

50376
1993
250

50376
1993
250

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Année 1993

N° d'ordre : 1184

THESE DE DOCTORAT ^{de l'}UNIVERSITE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Jean-François GOOSSENS



RETOUR

**CONTRIBUTION A LA CONCEPTION DE MOLECULES AGONISTES DU
VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE**

présentée devant la commission d'examen le 11 octobre 1993

JURY

Président : Pr. Maurice PORCHET

Rapporteurs : Pr. Patrick ROBBERECHT

Dr. Michel NEUWELS

Membres : Dr. Jean-Pierre HENICHART

Dr. Maud COLLYN D'HOOOGHE

Pr. Daniel LESIEUR



030 050764 6

Ce travail a été effectué sous la direction scientifique de Monsieur Jean-Pierre HENICHART, Directeur de recherche à l'INSERM. Vous m'avez initié avec passion au Drug Design, me permettant ainsi d'aborder ce travail à la fois sur le plan de la chimie organique et de la pharmacologie. Je tiens à vous exprimer mes remerciements pour m'avoir guidé tout au long de ce travail, pour votre confiance à mon égard et pour votre soutien amical.

Monsieur Maurice PORCHET, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, me fait l'honneur de présider ce jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude.

Monsieur Patrick ROBBERECHT, Professeur de biochimie générale et humaine et Professeur de pharmacologie à la faculté de médecine de l'Université Libre de Bruxelles et Monsieur Michel NEUWELS, docteur d'état, ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs. Je les en remercie très sincèrement.

Monsieur Daniel LESIEUR, Professeur à la faculté de pharmacie de Lille, me fait l'honneur de siéger à ce jury. Par cette occasion, je me permet de le remercier particulièrement pour la qualité de son enseignement de Drug Design.

Madame Maud COLLYN d'HOOGHE, Directeur de recherche à l'INSERM, me fait l'honneur de siéger à ce jury. Je vous remercie de bien vouloir apporter votre expérience en matière de biologie cellulaire et moléculaire.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude toute particulière à Nicole POMMERY. Qu'il me soit permis de vous adresser mes respectueux remerciements pour l'attention constante, la patience et la grande disponibilité dont vous avez fait preuve à mon égard tout au long de ce travail.

Je tiens à adresser un grand merci à Christian BAILLY. Ton aide amicale m'a permis en de nombreuses occasions de mener à bien le travail de synthèse organique.

Enfin, je tiens à remercier toutes celles et tous ceux qui d'une façon ou d'une autre m'ont fait part de leur précieuse expérience et de leur soutien amical.

A mes parents, à ma famille et à tous mes amis

INTRODUCTION.....	1
I. LE VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE.....	5
I.A. DECOUVERTE.....	5
I.B. BIOSYNTHESE.....	7
I.B.1. Identification du gène.....	7
I.B.2. Régulation de l'expression du gène.....	9
I.C. DISTRIBUTION, ACTIVITES ET PATHOLOGIES ASSOCIEES AU VIP.....	13
I.C.1. Système nerveux central.....	13
I.C.2. Système nerveux périphérique.....	15
I.C.2.1. Organes cibles du VIP.....	16
I.C.2.2. VIP et différenciation neuronale.....	23
I.C.2.3. Tractus respiratoire.....	26
I.D. CONCLUSION.....	33
II. MODELES PHARMACOLOGIQUES ETUDIES.....	34
II.A. LE NEUROBLASTOME.....	34
II.A.1. Lignées SK-N-SH et LA-N : caractéristiques générales.....	34
II.A.1.1. La lignée SK-N-SH.....	34
II.A.1.2. La lignée LA-N.....	35
II.A.2. Différenciation cellulaire et marqueurs biochimiques.....	36
II.A.3. Résultats personnels sur l'effet de différenciation induit par le VIP.....	41
II.A.3.1. Différenciation morphologique.....	42
II.A.3.2. Expression de la transglutaminase de tissu (SK-N- SH) et incorporation de thymidine tritiée (LA-N-2).....	42
II.A.3.3. Systèmes de transduction activés par le VIP.....	47
II.A.3.3.1. Mesure de la concentration intracellulaire en AMPC.....	47

II.A.3.3.2. Modulation de l'activité TPK : pp60c-src.	50
II.B. LE MUSCLE LISSE DE TRACHEE DE COBAYE.	55
II.B.1. Rôles respectifs des cellules épithéliales et des cellules musculaires lisses.	55
II.B.2. Résultats personnels.	57
III. APPROCHE MOLECULAIRE : LIGAND-RECEPTEUR.	60
III.A. LIGAND : VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE.	60
III.A.1. Analyse conformationnelle : revue bibliographique.	60
III.A.1.1. Prédications conformationnelles.	61
III.A.1.2. Dichroïsme circulaire.	61
III.A.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire.	62
III.A.2. Résultats personnels.	64
III.A.2.1. Analyses conformationnelles théoriques.	64
III.A.2.1.1. Méthode de Chou et Fasman.	64
III.A.2.1.2. Méthode de Novotny et Auffray	65
III.A.2.1.3. Méthode d'analyse des zones hydrophobes (HCA : "Hydrophobic cluster analysis").	66
III.A.2.2. Etudes spectroscopiques du VIP(1-11).	68
III.A.2.2.1. Dichroïsme circulaire.	68
III.A.2.2.2. Résonance magnétique nucléaire.	69
III.A.2.2.3. Modélisation moléculaire.	72
III.B. RECEPTEUR(S) MEMBRANAIRE(S) DU VIP.	77
III.B.1. Connaissances bibliographiques.	77
III.B.1.1. Présentation du récepteur VIP.	77
III.B.1.2. Régulation du récepteur VIP.	82
III.B.1.2.1. Modulation du site de liaison et de l'activité de l'adénylate cyclase.	82
III.B.1.2.2. Régulation cellulaire du récepteur VIP.	83

III.B.2. Résultats personnels : mise en évidence de récepteurs VIP.	85
III.B.2.1. Cellules de neuroblastome.	85
III.B.2.2. Cellules épithéliales de trachée de cobaye.	89
III.B.2.3. Discussion.	91
IV. CONCEPTION ET REALISATION DE PSEUDOPEPTIDES AGONISTES DU	
VIP.....	93
IV.A. ELABORATION DE STRUCTURES PSEUDOPEPTIDIQUES.....	93
IV.A.1. Relations structure-activité.	93
IV.A.1.1. Résultats de la littérature.	93
IV.A.1.2. Discussion.	99
IV.A.2. Résultats personnels.	105
IV.A.2.1. Conception des molécules pseudopeptidiques.....	105
IV A.2.2. Modélisation moléculaire.....	110
IV.B. REALISATION ET POTENTIEL PHARMACOLOGIQUE DES	
PSEUDOPEPTIDES.....	118
IV.B.1. Synthèse.....	118
IV.B.1.1. Dérivés de la pyrrolidinone.	118
IV.B.1.2. Dérivés pyrroliques.	122
IV.B.2. Potentiel pharmacologique : déplacement du VIP radiomarqué	
et production d'AMPC.....	125
IV.B.2.1. Modèle des cellules de neuroblastome.	125
IV.B.2.2. Modèle des cellules épithéliales de trachée de	
cobaye.....	130
CONCLUSION	133
PARTIE EXPERIMENTALE.....	136
1- CULTURE CELLULAIRE.....	136
1-1. Cellules de neuroblastomes.....	136
1-2. Cellules épithéliales de trachée de cobaye.....	136
2- TESTS DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE.....	137

2-1. Différenciation morphologique.....	137
2-2. Dosage de l'activité transglutaminase de tissu.....	137
2-3. Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée.	139
3- RELAXATION DU MUSCLE LISSE DE TRACHEE DE COBAYE.	140
4- SYSTEMES DE TRANSDUCTION.	141
4-1. Dosage de l'AMPc intracellulaire par la technique de CLHP.	141
4-2. Mise en évidence de l'activité tyrosine kinase pp60c-src.....	143
5- ETUDES SPECTROSCOPIQUES DU FRAGMENT 1-11.....	144
5-1. Dichroïsme circulaire.....	144
5-2. Résonance magnétique nucléaire du proton.....	144
6- ETUDE DE LA LIAISON AUX RECEPTEURS.....	144
6-1. Cellules de neuroblastome.	144
6-2. Cellules épithéliales de trachée de cobaye.....	145
7- SYNTHÈSE CHIMIQUE.....	147
7-1. Synthèse en phase liquide.....	148
7-1.1. Dérivés de la pyrrolidinone.....	148
7-1.1.1. Pyrrolidinone 1.....	148
7-1.1.2. Pyrrolidinone 2.....	150
7-1.1.3. Pyrrolidinone 3.....	155
7-1.2. Dérivés du pyrrole.....	160
7-1.2.1. Bispyrrole non substitué (4).....	165
7-1.2.2. Bispyrrole monosubstitué (5).....	168
7-2. Synthèse en phase hétérogène.....	172
7-3. Purification par CLHP.	174
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

ACh :	Acétylcholine
ACTH :	Corticotrophine
AMPc :	Adénosine-Mono-Phosphate Cyclique
AR :	Acide Rétinoïque
CGRP :	Calcitonin Gene-Related Peptide
CRF :	Corticotropin Releasing Factor
dbAMPc :	N ⁶ , O ^{2'} - dibutyryl-AMPc
DMSO :	Dimethylsulfoxyde
FMLP :	N Formyl, L Méthionine, L Leucine, L Phénylalanine
GDP :	Guanosine-Di-Phosphate
GRF :	Growth Hormone Releasing Factor
GIP :	Gastric Inhibitory Polypeptide
GTP :	Guanosine-Tri-Phosphate
HEPES :	4-(2-Hydroxyethyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
HFIP :	1,1,1,3,3,3-Hexa-Fluoro-2-Propanol
LHRH :	Gonadoliberine
MeOH :	Méthanol
NANC :	Non Adrénergique Non Cholinergique
NGF :	Nerve Growth Factor
NKA :	Neurokinine A
NKB :	Neurokinine B
PACAP :	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PAF ;	Platelet Activating Factor
PHA :	Phytohemagglutinin
PHI :	Peptide having Nt Histidine and Ct Isoleucine amide
PHM :	Peptide having Nt Histidine and Ct Méthionine amide
PHV :	Peptide having Nt Histidine and Ct Valine amide
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
PMSF :	Phenyl-Methyl Sulfonyl-Fluoride
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SP :	Substance P
RMS :	Root Mean Square (racine carrée de la moyenne des écarts au carré)
TPA :	12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate
TPCK :	N-Tosyl-L-Phénylalanine Chloromethyl Ketone
VIP :	Vasoactive Intestinal Peptide

INTRODUCTION

Au cours des années 60, on tenait pour acquis que seules sept à huit molécules assuraient le rôle de neuromédiateur dans l'organisme. Ces molécules étaient soit des amines comme la noradrénaline ou l'acétylcholine, soit des acides aminés comme l'acide glutamique, la glycine ou encore l'acide gamma amino butyrique. Mais depuis les années 70, on a pu mettre en évidence dans des circuits neuronaux, des molécules de poids moléculaires beaucoup plus importants (jusqu'à plus de 3000), et susceptibles de jouer un rôle de neurotransmetteur. Ces molécules sont des peptides qui ont tout d'abord été découverts dans différents organes sous la dépendance du système nerveux périphérique. On conçoit très bien aujourd'hui qu'il s'agit de neuropeptides ayant une activité de neuromodulation pour un nombre considérable de fonctions physiologiques. Ces peptides ont été plus ou moins regroupés en familles structurellement proches. Deux des plus importantes sont celles qui regroupent les neurokinines et les peptides apparentés à la sécrétine. Cette dernière famille est composée de peptides composés en moyenne d'une trentaine d'acides aminés et qui, en majorité, ont la particularité de posséder une fonction amide C-terminale. Le peptide intestinal vasoactif (ou "Vasoactive Intestinal Peptide" : VIP dans sa terminologie anglosaxonne) est un des éléments de cette famille.

Le VIP est un peptide amide de 28 acides aminés qui exerce des activités variées sur de nombreuses cibles cellulaires et tissulaires (Said S.I., 1984). La mise en évidence du VIP dans de nombreuses fibres nerveuses a permis de comprendre que ce peptide pouvait interagir avec d'autres neurotransmetteurs de nature peptidique ou non. On peut citer par exemple la coexistence du VIP et de l'acétylcholine dans des neurones innervant des glandes exocrines (Lundberg J.M., 1981), du VIP et du PHI dans de nombreux tissus normaux et tumoraux (Yanaihara N. et coll., 1983) ou encore du VIP, des enképhalines et des catécholamines dans les cellules chromaffines granulaires (Eiden L.E. et Hotchkiss A.J., 1983; Le Boulenger F. et coll., 1983). Le VIP coexiste également avec des peptides tels que la substance P, la galanine et le neuropeptide Y dans des fibres nerveuses se projetant sur le poumon (Sundler F. et coll., 1988). Cette dernière observation a suggéré aux chercheurs qu'il existait une voie dite non-adrénergique, non-cholinergique (NANC) capable d'agir sur la relaxation des muscles lisses de

la trachée, des bronches et des artères pulmonaires (Diamond L. et coll., 1983; Hamasaki Y. et coll., 1983). D'autres activités impliquant la voie NANC ont été observées telles que la stimulation du transport de l'eau et d'électrolytes à travers l'épithélium trachéal (Nathanson I. et coll., 1983). Ces différentes études ont ainsi permis de montrer que ce système nerveux spécifique au poumon était probablement la composante relaxante dominante des voies respiratoires dans de nombreuses espèces animales (Said S.I., 1982).

Au niveau tissulaire, de nombreuses interactions entre le VIP et les différentes hormones ont été rapportées. Le VIP est capable d'induire à la fois la stimulation de la sécrétion de prolactine, d'ACTH, de LHRH ou de sérotonine et l'inhibition de la sécrétion de somatostatine, d'histamine ou de cholécystokinine (Said S.I., 1984). De même, le VIP est capable d'augmenter l'affinité de l'acétylcholine pour le récepteur muscarinique et de potentialiser ainsi la sécrétion cellulaire (Lundberg J.M. et coll., 1980).

Pour assurer ces nombreuses activités, il semble évident que la régulation du VIP doive être finement contrôlée au sein de l'organisme. mais dans certains cas pathologiques, on a pu constater des modifications de la quantité de peptide dans différents tissus . Les deux exemples les plus souvent cités sont les suivants :

(i). Lors de certaines bronchopathies chroniques, une dégradation enzymatique excessive induite par les cellules de l'inflammation (mastocytes, neutrophiles, éosinophiles) conduit à une disparition presque totale du VIP (Ollerenshaw S. et coll., 1989). Certaines observations ont montré que l'activité peptidasique au niveau des voies respiratoires figurait parmi les plus importants déterminants d'une action pharmacologique (Barrowcliffe M.P. et coll., 1986). Actuellement on sait que les enképhalinases interviennent pour dégrader le VIP au niveau de la trachée (Liu L.W. et coll., 1987). La chymase et la tryptase ont aussi été mises en cause dans cette dégradation (Caughey G.H. et coll., 1988).

(ii). Des tumeurs produisant du VIP ont été décrites tout d'abord au niveau du pancréas (Verner J.V. et Morrison A.B., 1958) mais également au niveau du jéjunum, de la thyroïde et du poumon (Said S.I. et Faloona G., 1975). Ce syndrome défini sous le terme "WDHA :

Watery Diarrhea Hypokalemia Achlorhydria" est associé à des taux plasmatiques de VIP pouvant être jusqu'à 10 fois supérieurs aux taux enregistrés chez des sujets témoins, ces concentrations induisant également des perturbations vasculaires.

Il apparaît donc clairement que la conception de molécules analogues du VIP, pseudo-voire non-peptidiques, non dégradables par les protéases, présenterait un intérêt thérapeutique particulièrement important. Les bases de la conception rationnelle de médicaments ("Drug Design") ont été élaborées depuis quelques années. Les recherches ont eu pour but d'obtenir des médicaments puissants présentant une meilleure sélectivité et une plus faible toxicité que les produits pharmaceutiques utilisés à l'heure actuelle (Fauchère J.L., 1986). Le problème complexe du "drug design" peptidique réside dans la grande flexibilité de ces molécules.

La détermination de la conformation du peptide capable d'être reconnu par le récepteur est une étape cruciale pour concevoir un composé idéal. La prédiction conformationnelle ou des études spectroscopiques telles que le dichroïsme circulaire ou la RMN à haut champ voire l'analyse cristallographique constituent les premières investigations pour le "drug design". Néanmoins, la détermination précise de la conformation grâce à laquelle le peptide peut se lier spécifiquement au récepteur spécifique est à l'heure actuelle très difficile (Milner-White J., 1989). L'application de contraintes conformationnelles à une structure peptidique semble constituer une des meilleures approches du problème. Les informations obtenues sur la liaison spécifique d'analogues plus rigides sont très intéressantes pour comprendre la conformation adoptée par le peptide parent. On a en effet pu constater une plus grande efficacité de liaison de certains composés de synthèse par rapport à la molécule naturelle. On peut citer par exemple le cas de la somatostatine (Veber D.F. et coll., 1979), de l' α -mélantropine (Knittel J.J. et coll., 1983) et aussi du VIP (Bolin D.R. et coll., 1993). L'avantage de telles molécules réside dans une plus grande durée de vie du potentiel actif grâce à une meilleure résistance face à la protéolyse par rapport au peptide naturel.

Dans le cadre de cette étude qui avait pour objectif final l'élaboration et la réalisation de molécules analogues du VIP, nous avons suivi le raisonnement suivant :

(i). Des modèles pharmacologiques ont été choisis en raison du rôle essentiel joué à leur niveau par le VIP. Il s'agit de la différenciation cellulaire neuronale et de la relaxation du muscle lisse de trachée. Ces deux modèles totalement différents pouvaient éventuellement nous permettre d'aborder l'hétérogénéité des récepteurs membranaires du peptide. Chaque modèle a été appréhendé par l'étude des activités en relation avec le VIP. Parmi celles-ci, l'activité adénylate cyclase reste la composante commune aux deux modèles retenus.

(ii). Une approche moléculaire du ligand a été élaborée grâce à l'utilisation à la fois de techniques spectroscopiques et de l'outil informatique (modélisation moléculaire de SYBYL). Nous avons, dans le cadre de ce travail, plus particulièrement étudié la partie N-terminale du peptide constituée principalement d'une structure ordonnée en coudes β . En raison de cette structure particulière qui a souvent été impliquée dans les mécanismes de reconnaissance moléculaire de peptides ou de protéines globulaires, nous pensons qu'elle pourrait constituer l'adresse du VIP. En effet, notre hypothèse de départ s'est basée sur une distinction empirique, au sein de la molécule peptidique, entre d'un côté une reconnaissance membranaire en terme d'affinité liée à une notion d'adresse du peptide et une reconnaissance de résidus appartenant au site récepteur capables d'activer un système de transduction, liée à une notion de message.

(iii). A partir de ces données, notre travail a abouti à la synthèse de molécules pseudopeptidiques dont la séquence N-terminale était remplacée par des structures non peptidiques. Leurs activités potentielles nous ont permis de discuter de l'importance de certains groupements fonctionnels du fragment 1-10.

Après une présentation du VIP, nous avons donc choisi d'élaborer le plan de cet exposé selon la même progression que celle réalisée lors de cette étude en insérant à chaque stade du développement les données bibliographiques et les résultats personnels directement en relation avec l'objectif de ce travail.

I. LE VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE

I. LE VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE.

I.A. DECOUVERTE.

Dans les années 70, de nombreuses recherches ont permis de mettre en évidence et d'isoler un certain nombre de structures peptidiques capables de jouer un rôle dans la modulation de différentes activités physiologiques. Parmi celles-ci, la substance P et le VIP ont été plus particulièrement étudiés par Chang M.M. et coll. (1971), Said S.I. et Mutt V. (1970) respectivement. Avant même l'isolement du VIP, les chercheurs connaissaient les propriétés d'une substance endogène dotée d'effet vasodilatateur. A partir d'extraits tissulaires de poumon, on a pu mettre en évidence la nature peptidique de cette substance; l'isolement du peptide a été réalisé à partir du duodénum de porc, par chromatographie d'échange de cations (Said S.I. et Mutt V., 1970). En raison de sa localisation première et de son activité, les auteurs ont nommé cette molécule : peptide intestinal vasoactif (ou "Vasoactive Intestinal Peptide" dans sa dénomination anglo-saxonne).

Les années qui ont suivi n'ont pas permis de classer ce peptide parmi les hormones gastro-intestinales puisqu'aucune étude n'avait pu démontrer à l'époque sa présence au niveau sanguin. La "redécouverte" du VIP dans le cerveau et les nerfs centraux et périphériques (Besson J. et coll., 1979; Larsson L.I. et coll., 1976) a établi l'identité véritable du peptide en tant que neurotransmetteur possédant des propriétés de neuromodulation.

C'est en 1974 que Mutt V. et Said S.I. ont publié la structure primaire du peptide: c'est un octacosapeptide possédant la particularité de présenter une fonction amide en C-terminal. D'autres neuropeptides, isolés pendant cette même période, ont des homologies de séquence avec le VIP et constituent ainsi la famille des peptides apparentés au VIP. Aujourd'hui sont inclus dans cette série: la sécrétine, le glucagon, le PHI, le PHM, le PACAP, le CRF, le GRF, la sauvagine, l'urotensine I, l'hélodermine, l'hélospectine et le GIP (**Figure 1**).

Le VIP a été mis en évidence dans de nombreuses espèces animales où on a pu noter une très faible variété de séquences primaires. Chez le cobaye (Du B.H. et coll., 1985) et le

SPECIES	PEPTIDE	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45
b/do/go/h/o/p/r/ra	<u>VIP</u>	H-S-D-A-V-F-T-D-N-Y-T-R-L-R-K-Q-M-A-V-K-K-Y-L-N-S-I-L-N-*									
gp	VIP	H-S-D-A-L-F-T-D-T-Y-T-R-L-R-K-Q-M-A-M-K-K-Y-L-N-S-V-L-N-*									
c	VIP	H-S-D-A-V-F-T-D-N-Y-S-R-F-R-K-Q-M-A-V-K-K-Y-L-N-S-V-L-T-*									
b	PHI	H-A-D-G-V-F-T-S-D-Y-S-R-L-L-G-Q-L-S-A-K-K-Y-L-E-S-L-I-*									
p/ra	PHI	H-A-D-G-V-F-T-S-D-F-S-R-L-L-G-Q-L-S-A-K-K-Y-L-E-S-L-I-*									
gp	PHI	H-A-D-G-V-F-T-S-D-F-S-R-L-L-G-Q-L-S-A-R-K-Y-L-E-S-L-I-*									
r	PHI	H-A-D-G-V-F-T-S-D-Y-S-R-L-L-G-Q-I-S-A-K-K-Y-L-E-S-L-I-*									
r	PHI-G	H-A-D-G-V-F-T-S-D-Y-S-R-L-L-G-Q-I-S-A-K-K-Y-L-E-S-L-I-G									
r	PHV (1-42)	H-A-D-G-V-F-T-S-D-Y-S-R-L-L-G-Q-I-S-A-K-K-Y-L-E-S-L-I-G-K-R-I-S-S-S-I-S-E-D-P-V-P-V									
h	PHM	H-A-D-G-V-F-T-S-D-F-S-K-L-L-G-Q-L-S-A-K-K-Y-L-E-S-L-M-*									
h	PHV (1-42)	H-A-D-G-V-F-T-S-D-F-S-K-L-L-G-Q-L-S-A-K-K-Y-L-E-S-L-M-G-K-R-V-S-S-N-I-S-E-D-P-V-P-V									
b/p/gp	SECRETIN	H-S-D-G-T-F-T-S-E-L-S-R-L-R-D-S-A-R-L-Q-R-L-L-Q-G-L-V-*									
b/p	SECRETIN variants	H-S-D-G-T-F-T-S-E-L-S-R-L-R-D-S-A-R-L-Q-R-L-L-Q-G-L-V-G(K-R)									
h	SECRETIN	H-S-D-G-T-F-T-S-E-L-S-R-L-R-E-G-A-R-L-Q-R-L-L-Q-G-L-V-*									
r	SECRETIN	H-S-D-G-T-F-T-S-E-L-S-R-L-Q-E-G-A-R-L-Q-R-L-L-Q-G-L-V-*									
d	SECRETIN	H-S-D-G-T-F-T-S-E-L-S-R-L-R-E-S-A-R-L-Q-R-L-L-Q-G-L-V-*									
ra	SECRETIN	H-S-D-G-T-L-T-S-E-L-S-R-L-R-E-R-A-R-L-Q-R-L-L-Q-G-L-L-*									
c	SECRETIN	H-S-D-G-L-F-T-S-E-Y-S-K-M-R-G-N-A-Q-V-Q-K-F-I-Q-N-L-M-*									
o	PACAP 38	H-S-D-G-I-F-T-D-S-Y-S-R-Y-R-K-Q-M-A-V-K-K-Y-L-A-A-V-L-G-K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K-*									
hs	HELODERMIN	H-S-D-A-I-F-T-E-E-Y-S-K-L-L-A-K-L-A-L-Q-K-Y-L-A-S-I-L-G-S-R-T-S-P-P-P-S									
hh	HELOSPECTIN(S)	H-S-D-A-T-F-T-A-E-Y-S-K-L-L-A-K-L-A-L-Q-K-Y-L-E-S-I-L-G-S-S-T-S-P-R-P-P-S-(S)									
		1	5	10	15	20	25	30	35	40	45

Figure 1. Séquences en acides aminés des peptides de la famille du VIP. **Espèces :** b : bovin, c : poulet, do : chien, go : chèvre, gp : cobaye, h : homme, hh : lézard (heloderma horrid), hs : lézard (heloderma suspectum), o : ovin, p : porc, r : rat, ra : lapin. Les différences avec le VIP de bœuf sont soulignées. * = NH₂, d'après Christophe J. et coll., 1988.

poulet (Nilsson A., 1974), le VIP possède quatre acides aminés différents par rapport à sa séquence chez le porc (Carlquist M. et Jörnvall H., 1982), le bœuf, le chien et l'homme (Mutt V., 1988). Il est de plus à noter que ces différences de composition ne concernent que des modifications mineures (c'est-à-dire sans changement au niveau des groupements fonctionnels).

