp(OcHx) | BOP | 2 x 60 mn |
| Boc-Gly | BOP | 2 x 60 mn |
| Boc-Arg(Tos) | BOP | 3 x 60 mn |

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 300 mg de résine en présence de 300 mg de crésol et 3 ml d'HF. Après lyophilisation, nous récupérons 200 mg de peptide dans la fraction AcOH 5%.

La filtration sur gel (TSK HW 40S) du peptide brut a permis d'obtenir une pureté supérieure à 80%.

| Masse déposée | Gel | Dimension <i>en cm</i> | Eluant | λ <i>en nm</i> | Fraction |
|---------------|----------------|---------------------------|---------|---------------------------|----------------|
| 200 mg | TSK HW 40 S | 2,5x40 | AcOH 5% | 254 | 26-30 31-36 |

5. 3- Synthèse du Fn 80-89-candélabre

La synthèse a été réalisée sur 200 mg de polylysine résine chargée à 1,38 meq/g.

| Réactif de couplage | Méthode de couplage | Temps de couplage |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| Boc-Ala | DCC/HOBt | 60, 60, 30 mn |
| | BOP | 30, 60 mn |
| Boc-Pro | DCC/HOBt | 60, 90, 60 mn |
| Boc-Ser (Bzl) | DCC/HOBt | 60, WK |
| Boc-Asp (Ochx) | DCC/HOBt | 60, 60 mn |
| Boc-Gly | DCC/HOBt | 30, 60 mn |
| Boc-Arg (Tos) | DCC/HOBt | 30, 30, 60 mn |
| Boc-Gly | DCC/HOBt | 30, 60, 60 mn |
| | BOP | 60 mn |
| Boc-Thr (Bzl) | DCC/HOBt | 30, 60 mn |
| | BOP | 60, 60 mn |
| Boc-Val | BOP | 60, 60, 60, 60 mn |
| Boc-Ala | DCC/HOBt | 60 mn |
| | BOP | 60 mn |

Masse de peptidyl-résine obtenue: 384 mg. Rendement: 71,2%.

Le clivage par le fluorure d'hydrogène a été réalisé sur 360 mg de résine avec 500 mg de crésol et 5 ml d'HF. Coupure 1H30 à 0°C. Masse de Fn 80-89-candélabre dans la fraction AcOH 5%: 166 mg. Rendement de la coupure: 97,2%. Le peptide Fn 80-89-candélabre a été purifié par filtration sur gel. (Temps de collecte/tube=8mn)

| Masse déposée | Gel | Dimension <i>en cm</i> | Eluant | λ <i>en nm</i> | Débit | Rdt | Fraction |
|---------------|----------------|---------------------------|---------|---------------------------|--------|-----|-------------------------|
| 100 mg | TSK HW 40 S | 2,5 x 85 | AcOH 5% | 240 | 45ml/H | 72% | 10-11 12-13 14-15 |

Résultats des analyses d'acides aminés:

| Acide aminé | Théorique | Trouvé | | |
|-------------|-----------|---------|---------|---------|
| | | T 10-11 | T 12-13 | T 14-15 |
| Asp | 1 | 0,90 | 1,06 | 1,22 |
| Thr | 1 | 0,82 | 0,95 | 0,98 |
| Ser | 1 | 0,75 | 0,70 | 0,95 |
| Pro | 1 | 1,10 | 1,02 | 0,96 |
| Gly | 2 | 1,82 | 2,01 | 2,02 |
| Ala | 2 | 1,77 | 1,97 | 1,94 |
| Val | 1 | 0,87 | 0,95 | 0,93 |
| Arg | 1 | 0,77 | 0,99 | 0,93 |

La valeur 1 a été calculée sur la base des acides aminés suivants: Asp, Pro, Gly, Ala, Val, Arg.

| Acide aminé | Théorique | Trouvé | | |
|-------------|-----------|---------|---------|---------|
| | | T 10-11 | T 12-13 | T 14-15 |
| Asp | 8 | 8,35 | 8,61 | 9,47 |
| Thr | 8 | 7,58 | 7,76 | 7,58 |
| Ser | 8 | 6,92 | 5,68 | 7,39 |
| Pro | 8 | 10,15 | 8,31 | 7,48 |
| Gly | 16 | 16,81 | 16,37 | 15,66 |
| Ala | 16 | 16,35 | 16,00 | 15,07 |
| Val | 8 | 8,08 | 7,76 | 7,20 |
| Arg | 8 | 7,12 | 8,04 | 7,25 |
| Lys | 7 | 7 | 7 | 7 |

Les calculs ont été effectués sur la valeur du résidu lysine.

6- COUPLAGE DE PEPTIDE SUR CANDELABRE ACTIVE A L'ACIDE
MALEIMIDOCAPROIQUE

6. 1- Synthèse de "candélabre-MC"

Sur 172 mg de résine polylysine chargée à 1,38 meq/g, on couple 100 mg (0,473 mmoles) d'acide maléimidocaproïque au moyen du BOP pendant 2 heures. Après lavage, le test de Kaiser donne une solution incolore et des grains de résine noirs. Le test est considéré comme négatif puisque qu'il est basé sur la coloration bleue de la solution par libération du pourpre de Ruhmann. La négativité du test de Christensen pour les amines primaires (avec l'acétaldéhyde) nous a permis de confirmer le résultat du Kaiser donc la saturation des fonctions amines des résidus lysine.

Le clivage par le fluorure d'hydrogène est réalisé sur 176 mg de résine en présence de 180 mg de crésol et 2 ml d'HF, pendant 1 h 30 à 0°C. La masse de candélabre-MC dans l'AcOH à 50% est de 9,5 mg

6. 2- Couplage d'un peptide à SH sur le "candélabre-MC"

15 mg de peptide Allergène 117-133 (peptide de l'allergène DER P1) (1,5 équivalents) sont solubilisés dans 0,9 ml d'eau dégazée.

A 2 mg de candélabre-MC (en solution dans 0,4 ml de DMF dégazé) est ajouté en 4 temps (au temps 0, 70 mn, 120 mn et 18 heures) respectivement 0,3 ml, 0,3 ml, 0,15 ml et 0,15 ml de la solution de peptide Allergène 117-133.

Après lyophilisation du milieu réactionnel, une filtration sur gel (TSK HW 40 S) est effectuée dans l'AcOH à 5%.

| Gel | Dimension en cm | Eluant | λ en nm | Débit | Fraction |
|----------------|--------------------|---------|--------------------|--------|----------|
| TSK HW 40 S | 1,5 x 85 | AcOH 5% | 238 | 30ml/H | 14-15 |

L'analyse d'acides aminés sur la première fraction éluee nous indique la composition de l'espèce synthétisée. D'après les calculs, nous avons réussi à greffer 4 molécules de peptide par molécule de candélabre.

C- TECHNIQUES UTILISEES EN BIOLOGIE

1- MARQUAGE A L'IODE DE LA FIBRONECTINE- METHODE A LA CHLORAMINE T

Une solution de chloramine T à X mg/ml de tampon phosphate et une solution de métabisulfite de sodium (MBS) à X mg/ml de tampon phosphate (nous aurons X pour X x 100 µg de protéine) sont préparées extemporanément.

A X x 100 µg de protéine mis en solution dans 100 µl de tampon phosphate, est ajoutée Y mCurie d'iode ¹²⁵. Après agitation, 100 µl de la solution de chloramine T sont additionnés au goutte à goutte. La réaction dure une minute à partir du moment où la première goutte a été ajoutée.

La réaction est stoppée par addition en une fois de 200 µl de la solution de MBS.

Le milieu réactionnel est ensuite déposé sur une colonne de gel Séphadex PD10 préalablement saturée avec une solution de tampon phosphate/BSA à 0,1%, puis équilibrée en tampon phosphate qui servira à l'élution.

L'éluat est récupéré dans 13 tubes à raison de 10 gouttes par tube (soit environ 0,5 ml).

Le comptage est réalisé sur 10 µl de chaque tube, il se dessine alors un profil de marquage avec un pic correspondant au marquage de la protéine et l'amorce d'un second pic correspondant à l'excès d'iode ¹²⁵.