I.B. BIOSYNTHESE.

I.B.1. Identification du gène.

La séquence génomique codant pour le précurseur du VIP a été déterminée en 1983 à partir de cellules de neuroblastomes humains (lignée NB1) (Itoh N. et coll., 1983) et sa localisation sur le chromosome 6 (6 q 24) a été mise en évidence par Gozes I. (1988). La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique indique que le précurseur protéique contient non seulement le VIP mais aussi le PHM. Ce gène possède 8837 paires de bases et s'organise en sept exons et six introns (**Figure 2**) :

- l'exon 1 (165 paires de bases) code pour une région non traduite en 5' du gène (région flanquante en 5');
- l'exon 2 (117 paires de bases) code à la fois pour le reste de la région en 5' non traduite, pour le peptide signal et pour une partie de la région amino terminale du prépro VIP/PHM;
- l'exon 3 (123 paires de bases) code pour la plus grande partie de la région N_t;
- l'exon 4 (105 paires de bases) code pour la séquence du PHM et pour une partie de la région qui sépare la séquence du PHM et du VIP;
- l'exon 5 (132 paires de bases) code à la fois pour le reste de la région de séparation entre le PHM et le VIP, pour la séquence du VIP et pour une partie de la région C_t du prépro VIP/PHM;
- l'exon 6 (89 paires de bases) code pour la plus grande partie de la région C_t et pour une partie de la région flanquante en 3' du gène;
- l'exon 7 (724 paires de bases) code pour le reste de la région en 3'.

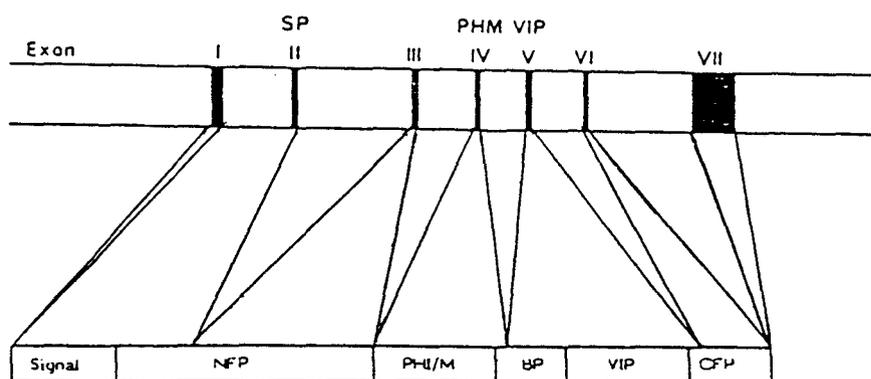


Figure 2. Schéma du gène comportant le PHM et le VIP et de la protéine "préprovasoactive intestinal peptide". **NFP** : région flanquante amino-terminale. **BP** : région intermédiaire. **CFP** : région flanquante carboxy-terminale, d'après Yamagami T. et coll., 1988.

La comparaison des séquences nucléotidiques du VIP et du PHM montre une homologie de séquence nucléotidique de 52%, ce qui correspond à 44% d'homologie en acides aminés. De plus, comme le VIP et le PHM sont codés par deux exons contigus, de nombreux auteurs ont émis l'hypothèse d'une duplication d'un gène ancestral. Cette remarque a également été faite pour d'autres gènes tels que glucagon et peptide glucagon-like (Bell G.I. et coll., 1983) ou encore calcitonine et son peptide apparenté (Jonas V. et coll., 1985). Dans le cas du prépro VIP/PHM, la duplication du gène ancestral semble concerner une large séquence nucléotidique puisqu'à la fois les exons et les introns adjacents du PHM et du VIP sont très conservés (**Figure 3**). Par ailleurs, dans la région 5' du génome, quatre séquences *TATA box* (enchaînement caractéristique TATAAA T/A) ont été mises en évidence en amont du site d'initiation de la transcription (Itoh N. et coll., 1983). Mais seule la *TATA box* située 28 paires de base avant le site de fixation de l'ARN polymérase est le promoteur inductible du gène VIP/PHM. L'hypothèse selon laquelle les trois autres *TATA box* pourraient être fonctionnelles dans certaines conditions ou dans certains autres types cellulaires n'a, à ce jour, pas encore pu être démontrée.

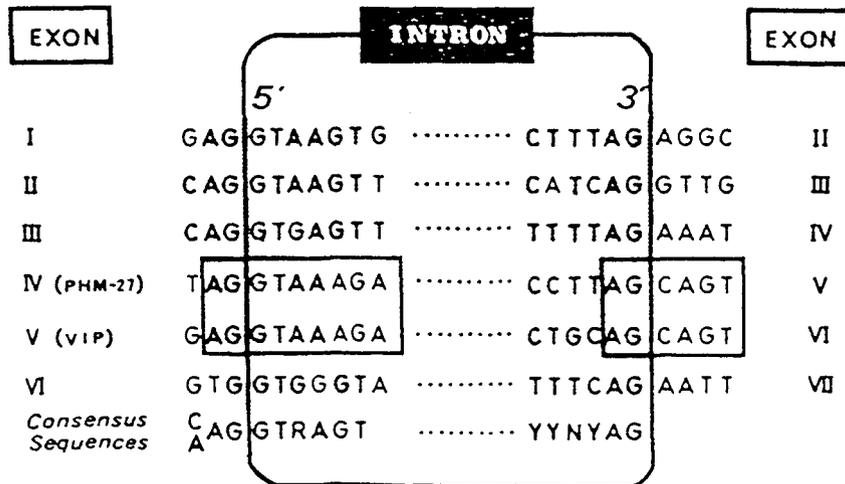


Figure 3. Séquences nucléotidiques conservées autour des régions d'épissage. Les nucléotides encadrés sont identiques dans les introns IV et V. R : purine, Y : pyrimidine, N : nucléotide, d'après Yamagami T. et coll., 1988.

I.B.2. Régulation de l'expression du gène.

Différents travaux portant soit sur la transcription ou l'expression du gène soit sur des modifications de cette transcription ont mis en évidence la complexité des processus de régulation. L'induction du gène peut être réalisée expérimentalement par le dibutyryl-AMPC ou par des esters de phorbol tels que le TPA sur les cellules NB1. Ceci est à rapprocher de la mise en évidence dans ces mêmes cellules de séquences consensus de forte homologie avec les éléments de réponse à l'AMPC (CRE : "cAMP responsive element") (Short J.M. et coll., 1986) ou aux esters de phorbol (Comb M. et coll., 1986). D'autres auteurs ont pu démontrer la régulation de l'activité du gène par des stéroïdes tels que la corticostérone ou par la prolactine (Gozes I., 1988). De façon générale, une régulation de l'expression du gène a été mise en évidence au cours des processus de développement suggérant que le VIP pourrait avoir un rôle de facteur de différenciation (Gozes I., 1988). En effet, sur le chromosome 6, on peut trouver à proximité l'un de l'autre le gène du VIP et le gène codant pour une protéine nucléaire, le protooncogène *c-myb*, ce qui incite les auteurs à soupçonner une relation fonctionnelle entre VIP et le produit de *c-myb*. L'expression rapide au niveau du tissu neuronal post-natal montre qu'ils sont sans doute impliqués dans le développement du cerveau.

La régulation de l'expression du gène a également été étudiée au niveau post-transcriptionnel, et de multiples formes d'ARN issues de la transcription du gène (précurseur de ARNm inclus) ont été détectées et caractérisées (Gozes I., 1988). Contrairement à la plupart des gènes, pour lesquels le transcrit primaire est labile, les précurseurs ARN (7000 bases) qui contiennent la séquence du VIP renferment des introns stables. Ceci suggère un mécanisme de régulation par stockage des ARN comme cela a été démontré pour d'autres peptides tels que la calcitonine (Amara S.G. et coll., 1982) ou la vasopressine (Sausville E. et coll., 1985) qui, comme le VIP, sont des peptides impliqués dans des communications intercellulaires (Bloom F.E. et coll., 1985). Au niveau post-translationnel, la protéine précurseur du VIP (11000 daltons), possède des sites de glycosylation suggérant également une possible régulation (Itoh N. et coll., 1983).

Les études concernant la régulation de la biosynthèse du VIP en présence de certains composés endogènes et/ou exogènes ont été réalisées sur différents types cellulaires de différentes espèces animales. La synthèse du VIP sur ces lignées cellulaires peut être modulée par différentes substances. Par exemple, des cellules humaines de phéochromocytome ou des cellules chromaffines (cellules tumorales ayant comme origine les glandes surrénales) ont une production en VIP qui peut être augmentée par le NGF (*Nerve Growth Factor*), alors que la dexaméthasone inhibe cet accroissement (Tischler A.S. et coll., 1984; Tischler A.S. et coll., 1985). Par contre, des cellules chromaffines de bovins ne synthétisant pas des concentrations en VIP détectables, sont capables de produire et de stocker le peptide sous l'action de fortes concentrations en K^+ ou d'agonistes cholinergiques. Par ailleurs, la libération du VIP dans le milieu extracellulaire est également dépendante du calcium. De plus, cette production peut être fortement accrue par l'action de composés capables d'activer l'adénylate cyclase tels que la forskoline (Eiden L.E. et Hotchkiss A.J., 1983). L'utilisation des esters de phorbol comme le TPA (composés capables d'activer directement la protéine kinase C) provoque également une élévation de la quantité de VIP dans le milieu extracellulaire. L'action combinée de ces deux types de composés (l'un activant PKA, l'autre PKC) conduit à un effet additif (Pruss R.M. et coll., 1985). Ceci se retrouve d'ailleurs sur une toute autre lignée cellulaire produisant du VIP :

les cellules humaines de neuroblastome où on observe une synergie d'action du TPA et du dibutyryl-AMPc (Ohsawa K. et coll., 1985).

Un dernier type de régulation concerne le processus d'amidification de la fonction COOH terminale du peptide. En effet, la mise en évidence d'une enzyme spécifique suggère un possible mécanisme post-traductionnel (Bradbury A. F. et coll., 1982). Cette enzyme admet comme cofacteur l'ascorbate qui est capable d'augmenter la concentration en VIP du milieu extracellulaire de cellules murines de neuroblastome. De plus, un effet synergique est observé si les cellules sont incubées à la fois avec la forskoline et l'ascorbate (Brick P.L. et coll., 1985). Ces différents exemples cités sont résumés dans le **Tableau 1**.

Facteurs	Cellules endocrines humaines	Neuroblastomes murins	Cellules chromaffines bovines	Références
Agents augmentant l'AMPc intracellulaire	- ↑ proVIP/PHM ^a - ↑ VIP mRNA ^b	↑ VIP dans les cellules et dans le milieu ^c	↑ VIP dans les cellules et dans le milieu ^d	(a) Obata K-I. et coll., 1981 (b) Hayakawa Y. et coll., 1984 (c) Brick P.L. et coll., 1985 (d) Eiden L.E. et Hotchkiss A.J., 1983
Esters de phorbol	- ↑ VIP mRNA ^e - synergie avec l'AMPc ^e - pas d'amplification de gène ^e	?	- ↑ VIP dans les cellules et dans le milieu ^f - effet additif avec l'AMPc ^g	(e) Ohsawa K. et coll., 1985 (f) Pruss R.M. et coll., 1985 (g) Beinfeld M.C. et coll. 1988
Acide ascorbique	?	- ↑ VIP dans les cellules et dans le milieu ^g - synergie avec l'AMPc ^c	?	(c) Brick P.L. et coll., 1985 (g) Beinfeld M.C. et coll. 1988
NGF	↑ VIP accompagné d'extension de neurites ^{h,i}	?	?	(h) Tischler A.S. et coll., 1984 (i) Tischler A.S. et coll., 1985
Dexaméthasone	↓ VIP accompagné d'une inhibition de l'extension de neurites ^{h,i}	?	?	(h) Tischler A.S. et coll., 1984 (i) Tischler A.S. et coll., 1985
Potassium, Veratridine, Nicotine	?	?	↑ VIP dans les cellules et dans le milieu ^j	(j) Waschek J.A. et coll., 1987

Tableau 1. Facteurs impliqués dans la modulation de la biosynthèse du VIP, d'après Beinfeld M.C. et coll., 1988.

I.C. DISTRIBUTION, ACTIVITES ET PATHOLOGIES ASSOCIEES AU VIP.

La distribution du VIP est ubiquitaire et les effets physiologiques observés sont très variés. Bien que sa mise en évidence au niveau de l'intestin puisse le classer parmi les hormones gastro-intestinales comme la sécrétine et le glucagon, le VIP est un neuropeptide clairement localisé au niveau de neurones des systèmes nerveux central et périphérique.

I.C.1. Système nerveux central.

Par des techniques classiques d'immunohistochimie, de nombreuses études ont montré sa présence au niveau du cortex cérébral (Morrison J.H. et coll., 1984). Plus précisément, le VIP est localisé dans des neurones bipolaires orientés de façon radiale par rapport à la pie-mère (Connor J.R. et Peters A., 1984). L'arborisation de ces cellules neuronales est très spécifique. En effet, elle se situe au niveau des couches I et V, ce qui implique une libération du VIP dans des zones bien précises du cortex (**Figure 4**). Ces neurones intracorticaux ont des corps cellulaires répartis entre les couches II et IV avec une prédominance au niveau de cette dernière. La densité des neurones bipolaires a pu être déterminée au niveau du cortex visuel : elle est de 1 cellule pour $27 \mu\text{m}^2$ avec un diamètre de $3 \mu\text{m}$. Ces neurones représentent une sous-classe de cellules bipolaires décrite par Peters et Kimerer en 1981. Ainsi ce type cellulaire possède la particularité de transmettre une information entre la pie-mère et la couche V à travers ce que l'on définit comme étant une colonne radiale étroite (**Figure 5**). La libération du VIP intervient donc à des endroits bien localisés du cortex. On distingue différents modes de relargage, soit par l'intermédiaire de synapse lorsque la cible est un autre neurone, soit selon un mode non synaptique dans le cas de cellules gliales ou de cellules vasculaires (Magistretti P.J., 1986), ce deuxième mode intervenant surtout au niveau de la couche I (Edvinsson L. et coll., 1980).

Cette organisation des neurones bipolaires contenant du VIP a été comparée au système noradrénergique en raison de l'effet similaire produit sur les différentes cellules cibles, c'est-à-dire la production d'AMPC. Le système noradrénergique afférent est constitué de fibres nerveuses originaires du noyau du locus cœruleus (Morrison J.H. et coll., 1978).

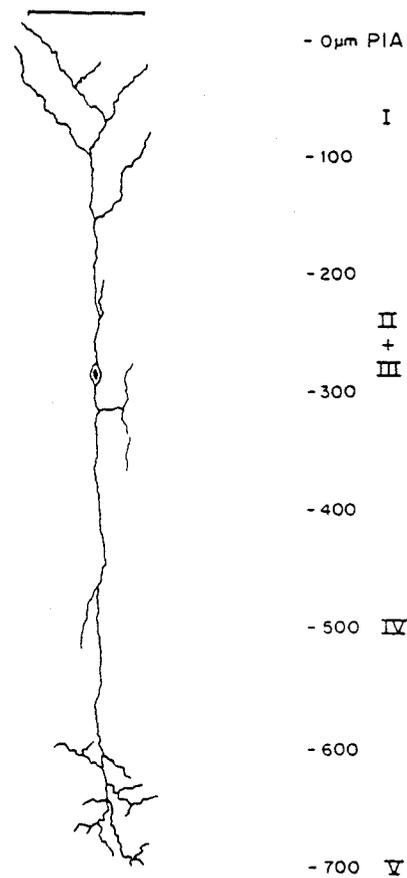


Figure 4. Cellule bipolaire contenant du VIP. Ramification axo-dendritique dans les couches corticales I et V, d'après Morrison J.H. et coll, 1984.

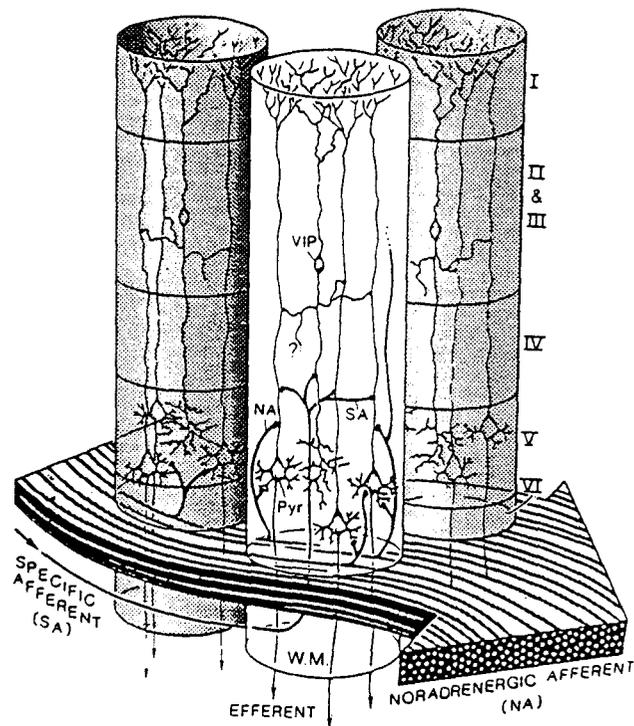


Figure 5. Colonnes radiales étroites. VIP : cellules bipolaires contenant du VIP. NA : neurones afférents noradrénergiques. SA : afférents spécifiques provenant du thalamus. PYR : cellule pyramidale possédant de nombreuses projections afférentes. WM: substance blanche souscorticale. I à VI : couches corticales, d'après Bouras C. et coll., 1987.

La trajectoire suivie reliant le pôle frontal au pôle occipital du cortex se fait principalement à travers la couche VI et se situe parallèlement à la surface de la pie-mère (**Figure 5**) (Bouras C. et coll., 1987). Contrairement aux cellules bipolaires, le système noradrénergique possède une action globale au niveau du cortex (Foote S.L. et Morrison J.H., 1987). Les rôles de régulation de chaque neurotransmetteur semblent donc indépendants; néanmoins certaines zones du cortex (couches IV et V) contiennent les deux types de terminaisons nerveuses. Ceci a suggéré une possible action commune des deux neurotransmetteurs. En effet, une synergie d'action sur la production d'AMPC a pu être démontrée au niveau de zones corticales appelées "points chauds" ("*hot spot*") (Magistretti P.J. et Schorderet M., 1984).

La stimulation des neurones intracorticaux contenant du VIP n'est pas documentée. Par analogie avec d'autres neurones bipolaires (Morrison J.H. et coll., 1984), de nombreuses observations suggèrent que les neurones contenant du VIP pourraient être activés par des stimulations sensorielles relayées par des fibres afférentes originaires du thalamus (Peters A. et Kimerer L.M. 1981; Morrison J.H. et coll., 1984). Ainsi, cette activation pourrait constituer un processus de neuromodulation du système noradrénergique afférent dans le cortex sensoriel primaire (Magistretti P.J. et coll., 1981).

I.C.2. Système nerveux périphérique.

Des terminaisons nerveuses détectées par immunoréactivité ont pu être visualisées dans de nombreux tissus périphériques au sein desquels le VIP joue pleinement son rôle de neuromodulateur. Les exemples sont nombreux; nous ne citerons ici que les études réalisées sur les principaux organes cibles du peptide en distinguant plus particulièrement celles concernant l'influence du VIP sur la différenciation neuronale et les voies respiratoires, dont l'importance a justifié notre choix pour l'approche pharmacologique de ce travail.

I.C.2.1. Organes cibles du VIP.

Système gastrointestinal

Dans un premier temps, des études du système gastrointestinal de différentes espèces animales ont été rapportées. La grande majorité des neurones contenant le VIP ont une origine intrinsèque au tissu, avec des corps cellulaires se situant dans les ganglions sous-muqueux et myentériques. Les fibres nerveuses se projettent sur les muscles circulaires et longitudinaux ou encore sur la sous-muqueuse. Ce réseau nerveux constitue le système moteur inhibiteur du tractus gastrointestinal (Figure 6) (inhibition de la contraction) (Costa M. et Furness J.B., 1983). Les cibles cellulaires du VIP sont de deux types au niveau de l'intestin; il s'agit d'une part des cellules musculaires lisses permettant de réguler la motilité intestinale (Gnider J.R. et coll., 1985) et d'autre part des cellules épithéliales responsables de la sécrétion d'eau et d'électrolytes comme notamment les ions chlorure (Dharmasathaphorn K. et coll., 1985). La caractérisation de sites récepteurs spécifiques sur les cellules musculaires (Bitar K.N. et Jensen R.T., 1983; Power R.F. et coll., 1988) montre que le peptide agit directement sur la relaxation de la musculature gastrique et intestinale (Bitar K.N. et Maklouf G.M., 1982). D'autres récepteurs situés au niveau intestinal ont été localisés à la surface membranaire des cellules épithéliales (Izzo R.S. et coll., 1991). La fixation du VIP sur le récepteur épithélial produit une sécrétion d'ions Cl^- qui est dépendante d'un système de cotransport Na^+ , K^+ , Cl^- à la surface basolatérale de la cellule (Dharmasathaphorn K. et coll., 1985).

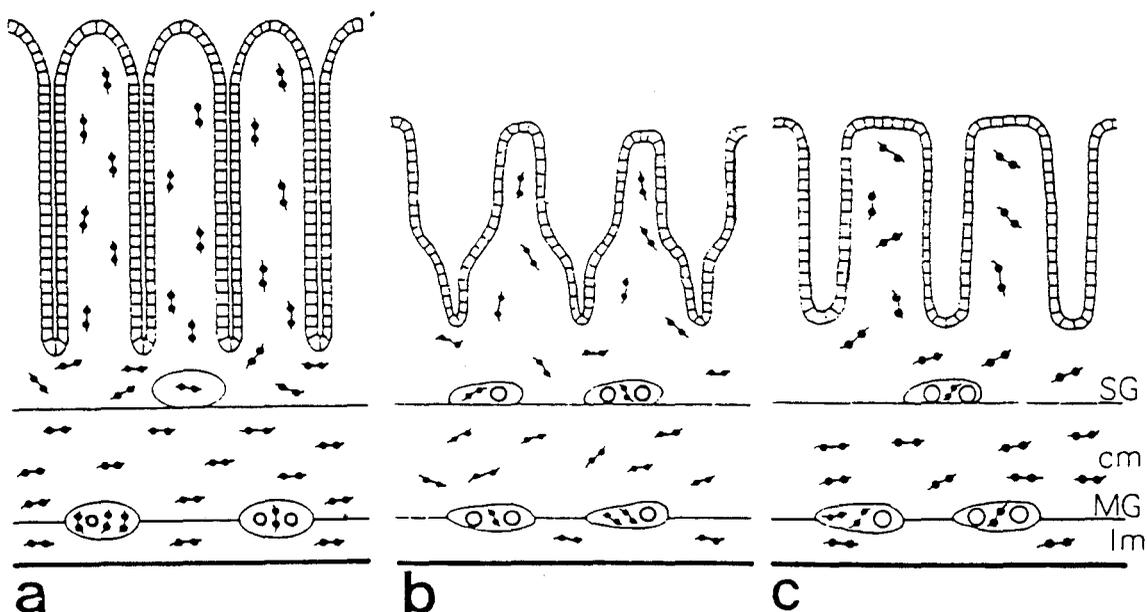


Figure 6. Schéma topographique des fibres nerveuses contenant du VIP (—●—) chez le rat au niveau (a) de l'estomac, (b) de l'intestin grêle, (c) du gros intestin. (O) : corps cellulaires des fibres nerveuses contenant du VIP. MG : ganglion myentérique. SG : ganglion sous-muqueux. lm : muscle longitudinal. cm : muscle circulaire. d'après Sundler F. et coll., 1988.