Sur les tubes contenant la plus forte concentration en iode ¹²⁵ sera déterminée l'activité spécifique de la protéine. Pour cela, 100 µl de sérum humain normal sont ajoutés dans ces tubes.

Les protéines sont ensuite précipitées par 1 ml d'acide trichloracétique à 20 %M dans l'eau. Les petits fragments iodés ou l'iode libre sont comptés dans le surnageant et le marquage réel de la protéine dans le culot de centrifugation.

2- RECUPERATION DES PARASITES

Les trypomastigotes sont mis en culture sur un tapis cellulaire de fibroblastes 3T3 de souris. Après pénétration dans les cellules, ils se transforment en amastigotes, se multiplient et sont libérés dans le milieu de culture par éclatement des cellules. Les trypomastigotes que nous récupérons sont donc dans le milieu de culture. Après une première centrifugation afin d'éliminer les débris cellulaires (10 mn à 800 tours/mn), le surnageant dans lequel se trouvent toujours les parasites est récupéré puis de nouveau centrifugé 10 mn à 3000 tours/mn. Les parasites se trouvent maintenant dans le culot, le surnageant est éliminé. Les parasites sont ensuite repris dans du RPMI et lavés plusieurs fois par centrifugation 10 mn à 3000tours/mn.

3- ETUDE DE LA TOXICITE DES DROGUES SUR LES TRYPOMASTIGOTES

Après récupération, lavage et comptage des parasites, ils sont répartis dans une boîte à fond plat Nuclon 96 puits (1 million par puits dans 50 μ l de RPMI 1640 sérum de veau à 10%). Les parasites sont ensuite mis en contact avec 50 μ l d'une solution de Benznidazole ou peptidyl-drogues à différentes concentrations. Les drogues sont solubilisées dans du milieu RPMI 1640 DMSO 1%.

Après 5 heures d'incubation, 1 μ curie (37 KBq) d'hypoxanthine tritiée est ajoutée dans chaque puits. 20 heures après, les parasites sont récupérés et lavés sur papier filtre en fibre de verre.

L'hypoxanthine tritiée incorporée est mesurée sur un compteur à scintillation liquide (Rackbeta, Turku, Finlande).

4- ETUDE DE LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T

L'immunisation des souris est réalisée par injection à la base de la queue de 100 μ l d'une solution contenant 20 à 50 μ g d'antigène en présence ou non d'adjuvant complet ou incomplet de Freund. En présence d'adjuvant, celui-ci sera en proportion de 50 μ l pour 50 μ l d'antigène.

3 souris servent à l'immunisation avec un type d'antigène.

10 à 12 jours après l'injection, les souris sont sacrifiées afin de récupérer de façon aseptique les ganglions inguinaux et périaortiques.

Ceux-ci sont ensuite dilacérés et les cellules sont remises en suspension dans du RPMI-PS contenant 10% de sérum de veau fétal, 10 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 100 U de pénicilline/ml, 100 U de streptomycine/ml, 1 mM de pyruvate de sodium et 5×10^{-5} M de β mercaptoéthanol.

Nous répartissons ensuite 10^5 cellules par puits dans un volume de 100 μ l. Les antigènes sont introduits à différentes concentrations (16; 8; 1,6; 0,16; 0,016 μ g) dans un volume de 100 μ l de façon à obtenir des concentrations finales de 80; 40; 8; 0,8; 0,08 μ l/ml.

Après 4 jours d'incubation à 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO₂, 0,5 µcurie de thymidine tritiée est ajouté.

18 heures après, les cellules sont filtrées. L'incorporation de la thymidine est mesurée après addition de liquide de scintillation avec un compteur gamma à scintillation.

5- TEST ELISA INDIRECT (TITRATION DES IMMUNSERUMS)

Les tests sont réalisés sur des plaques EIA (Enzyme Immuno Assay) Nunc 96 trous à fond plat.

5.1- Fixation de l'antigène

Le peptide ou la protéine sont mis en solution dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4 aux concentrations respectives de 10 et 2 µg/ml.

On dépose dans chaque puits 100 µl de ces solutions (une solution par puits). Après incubation d'une nuit à température ambiante, la plaque est lavée 3 fois avec le tampon phosphate.

5. 2- Addition de l'immunsérum (IS) à titrer

100 µl de différentes dilutions de l'IS dans du tampon phosphate/BSA à 1% ou 100 µl des mêmes dilutions de sérum pré-immun sont déposés. Après incubation de 2 heures à 37°C, la plaque est lavée 3 fois avec le tampon phosphate.

5. 3-Addition du second anticorps anti IgG de souris

100 μ l du second anticorps, anticorps de monton anti-anticorps de souris marqué par la peroxydase (Pasteur production) dilué au 1/10000 dans du tampon phosphate/BSA 1% sont additionnés. Après incubation de 2 heures à 37°C, la plaque est lavée 3 fois avec le tampon phosphate.

5. 4-Addition du substrat

100 μ l par puits du substrat de la peroxydase sont additionnés. Après incubation de 30 mn à l'abri de la lumière, la réaction est arrêtée par addition de 100 μ l par puits d'acide chlorhydrique 1N.

L'intensité de coloration est lue spectrophotométriquement à 492 nm.

BIBLIOGRAPHIE

AKIYAMA S. K., YAMADA K. M.

The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cells in suspension.

J. Biol. Chem., 260, 4492-4500, 1985.

ANDERS R. F.

Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria.

Parasite Immunology, 8, 529-539, 1986.

ANDRADE Z.A.

Cytopathology of Parasitic Disease. Pitman Books, London, (Ciba Fondation Symposium), 99, 214-233, 1983.

ANDREWS N.W., KATZIN A.M., COLLI W.

Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* in two-dimensional electrophoresis. Correlation with the cell invasion capacity.

J. Biochem., 140, 599-604, 1984.

AUDIBERT F., JOLIVET M., CHEDID L., ALOUF J.E., BOQUET P., RIVAILLE P., SIFFERT O.

Active antitoxic immunization by a diphtheria toxin synthetic oligopeptide.

Nature, 289, 393-594, 1981.

AVRAMEAS S., TERNYNCK T.

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunosorbents.

Immunochemistry, 6, 53-66, 1969.

BALLOU W. R., ROTHBARD J., WIRTZ R. A., GORDON D. M., WILLIAMS J. S., GORE R. N., SCHNEIDER I., HOLLINGDALE M. R., BEAUDOUIN R. L., MALOY W. L., MILLER L. H., HOCKMEYER W. T.

Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*.

Science, 228, 996-999, 1985.

BARANY G. and MERRIFIELD R.B.

In "The Peptides", Gross E. and Meienhofer J. Eds., vol.2, p. 1-284, Academic Press : New-York, 1985.

BODANSZKY M. and KWEI J.Z.

Int. J. Peptide Protein Res., 12, 69-74, 1978.

BOSCHETTI M.A., PIRAS M.M., HENRIQUEZ D., PIRAS R.

The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion.

Mol. Biochem. Parasitol., 185 - 188, 92, 1987.

BRIAND J. P., MULLER S., VAN REGENMORTEL M. H. V.

Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods.