Le VIP est présent au niveau du sphincter œsophagien (Biancini P. et coll., 1984) et du sphincter du colon (Biancini P. et coll., 1985). La relaxation de ces organes est assurée par le VIP qui est à ce niveau le principal médiateur des neurones appartenant au système inhibiteur non adrénérgique non cholinérgique (NANC) (Goyal R.K. et coll., 1980). Actuellement, une absence ou un dysfonctionnement des neurones contenant le VIP n'a pu être démontré comme étant la cause unique de désordre de la motilité. Néanmoins, la nette diminution voire l'absence de ces neurones a été observée pour certaines pathologies liées soit à l'ouverture du sphincter œsophagien (achalasia) soit à la propagation du péristaltisme de l'œsophage (spasme œsophagien) (Aggestrup S. et coll., 1983). Deux autres pathologies du tractus gastrointestinal semblent liées à une absence ou un dysfonctionnement de neurones VIPérgiques. La maladie de Hirschsprung résulte de l'obstruction des portions distales de l'intestin due à une absence congénitale de cellules ganglionnaires dans cette zone du colon (Lavery I.C., 1984). Ainsi l'absence de toute structure neuronale implique que le segment intestinal est incapable de mouvement de relaxation (inhibition de la contraction). Une étude comparative de l'innervation chez l'homme a montré qu'un segment de colon déficient en structure ganglionnaire ne possédait aucun neurone VIPérgique contrairement à une portion de colon sain (Tsuto T. et coll., 1982).

La maladie de Chagas est une infection par le trypanosome *Cruzi*, ayant pour conséquence une dégénérescence neuronale intrinsèque du tractus gastrointestinal. Les neurones VIPérgiques, comme beaucoup d'autres sont ainsi détruits (Long R.G. et coll., 1980).

Foie, glandes exocrines et endocrines

L'activité neuromodulatrice du VIP a également été étudiée sur des tissus en relation avec le tractus gastrointestinal. Le foie, le pancréas, les glandes salivaires sont des cibles du peptide. Tout d'abord, le **foie** semble être une cible très particulière pour le VIP. Le tractus gastrointestinal est la source quasi exclusive du VIP endogène présent au niveau de la circulation portale où des quantités détectables de peptide ont pu être dosées après stimulation vagale (Bloom S.R. et Edwards A.V., 1980). Des auteurs ont proposé que l'entrée d'aliment

dans l'intestin serait susceptible de provoquer une libération de VIP à partir des neurones inhibiteurs (Raid A.M. et coll., 1985). Le test du bol alimentaire montre, de plus, que la quantité de VIP augmente au niveau portal mais non dans la circulation systémique (Wolfe M.M. et coll., 1983). Des récepteurs spécifiques de haute affinité pour le VIP ont été mis en évidence à la surface membranaire des hépatocytes (Misbin R.I. et coll., 1982). La liaison du VIP au récepteur entraînerait une internalisation du complexe ligand-récepteur et une dégradation dans des lysosomes. Ainsi, dans des conditions normales, l'action du VIP s'exercerait localement au niveau intestinal et l'épuration du peptide serait réalisée par le foie (Wolfe M.M. et coll., 1983).

Le **pancréas** est aussi une cible très importante du VIP dans ses fonctions de glande endocrine et exocrine. Des fibres nerveuses contenant le VIP ont été localisées à la fois à la périphérie des îlots de Langerhans (Schebalin M. et coll., 1977) et autour des acini et des vaisseaux sanguins (Larsson L.I. et coll., 1978). Des expériences sur des volontaires sains ont montré que l'infusion intraveineuse de grandes quantités de VIP provoquait une stimulation de la sécrétion d'insuline et de glucagon (Fahrenkrug J. et coll., 1987). Par ailleurs, le VIP agit sur le pancréas exocrine en stimulant la sécrétion de fluide et de bicarbonate (Holst J.J. et coll., 1984). Cette action du VIP est en partie due à l'augmentation du flux sanguin et à l'effet direct sur les éléments sécrétoires. Cette observation se vérifie sur les **glandes salivaires** où le VIP stimule la sécrétion de l'amylase à partir des glandes parotides chez le rat (Dehaye J.P. et coll., 1985). Le VIP potentialise l'action de l'acétylcholine sur la sécrétion salivaire, ceci étant facilité par la colocalisation des deux neurotransmetteurs dans des fibres cholinergiques (Lundberg J.M. et coll., 1982). On peut également citer des études qui ont permis de mettre en évidence la présence de terminaisons nerveuses et le rôle du VIP sur les **glandes thyroïde** (Ahren B. et coll., 1980) et **surrénales** (Alm P. et coll., 1980) ou encore au niveau de l'appareil génital de différents mammifères. En effet, le VIP est capable d'augmenter la sécrétion endocrine et de moduler soit la dilatation des tissus érectiles chez le mâle (vaisseaux sanguins et muscles lisses) (Dail W.G. et coll., 1983) soit d'inhiber l'activité motrice du muscle lisse utérin (Ottesen B. et coll., 1981).

Un dysfonctionnement de la synthèse du VIP a été observé dans le cas de différentes pathologies du pancréas. Un excès de synthèse du VIP par les cellules pancréatiques a été évoqué dans le syndrome de Verner-Morrison (Verner J.V. et Morrison A.B., 1958). Cette pathologie du pancréas est un syndrome cholérique qui entraîne de fortes diarrhées accompagnées d'une hypokaliémie, d'une hypochlorhydrie et d'une acidose. Il s'agit d'une tumeur des cellules pancréatiques qui deviennent alors capables de synthétiser et de sécréter de grandes quantités de VIP que l'on retrouve dans le plasma (Unwin R.J. et coll., 1982). Ce type de dysfonctionnement appelé également VIPome, entraîne des effets périphériques néfastes sur différents tissus via la perte de contrôle de la synthèse du peptide. Néanmoins, certains auteurs semblent en désaccord avec cette relative évidence. En effet, d'une part certains patients atteints du syndrome de Verner-Morrison n'ont pas de taux plasmatiques élevés en VIP bien que tous les autres symptômes soient identiques chez la plupart des malades (Unwin R.J. et coll., 1982). D'autre part, chez des personnes saines, des taux élevés plasmatiques ont pu être décelés (Ginsberg A.L., 1978). De plus, la tumeur des îlots de Langerhans produit de nombreux peptides en forte quantité ce qui pourrait laisser supposer que le VIP ne serait pas le seul médiateur du syndrome cholérique. Néanmoins par infusion prolongée intestinale de VIP chez des sujets sains (10h) on peut reproduire les différentes caractéristiques rencontrées dans cette pathologie en amenant le taux plasmatique en VIP au niveau de celui des patients (150 pmol/l par rapport au taux normal de 10 pmol/l) (Krejs G.J., 1988). Ainsi, on a pu noter d'une part l'abolition de l'absorption d'eau du jéjunum, de l'iléon et du colon et d'autre part une modification des mouvements ioniques dans le sérum telle que l'augmentation d'ions chlorure et la diminution d'ions bicarbonate ce qui entraîne à la fois des symptômes de diarrhée et d'acidose métabolique (Krejs G.J., 1988). Cette étude est tout à fait en accord avec une implication du VIP dans les phénomènes liés au syndrome de Verner-Morrison. Des effets secondaires sont fréquemment observés pour certains VIPomes. Principalement des désordres cardiovasculaires tels que l'hypotension, la tachycardie ou encore l'apparition de rougeurs cutanées ("flush") sont enregistrés à la fois chez des patients atteints du syndrome pancréatique et chez des volontaires sains ayant reçu des infusions de VIP. Chez ces derniers, on a pu noter une baisse de 30% des résistances périphériques et une augmentation du flux sanguin de 270%

produisant des désordres du rythme cardiaque et une forte baisse de la pression artérielle (Krejs G.J. et coll., 1980).

L'hypokaliémie varie très peu d'un patient à un autre mais peut devenir suffisamment sévère pour entraîner une tétraplégie temporaire. On a pu également observer des symptômes de douleurs abdominales ainsi qu'une perte de poids non liée à la déshydratation (Long R.G. et coll., 1981).

Systèmes cardiovasculaire et immunitaire.

En raison de son activité vasodilatatrice, de nombreuses études ont montré un rôle physiologique important du VIP sur le **système cardiovasculaire**. L'innervation cardiaque montre clairement l'implication du peptide sur des régions fonctionnelles primordiales du cœur des mammifères (Della N.G. et coll., 1983) comme le plexus nerveux périsvasculaire et le système coronarien (Weihe E. et coll., 1984) avec une prédominance dans les artères plutôt que dans les veines coronaires (**Figure 7**). L'influence du VIP sur l'innervation cardiaque intrinsèque n'est pas actuellement bien comprise mais son importance dans la régulation des paramètres cardiaques ne fait aucun doute puisqu'on décèle de fortes concentrations en peptide dans les centres vagaux et dans le tissu nodal (noeud sino-auriculaire) (Forsman W.G. et coll., 1988). Le rôle du VIP sur la régulation de la vasodilatation des artères coronaires est beaucoup plus clair. Plusieurs équipes ont pu observer sur différentes espèces animales (cobaye, rat, lapin, homme) des activités doses-dépendantes du VIP sur le tonus du muscle lisse des coronaires (Smitherman T.C. et coll., 1982; Brum J.M. et coll., 1986; Smitherman J.C. et coll., 1986). Parallèlement, des récepteurs spécifiques du VIP ont été caractérisés (Christophe J. et coll., 1984). D'une part l'action du peptide sur la relaxation des artères coronaires est beaucoup plus marquée que sur les artères de la circulation systématique. D'autre part, des études ont montré que cette régulation était indépendante de l'endothélium, impliquant une action directe du peptide sur le muscle lisse contrairement à la relaxation induite par le VIP sur aorte isolée de ces mêmes espèces animales (Forssman W.G. et coll., 1988; Brum J.M. et coll., 1985; Brum J.M. et coll., 1986).

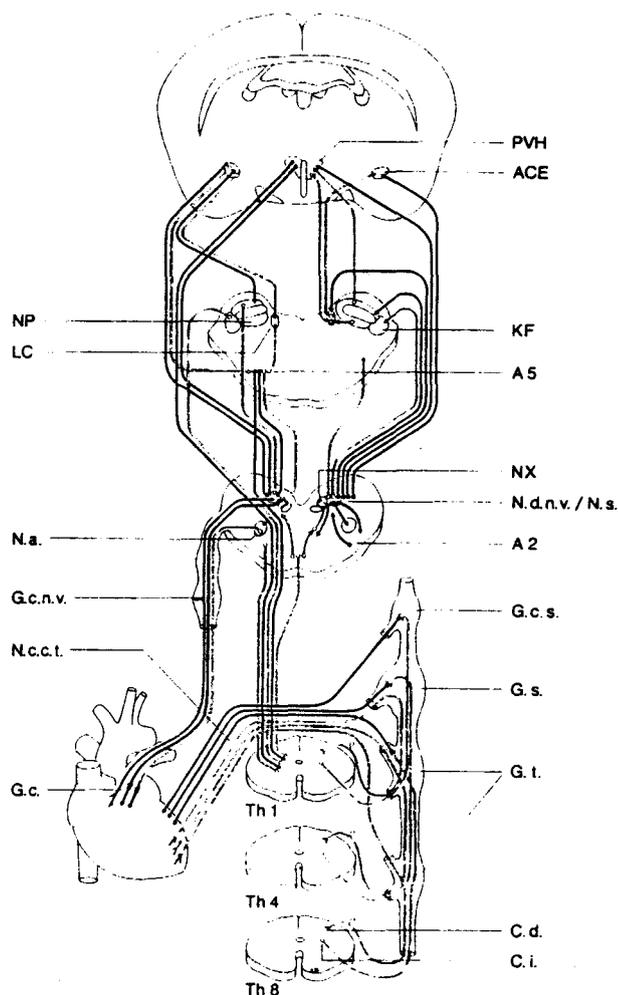


Figure 7. Innervation cardiaque:

Diencephale : PHV : hypothalamus périventriculaire; ACE : amygdale;

Mésencéphale : NP : noyau parabranchial; LC : locus cœruleus; KF : noyau Koelliker-Fuse;
A5 : région A5;

Moelle primaire : NX, N.d.n.v., N.s. : complexe nerf vague-solitaire; N.a. : noyau amiguus; A2 : formation réticulée latérale;

Moelle épinière : C.d. : colonne dorsale; C.i. : substance latérale intermédiaire.

Les fibres les plus denses sont des fibres contenant le VIP.

Connexions afférentes et efférentes entre le cœur et les centres primaires : G.c.s. : ganglion cervical supérieur; G.s. : ganglion stellaire; G.t. : ganglion thoracique paravertébrale; G.c.n.v. : ganglion nodal du nerf vague; N.c.c.t. : nerfs cardiaques cervical et thoracique; G.c. : ganglion intra-cardiaque; Th. : segment thoracique, d'après Forssmann W.G. et coll., 1988.

La mise en évidence de récepteurs membranaires spécifiques du VIP à la surface de lymphocytes (Danek A. et coll., 1983), de monocytes (Wiik P. et coll., 1985) et de plaquettes sanguines (Cox C.P. et coll., 1984) a suggéré à de nombreux auteurs une interaction entre le système nerveux et le **système immunitaire**. La modulation potentielle de la réponse immunitaire par différents neuropeptides semble être confirmée par la présence des récepteurs à enképhaline (Wybran J. et coll., 1979), à somatostatine et à substance P (Payan D.B. et Goetzel E.J., 1985) à la surface de cellules du système immunitaire. Le VIP semble jouer un rôle modulateur prépondérant dans différentes fonctions immunitaires chez l'homme (Payan D.B. et coll., 1984) telles que la prolifération des lymphocytes T (Rola-Pleszczynski M. et coll., 1985; Drew P.A. et Shearman D.J., 1985), la synthèse d'immunoglobuline (Drew P.A. et Shearman D.J., 1985) ou encore la migration des lymphocytes T₁ chez la souris. Le potentiel antiinflammatoire du VIP a été mis en évidence pour le poumon. En effet, le VIP est capable d'inhiber à la fois la prolifération de lymphocytes T et la libération de cytokines principalement l'Interleukine-2 (Ottaway C.A., 1985). Il intervient également dans l'inhibition du mécanisme impliquant des espèces radicalaires (ions superoxydes) synthétisées par les monocytes ou les macrophages (Wiik P., 1989). Son potentiel antiaggrégant plaquettaire a été observé chez le lapin, de même que l'inhibition de la sécrétion de sérotonine induite par le Facteur d'Activation Plaquettaire (PAF) (Cox C.P. et coll., 1984). Ainsi sur le plan expérimental *in vivo*, le VIP est capable de prévenir ou d'atténuer fortement les effets produits par des substances telles que l'acide chlorhydrique, le PAF, la xanthine ou la xanthine oxydase (Berisha H. et coll., 1990).

Dans le cadre de ces interactions existant entre le VIP et le système immunitaire, il faut également signaler des travaux relatant l'homologie de séquence entre l'enveloppe du virus du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et la partie N-terminale du peptide. Le virus du SIDA pénètre la surface de cellules lymphocytaires via un mécanisme d'absorption; plus précisément, une glycoprotéine externe du virus (GP120) semble capable de reconnaître un site récepteur de la cellule immunitaire (Pert C.B. et coll., 1986). La caractérisation de la séquence peptidique indispensable à la reconnaissance montre qu'il s'agit d'une séquence riche en résidu thréonine dénommée peptide T (A-S-T-T-T-N-Y-T) (Pert C.B. et coll., 1986). Par ailleurs, le

récepteur membranaire impliqué a été localisé à la fois au niveau du cerveau, des macrophages et des lymphocytes T (récepteur CD₄ ou T₄) (Hill J.M. et coll., 1986). L'octapeptide seul semble être capable de prévenir l'infection de cellules T par le virus VIH (Pert C.B. et coll., 1986). L'homologie de séquence avec la partie Nt du VIP (A-V-F-T-D-N-Y-T) a suggéré que le neuropeptide pouvait être un ligand endogène du récepteur T₄ (Sacerdote P. et coll., 1988). Ainsi, le VIP tout comme le "peptide T" induit le chimiotactisme de monocytes en culture (Ruff M.R. et coll., 1987). Des fragments de VIP ont également été testés sur ce même modèle : la séquence comprenant les acides aminés 1 à 12 possède une activité très proche de celle du VIP alors que le fragment 10 à 28 est très peu actif. Cet effet peut être inhibé par un anticorps antirécepteur T₄ : OKT₄, ce qui démontre l'importance du CD₄ dans le mécanisme de chimiotactisme. L'anticorps n'est pas actif sur le chimiotactisme induit par un tout autre composé le FMLP.

De nombreuses analogies ont pu être relevées entre des dysfonctionnements immunologiques liés au SIDA et certains effets connus du VIP sur le système immunitaire. En effet, chez les malades, les lymphocytes T deviennent beaucoup moins sensibles aux agents mitogènes comme la concanavaline A ou le PHA, le taux d'immunoglobulines produit par les lymphocytes B est fortement augmenté et on a également noté une diminution de l'activité des cellules "tueuses" induites par le virus (Lane M.C. et Fauci A.S., 1985). De façon similaire, des études ont montré que le VIP était capable d'inhiber la prolifération de lymphocytes T induite par le PHA (Stanisz A.M. et coll., 1986), d'augmenter la synthèse d'immunoglobulines IgG, IgM et IgA (Ottaway C.A. et Greenberg G.R., 1984) ou encore d'inhiber l'activité des cellules "tueuses" (Drew P.A. et Shearman J.C., 1985).

I.C.2.2. VIP et différenciation neuronale.

Le nombre important de tissus cible du VIP montre bien que le peptide se trouve localisé dans une grande quantité de neurones pouvant parcourir des distances plus ou moins longues (cf. **Figure 7**). On peut, de plus, observer de nombreuses synapses VIPergiques démontrant ainsi qu'une des cibles potentielles du peptide peut être une cellule nerveuse.

Le rôle des différents neuromédiateurs peptidiques, rapidement synthétisés dès les premiers jours de la vie de l'embryon et impliqués dans le développement du système nerveux central et périphérique, a fait l'objet de nombreuses recherches.

Ces neuropeptides sont capables de réguler différents processus neuronaux comme par exemple l'expression phénotypique, c'est-à-dire la croissance de neurites (Lipton S.A. et Kater S.B., 1989). En particulier, le VIP semble avoir un rôle physiologique important puisqu'il est capable de réguler d'une part la mitose de neuroblastes dans la lignée sympathique embryonnaire et d'autre part de moduler la croissance, le nombre et la complexité de neurites provenant d'un neuroblaste (Pincus D.W. et coll., 1990). D'autres neuropeptides apparentés au VIP tels que la sécrétine, le PHI ou le GRF ne montrent pas ce même potentiel à promouvoir à la fois la mitose et la différenciation des cellules neuronales.

A l'échelle cellulaire, le VIP semble être un facteur de croissance pouvant agir selon un mécanisme autocrine. Ceci a été démontré sur une lignée cellulaire tumorale : le neuroblastome (Tumilowicz J.J. et coll., 1970). Différents travaux ont montré que des récepteurs spécifiques du VIP se trouvaient à la surface membranaire de cellules issues de cette affection cancéreuse (Muller J.M. et coll., 1989; Olasmara M. et coll., 1987; O'Dorisio M.S. et coll., 1992). Il s'agit d'une tumeur solide du système nerveux sympathique ayant pour origine la crête neurale et qui est la plus répandue en dehors du système nerveux central chez l'enfant de moins de cinq ans. Le même type de tumeur se retrouve chez la souris avec des propriétés tout à fait semblables à ce que l'on rencontre chez l'homme (Glaser T. et coll., 1983). On y trouve principalement des neuroblastes et des cellules gliales ou des cellules de Schwann qui dérivent d'une même lignée précurseur (Tumilowicz J.J. et coll., 1970; Glaser T. et coll., 1983). Certaines de ces lignées synthétisent elles-mêmes du VIP et la faible quantité produite peut être augmentée par la présence de différents agents comme la forskoline ou le dibutyryl-AMPC. Des modifications morphologiques, et notamment l'accroissement de neurites, peuvent être visualisées en présence de ces agents de différenciation. Une relation entre l'état de différenciation du neuroblastome et la quantité de VIP intracellulaire semble clairement établie

(Beinfeld et coll., 1988). Réciproquement, pour la lignée murine, Beinfeld et coll. ont réalisé des injections de cellules de neuroblastome dans des souris immunodéprimées (souris "nude"). Le développement rapide de ces cellules en tumeur solide a été corrélé avec l'absence de quantité détectable de VIP. En ce qui concerne la lignée humaine, la différenciation de ces cellules peut être observée sous l'action de l'acide rétinoïque, composé très étudié dans les processus de maturation de différents types cellulaires (Sidell N., 1982; Lacroix A. et Liggman M.E., 1980; Honma Y. et coll., 1980). Dans ce cas, aucune augmentation de synthèse de VIP intracellulaire n'a pu être observée. Par contre, une étude a montré sur cellules de neuroblastome un net accroissement de la quantité de récepteurs spécifiques du VIP à la surface membranaire de cellules différenciées par l'acide rétinoïque (Waschek J.A. et coll., 1989). La lignée murine de neuroblastome possède la particularité d'exprimer à sa surface membranaire des récepteurs capables de reconnaître à la fois le VIP et la sécrétine (Roth B.L. et coll., 1984). Ainsi, l'action combinée de la sécrétine et du dibutyryl-AMPC augmente très fortement la concentration en VIP extracellulaire. Un effet synergique identique peut être observé par l'action simultanée de la forskoline et de l'ascorbate (Brick P.L. et coll., 1985). Ceci s'explique par l'impact différent des deux molécules; la forskoline agissant via la voie AMPC sur l'augmentation de l'ARNm codant pour le VIP, l'ascorbate étant lié au mécanisme post-traductionnel par son rôle de cofacteur dans le processus d'amidification du C-terminal du peptide.

La physiopathologie du neuroblastome est encore assez peu connue actuellement; c'est pourquoi, le pronostic de guérison demeure en général peu favorable (D'Angio G.J., 1987). Néanmoins, des maturations spontanées ont été observées *in vivo*, mais le mécanisme reste actuellement encore inconnu. Des observations cliniques montrent une possible corrélation entre l'état de différenciation et la forte quantité sérique en VIP (Lacey S.R. et coll., 1989). Tout comme d'autres agents de différenciation cités précédemment (acide rétinoïque, forskoline et dbAMPC), le VIP est lui aussi capable de différencier des cellules de neuroblastome en culture (Pence J.C. et Shorter N.A., 1990). Des changements morphologiques observés ont été plus ou moins corrélés avec différents indicateurs de différenciation tels que la synthèse de différents

neurotransmetteurs (Abemayor E. et Sidell N., 1989), l'augmentation d'activité enzymatique comme l'acétyl cholinestérase (Sidell N. et Horn R., 1985), l'expression de protooncogènes (Thiele C.J. et coll., 1988) et la baisse de la tumorigénicité chez la souris "nude" (Abemayor E. et Sidell N., 1989).

Il ressort de toutes ces études que le VIP joue sans doute un rôle essentiel dans la différenciation neuronale et O'Dorisio M.S. et ses collaborateurs (1992) ont émis l'hypothèse selon laquelle une dérégulation de la synthèse (mutations du gène, mauvaise expression) ou de l'activité du peptide (dégradation enzymatique excessive) pouvait être à l'origine d'un dysfonctionnement de la voie de prolifération et/ou de maturation des cellules nerveuses.