J. Immunol. Meth., 78, 59-69, 1985.

- BUKO A. M., PHILLIPS L. R., FRASER B. A.
Biomed. Mass Spectrom., 10, 408, 1983.
- CARPINO L.A.
J. Amer. Soc., 79, 4427-4431, 1957.
- CASTRO B., DORMOY J.R., EVIN G. and SELVE C.
BOP, hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino-
phosphonium
Tetrahedron Letters, 14, 1219-1222, 1975.
- CHRISTENSEN T.
A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid
phase peptide synthesis using chloranil.
Acta Chemica Scandinavia, B33, 763-766, 1979.
- CORRADIN G., ETLINGER H. W., CHILLER J. M.
Lymphocyte specificity to protein antigens.
I. Characterization of the antigen-induced *in vitro* T cell-
dependent proliferative response with lymph node cells from primed
mice.
J. Immunol., 119, 1048-1053, 1977.
- COY D. H., VILCHEZ-MARTINEZ J. A., COY E. J., SCHALLY A. V.
Analogues of luteinizing hormone-releasing hormone with increased
biological activity produced by D-amino acid substitutions in
position 6.
J. Med. Chem., 19, 423, 1976.
- D'IMPERIO LIMA M. R., JOSKOWICZ M., COUTINHO A., KIPNIS T., EISEN H.
Very large and isotopically atypical polyclonal plaque-forming cell
responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*
Eur. J. Immunol., 15, 201-203, 1985.
- DIMARCHI R., BROOKE G., GALE C., CRACKNELL V., DOEL T., MOWAT N.
Protection against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide.
Science, 232, 639-641, 1986.
- EDWARDS R. J., SINGLETON A. M., BOOBIS A. R., DAVIES D. S.
Cross-reaction of antibodies to coupling groups used in the
production of anti-peptide antibodies.
J. Immunol. Meth., 117, 215-220, 1989.
- ERICKSON B.W. and MERRIFIELD R.B.
Acid stability of several benzylic protecting groups used in solid
phase peptide synthesis. Rearrangement in O-Benzyl Tyrosine to 3-
Benzyl Tyrosine.
J. Amer. Chem. Soc., 95, 3750-3756, 1973.
- FEINBERG R. S., MERRIFIELD R. B.
Modification of peptides containing glutamic acid by hydrogen
fluoride-anisole mixtures. γ acylation of anisole or the glutamyl
nitrogen.
J. Am. Chem. Soc., 97, 3485-3496, 1975.

- FERNANDES J.F., HALSMAN M., CASTELLANI O.
Effect of actinomycin D on the infectivity of *Trypanosoma cruzi*.
Nature, 207, 1004-1005, 1965.
- FUJII T. and SAKAKIBARA S.
The solid-phase synthesis of Ile-Angiotensin II to demonstrate the use of *Nim*-Tosyl-Histidine.
Bull. Chem. Soc. Jpn., 43, 3954-3956, 1970.
- GARTNER T. K., BENNETT J. S.
The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets.
J. Biol. Chem., 260, 11891-11894, 1985.
- GEYSEN H. M., MELOEN R. H., BARTELING S. J.
Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3998-4002, 1984.
- GISIN B.F.
The preparation of Merrifield-resins through total esterification with Cesium salts.
Helv. Chim. Acta, 56, 1476, 1972.
- GOODFRIEND T. L., LEVINE L., FASMAN G. D.
Antibodies to bradykinine and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology.
Science, 144, 1344-1346, 1964.
- HAMMOND D.J., HOGG J., GUTTERIDGE W.E.
Trypanosoma cruzi: possible control of parasite transmission by blood transmission using amphiphilic cationic drugs.
Exp. Parasitol., 60, 32-42, 1985.
- HAYMAN E. G., PIERSCHBACHER M. D., RUOSLAHTI E.
Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides.
J. Cell. Biol., 100, 1948-1954, 1985.
- HEATH W. F., TAM J. P., MERRIFIELD R. B.
Improved deprotection of cysteine-containing peptides in HF.
Int. J. Peptide Protein Res., 28, 498-507, 1986.
- HENRIQUEZ D., PIRAS R., PIRAS M.M.
The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes.
Mol. Biochem. Parasitol., 2, 359-366, 1981.
- HERZENBERG L. A., TOKUHISA T., HERZENBERG L. A.
Carrier-priming leads to hapten-specific suppression.
Nature, 285, 664-667, 1980.

HOUGHTEN R.

General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 5131-5135, 1985.

HUDSON D

Methodological implication of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures..

J. Org. Chem., 53, 617-624, 1988.

HUNT S.

In "Chemistry and biochemistry of the amino-acids",
Barett G.C. Ed. , p.393, Chapman and Hall, 1982.

JOLIVET M., AUDIBERT F., GRAS-MASSE H., TARTAR A., SCHLESINGER D.,
WIRTZ H., CHEDID L.

Induction of biologically active antibodies by a polyvalent synthetic vaccine constructed without carrier.

Inf. Immun., 55, 1498-1502, 1987.

KAISER E., COLESCOTT R. BOSSINGER C. and COOK P.

Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase peptide synthesis of peptides.

Analytical Biochemistry, 34, 595-598, 1970.

KELLER O., RUDINGER J.

Preparation and some properties of maleimido acids and maleoyl derivatives of peptides.

Helv. Chem. Acta, 58, 531-540, 1985.

KONIG W., GEIGER R.

Eine neue amid-schutz gruppe.

Chem. Ber., 103, 2041-2051, 1970.

LE-NGUYEN D., HEITZ A. and CASTRO B.

Renin substrate. Part 2. Rapid solid phase peptide synthesis of the ratine sequence tetradecapeptide using BOP reagent.

J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1915-1919, 1987.

LEE A., POWELL J. E., TREGGAR G. W., NIALH H., STEVENS V.

A method for preparing b HCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition.

Mol. Immunol., 17, 749-756, 1980.

LLOYD J. R., COTTER M. L., OHORI D., DOYLE D. L.

Dinstinction of α - and β -aspartyl and α - and β -glutamyl peptides by Fast Atom Bombardment/Tandem Mass Spectrometry.

Biomed. Env. Mass. Spectrom., 15, 399-402, 1988.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J.

Protein measurement with Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

- MANSO ALVES M.J., ABUIN G., KUWAJIMA V.Y., COLLI W.
Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*.
Mol. Biochem. Parasitol., 21, 75-82, 1986.
- MELTZER N. M., TOUS G. I., GRUBER S., STEIN S.
Gas-phase hydrolysis of proteins and peptides.
Anal. Biochem., 160, 356-361, 1987.
- MERRIFIELD R.
Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide.
J. Am. Chem. Soc., 85, 2149, 1963.
- MINOPRIO P. M., COUTINHO A., JOSKOWICZ M., D'IMPERIO LIMA M. R., EISEN H.
Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes.
Scand. J. Immunol., 24, 669-679, 1986.
- MITCHELL A.R., KENT S.B.H., ENGELHARD M. and MERRIFIELD R.B.
A new synthetic route to tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxyméthyl) phenylacetamidomethyl-resin, an improved support for solid phase peptide synthesis.
J. Org. Chem., 43, 2845-2852, 1978.
- MITCHISON N. A.
The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II cellular cooperation.
Eur. J. Immunol., 1, 18-27, 1971.
- MOOLTEN F., ZAJDEL S., COOPERBAND S.
Immunotherapy of experimental animals tumors with antitumor antibodies conjugated to diphtheria toxin or ricin.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 277, 690, 1976.
- OMS, relevé épidémiologique hebd., 60, 37-42, 1985.
- ONDETTI M. A., DEER A., SHEEHAN J. T., PLUSCEC J., KOCY O.
Side reactions in the synthesis of peptides containing the aspartylglycyl sequence.
Biochemistry, 7, 4069-4075, 1968
- ORTIZ-ORTIZ L., ELLIOT PARKS D., RODRIGUEZ M., WEIGLE W. O.
Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection.
J. Immunol., 124, 121-124, 1980.
- OUAISSI M. A., AFCHAIN D., CAPRON A., GRIMAUD J. A.
Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function;
Nature, 308, 380-382, 1984.

- OUAISSI M. A., CORNETTE J., AFCHAIN D., CAPRON A., GRAS-MASSE H., TARTAR A.
Trypanosoma cruzi infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain.
Science, 234, 603-607, 1986.
- OUAISSI M. A., CORNETTE J., CAPRON A.
Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor.
Mol. Biochem. Parasitol., 19, 201-211, 1986.
- OUAISSI M. A., KUSNIERZ J. P., GRAS-MASSE H., DROBECQ H., VELGE P., CORNETTE J., CAPRON A., TARTAR A.
Fluorescence-activated cell-sorting analysis of fibronectin peptides binding to *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes.
J. Protozool., 35, 111-114, 1988.
- OUAISSI M.A., CORNETTE J., CAPRON A.
Trypanosoma cruzi: modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin.
Eur. J. Immunol., 15, 1096-1101, 1985.
- PETERSON D. S., WRIGTSMAN R. A., MANNING J. E.
Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat.
Nature, 322, 566-568, 1986.
- PIERSCHBACHER M. D, RUOSLAHTI E.
Influence of the stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion.
J. Biol. Chem., 262, 17294-17298, 1987.
- PIERSCHBACHER M.D., RUOSLAHTI E.
Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5985-5988, 1984.
- PIERSCHBACHER M.D., RUOSLAHTI E.
Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule.
Nature, 309, 30-33, 1984.
- PIETTA P.G., CAVALLO P.F., TAKAHASHI K. and MARSHALL G.R.
Preparation and use of benzhydrylamine polymers in peptide synthesis. II. Synthesis of thyrotropin releasing hormone, thyrocalcitonin 26-32, and elidoisin.
J. Org. Chem., 39, 44-48, 1974.
- PIRAS R., PIRAS M. M., HENRIQUEZ D.
Trypanosoma cruzi-fibroblastic cell interaction necessary for cellular invasion.
Ciba Foundation Symposium 99, Pitman Books, London, 31-51, 1983.