I.C.2.3. Tractus respiratoire.

Parmi les cibles du VIP, le système respiratoire semble être une des plus importantes. En effet, en ce qui concerne le poumon, la prédominance de fibres nerveuses contenant du VIP a été démontrée pour de nombreuses espèces animales et en particulier chez l'homme (Dey R.D. et coll., 1981). L'existence d'une innervation NANC a été très étudiée (Richardson J.B., 1981; Barnes P.J., 1986a). La faible densité de fibres appartenant à tout autre système neuronal chez l'homme a même été suggérée (Barnes P.J., 1987), alors que chez les autres espèces animales, l'effet NANC peut être remplacé par les systèmes sympathique et parasympathique (Barnes P.J., 1987; Richardson J.B., 1979). Chez l'homme, le VIP est le peptide le plus abondamment trouvé dans le poumon, la densité des terminaisons nerveuses diminuant avec le calibre des voies respiratoires (Barnes P.J., 1987); plus précisément les fibres nerveuses ont été localisées sur la surface épithéliale, autour des muscles lisses ainsi qu'autour des glandes de la sous-muqueuse (Dey R.D. et coll., 1981). L'effet de la bronchodilatation résultant de la libération de médiateurs issus de la voie NANC a suscité de nombreuses recherches surtout depuis la mise en évidence d'un neuromédiateur non peptidique : l'oxyde nitrique NO[•] (Culotta E. et Koshland D.E., 1992). Cette molécule que l'on connaît depuis relativement longtemps, a souvent été considérée comme néfaste pour l'organisme en raison de sa nature radicalaire. Actuellement, il est tout à fait clair que cette molécule participe à la modulation de la neurotransmission

cholinergique via la voie NANC chez différentes espèces animales (Belvisi M.G. et coll., 1992; Belvisi M.G. et coll., 1993; Fisher J.T. et coll., 1993). D'autres activités du NO' sont également très étudiées parmi lesquelles on peut citer ses propriétés antibactériennes ou son action de neurotransmetteur du cortex cérébral (Culotta E. et Koshland D.E., 1992). Les relations entre NO' et VIP ne sont pas encore tout à fait élucidées et selon l'espèce animale considérée des résultats différents ont été publiés (Belvisi M.G. et coll., 1992; Belvisi M.G. et coll., 1993).

Des sites récepteurs spécifiques du VIP ont été mis en évidence dans le poumon (Robberecht P. et coll., 1981). Par des techniques précises d'autoradiographie et d'immunocytochimie, la distribution des récepteurs VIP a été observée sur le muscle lisse, l'épithélium et les glandes de la sous-muqueuse (Carstairs J.R. et Barnes P.J., 1986; Lazarus S.C. et coll., 1986) démontrant ainsi une très bonne corrélation entre la présence du peptide et l'existence de sites récepteurs à des endroits bien localisés des voies respiratoires. L'action du VIP sur la dilatation des bronches humaines isolées est cinquante à cent fois plus forte que celle de l'isoprotérénol mais elle diminue en fonction du rétrécissement du calibre des voies respiratoires alors que l'effet agoniste β adrénergique reste identique (Palmer J.B. et coll., 1986a). Des études *in vivo* réalisées sur différentes espèces animales ont montré que le VIP avait un effet protecteur contre une bronchoconstriction provoquée par l'histamine ou par la prostaglandine $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Said S.I., 1982). Par contre, chez l'homme, l'inhalation de VIP n'a aucun effet de bronchodilatation et l'effet protecteur est très faible par rapport à celui de l'agoniste β (Barnes P.J. et Dixon C.M.S., 1984). Le VIP a été localisé dans des terminaisons nerveuses de fibres parasympathiques pulmonaires. Chez le bœuf, le VIP est colocalisé avec l'acétylcholine. Il peut être libéré dans le cas de fortes sécrétions d'acétylcholine et ainsi réguler le tonus du muscle lisse bronchique (Palmer J.B. et coll., 1985).

La stimulation de la sécrétion peut être induite par le VIP et particulièrement la sécrétion de mucus à partir des glandes de la sous-muqueuse. Ici encore, le peptide possède un potentiel de stimulation bien supérieur à l'isoprotérénol *in vitro* (Peatfield A.C. et coll., 1983). Des études ont rapporté que le peptide était capable d'augmenter le transport d'ions chlorure ainsi que les mouvements d'eau dans l'épithélium de trachée de chien (Nathanson I. et coll., 1983).

Cette activité de sécrétion semble particulièrement importante puisque le peptide pourrait être modulateur de la clairance mucociliaire. Cette hypothèse peut être transposée chez l'homme puisque des récepteurs VIP de forte affinité ont été localisés sur les cellules épithéliales de trachée (Lazarus S.C. et coll., 1986). Le rôle de l'épithélium est en fait très important dans le contrôle du tonus musculaire lisse bronchique. Des études ont montré que l'absence de couches épithéliales était susceptible d'augmenter la réactivité du muscle lisse bronchique en réponse à différents agonistes contracturant chez le chien (Flavahan N.A. et coll., 1985). Par un mécanisme encore actuellement assez mal connu, l'épithélium serait capable de sécréter un ou plusieurs facteurs relaxants (EpDRF: Epithelium Derivated Relaxing Factor) réduisant la sensibilité du muscle lisse de différentes espèces animales aux agents bronchocontracturants (Goldie R.G. et coll., 1986, Reaburn D. et coll., 1986). Ainsi, l'effet du VIP sur la sécrétion produite par les cellules épithéliales pourrait compléter son mode d'action direct sur le muscle lisse bronchique. Il faut d'ailleurs remarquer que tout comme pour le VIP, l'effet inhibiteur de l'épithélium bronchique décroît parallèlement à la réduction du diamètre des bronches (Stuart-Smith K et Vanhoutte P.M., 1987).

La troisième composante constituant l'activité du peptide au niveau des poumons concerne l'effet vasodilatateur du peptide. En fait, le VIP agit sur le muscle lisse avec un potentiel dix fois plus important au niveau des vaisseaux pulmonaires qu'au niveau des voies respiratoires (Lazarus S.C. et coll., 1986), ceci pouvant s'expliquer par la plus grande densité de récepteurs sur le muscle lisse des artères pulmonaires. Contrairement aux voies respiratoires où l'épithélium joue un rôle dans le phénomène de relaxation, l'endothélium pulmonaire ne semble pas posséder de récepteurs VIP spécifiques (Greenberg B. et coll., 1987), l'action du VIP se faisant de façon directe sur le muscle lisse vasculaire.

D'un point de vue physiologique, le rôle du VIP ne peut pas être dissocié de la régulation induite par le système NANC. Le rôle du système NANC est primordial chez l'homme en raison du contrôle qu'il exerce sur de nombreux aspects de la fonction pulmonaire : tonus musculaire lisse, sécrétion de mucus, transport de fluide, perméabilité des vaisseaux sanguins, libération de différents médiateurs de l'inflammation (Nadel J.A. et Barnes P.J., 1984). En fait, celui-ci peut être divisé en deux sous-systèmes : le système dit excitateur dont

les neuromédiateurs sont la substance P et les tachykinines et le système inhibiteur principalement représenté par le VIP et le PHM. Ainsi, dans des conditions "normales", un équilibre très précis fait interagir des neurones excitateurs (cholinergiques muscariniques et non cholinergiques) (**Figure 8**) et inhibiteurs (principalement non adrénérgiques avec une faible composante β adrénérgique) (Barnes P.J., 1986b) (**Figure 9**). Un dysfonctionnement de cette balance peut entraîner des conséquences dramatiques.

Dans le cas de l'asthme, la faible densité voire l'absence de fibres nerveuses contenant du VIP a été rapportée chez différents patients (Ollenrenshaw S. et coll., 1989). Les auteurs concluent leurs observations en suggérant que le déficit en VIP peut être la cause de l'hyperréactivité des voies pulmonaires. Le second composant majeur de la voie NANC est lui aussi inhibé dans cette pathologie. Le mécanisme d'inhibition ferait intervenir d'autres radicaux oxygénés ($O_2^{\cdot-}$) libérés par les cellules de l'inflammation : mastocytes, éosinophiles, basophiles (Barnes P.J., 1992). Ainsi, dans le cas de l'asthme, la neuromodulation réalisée par le VIP et NO serait inactivée notamment en ce qui concerne la bronchoconstriction du muscle lisse induite par l'acétylcholine. D'autres facteurs sont impliqués dans la pathologie asthmatique. En effet, on note une forte dégradation de la couche épithéliale sous l'action de médiateurs de l'inflammation (bradykinine) issus des mastocytes, des neutrophiles et des éosinophiles (**Figure 10**).

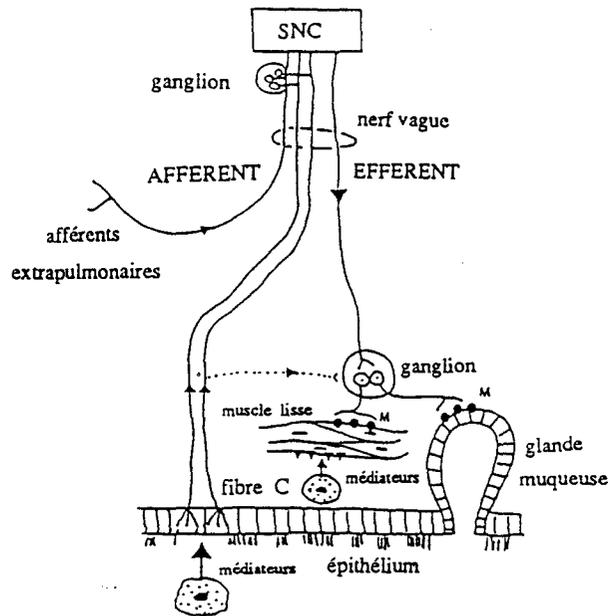


Figure 8. Innervation cholinergique des voies respiratoires. M : récepteurs muscariniques, d'après Barnes P.J., 1986b.

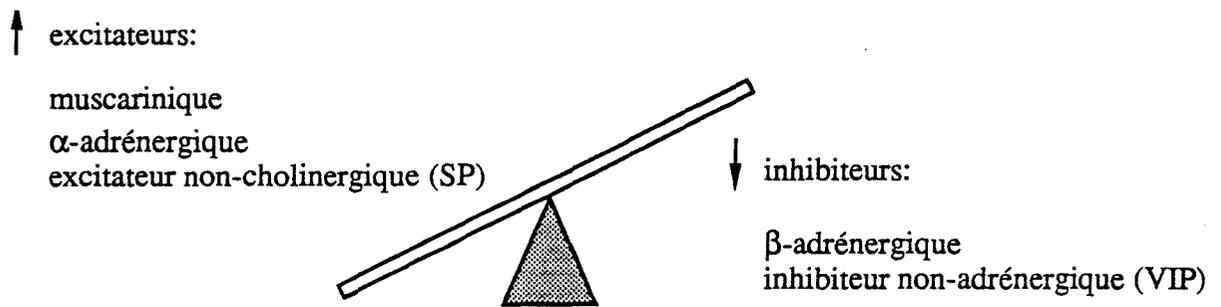


Figure 9. Déséquilibre observé dans la pathologie inflammatoire, d'après Barnes P.J. 1986c.

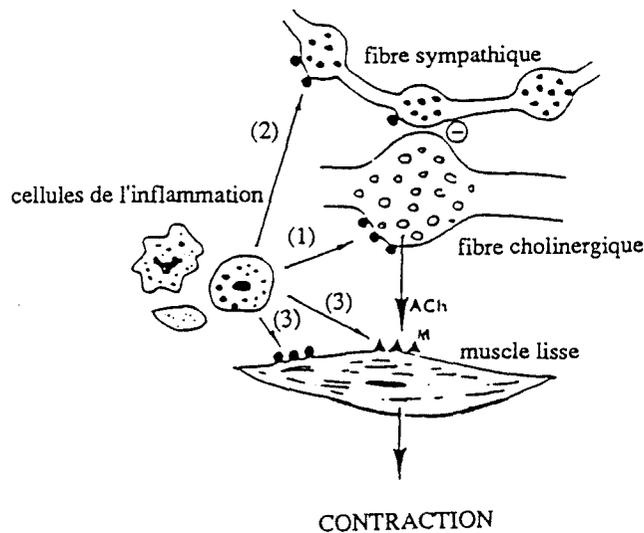


Figure 10. Médiateurs de l'inflammation : (1) : levée de l'inhibition sympathique; (2) : stimulation de la libération de l'acétyl-choline; (3) : action positive directe ou indirecte sur les récepteurs muscariniques (système de couplage), d'après Barnes P.J., 1986c).

Un mécanisme de réflexe axonique via la stimulation des fibres afférentes (fibres C stimulées par la bradykinine, les prostaglandines ou l'histamine ...) a été suggéré par différents auteurs (Barnes P.J., 1986c; Laitinen L.A. et coll., 1985). Il s'agit d'un réflexe cholinergique provoquant une bronchoconstriction mais surtout d'une activation des ganglions locaux qui stimulent à leur tour des fibres contenant différents neuropeptides, principalement la SP, les neurokinines NKA, NKB et le CGRP (Fewtrell C.M.S. et coll., 1982) (Figure 11). La libération de ces neuromédiateurs excitateurs provoque d'une part une hypersécrétion de mucus à partir des glandes de la sous-muqueuse et d'autre part une extravasation plasmatique pouvant entraîner la formation d'œdème pulmonaire renforçant la réaction inflammatoire.

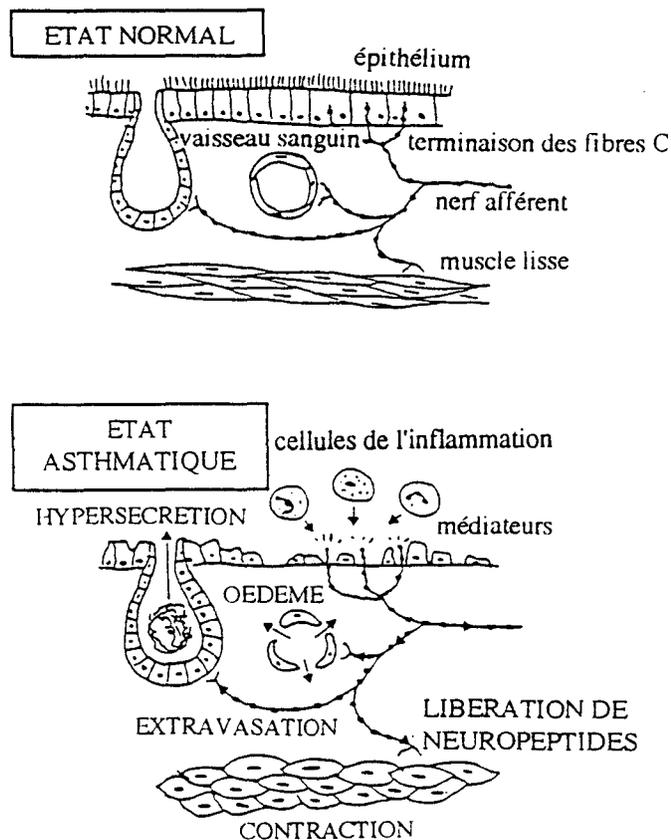


Figure 11. Réflexe axonique, d'après Fewtrell C.M.S. et coll., 1982.

Ses propriétés de bronchorelaxation (Palmer J.B. et coll., 1986b) et son action antiinflammatoire (Said S.I., 1989) font du VIP un excellent candidat pour une thérapie antiasthmatique. Néanmoins, des études ont clairement montré que le peptide inhalé ne produit

pas d'effet protecteur contre une hyperréactivité bronchique chez l'homme (Barnes P.J. et Dixon C.M.S., 1984). De plus, chez des patients asthmatiques, l'effet bronchodilatateur est très faible même en injection intraveineuse alors qu'un agoniste β chez les mêmes sujets provoque une bronchorelaxation (Morice A. et coll., 1983; Palmer J.B. et coll., 1986b). Pour des doses relativement élevées, l'effet bronchodilatateur du VIP peut être observé. L'injection intraveineuse de VIP à raison de 6pmol/kg/mn produit l'effet attendu mais provoque également des effets marqués sur le tonus du système cardiovasculaire tels que tachycardie, hypotension et sensation de chaleur accompagnée de rougeurs cutanées (Morice A. et coll., 1983; Palmer J.B. et coll., 1986b). Ces effets secondaires limitent donc la dose d'administration d'autant plus que le potentiel du VIP est plus important sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins que sur les cellules musculaires lisses des voies respiratoires (Barnes P.J., 1987). La connaissance du processus physiologique normal et pathologique de dégradation du peptide peut apporter une autre explication au faible potentiel bronchodilatateur du VIP endogène ou exogène (Figure 12). En effet, des études ont pu mettre en évidence sur le tissu pulmonaire du cobaye et de l'homme, une modulation de l'activité du peptide par des inhibiteurs enzymatiques (Tam E.K. et coll., 1990; Farmer S.G. et Togo J., 1990; Hachisu M. et coll., 1991). Le système enzymatique responsable de la biodégradation du peptide n'a pas encore pu être identifié clairement. In vitro, sur un système isolé de poumon de cobaye, l'endopeptidase neutre (EC 3.4.24.11.) (NEP) et des protéases sécrétées par les mastocytes semblent être les enzymes qui amènent à une cinétique de dégradation du VIP la plus proche de celle induite par les activités protéolytiques dans des conditions physiologiques (Goetzl E.J. et coll., 1989; Caughey G.H. et coll., 1988). D'autre part, une étude récente sur organe perfusé chez le cobaye montre que l'activité bronchorelaxante du VIP est limitée par la NEP et par une autre enzyme dont le profil d'hydrolyse est de type "Sérine protéase" (Lilly C.M. et coll., 1993). Ainsi, la mobilisation de cellules impliquées dans des processus inflammatoires, principalement les mastocytes, conduit à une concentration excessive en enzymes sécrétées. Le faible potentiel du peptide peut donc s'expliquer en grande partie par une forte dégradation du VIP exogène.

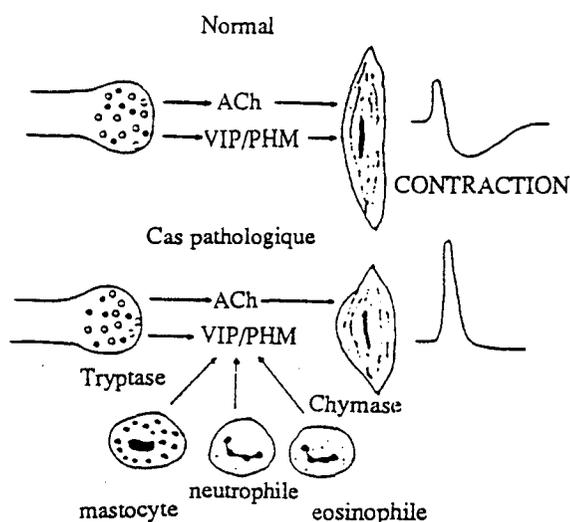


Figure 12. Processus de dégradation du VIP/PHM, d'après Barnes P.J., 1987.

I.D. CONCLUSION

L'implication du VIP dans de nombreuses activités régulatrices et la mise en évidence de différentes pathologies pour lesquelles un déficit en VIP semble jouer un rôle important, nous a conduit à rechercher des molécules susceptibles de mimer l'action du peptide. L'intérêt de telles molécules agonistes serait de remplacer le VIP par des structures capables de résister à la dégradation enzymatique et de servir de modèles en vue d'une simplification ultérieure. Ces molécules constitueraient donc à la fois un outil pharmacologique très intéressant qui nous permettrait de mieux comprendre la spécificité de réponse vis-à-vis des différentes cibles du VIP et un objectif thérapeutique non négligeable. Néanmoins, il est clair que des molécules capables de mimer le VIP (peptide de 28 acides aminés) ne peuvent se concevoir que par une démarche rationnelle pas-à-pas, c'est-à-dire en tentant de remplacer petit à petit des parties peptidiques essentielles à l'activité du VIP. Par des techniques de synthèse chimique, nous nous sommes donc tout d'abord attachés à élaborer différentes structures pseudopeptidiques.

Les modèles de différenciation cellulaire neuronale d'une part et de relaxation du muscle lisse des voies respiratoires d'autre part nous ont semblé être deux modèles pharmacologiques particulièrement importants. Notre premier objectif a été de mieux comprendre le modèle de neuroblastome et le modèle concernant les processus inflammatoires ainsi que les réponses de ces deux systèmes en présence de VIP.

II. MODELES PHARMACOLOGIQUES ETUDIES

II. MODELES PHARMACOLOGIQUES ETUDIES.

II.A. LE NEUROBLASTOME.

Les lignées de neuroblastome sont nombreuses; elles sont composées de populations cellulaires plus ou moins homogènes dont certaines synthétisent du VIP et expriment le récepteur VIP, suggérant un rôle autocrine du peptide (O'Dorisio M.S. et coll., 1992; Pence J.C. et Shorter N.A., 1993). Les lignées de neuroblastome humain constituent des modèles pharmacologiques qui ont permis d'étudier d'une part la biosynthèse et les mécanismes de régulation de l'expression du peptide (Gozes I., 1988), d'autre part les différents systèmes de transduction activés à la fois par le VIP (Müller J.M. et coll., 1989; Oetting G. et coll. 1990) et par d'autres peptides appartenant à la famille du VIP tel que le PACAP (Cauvin A. et coll., 1990). Elles ont également permis de comprendre le rôle du VIP dans la survie et la différenciation de neuroblastes en culture (Pincus D.W. et coll., 1990). De nombreuses études ont tenté de corréler la différenciation morphologique de ces cellules (critère difficilement quantifiable) avec différentes activités pharmacologiques telles que l'activité de la transglutaminase de tissu (Melino G. et coll., 1988), celle de la choline acétyl transférase (Haussler M. et coll., 1983) ou encore l'expression de différents protooncogènes (*c-src*, *mdr 1*) (Matsunaga T. et coll., 1991; Bates S.E. et coll., 1989) ou oncogènes (*N-myc*, *N-ras*) (Matsunaga T. et coll., 1991).

Nous avons retenu pour notre étude deux lignées de neuroblastome, les cellules SK-N-SH et LA-N-2 qui nous ont semblé représentatives des différents types de lignées de neuroblastome comme nous le verrons ci-après.

II.A.1. Lignées SK-N-SH et LA-N : caractéristiques générales.

II.A.1.1. La lignée SK-N-SH.

La lignée cellulaire SK-N-SH a été obtenue par Biedler J.L. et coll. (1973) avec trois autres lignées continues, à partir de seize prélèvements biopsiques de moelle osseuse réalisés chez treize patients présentant un neuroblastome. Au sein de cette lignée, deux types cellulaires

ont été distingués selon des critères à la fois morphologiques et biochimiques (Ciccarone V. et coll., 1989; Thiele C.J. et coll., 1985; Abemayor E. et coll., 1989). Le type N prédomine; il est caractérisé par une population de petites cellules, denses aux électrons, avec un cytoplasme peu abondant et des prolongements courts (neurites) pouvant néanmoins atteindre des longueurs de l'ordre de 100 μm ressemblant à un type neuronal. Le type dénommé S est une cellule plus grande et de type épithéloïde ou pseudogliale. Les cellules SK-N-SH présentent entre autres une activité dopamine hydroxylase élevée, enzyme issue du système sympathique et présente dans les cellules du type neuronal (N) (Biedler J.L. et coll., 1973). Cette lignée cellulaire est une exception parmi les différentes lignées de neuroblastome car elle ne présente pas de surexpression de l'oncogène *N-myc*. Dans les autres lignées de neuroblastome une diminution de la quantité de cette protéine a pu être corrélée avec la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque (Thiele C.J. et coll., 1985). La lignée SK-N-SH contient par contre un autre oncogène, *N-ras*, rencontré dans d'autres lignées comme la lignée cellulaire LA-N-5. Les différents types cellulaires de cette lignée ont été clonés en lignées cellulaires pures sur le plan phénotypique exprimant des propriétés électriques, morphologiques et enzymatiques identiques (Haffke S.C. et Seads N.W., 1975; Prasad K.N., 1975) mais aussi des différences internes notamment sur le plan morphologique (de type S ou de type N comme le sous clone SK-SY-5Y).

II.A.1.2. La lignée LA-N.