- PLOW E. F., PIERSCHBACHER M. D., RUOSLAHTI E., MARGUERIE G. A., GINSBERG H.
The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8057-8061, 1985.
- POSNETT D.N., Mc GRATH H. and TAM P.
A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor β -chain.
J. Biol. Chem., 263, 1719-1725, 1988.
- RIVAILLE P., MILHAUD G.
Synthèse en phase solide de la thyrocalcitonine humaine.
Helv. Chim. Acta, 55, 1617-1619, 1972.
- ROEPSTORFF P., HOJRUP P., MOLLER J.
Evaluation of Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry for sequence determination of peptides.
Biomed. Mass Spectrom., 12, 181-189, 1985.
- RUDINGER J. and BUETZER P.
In "Peptides", Y. Wolman Ed., p.211-219, Wiley: New York, 1974.
- RUOSLAHTI E., PIERSCHBACHER M. D.
New perspectives in cell adhesion: RGD and Integrins.
Science, 238, 491-497, 1987.
- SAKAKIBARA S. and SHIMONISHI Y.
Bull. Chem. Soc. Jpn., 38, 4921-4928, 1965.
- SHEEHAN J.C. and HESS G.P.
A new method of forming peptide bonds.
J. Amer. Chem. Soc., 77, 1067-1068, 1955.
- SHERNDAL A. E.
Chemistry and development of Atabrine and Plasmochin.
Chemical and engineering news, 21, 1154-1158, 1943.
- STANISLAWSKI L., SIMPSON W.A., HASTHI D., SHARON N., BEACHEY E.H., OFEK I.
Role of fibronectin in attachment of *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* to human cell lines and isolated oral epithelial cells.
Infection and Immunity, 48, 257-259, 1985.
- STEWART J.M., KNIGHT M., PAIVA A.C. and PAIVA T.
In "Progress in Peptide Research", S. Lande Ed., p.59-64, Gordon & Bred : New York-1972.
- STEWART J.M., PENA C., MATSUEDA G.R. and HARRIS K.
In "Peptides 1976", A. Loffet Ed., p.285-290, Editions de l'Université de Bruxelles : Belgium.

- ST PIERRE S., GAUDREAU P., DROUIN J. N., REGOLETI D., LEMAIRE S.
Synthesis of peptides by solid-phase method. IV. Des-Arg-bradikinin and analogs.
Can. J. Biochem., 57, 1084-1089, 1979.
- TAM J.P.
Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5409-5413, 1988.
- TAM J.P.
Multiple antigen peptide system: a novel design for synthetic peptide vaccine and immunoassay
In "*Synthetic Peptides : approaches to biological problems*", Alan R. Liss Inc., 3-18, 1989.
- TAM J.P., HEATH W.F. and MERRIFIELD R.B.
S_N1 and S_N2 mechanisms for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride.
Int. J. Peptide Protein Res., 21, 57-65, 1983.
- TAM J.P., HEATH W.F. and MERRIFIELD R.B.
S_N2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethylsulfide: evidence and application in peptide synthesis.
J. Am. Chem. Soc., 105, 6442-6455, 1983.
- TAM J.P., HEATH W.F. and MERRIFIELD R.B.
Improved deprotection in solid phase peptide synthesis removal of protecting groups from synthetic peptides by a S_N2 mechanism with low concentration of HF in dimethylsulfide.
Tetrahedron Letters, 23, 4435-4438, 1982.
- TAM J.P., WONG T.W., RIEMEN M.W., TJOENG F.S. and MERRIFIELD R.B.
Cyclohexyl ester as a new protecting group for aspartyl peptides to minimize aspartimide formation in acidic and basic treatments.
Tetrahedron Letters, 42, 4033-4036, 1979.
- TROUET A., BAURAIN R., DEPRez-De CAPENEERE D., MASQUELIER M., PIRSON P.
Targeting of antitumour and antiprotozoal drugs by covalent linkage to protein carriers.
Ed. GREGORIADIS, *Plenum Press, N. Y.*, 19-30, 1982.
- VEBER D.F., MILKOWSKI J.D., VARGA S.L., DENREWALTER R.G. and HIRSCHMANN R.
Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cystein.
J. Amer. Chem. Soc., 94, 5456-5461, 1972.
- VON ARX E., FAUPEL M. and BRUGGER M.
Das 4-4'-tetramethyldiamino-diphenylmethan reagens (TDM). Eine modifikation der chlor-o-tolidin farbereaktion für die dünnschicht-chromatographie.
J. of Chromatography, 120, 224-228, 1976.