La lignée LA-N a été établie en 1977 par l'équipe de Seeger R.C.. Deux sous-clones ont été isolés à partir de la moelle osseuse et de la tumeur primaire de deux enfants au stade clinique type IV. Les cellules LA-N-1 et LA-N-2 ont été étudiées sur le plan morphologique et ultrastructural d'une part, sur le plan biochimique d'autre part. En plus des caractéristiques de cellules malignes, les deux types cellulaires possèdent des propriétés neurochimiques de tumeurs neuronales. Les cellules LA-N-1 possèdent de multiples vésicules cytoplasmiques que l'on retrouve fréquemment dans les neurones du système nerveux sympathique. De plus, la lignée LA-N-1 exprime un marqueur adrénérgique : la tyrosine hydroxylase. La lignée LA-N-2 quant à elle synthétise de l'acétylcholine par l'intermédiaire de l'acétylcholine estérase.

La différenciation morphologique des deux types cellulaires induites par l'acide rétinoïque a été étudiée parallèlement aux activités enzymatiques caractéristiques de chaque lignée (Singh I.N. et coll., 1990). La tyrosine hydroxylase contenue dans la lignée catécholaminergique LA-N-1 a une activité qui augmente lors du traitement par l'acide rétinoïque. Dans la lignée LA-N-2, l'activité acétylcholine transférase s'accroît au cours de la différenciation alors que l'activité acétylcholine estérase diminue fortement (73%) dans le même temps.

A notre connaissance, peu d'études ont été réalisées sur la lignée LA-N en ce qui concerne la différenciation induite par le VIP.

Nous avons choisi d'étudier la lignée cholinergique LA-N-2 car la culture in vitro ne nous a pas posé de problèmes alors que les cellules LA-N-1 sont beaucoup plus difficiles à cultiver. Les cellules SK-N-SH qui appartiennent au groupe des lignées catécholaminergiques ont permis de comparer les deux types de lignée cellulaire.

II.A.2. Différenciation cellulaire et marqueurs biochimiques.

Dès 1927, Cushing H. et Wollbach S.B. ont rapporté que les neuroblastomes étaient capables de se différencier spontanément en ganglioneurones bénins. Cette observation a suscité un certain intérêt et a amené de nombreux chercheurs à utiliser des lignées cellulaires de neuroblastomes comme modèles pour l'étude des processus généraux de différenciation cellulaire des tumeurs. Ainsi, la différenciation de cellules de neuroblastome a été étudiée sous l'action de différents agents tels que le facteur de croissance neuronal (NGF) sur le sous clone SK-SY-5Y de la lignée SK-N-SH d'une part (Perez-Polo J.R. et coll., 1982) et sur la lignée LA-N d'autre part (Pavelic K. et Spaventi S., 1987), l'acide rétinoïque (Pahlman S. et coll., 1984; Pence J.C. et Shorter N.A., 1990), les esters de phorbol (Pahlman S., 1981; Pahlman S., 1984), les analogues de l'AMPc ou des agents activant l'adénylate cyclase ou inhibant la phosphodiesterase (Prasad K.N. et Kumar S., 1975; Lando M. et coll., 1989).

Il existe de nombreuses modifications intracellulaires pendant la différenciation cellulaire des cellules de neuroblastome. Par exemple, le traitement des cellules SK-N-SH par l'acide rétinoïque pendant 24 à 72 heures provoque une élévation de trois à vingt fois de l'expression de l'ARN messager de *mdr 1* ("multidrug resistance gene") détecté dès la 6^{ème} heure et exprimé exclusivement dans les cellules N (Bates S.E. et coll., 1989). Dans le sous-clone cellulaire SK-SY-5Y, une augmentation frappante de l'expression du récepteur VIP a été observée avec une potentialisation parallèle de la stimulation de l'adényl-cyclase par le VIP (Waschek J.A. et coll., 1989). Enfin, dans une lignée proche de la lignée SK-N-BE, une augmentation parallèle de l'expression de la transglutaminase de tissu avait pu être observée au cours de la différenciation cellulaire induite par l'acide rétinoïque (Melino G. et coll., 1988). Actuellement, les recherches tendent plutôt à montrer une relation étroite entre l'expression de cette enzyme et la mort cellulaire programmée (apoptose) (Piacentini M. et coll., 1991). En effet, la transglutaminase de tissu est impliquée dans la formation de structures constituées par des protéines liées de façon covalente par des ponts entre des résidus de lysine et de glutamine, structures caractéristiques des corps apoptotiques.

En ce qui concerne la lignée LA-N, des études ont montré une corrélation entre l'élévation de l'AMPc intracellulaire et l'état de différenciation de la cellule estimé par une baisse de la prolifération cellulaire accompagnée d'une croissance des neurites (Lando M. et coll., 1990). Le dibutyryl-AMPc, le 8-bromo AMPc, la toxine du choléra et la forskoline provoquent de tels effets. L'acide rétinoïque est capable également de différencier les cellules LA-N-1 et LA-N-5 mais sans augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc (Haussler M. et coll., 1983). L'effet combiné du dibutyrylAMPc et de l'acide rétinoïque montre un meilleur degré de différenciation que celui observé pour les deux agents utilisés séparément (Pence J.C. et Shorter N.A., 1990). Le VIP a également été testé en raison de sa capacité à augmenter l'AMPc intracellulaire. Les résultats ont mis en évidence une nette diminution de la prolifération cellulaire (baisse d'incorporation de thymidine tritiée), corrélée avec une différenciation morphologique tout à fait comparable à celle induite par l'acide rétinoïque (Pence J.C. et Shorter N.A., 1990).

Il faut enfin souligner plus particulièrement une activité enzymatique qui a beaucoup été étudiée dans le tissu neuronal (Brugge J.S. et coll., 1985). Cette protéine membranaire est le produit du protooncogène *c-src* appartenant à la famille des tyrosine kinases (Hunter T. et Sefton B., 1978). Bien que le rôle de cette protéine n'ait pas encore été bien élucidé, des taux importants ont été décelés dans des neurones différenciés ou en cours de différenciation (Brugge J.S. et coll., 1985). Par ailleurs, la stimulation de la phosphorylation de molécules de haut poids moléculaire induite par le VIP a été étudiée dans des cellules embryonnaires épithéliales de la rétine de poulet (Koh S.W.M., 1989). Ces premiers résultats ont été suivis d'une étude plus précise concernant le mécanisme de phosphorylation. Enfin, la mise en évidence d'une modulation de l'activité de SRC par le VIP a été corrélée avec une stimulation de la différenciation de l'épithélium de la rétine (Koh S.W.M. et Kane G.J., 1992). De plus, ces auteurs ont suggéré que cette stimulation constitue, en fait, une voie de transduction parallèle à la voie classique utilisant l'adénylate cyclase (Koh S.W.M., 1991; Koh S.W.M., 1992). Cette suggestion qu'un signal de transduction serait un système enzymatique à activité tyrosine kinase avait d'ailleurs déjà été énoncée pour différents couples peptide extracellulaire/protéine tyrosine kinase (TPK) tels que l'interleukine 2/LCK, IgE/LYN ou YES (pour revue : Bolen J.B., 1991; Cantley L.C. et coll., 1991). Afin de comprendre la stimulation de SRC par le VIP, il nous a semblé important de rappeler quelques informations sur la structure et le fonctionnement de la TPK. SRC est une protéine de 60 kD que l'on trouve de façon ubiquitaire dans l'organisme mais qui est surexprimée dans les neurones différenciés et les plaquettes sanguines. La structure de cette protéine composée d'environ 300 acides aminés s'organise en différents domaines distincts sur le plan fonctionnel (**Figure 13**) :

- Un domaine N-terminal spécifique de chaque TPK contient une glycine terminale myristylée qui permet l'association de la molécule à la membrane.

- Un domaine catalytique (ou domaine SH1 pour "SRC homology domain") comprend un site de fixation de l'ATP et un site de phosphorylation. L'association des TPK avec le récepteur membranaire pourrait se faire directement par l'intermédiaire du segment N-terminal

de ce domaine. Cela a en effet été montré pour l'association de la p56^{lck} et le récepteur de l'interleukine 2 (Hatakeyama M. et coll., 1991).

- Un domaine régulateur en C-terminal possédant un site de phosphorylation.

- Deux domaines sont également conservés : SH2 et SH3. Le domaine SH2 est retrouvé dans toutes les TPK de la famille de SRC. Ce domaine a sans doute un rôle régulateur important puisqu'il confère aux protéines la capacité de se fixer sur les phosphotyrosines (Matsuda M. et coll., 1990). Cette séquence SH2 permettrait l'interaction entre le TPK et son substrat. La fonction des domaines SH3 est peu claire. Ils pourraient être impliqués dans l'interaction avec le cytosquelette.

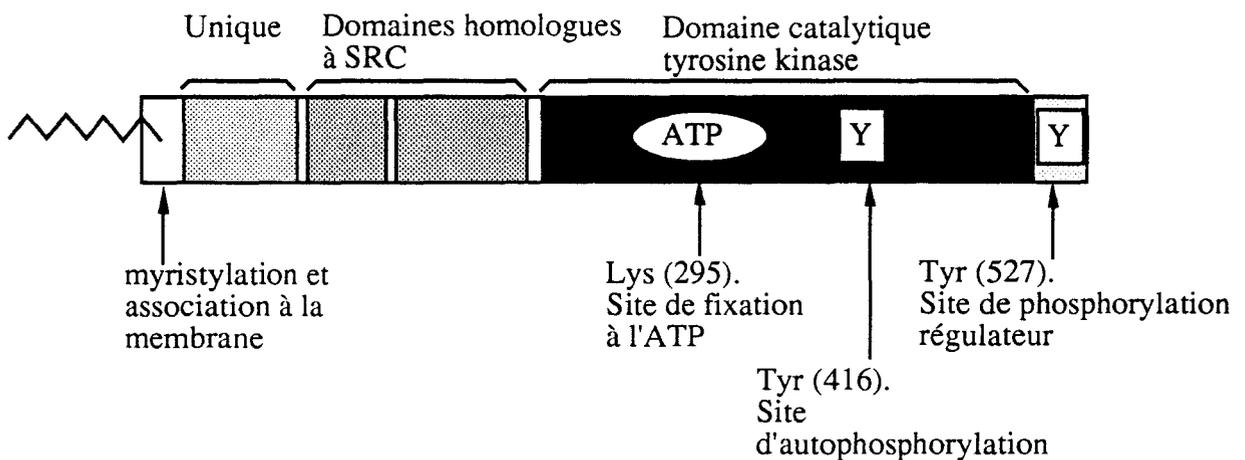


Figure 13. Domaines des TPK. Les sites représentés sont ceux de pp60^{c-src}, d'après Bolen J.B., 1991.

Des études ont montré que la protéine SRC tout comme les autres TPK était capable de s'autophosphoryler sur une tyrosine du site catalytique (Tyr⁴¹⁶). La phosphorylation de ce site est corrélée avec la capacité à phosphoryler un substrat exogène (Golden A. et Brugge J.S., 1988). Le domaine régulateur possède également une tyrosine (Tyr⁵²⁷) qui, lorsqu'elle est phosphorylée, exerce une action inhibitrice de l'activité kinase (Amrein K.E. et Sefton B.M., 1988). Ainsi l'activité kinase est régulée par le degré de phosphorylation de deux résidus Tyr importants (**Figure 14**).

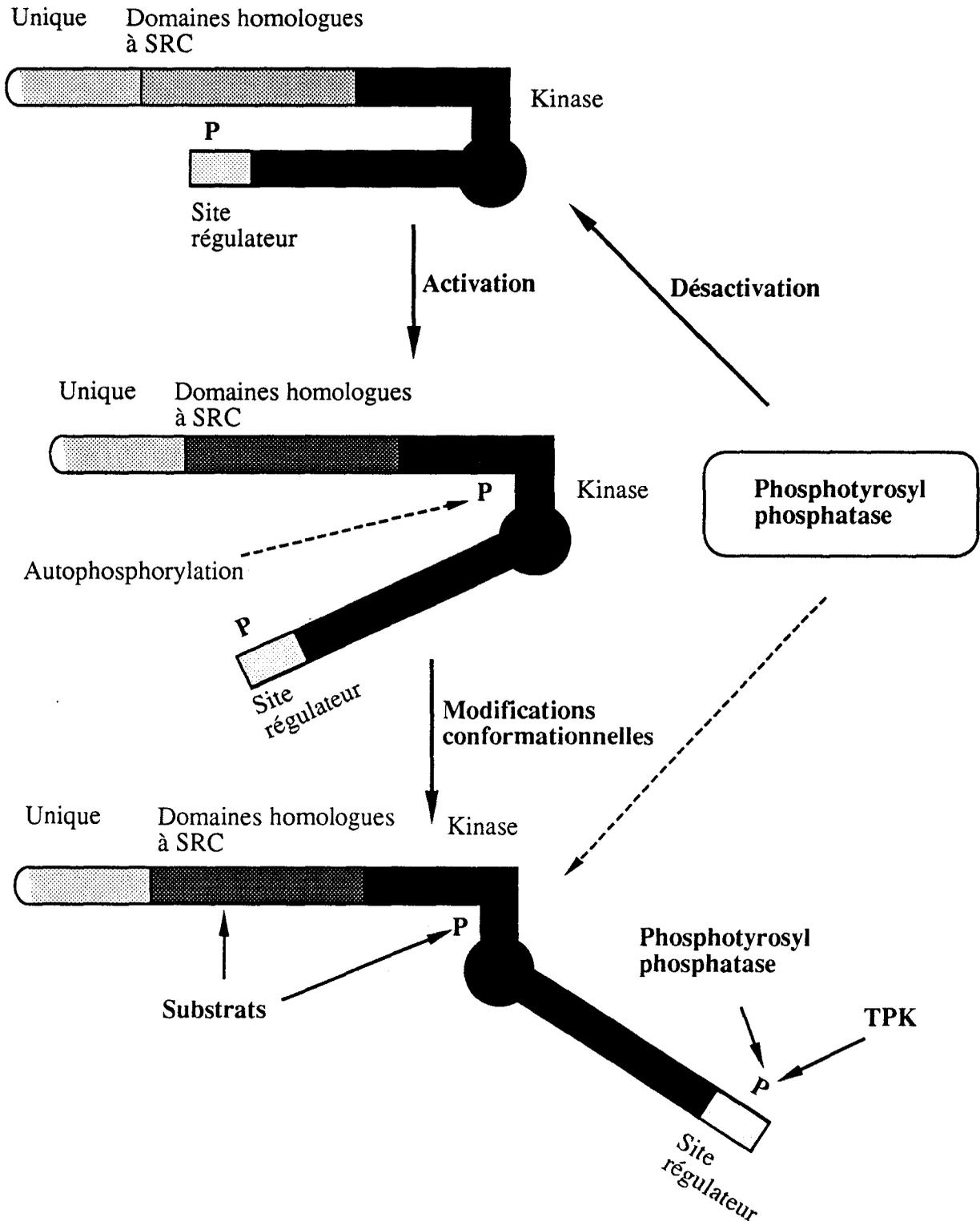


Figure 14. Modèle d'activation des TPK, d'après Bolen J.B., 1991.

L'enzyme responsable de la phosphorylation du résidu Tyr en C-terminal (inhibiteur de l'activité) a été tout récemment identifiée, il s'agit de la CSK (kinase cellulaire : "cellular SRC kinase"). D'autres sites phosphorylés sont importants pour la régulation de ces kinases : le pp60^{c-src} possède des sites de phosphorylation pour la PKC et la PKA (Ser¹² et Ser¹⁷ respectivement). Les cibles de pp60^{c-src} ne semblent pas avoir toutes été élucidées. On peut néanmoins signaler l'homologue viral du protooncogène (pp60^{c-src}) qui phosphoryle une protéine à activité GTPasique (GAP : ras-GTPase activating protein) (Cantley L.C. et coll., 1991). Récemment, une étude a permis d'identifier et de caractériser un substrat de pp60^{c-src} dans des cellules embryonnaires (Wu H. et coll., 1991). La détermination de la structure des deux protéines cibles de 80 et 85 kD (p80/85) et leur colocalisation dans des fibres d'actine suggèrent que ces molécules sont associées avec des composants du cytosquelette et contribuent à l'organisation structurale de la cellule.

L'implication démontrée du VIP dans la différenciation cellulaire et à la fois dans la modulation de l'adénylate cyclase, de pp60^{c-src} et des protéines associées aux microtubules (MAP) (Koh S.W.M., 1989) nous a donc orienté dans le choix des paramètres majeurs à suivre dans le cadre de notre étude. Les critères de différenciation suivants : morphologie cellulaire, induction de la transglutaminase de tissu et inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée, nous ont permis d'évaluer le potentiel de différenciation du VIP par rapport à l'acide rétinoïque. Des mesures d'AMPc et d'activité TPK (pp60^{c-src}) ont constitué nos marqueurs quantitatifs des effets intracellulaires induits par le peptide.

II.A.3. Résultats personnels sur l'effet de différenciation induit par le VIP.

Les travaux qui sont exposés tout au long de ce manuscrit ont été détaillés d'un point de vue technique dans une partie expérimentale afin d'alléger le compte-rendu de nos résultats. Pour chaque paragraphe de résultats personnels, un numéro de page indiquera l'endroit où le lecteur pourra trouver les détails expérimentaux.

II.A.3.1. Différenciation morphologique (voir p.137)

La différenciation morphologique des cellules SK-N-SH et du sous-clone LA-N-2 a été observée après des incubations de 48 heures . L'extension des neurites (prolongements dont la taille est supérieure à deux fois celle du corps cellulaire) a été mise en évidence après traitement par l'acide rétinoïque, le dibutyrylAMPc ou le VIP (**Figure 15**). L'action combinée de l'AR/VIP ou AR/dbAMPc montre d'un point de vue morphologique une nette augmentation de l'état de différenciation cellulaire avec la formation d'un réseau neuronal.

II.A.3.2. Expression de la transglutaminase de tissu (SK-N-SH) et incorporation de thymidine tritiée (LA-N-2).

Expression de la transglutaminase de tissu. (voir p. 137)

L'activité de la transglutaminase de tissu a été mesurée dans les cellules SK-N-SH (Goossens J.F. et coll., 1993). L'induction de l'enzyme par l'acide rétinoïque avait déjà été signalée dans une autre lignée cellulaire de neuroblastome, la lignée SK-N-BE (Melino G. et coll., 1988; Piacentini M. et coll., 1991). Le taux de base de l'activité de la transglutaminase (TG) de tissu est relativement élevé dans la lignée SK-N-SH par rapport à d'autres lignées telles que les lignées HL-60 (cellules de leucémie aiguë myéloblastique et promyélocytaire humaine), HEL (cellules d'érythroleucémie humaine). Nous avons pu mettre en évidence que contrairement au dbAMPc et à l'acide rétinoïque, le VIP seul ne semble pas induire une augmentation de l'activité transglutaminase basale. Par contre, à la fois le dbAMPc et le VIP sont capables de potentialiser l'activité TG induite par l'acide rétinoïque (**Figure 16**).

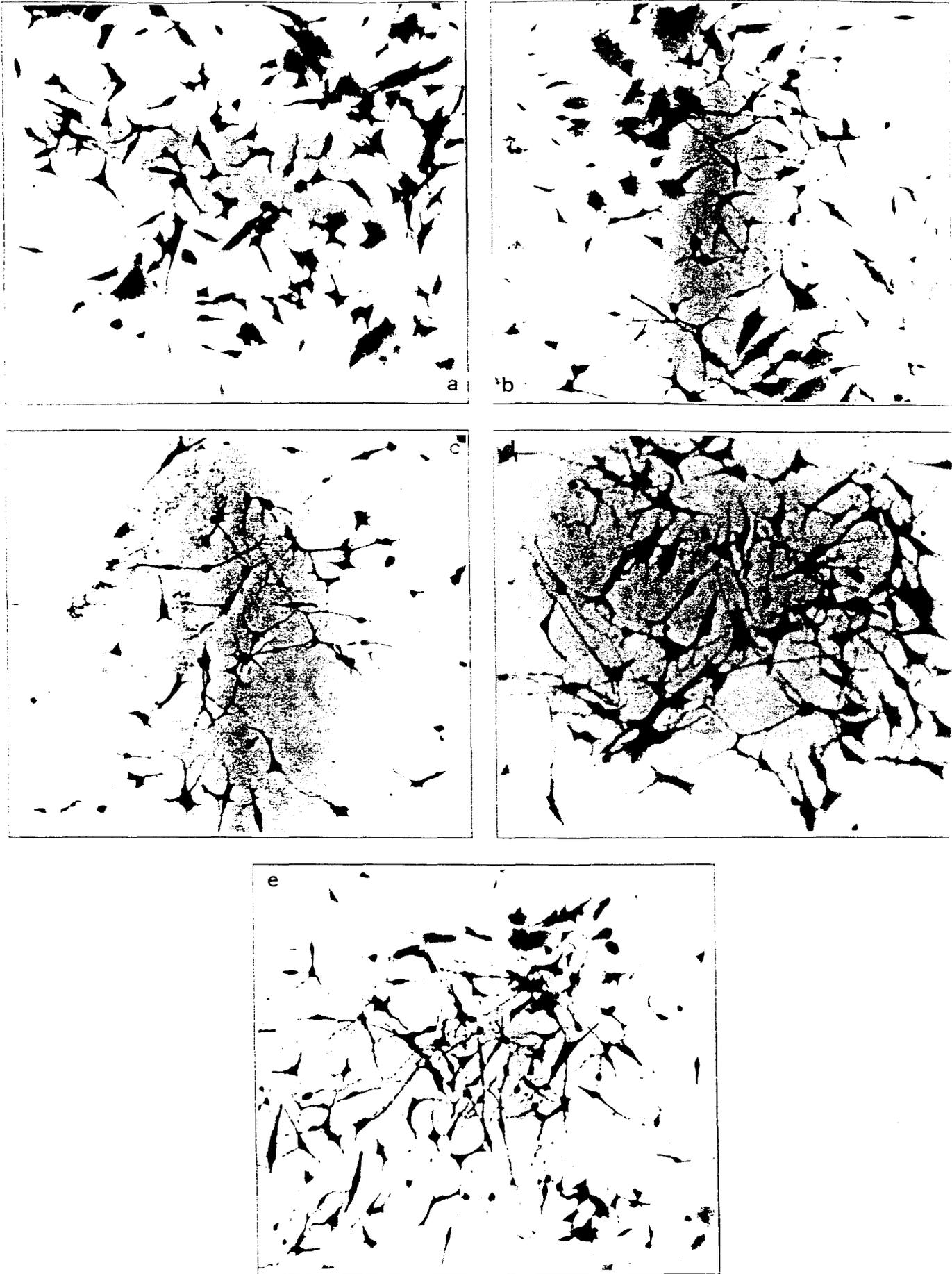


Figure 15A. Observation morphologique des cellules de neuroblastome SK-N-SH par microscopie en contraste de phase (grossissement 200). (a), cellules témoins, ou après traitement par (b), VIP 1 μ M; (c), AR 1 μ M; (d), dbAMPC 1mM ou (e), VIP 1 μ M + AR 1 μ M.

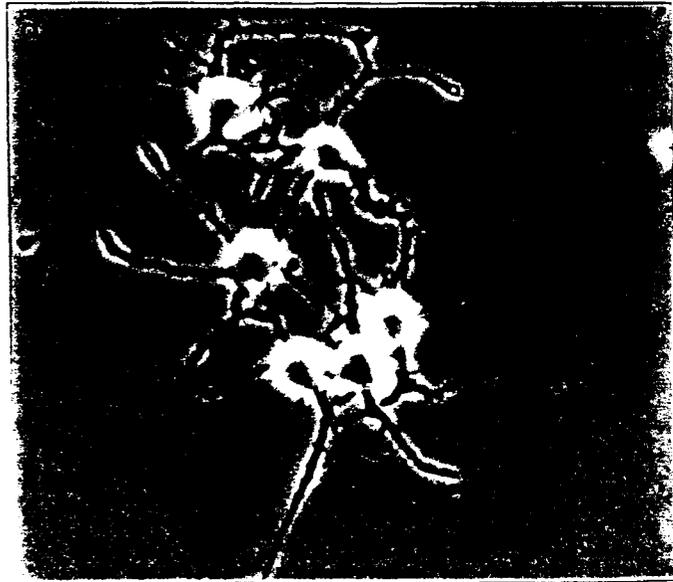
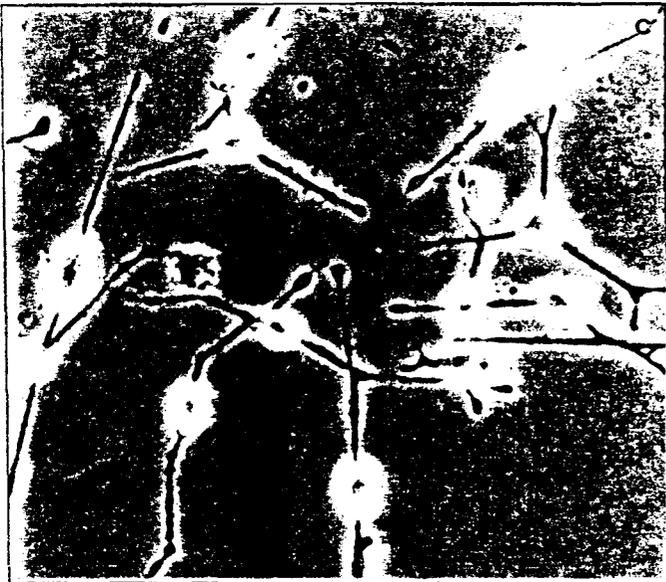
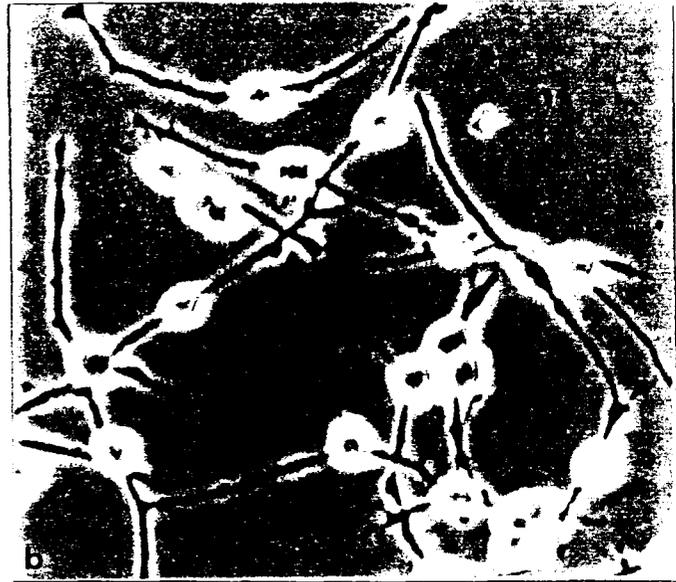


Figure 15B. Observation morphologique des cellules de neuroblastome LA-N-2 par microscopie en contraste de phase (grossissement 400). (a), cellules témoins, ou après traitement par (b), VIP 1 μ M; (c), AR 1 μ M ou (d), dbAMPC 1mM.

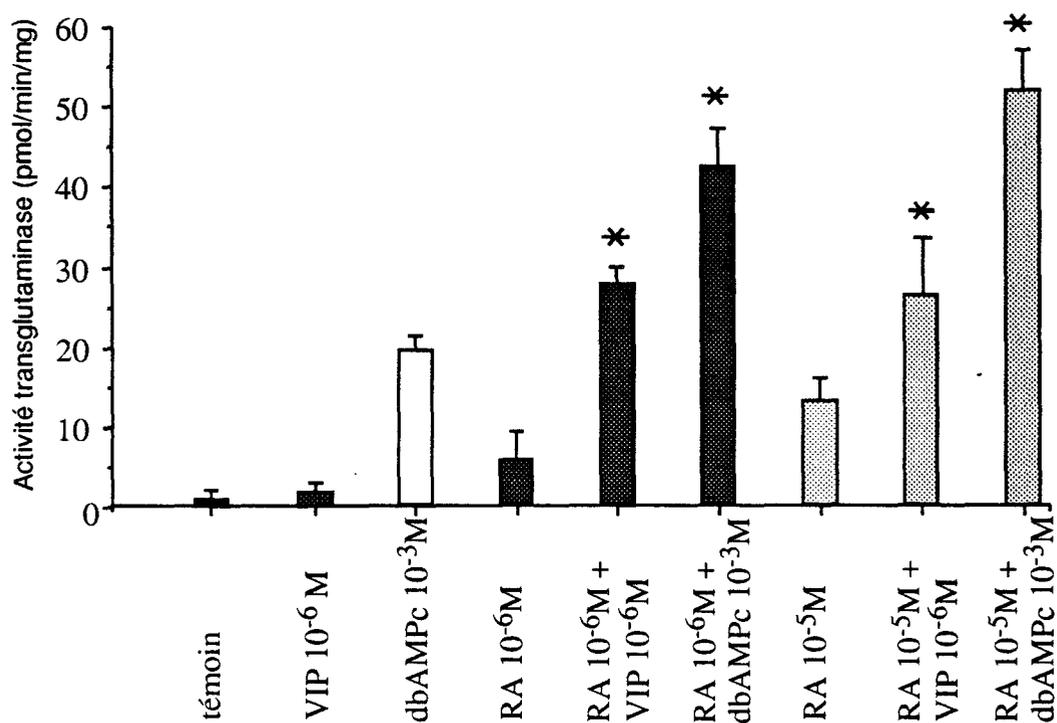


Figure 16. Induction de l'activité transglutaminase dans les cellules SK-N-SH. Potentialisation de l'effet de l'acide rétinoïque par le VIP ou le dbAMPc (*, $p < 0,05$; $n=5$).

Cette synergie d'effet entre l'acide rétinoïque et un agent capable d'augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc est à comparer avec l'observation morphologique. En effet, la différenciation morphologique des cellules SK-N-SH a été observée avec le VIP seul sans provoquer de modification de l'activité TG suggérant ainsi que l'activité de l'enzyme ne peut être, dans tous les cas, corrélée à un état de différenciation cellulaire. Ceci rejoint les résultats rapportés par Piacentini M. et coll. (1991) sur les sous-populations de la lignée SK-N-SH. En effet, la transglutaminase de tissu a été mise en évidence dans les cellules S (cellules gliales ou cellules de Schwann) mais non dans les cellules N (cellules neuroblastiques), alors que seul le type N présente une différenciation morphologique par accroissement des neurites.

Incorporation de thymidine tritiée. (voir p. 139)

La croissance des cellules LA-N-2 a été suivie en présence de concentrations croissantes d'acide rétinoïque ou de VIP afin de mesurer l'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats obtenus permettent de montrer que, tout comme l'acide rétinoïque (agent de différenciation de référence), le VIP est capable d'inhiber l'incorporation de thymidine tritiée de façon dose dépendante (**Figure 17**). En raison de la faible cytotoxicité de l'acide rétinoïque ou du VIP (concentrations inférieures à $1\mu\text{M}$), ces résultats suggèrent une inhibition de la synthèse d'ADN indiquant ainsi un arrêt de la prolifération cellulaire.

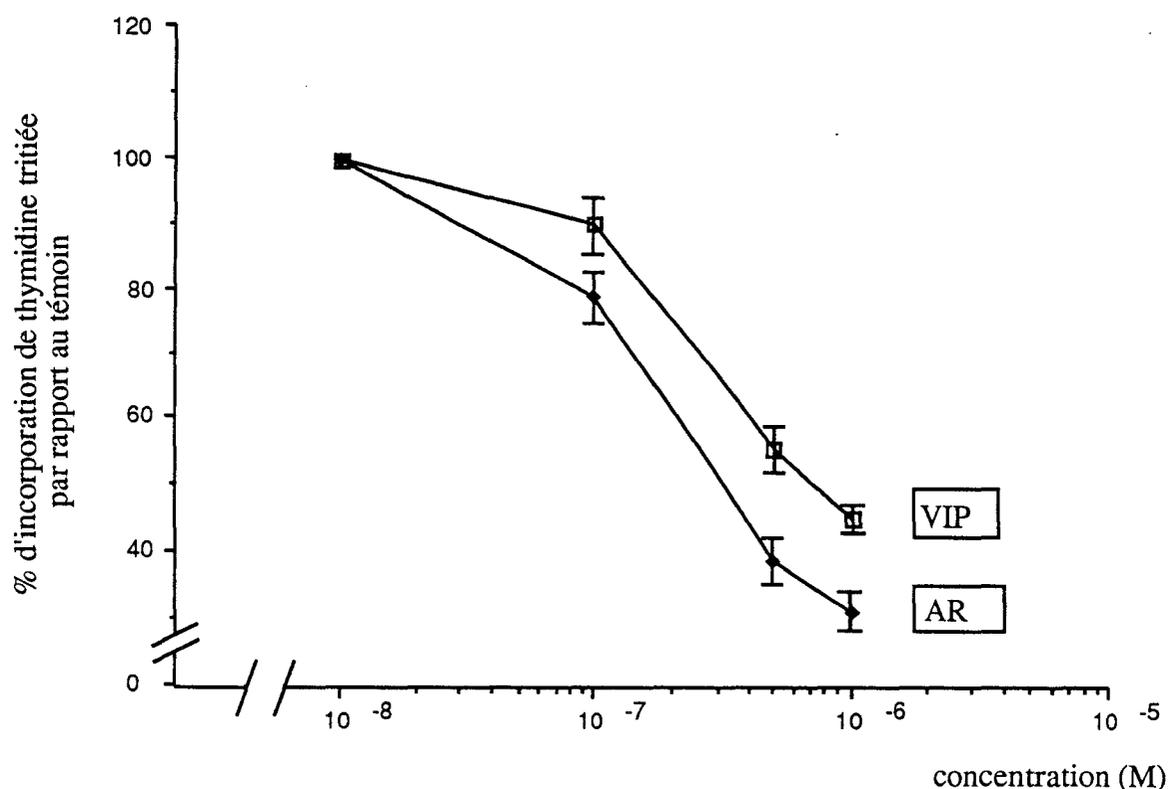


Figure 17. Incorporation de thymidine tritiée (n=4).

II.A.3.3. Systèmes de transduction activés par le VIP.

La transmission du message peptidique qui se traduit par l'interaction VIP-récepteur-protéine G est très souvent la cause d'une activation d'adénylate cyclase. Néanmoins, dans le cas du neuroblastome, il nous a semblé intéressant d'étudier également les effets du VIP sur l'activité tyrosine kinase (pp60^{src}) qui pourrait être considérée comme une voie de transduction potentielle.

II.A.3.3.1. Mesure de la concentration intracellulaire en AMPc (voir p.141).

Ces expériences ont été réalisées sur les deux lignées cellulaires de neuroblastome. Tout d'abord, nous avons mis au point un dosage de l'AMPc intracellulaire par chromatographie liquide haute performance (CLHP) associée à une détection par fluorescence (Goossens J.F. et coll., 1993). Les cellules à confluence sont placées dans un milieu dépourvu de sérum et supplémenté par 1% de sérum albumine bovine. La présence d'un inhibiteur de phosphodiesterases est nécessaire afin d'empêcher la dégradation de l'AMPc intracellulaire formé lors de l'incubation. Après extraction, l'AMPc est dérivé par le chloroacétaldéhyde afin d'obtenir un composé doué d'une propriété de fluorescence. Une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de quantité d'AMPc connue, nous a permis de déduire les concentrations intracellulaires des différents échantillons. Cette méthode analytique a été comparée à la méthode utilisant la technique radioimmunologique courante. Les résultats comparatifs sont tout à fait satisfaisants en ce qui concerne la sensibilité et la spécificité de la méthode.

Nous avons mesuré le taux d'AMPc intracellulaire sous l'effet de concentrations croissantes en VIP. La stimulation de l'adénylate cyclase observée de façon indirecte est dépendante de la concentration en peptide. La **Figure 18** montre que l'augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire n'est observable que pour des concentrations supérieures à 10^{-9} M dans le cas des cellules SK-N-SH alors qu'il faut une concentration dix fois supérieure dans le cas des cellules LA-N-2. Les valeurs de EC50 sont respectivement de 1.10^{-8} M et 8.10^{-8} M pour les cellules SK-N-SH et LA-N-2. L'analyse de ces courbes dose-réponse met en

évidence dans les deux lignées cellulaires un même effet vis-à-vis des fortes concentrations en peptide. En effet, dans les deux cas une diminution de la production d'AMPc s'observe pour des concentrations supérieures à 10^{-6} M. Ce phénomène de saturation puis de diminution de la réponse pourrait suggérer une désensibilisation du récepteur VIP.

Sur la lignée LA-N-2, nous avons pu montrer que la production d'AMPc intracellulaire induite par le VIP est dépendante de la présence de GTP dans le milieu. Ces résultats présentés sur la **Figure19** montrent l'influence du système de couplage (protéine G) sur l'efficacité de l'adénylate cyclase. Le GTP agirait ainsi comme un cofacteur capable de moduler positivement l'interaction entre la sous-unité α_s de la protéine G et l'enzyme.

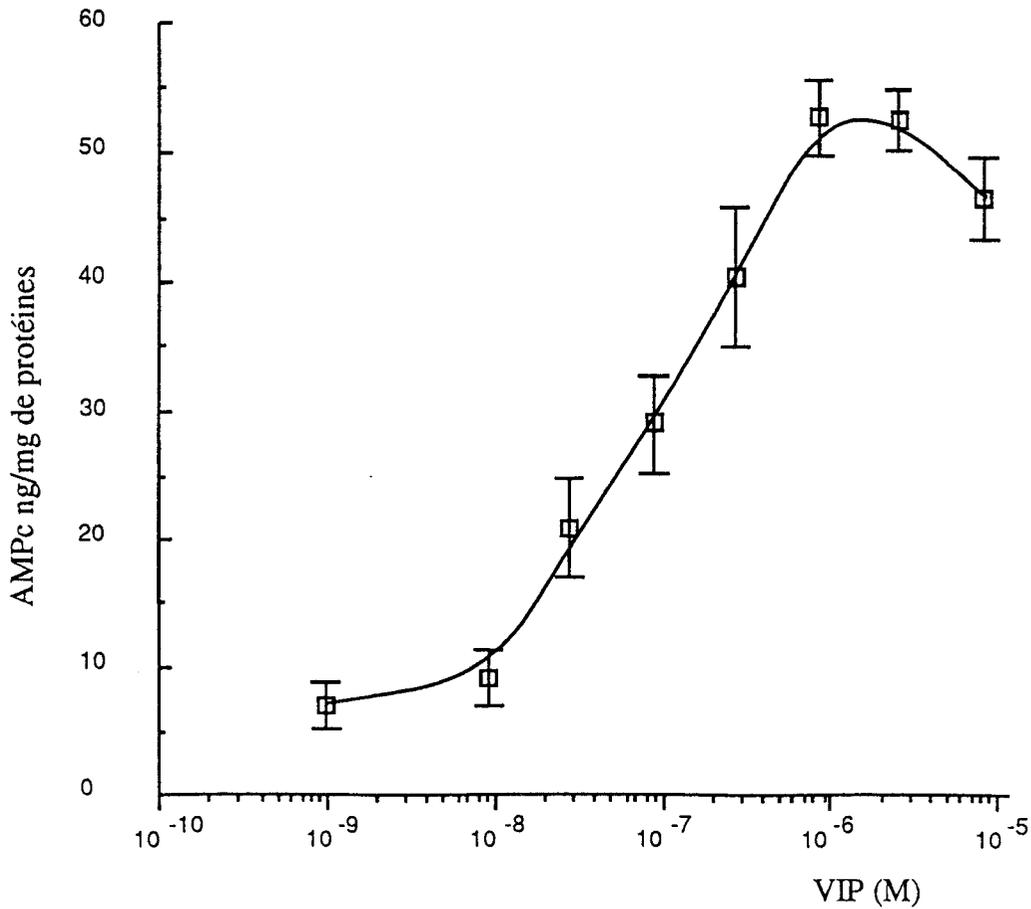
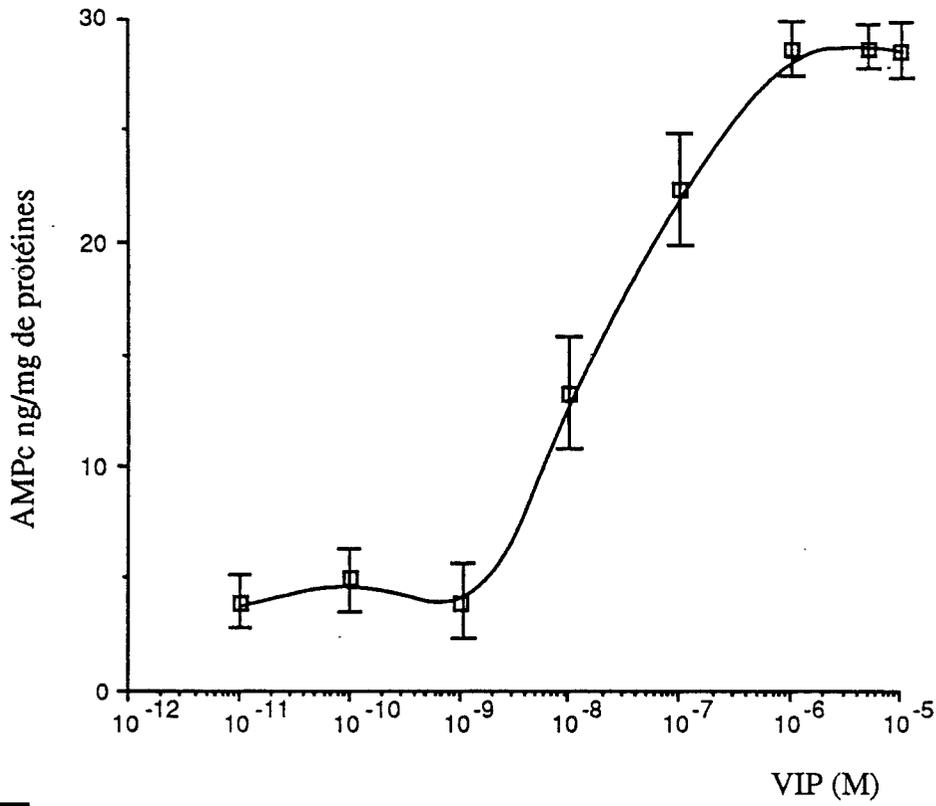


Figure 18. Production d'AMPc par les cellules SK-N-SH et LA-N-2 en fonction de la concentration en VIP (n=5).

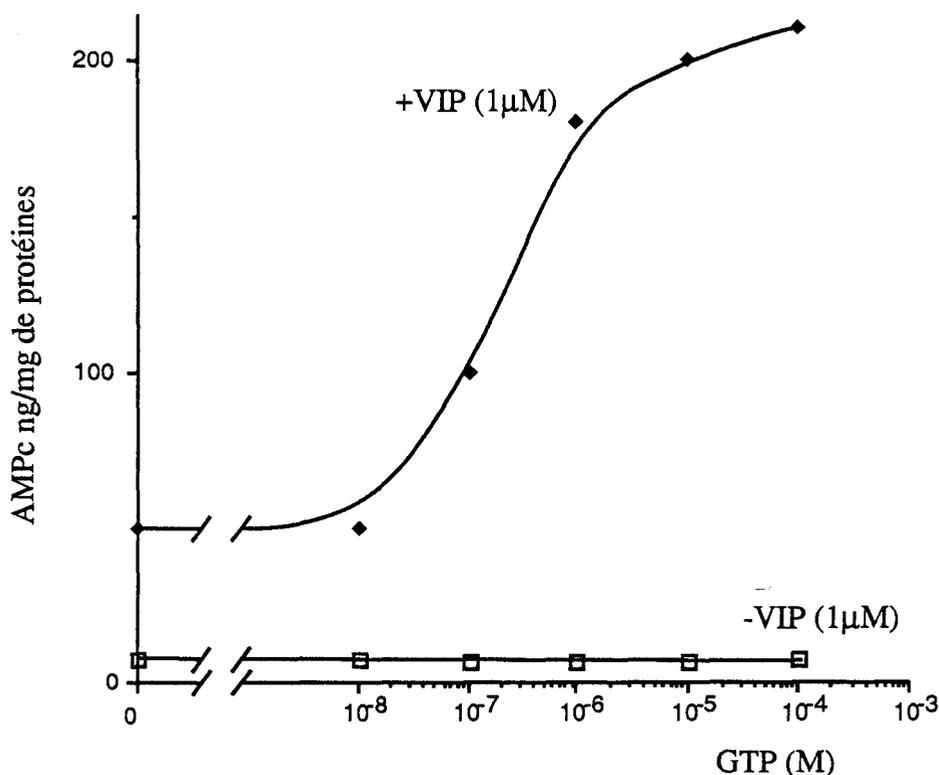


Figure 19. Effet du GTP sur la production d'AMPc induite par le VIP sur les cellules LA-N-2.

II.A.3.3.2. Modulation de l'activité TPK : pp60^{c-src}. (voir p. 143)

Cette partie du travail nous a permis tout d'abord de mettre en évidence la présence de pp60^{c-src} dans les deux lignées cellulaires de neuroblastome (Goossens J.F., 1991). La lignée SK-N-SH tout comme la lignée LA-N-2 expriment des quantités détectables de protéine pp60^{c-src}. A l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine (anti-pp60^{c-src}), nous avons pu mettre en évidence une bande protéique dont la position électrophorétique relative a pu être mesurée à l'aide de marqueurs de taille (**Figure 20**). Nous avons ainsi obtenu des valeurs précises de 57,74 et de 58,03 kD pour la TPK révélée respectivement dans le cytosol des SK-N-SH et des LA-N-2. L'incubation des cellules de neuroblastomes avec le VIP (10⁻⁶ M) ou le dbAMPc (10⁻³ M) a montré de façon significative une augmentation de la quantité de protéines pp60^{c-src}. Dans les deux lignées, nous observons la même stimulation de l'expression du taux de pp60^{c-src} parallèlement à une différenciation morphologique dans les mêmes conditions expérimentales (cf § II.A.3.1. Différenciation morphologique).

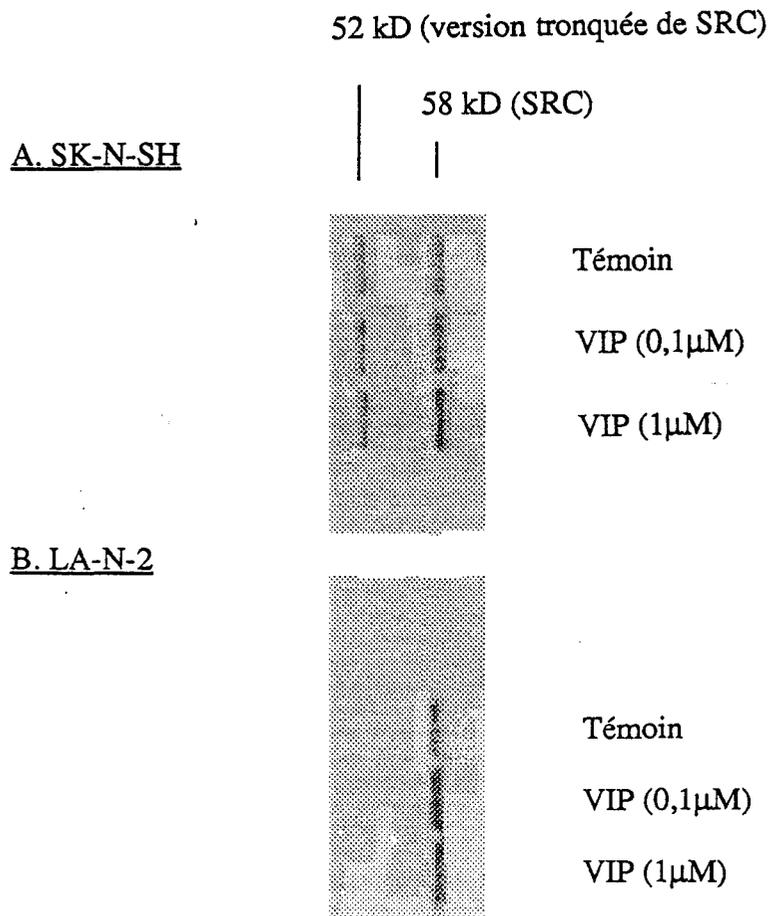


Figure 20. "Immunoblotting" de pp60^{c-src} sur le cytosol préparé à partir des cellules SK-N-SH et LA-N2.

Deux remarques peuvent être faites et commentées.

(i). La présence de pp60^{c-src} n'a pu être détectée que dans le cytosol des deux types cellulaires et non dans la fraction membranaire. Bien que pp60^{c-src} soit une protéine juxtamembranaire (attachement à la membrane par sa partie myristylée), il n'est pas surprenant de le retrouver dans la fraction cytoplasmique en raison des conditions de lyse des cellules. Les détergents utilisés sont en général trop agressifs et ne permettent pas de conserver la partie N-terminale de la protéine (partie myristylée), l'activité kinase n'étant pas altérée. Néanmoins, il existe des détergents permettant l'extraction de la protéine entière (Levinson A.D. et coll., 1981) que nous pourrions utiliser par la suite.