WILLIAMS D. H, BRADLEY C. V., SANTIKARN S., BOJESEN G.
Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. A new technique for the
determination of molecular weights and amino acid sequences of
peptides.
Biochem. J., 201, 105-117, 1982.

WYLER D.J., SYPEK J.P., McDONALD J.A.
In vitro parasite monocyte interactions in human leishmaniasis:
possible role of fibronectin in parasite attachment.
Infection and Immunity., 49, 305-311, 1985.

YANG C. C., MERRIFIELD R. B.
The β -phenacyl ester as a temporary protecting group to minimize
cyclic imide formation during subsequent treatment of aspartyl
peptides with HF.
J. Org. Chem., 41, 1032-1041, 1976.



PPN 036117439

DEFOORT Jean-Philippe

ETUDE DE STRUCTURES PEPTIDIQUES MINIMALES SUSCEPTIBLES
D'INTERFERER AVEC L'INFECTION DE LA CELLULE HOTE PAR *TRYPANOSOMA*
CRUZI.

RESUME



La maladie de Chagas est une maladie à forte composante auto-immune, due à un protozoaire flagellé, *Trypanosoma cruzi*. Les traitements curatifs ou préventifs restent, à nos jours, encore peu satisfaisants. Nous avons alors étudié deux nouvelles stratégies de lutte basées sur l'inhibition de la fixation de la forme trypomastigote sur la cellule hôte, étape cruciale du cycle parasitaire.

-Nous avons synthétisé 60 analogues du tétrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser, peptide constitutif de la fibronectine et impliqué dans les phénomènes d'adhésion hôte-pathogène, afin de déterminer une structure plus spécifique du trypomastigote capable d'inhiber cette étape. Ces peptides ont été synthétisés par une méthode originale et performante: la synthèse multiple en phase solide. L'utilisation de la spectrométrie de masse FAB nous a également été précieuse pour la confirmation de structures peptidiques ainsi que pour la résolution de problèmes rencontrés au cours de ces synthèses. L'activité de ces différents analogues a été déterminée par l'inhibition de la fixation de la fibronectine sur le trypomastigote.

Différentes peptidyl-drogues, ont été synthétisées et testées en vue de réaliser le ciblage de drogue sur les trypomastigotes. Nous avons montré que les drogues choisies ont perdu leurs activités cytotoxiques. De plus, les peptides porteurs contenant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser ont vu leur capacité à se fixer sur le trypomastigote diminuer considérablement.

-L'immunisation de souris avec un peptide synthétique représentant une séquence répétitive d'une protéine de surface du trypomastigote, a permis de protéger partiellement ces souris contre une infection massive de pathogènes. Cependant, nous avons pu observer que ce peptide était à l'origine de désordres immunologiques évoquant les manifestations auto-immunes apparaissant au cours du développement de la maladie chez l'homme.

MOTS CLES

Trypanosoma cruzi, Synthèse multiple de peptides en phase solide, Spectrométrie de masse FAB, Fibronectine, Ciblage de drogue, Immunogène synthétique, Autoimmunité.