(ii). La position électrophorétique apparente de la bande immunodétectée ne se trouve pas à 60 kD. Cette constatation se conçoit très bien en raison du clivage N-terminal de la protéine. Nous avons pu révéler une autre bande mineure dans le cas des protéines cytosoliques des SK-N-SH. La position électrophorétique de celle-ci se situe à 52,71 kD. De nombreux auteurs ont en effet rapporté la présence d'une bande mineure qui résulte d'un second clivage de pp60^{c-src} qui peut être phosphorylée in vitro (Koh S.W.M., 1991; Levinson A.D. et coll., 1981).

Dans un second temps, la stimulation de la phosphorylation de pp60^{c-src} par le VIP a pu être étudiée par incubation des fractions cytosoliques en présence d'ATP[$\gamma^{32}\text{P}$]. Les résultats présentés sur les **Figures 21** et **22** permettent de noter différentes remarques sur chaque lignée cellulaire.

Lignée SK-N-SH.

La lignée SK-N-SH a été incubée par des concentrations croissantes en VIP (10^{-7}M et 10^{-6}M). Les résultats présentés montrent que le VIP est capable de phosphoryler de nombreuses protéines intracellulaires. Nous avons pu analyser leur poids moléculaires apparents respectifs ainsi que leurs degrés de phosphorylation relatifs (analyse de la densité) par l'utilisation d'un logiciel de traitement d'image. La **Figure 21** permet de dénombrer onze protéines phosphorylées dont les poids moléculaires (PM) sont les suivants : 130, 115, 103,

88, 80, 58, 54, 47, 39, 31, 21kD. La stimulation par le VIP induit la phosphorylation spécifique de deux protéines de PM 130 et 47kD. La comparaison avec la stimulation induite par le dbAMPc montre un profil identique à celui du VIP avec néanmoins une phosphorylation plus importante de la protéine de PM 31kD. La phosphorylation de la protéine située à 58kD ne semble pas augmenter mais on peut néanmoins noter sa présence qui correspond exactement à la protéine révélée par un anti-pp60^{c-src}. Un antagoniste commercialisé du VIP : le [pDClPhe⁶, Leu¹⁷]-VIP a été incubé avec le peptide pendant les 48 heures de traitement. La **Figure 21** montre clairement que parallèlement à l'augmentation de la quantité d'antagoniste dans le milieu d'incubation, les effets du VIP sur la phosphorylation cellulaire sont inhibés. Les protéines de PM 130 et 47kD ont des intensités beaucoup plus faibles.

Lignée LA-N-2.

Le traitement des cellules LA-N-2 par le VIP ou le dbAMPc a été réalisé dans des conditions identiques à celles utilisées pour les SK-N-SH. Le VIP est capable de stimuler la phosphorylation de onze protéines dans la fraction cytosolique (**Figure 22**). Les PM sont les suivants : 128, 117, 96, 94, 89, 73, 58, 49, 42, 35, 29kD. Dans ce profil, nous avons repéré la présence de deux protéines de PM 128 et 42kD qui ont des intensités de phosphorylation augmentées par rapport aux protéines de cellules témoins.

La phosphorylation des protéines induite par le dbAMPc n'est pas très différente de celle observée pour le VIP. Néanmoins, l'intensité relative du marquage n'est pas aussi importante que pour l'induction réalisée par le neuropeptide.

Les deux lignées cellulaires de neuroblastome ont des comportements tout à fait voisins vis-à-vis du VIP. Nous avons pu constater une augmentation de la quantité de pp60^{c-src} corrélée avec une stimulation de la phosphorylation de certaines protéines cytosoliques. Le dbAMPc qui n'augmente pas de façon quantitative la TPK induit des effets proches du VIP via la voie de la PKA. Ces résultats suggèrent donc que le VIP est capable de stimuler la phosphorylation cellulaire par l'induction probable de différents systèmes enzymatiques. La stimulation spécifique sur ce modèle cellulaire de l'activité pp60^{c-src} semble tout à fait corrélée avec l'état de différenciation des cellules de neuroblastome.

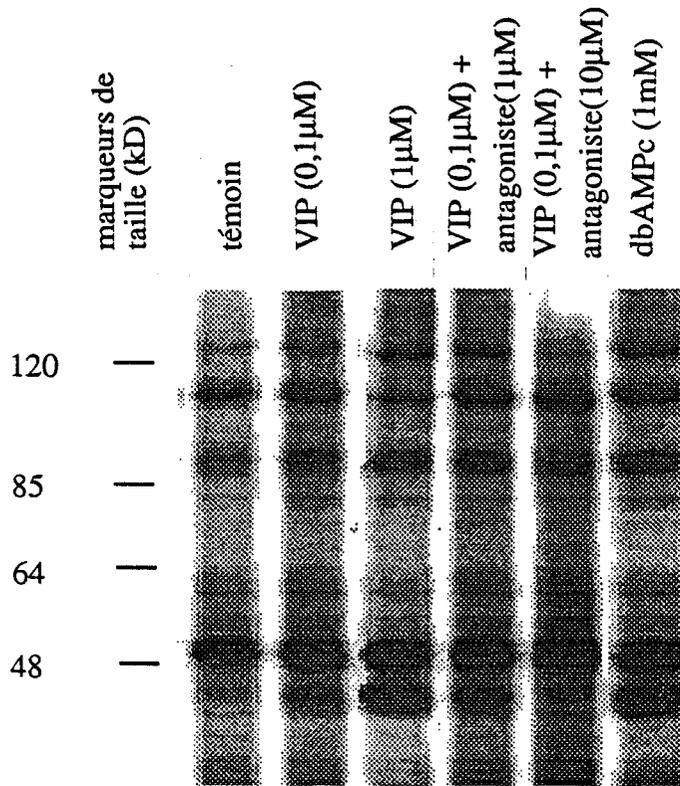


Figure 21. Phosphorylation des protéines cytosoliques dans les cellules SK-N-SH.

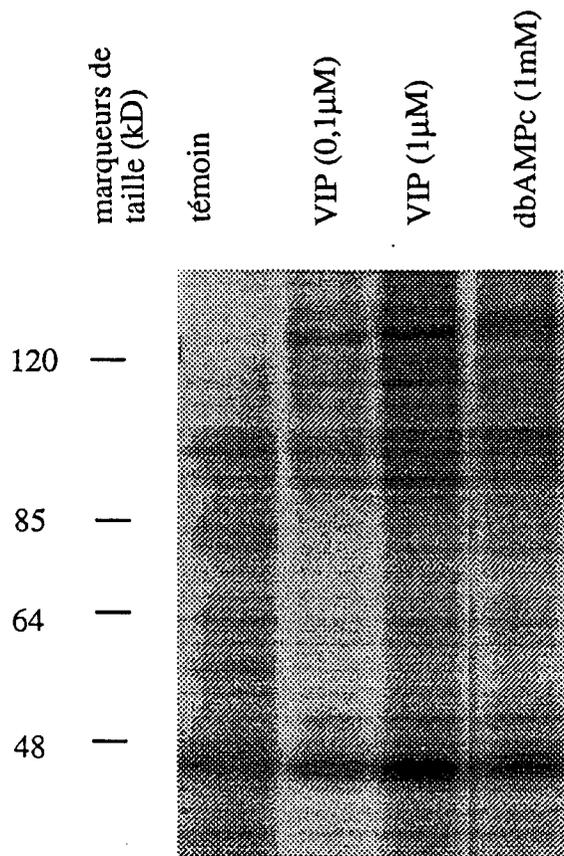


Figure 22. Phosphorylation des protéines cytosoliques dans les cellules LA-N-2.

II.B. LE MUSCLE LISSE DE TRACHEE DE COBAYE.

II.B.1. Rôles respectifs des cellules épithéliales et des cellules musculaires lisses.

Le tonus des muscles lisses est bien évidemment sous la dépendance des cellules musculaires qui répondent à des stimuli tels que les neuromédiateurs, mais il faut également tenir compte du rôle de l'épithélium qui n'est pas une composante négligeable.

L'épithélium des voies aériennes pulmonaires est un épithélium pseudopavimenteux, composé d'au moins huit types cellulaires (**Figure 23**), dont la répartition est évolutive tout au long de l'arbre trachéo-bronchique (Tschirhart E. et Bertrand C., 1988).

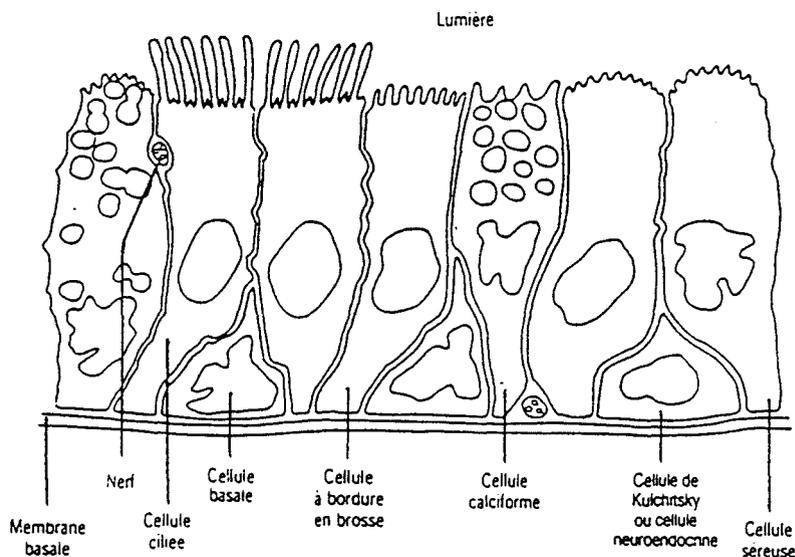


Figure 23. Représentation schématique de la couche cellulaire épithéliale humaine dans les bronches principales, d'après Tschirhart E. et Bertrand C., 1988.

Des jonctions serrées ("tight-junctions") assurent la cohésion ainsi que la relative étanchéité de la couche cellulaire aux agents chimiques et physiques de l'environnement. Des études récentes au niveau de l'arbre trachéo-bronchique ont pu montrer que l'épithélium des voies aériennes pulmonaires pouvait également moduler directement le tonus du muscle lisse, bronchique ou trachéal sous-jacent. En effet, les premières observations *in vitro* montrent que l'absence de la couche épithéliale est susceptible d'augmenter la réactivité du muscle lisse bronchique à différents agonistes contracturants au niveau de la bronche du chien (Flavahan

N.A. et coll., 1985). L'ensemble des résultats obtenus avec ces préparations intactes ou dépourvues d'épithélium suggère que les cellules épithéliales pourraient sécréter un (ou plusieurs) facteur(s) relaxant(s) : EpDRF ("Epithelium-Derivated Relaxing Factor") susceptible(s) de réduire la sensibilité du muscle lisse à des agents bronchocontracturants. Ceci a pu être mis en évidence chez différentes espèces animales comme le lapin (Butler G.B. et coll., 1987), le rat (Frossart N. et Muller F., 1986), le cobaye (Goldie R.G. et coll., 1986) et chez l'homme (Raeburn D. et coll., 1986). La nature du facteur relaxant épithélial n'est pas clairement connue. Il pourrait agir par une voie de régulation locale (paracrine) du tonus musculaire lisse et comprendre plusieurs composantes variant suivant les espèces. Différentes études ont pu montrer que, chez le cobaye et le chien, certains effets de la suppression de l'épithélium bronchique peuvent être reproduits par l'indométhacine, un inhibiteur sélectif de la cyclooxygénase. Les prostaglandines (spécialement la PGE₂) interviendraient donc sur la synthèse, le mode d'action, ou seraient un constituant du facteur relaxant épithélial (Tschirhart E. et coll., 1987; Butler G.B. et coll., 1987; Braunstein G. et coll., 1988). On sait toutefois que la PGE₂ agit en inhibant la libération de neuromédiateurs du nerf vague, mais également par un effet direct sur le muscle lisse (Walters E.H. et coll., 1984).

Par ailleurs, les cellules épithéliales de trachée de chien produisent des leucotriènes B₄ (LTB₄) et certains HETEs (produits de la 5-lipoxygénase). Les cellules épithéliales de trachée humaine produisent plutôt du 15-HETE (produit de la 15-lipoxygénase) et du 8-15 HETE (Hunter J.A. et coll., 1985). Les 15-HETEs peuvent être convertis en lipoxines (lipoxine A par exemple) capables de provoquer la contraction du muscle bronchique (Dahlen S.E. et coll., 1987). Ainsi l'épithélium peut également être la source de facteurs contracturants, dérivés de l'acide arachidonique. Aussi, par sa capacité de synthèse de substances contracturantes et relaxantes néoformées, dérivées de l'acide arachidonique, l'épithélium pourrait exercer un contrôle bidirectionnel sur le tonus du muscle lisse.

II.B.2. Résultats personnels.

Notre approche du modèle a été double comme dans le cas du neuroblastome :

(i) Observation de la relaxation du muscle lisse de trachée : réponse globale de l'organe isolé à l'ajout de VIP.

(ii) Suivi du principal système de transduction du VIP : mesure de l'AMPC intracellulaire produit par les cellules épithéliales.

Relaxation du muscle lisse de trachée. Modulation par l'épithélium. (voir p. 140)

L'étude de la relaxation d'anneaux de trachée de cobaye a permis tout d'abord de mettre en évidence une bronchorelaxation induite par le VIP, que la trachée soit précontractée ou non par la carbamylcholine, contrairement à ce qui a pu être rapporté sur d'autres modèles (Webber S.E. et Widdicombe J.G., 1987; Tschirhart E. et coll., 1987). Ces auteurs montrent, chez le furet, qu'une contraction du muscle lisse de trachée induite par la méthacholine ou la phényléphrine peut être réduite par le VIP. La **Figure 24** montre une relaxation dose dépendante induite par le VIP. La concentration produisant 50% de la réponse maximale du muscle lisse de trachée (EC₅₀) est de $16,25 \pm 5,35$ nM (Goossens J.F., 1990). Une seconde série d'expériences a montré l'importance de l'épithélium trachéal. L'abrasion légère de la surface luminale d'un fragment de trachée suffit à supprimer les cellules épithéliales sans que le tissu sous-jacent ne soit altéré. Ainsi, il est possible d'étudier, *in vitro*, sur des fragments de voies aériennes, le rôle modulateur de l'épithélium trachéal et bronchique. Nos résultats montrent de façon significative une courbe dose-réponse déplacée vers la gauche avec une valeur de EC₅₀ égale à $3,83 \pm 1,05$ nM. Ceci se traduit par la nécessité d'augmenter les doses de peptide pour obtenir les mêmes effets qu'au niveau des fragments de trachée dépourvus d'épithélium sans qu'il y ait de modifications de la réponse maximale à l'agoniste (10^{-6} M).

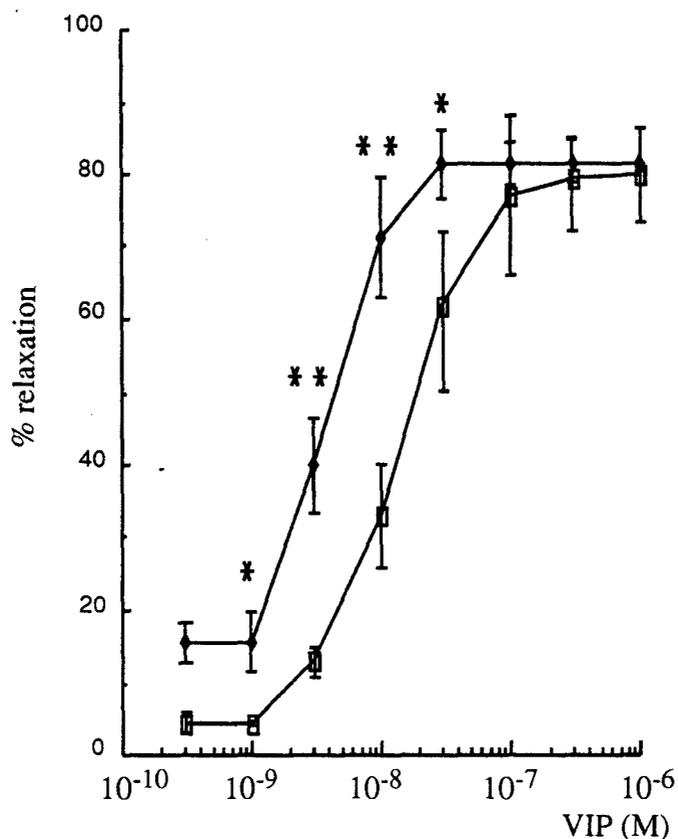


Figure 24. Courbes de relaxation du muscle lisse en présence (□) ou en absence (♦) d'épithélium sur trachée de cobaye précontractée par la carbamylcholine 10^{-7} M (*, $p < 0,02$; **, $p < 0,01$; $n=8$).

Mesure de l'AMPC intracellulaire. (voir p. 141)

La production d'AMPC intracellulaire a été étudiée sur les cellules épithéliales de trachée en culture primaire. Les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées sur le modèle du neuroblastome (**Figure 25**). L'analyse des résultats montre tout d'abord que contrairement aux lignées cancéreuses, le taux d'AMPC basal est relativement important puisqu'on détecte $5,10 \pm 0,20$ pmol/cm² alors qu'il n'est que de $0,02 \pm 0,001$ pmol/cm² pour les cellules LA-N-2. Ensuite, l'augmentation de la quantité d'AMPC est dépendante de la concentration en VIP présent dans le milieu d'incubation. La valeur de EC₅₀ (concentration correspondant à 50% de la production maximale d'AMPC) est de $2,90 \pm 0,52$ nM. De la même

façon que pour les cellules de neuroblastome, les expériences répétées montrent une désensibilisation du récepteur pour des valeurs supérieures à $0,30 \mu\text{M}$.

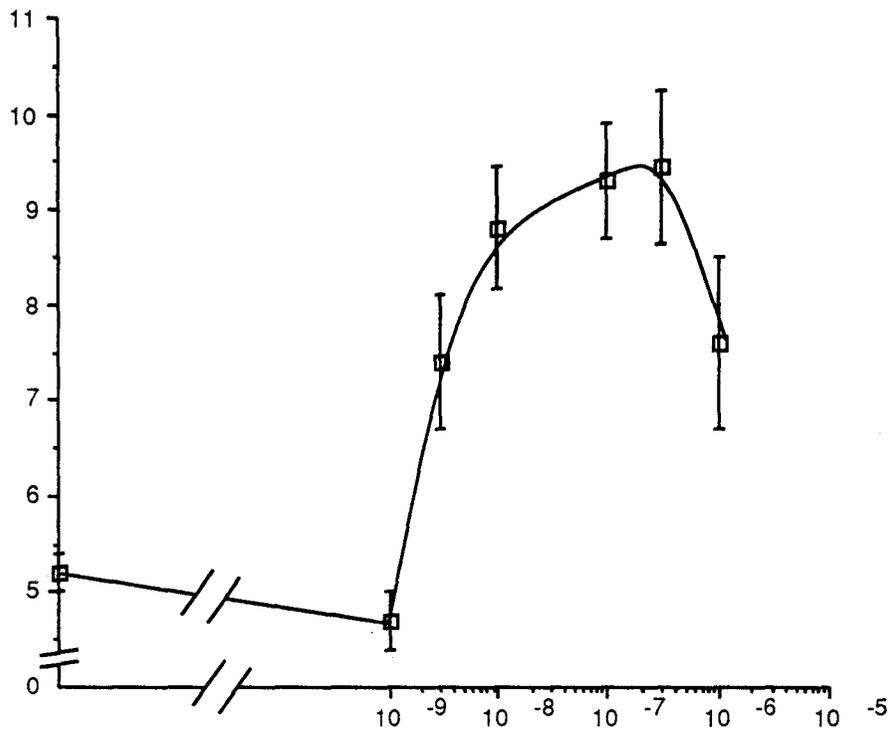


Figure 25. Production d'AMPc dans les cellules épithéliales en fonction de la concentration en VIP (n=3).

III. APPROCHE MOLECULAIRE :
LIGAND-RECEPTEUR

III. APPROCHE MOLECULAIRE : LIGAND-RECEPTEUR.

Les deux modèles pharmacologiques retenus nous ont donc servi de point de départ pour une étude plus approfondie focalisée sur une approche moléculaire intéressant d'une part le ligand et ses sites de liaison et d'autre part les systèmes de transduction potentiels, spécifiques ou non de la réponse cellulaire.

III.A. LIGAND : VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE.

III.A.1. Analyse conformationnelle : revue bibliographique.

La conformation adoptée par les polypeptides est responsable à la fois de la haute spécificité pour leurs récepteurs respectifs et de l'expression de leur activité biologique. Ainsi, l'analyse conformationnelle et l'étude des relations structure-activité sont toutes deux des méthodes indispensables pour tenter de corréler l'activité biologique et la structure tridimensionnelle des molécules. Des expériences classiques de dénaturation/renaturation des peptides (Anfinsen C.B. et coll., 1961; Wetlaufer D.B. et Ristow S., 1973) ont montré que pour la plupart de ces molécules, l'information requise pour produire la structure finale se trouve contenue en totalité dans la séquence en acides aminés. Il est donc possible, à partir d'une analyse théorique de la structure primaire d'un peptide, d'évaluer le potentiel structural de chaque segment peptidique et de prédire l'arrangement spatial de toute la molécule. Parmi les algorithmes permettant d'évaluer de façon empirique la structure secondaire d'un peptide, la méthode de Chou et Fasman (1978) a été la plus utilisée en raison de sa facilité d'emploi et des résultats satisfaisants obtenus sur différentes molécules testées.

Parallèlement, des études spectroscopiques utilisant les techniques de dichroïsme circulaire et de résonance magnétique nucléaire (RMN) à haute résolution peuvent apporter une grande quantité d'information sur la structure secondaire des peptides. Le dichroïsme circulaire est particulièrement utilisé afin d'estimer la présence éventuelle de structure en hélice. La RMN à haute résolution demeure quant à elle la technique indispensable pour l'étude

conformationnelle de peptides en solution. En effet, des interactions précises entre différents groupements fonctionnels des acides aminés peuvent ainsi être visualisées.

III.A.1.1. Prédiction conformationnelles.

Le calcul des probabilités concernant différentes parties du VIP, réalisé en utilisant les paramètres de Chou et Fasman, a permis de définir au sein du peptide deux régions ordonnées. L'une N-terminale, posséderait deux coudes β composés des segments 1-4 et 7-10 de la molécule, l'autre C-terminale (segment 14-28) serait plutôt dans une conformation hélicoïdale (Fournier A. et coll., 1988).

III.A.1.2. Dichroïsme circulaire.

Les études spectroscopiques par dichroïsme circulaire (DC) ont été réalisées sur différents fragments N-terminaux et C-terminaux. Contrairement à d'autres peptides linéaires, ces molécules n'adoptent pas de structure définie en solution aqueuse (Roques B.P. et coll., 1980). L'addition d'un solvant organique miscible à l'eau : le 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) permet d'observer une structure ordonnée pour ces différents fragments peptidiques. Les études réalisées par DC sur les fragments peptidiques du VIP et sur la molécule entière permettent de dégager certains points conformationnels importants. La présence d'une structure hélicoïdale a été détectée pour l'octacosapeptide mais également pour des fragments C-terminaux (14-28 : segment minimal pour obtenir un spectre caractéristique d'une hélice) (Fournier A. et coll., 1988; Bodanszky M. et coll., 1974; Fry D.C. et coll., 1989).

Des études comparatives entre le VIP et le fragment 2-28 suggèrent l'importance d'His¹ dans la conformation globale de la molécule. En effet, la propension à former une hélice est significativement plus importante pour le segment 2-28 que pour la molécule entière. Cette observation conforte l'hypothèse selon laquelle His¹ influencerait fortement la formation d'un ou de plusieurs coudes β potentiels situés en N-terminal. Ainsi, dans le peptide 2-28 la structure en hélice serait plus étendue (Fournier A. et coll., 1988).

L'influence du pH a été évaluée sur le peptide entier. Aucun effet sur la modification de la structure secondaire du VIP n'a pu être constaté pour une échelle de pH comprise entre 2,8 et 11,7 dans un mélange HFIP/H₂O (40/60; V/V) (Fournier A. et coll., 1988). Par contre, dans un mélange MeOH/H₂O (50/50; V/V), une faible augmentation du pourcentage en hélice a été observée parallèlement à une élévation de la valeur du pH (pH 4 à 6) (Fry D.C. et coll., 1989).

III.A.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire.

Des études de RMN à haute résolution, à une dimension et à deux dimensions, ont été reportées dans la littérature. Tout d'abord, Fournier A. et coll. (1988) ont souligné l'importance de l'histidine en position 1. En effet, dans leur conclusion, les auteurs proposent une interaction probable entre le noyau imidazole et la tyrosine en position 10 (groupement phénolique) signifiant un repliement global de la partie N-terminale sur elle-même. De plus, ils notent également un effet NOE (Nuclear Overhauser Effect) entre les protons aromatiques de la phénylalanine en position 6 et l'asparagine en position 9 et proposent l'hypothèse selon laquelle la partie 7-10 du peptide pourrait servir d'inducteur de l'hélice α comprise dans la partie C-terminale.

Deux études RMN à deux dimensions ont ensuite été réalisées. L'une, réalisée dans un mélange MeOH/H₂O (50/50; V/V), conclut à une structure secondaire composée de coudes β en 4-7 et 25-28 et d'une hélice α formée par les résidus 10 à 25 (Fry D.C. et coll., 1989). L'autre, réalisée dans un mélange TFE/H₂O (40/60; V/V), propose l'existence de deux segments hélicoïdaux 7-15 et 19-27 séparés par une séquence conférant une mobilité à la molécule. Enfin, des fragments N-terminaux et C-terminaux du peptide ont été étudiés afin de mieux affiner la connaissance de la structure ordonnée potentielle de ces zones non hélicoïdales du VIP.

L'étude RMN du peptide T (ASTTTNYT) dont la séquence peptidique présente une forte homologie avec le fragment du VIP (AVFTDNYT) a été réalisée par différentes équipes (Picone D. et coll., 1988) et dans notre laboratoire (Cotelle N. et coll., 1990). Les expériences d'élévation de température ont montré la présence d'un coude β formé par l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le CO de Thr⁵ et le NH de Thr⁸. De plus, une seconde

liaison hydrogène a été mise en évidence entre le CO de Thr⁴ et le NH de Tyr⁷. Ainsi une structure secondaire a pu être proposée. En raison d'une similitude entre les structures primaires et d'un potentiel de reconnaissance du récepteur CD₄, on peut tout à fait envisager la même structure secondaire pour la partie N-terminale du peptide.

La partie C-terminale 21-28 (KYLNSILN) a fait l'objet d'une étude RMN démontrant la présence d'une structure ordonnée (Fournier A. et coll., 1982). Plus précisément, la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires a été mise en évidence par l'observation de la variation du déplacement chimique des protons en fonction de la température. Il apparaît ainsi que le proton en cis de la fonction amide sur la chaîne latérale d'Asn²⁸ en C-terminal puisse interagir avec l'oxygène porté par le groupement phénolique de Tyr²² dans le fragment peptidique. Ce résultat est d'ailleurs tout à fait en accord avec une prédiction conformationnelle par la méthode de Chou et Fasman (1978) qui suggère l'existence d'une structure ordonnée de type feuillet β entre les résidus 22 à 25. Pour conclure, les auteurs de cette étude postulent d'une part que cette structure est probablement présente dans le VIP entier et d'autre part que la partie C-terminale du VIP pourrait être associée à la même séquence d'une autre molécule pour former un arrangement de type feuillet plissé β intermoléculaire (Fournier A. et coll., 1982).

III.A.2.Résultats personnels.

Les différentes techniques citées précédemment ont été utilisées pour préciser la conformation du VIP mais aussi celle des séquences peptidiques dont la synthèse s'est avérée essentielle pour notre recherche de molécules "VIP-like".

III.A.2.1. Analyses conformationnelles théoriques.

Différents algorithmes dérivés ou non de la méthode de Chou et Fasman ont été utilisés afin de vérifier les différentes hypothèses soulignées dans la littérature.

III.A.2.1.1. Méthode de Chou et Fasman.

Les prédictions conformationnelles utilisant cet algorithme ont permis de décrire pour la première fois une structure ordonnée du peptide. Les résultats sont les suivants :

(i) La partie N-terminale de la molécule est une structure ordonnée possédant une organisation comprenant deux coudes β . Ainsi, les paramètres de Chou et Fasman pour le segment du VIP (1-4) et le segment du VIP (7-10) sont respectivement $\langle p_t \rangle = 1,13$ ($\langle P_t \rangle = 2,02 \cdot 10^{-4}$) et $\langle p_t \rangle = 1,28$ ($\langle P_t \rangle = 2,26 \cdot 10^{-4}$).

$\langle p_\alpha \rangle$, $\langle p_\beta \rangle$, $\langle p_t \rangle$ sont les probabilités d'avoir une structure respectivement en hélice α , en feuillet β ou en coude β pour la séquence considérée.

$\langle P_\alpha \rangle$, $\langle P_\beta \rangle$ ou $\langle P_t \rangle$ sont des moyennes conformationnelles d'une séquence possédant respectivement un potentiel en hélice α , en feuillet β ou en coude β .

(ii) En ce qui concerne l'arrangement hélicoïdal de la partie médiane du peptide, la meilleure probabilité est obtenue pour la séquence 12-23 pour laquelle la probabilité de présence d'une hélice α ($\langle p_\alpha \rangle = 1,13$) est supérieure aux autres structures potentielles ($\langle p_\beta \rangle = 1,02$ et $\langle p_t \rangle = 0,79$).

III.A.2.1.2. Méthode de Novotny et Auffray

Cet algorithme offre un intérêt considérable compte tenu de sa capacité à utiliser à la fois les informations de charge et de profil hydrophile-hydrophobe des acides aminés composant une séquence peptidique (Novotny J. et Auffray C., 1984). Plus précisément pour le VIP, le profil de charges du VIP ainsi que le profil hydrophobe montrent clairement différents points importants à souligner :

(i) Deux résidus chargés négativement dans la partie N-terminale sont situés l'un du côté amino terminal et l'autre au centre d'une structure potentiellement en coude β : la séquence 6-9.

(ii) Une alternance de résidus chargés positivement se trouve insérée dans la structure composée des acides aminés 11 à 21 formant une hélice α . Ceci est d'ailleurs tout à fait en accord avec des résultats publiés sur le potentiel amphiphile de cette hélice qui, d'après certains auteurs, serait plutôt une hélice de type π (Musso G.F. et coll., 1988) (**Figure 26**).

(iii) Enfin, la partie C-terminale serait quant à elle une structure neutre électriquement et plutôt insérée dans une conformation de type feuillet plissé β intra- ou intermoléculaire.

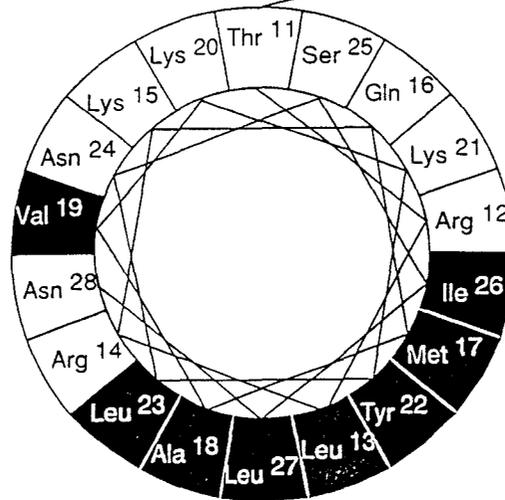
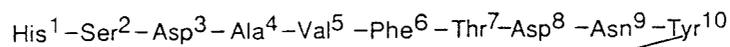


Figure 26. Représentation axiale du segment 11-28 du VIP (en clair, acides aminés hydrophiles; en sombre, acides aminés hydrophobes). D'après Musso G.F. et coll., 1988.

III.A.2.1.3. Méthode d'analyse des zones hydrophobes (HCA : "Hydrophobic cluster analysis").

Cette méthode décrite par l'équipe de J.P. Mornon (Gaboriaud C. et coll., 1987; Lemesle-Varloot L. et coll., 1990) a été utilisée pour notre étude de la structure secondaire du VIP. Cet algorithme possède la particularité de déterminer, dans une structure protéique globulaire, les différentes zones en hélice α et/ou en structure β . A partir d'une représentation en deux dimensions d'une séquence peptidique, les différents acides aminés hydrophobes sont reliés entre eux et forment ainsi des zones de "cluster" hydrophobes (**Figure 27**). Par comparaison à d'autres zones caractéristiques rencontrées dans des structures ordonnées établies, on peut prédire une homologie de structure secondaire.

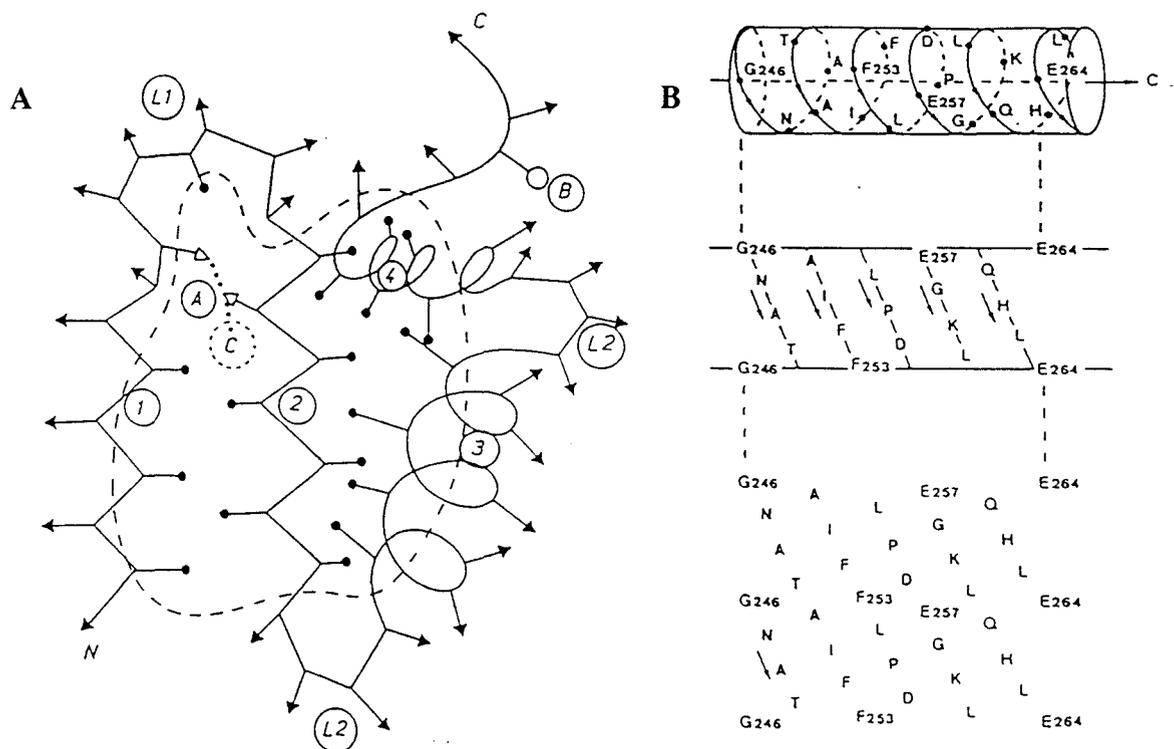


Figure 27. (A) Représentation schématique d'un domaine protéique globulaire. Structures fréquemment observées : (1) feuillet β en surface composé de (●, résidus hydrophobes; ▲, résidus hydrophiles); (2) feuillet β interne; (3) hélice α amphiphile en surface; (4) hélice α amphiphile interne (rare); (L1) boucle contenant des résidus hydrophobes; (L2) boucle contenant des résidus hydrophiles pouvant inclure des coudes β . La cavité hydrophobe est délimitée par les pointillés. (B) Exemple d'analyse de zones hydrophobes. Séquence GNATAIFFLPDEGKLQHLE de l' α_1 -antitrypsine, d'après Gaboriaud C. et coll., 1987.

Cette méthode a été appliquée pour le VIP. La **Figure 28** montre tout à fait clairement la présence d'un "nuage" à caractère hydrophobe que nous avons pu comparer à des structures de type hélicoïdal comme par exemple celles rencontrées dans l' α_1 -antitrypsine, dans les récepteurs aux œstrogènes ou aux minéralocorticoïdes (Lemesle-Varloot L. et coll., 1990). Il en résulte, que d'après cette méthode, le segment 5-27 pourrait former une hélice α .

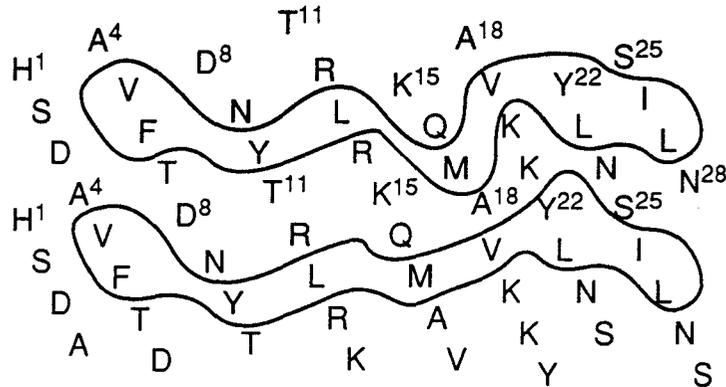


Figure 28. Représentation du VIP selon la méthode de l'analyse HCA

En résumé, ces différents algorithmes nous ont permis de dégager de nombreuses informations quant à la structure secondaire probable du peptide. Il semble se dégager une structure rigide composée par l'hélice amphiphile (partie médiane du VIP) flanquée de deux régions plus courtes en N-terminal et en C-terminal ayant un caractère plus souple. La présence de résidus chargés surtout en N-terminal laisse supposer un repliement de ces chaînes afin de masquer la face hydrophobe de l'hélice et de permettre une meilleure solvation de la molécule.

Cette première approche conformationnelle théorique a été suivie d'une étude pratique visant à confirmer une partie de ces résultats. Nous avons délibérément choisi de nous intéresser plus particulièrement à la partie N-terminale du peptide qui n'avait jusqu'ici soulevé que très peu d'intérêt et suscité peu de publications (Bodanszky M. et coll., 1977). Cette séquence nous a semblé néanmoins intéressante sur le plan structural puisque capable de reconnaître le site récepteur CD₄ (Ruff M.R. et coll., 1987), ceci s'expliquant par une grande analogie structurale avec le peptide T.

III.A.2.2. Etudes spectroscopiques du VIP(1-11).

III.A.2.2.1. Dichroïsme circulaire. (voir p. 144)

Les spectres dichroïques montrent, pour la partie 1-11 du peptide, la présence d'une structure ordonnée qui n'est ni une hélice α , ni une conformation en feuillet β (Goossens J.F. et coll., 1992). Plus précisément, le spectre reflète la présence de plusieurs structures ordonnées incluant probablement le type coude β (I, II ou III) (**Figure 29**). Par ailleurs, un dichroïsme fortement négatif dans la région UV de 250 à 300 nm a été observé pour le peptide 1-11 alors que cela n'est pas observé pour le peptide 2-11. Ceci suggère une possible interaction entre His¹ et Tyr¹⁰ qui se trouvent sans doute très proches l'un de l'autre.

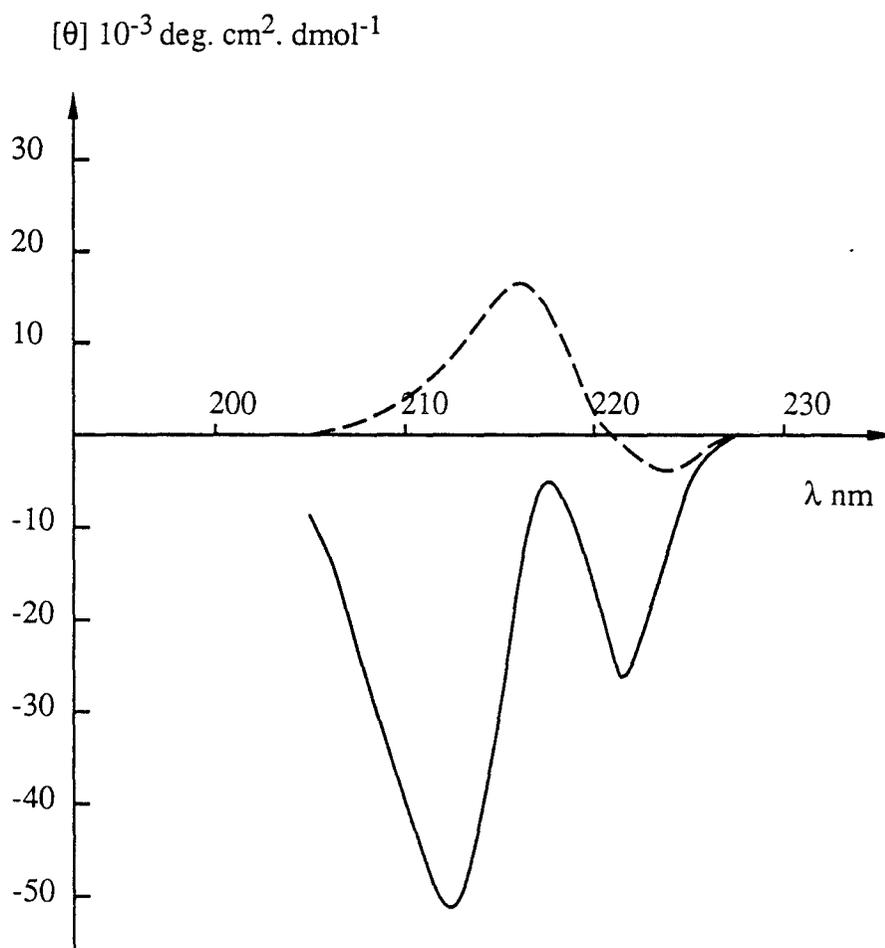


Figure 29. Spectres dichroïques des fragments 7-11 (---) et 1-11 (—) dans le DMSO (C= 0,165 mg/ml, d= 0,1cm)

Parallèlement à cette première étude spectroscopique, nous avons réalisé une étude en RMN capable de préciser ces différents éléments structuraux.

III.A.2.2.2. Résonance magnétique nucléaire. (voir p. 144)

La structure du VIP (1-11) a été étudiée par la technique RMN à haut champ et à deux dimensions. Par COSY (Correlated spectroscopy analysis), nous avons pu attribuer chaque proton de chaque résidu d'acides aminés de la molécule (**Figure 30**). Dans un second temps, par élévation de la température, la variation des glissements chimiques a été déterminée pour chaque groupement NH_{α} (**Tableau 2**). Cette fonction est linéaire et le calcul de la pente détermine la plus ou moins grande variation du déplacement chimique. Ainsi, les groupements NH_2 de Ala⁴, Val⁵ et Tyr¹⁰ ont des déplacements chimiques qui varient faiblement en fonction de la température (valeur $< -3.10^{-3}$ ppm/°C) ce qui indique la présence de liaisons hydrogène intra-moléculaires. Ces résultats révèlent une interaction entre ces trois résidus conférant ainsi une conformation semi-rigide à la molécule. L'existence de coudes β de type I et III peut être envisagée car stabilisée d'une part par une liaison hydrogène entre le proton amide de Val⁵ et le CO du résidu Ser² et d'autre part une liaison H supplémentaire entre le NH de Ala⁴ et l'oxygène de la fonction alcool situé sur la chaîne latérale de Ser². Ce type de liaison H particulière entre la chaîne latérale d'un résidu en position i qui peut être Ser, Thr, Asp ou Asn et la position amide d'un résidu en position $i+2$ a été mis en évidence pour différents peptides tels que la séquence S-P-K-K (Suzuki M., 1989; Bailly F., 1992; Bailly F. et coll., 1992) (**Figure 31**). C'est pourquoi cette structure secondaire a été dénommée "Asx turn". Le second coude β de type II est stabilisé par une liaison H entre le NH de Tyr¹⁰ et le CO de la Thr⁷.

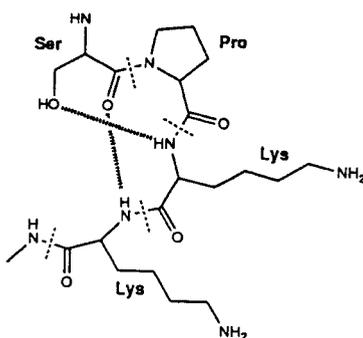


Figure 31. Structure SPKK, d'après Bailly F., 1992.

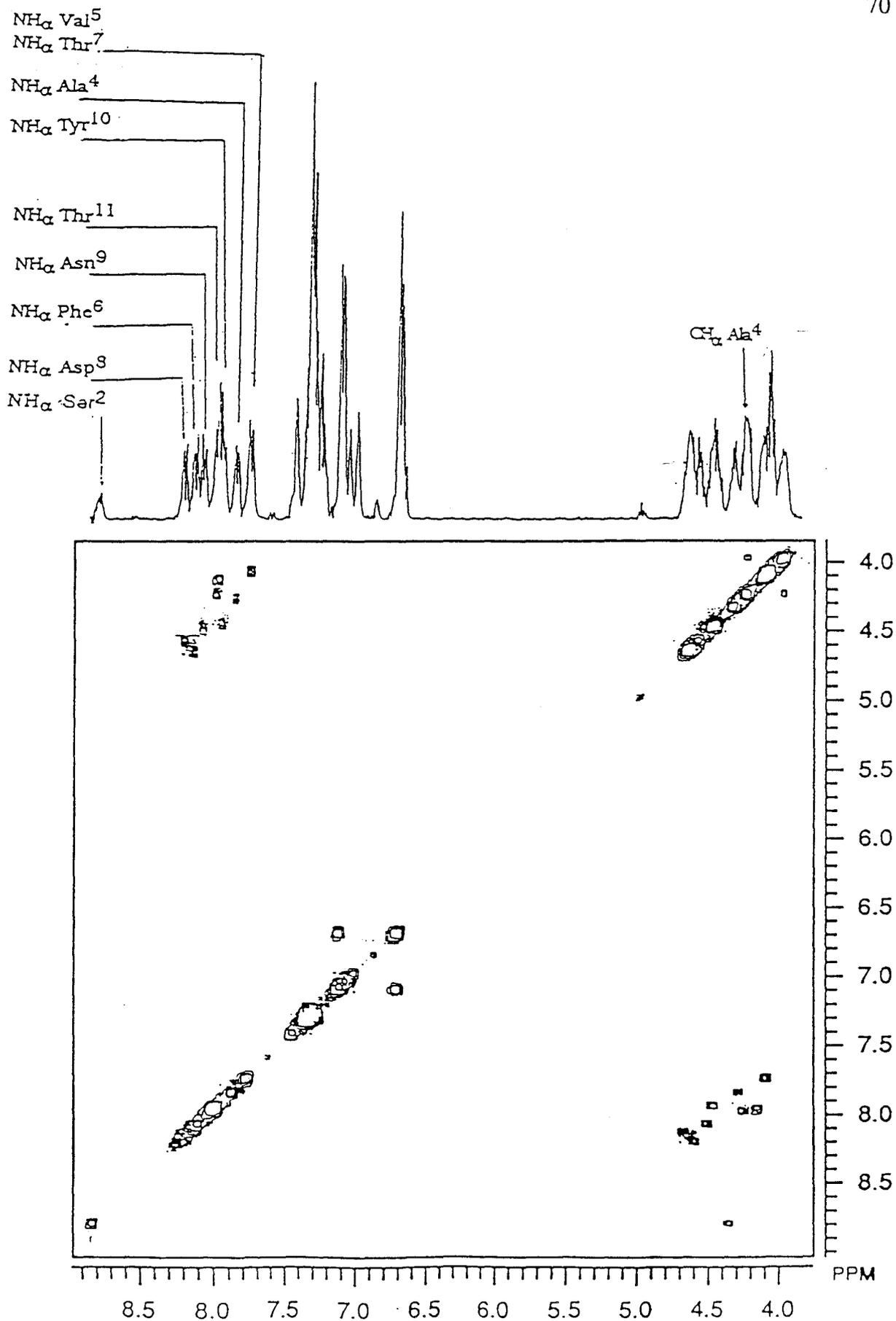


Figure 30. Spectre du fragment 1-11 dissous dans le DMSO obtenu par RMN du proton (400MHz), type COSY.

Résidus	Déplacements chimiques				$^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}}^{\text{a}}$	$\Delta\delta/\Delta T$
	NH	H α	H $\beta\beta'$	autres		
	δ_{ppm}					
His	<i>b</i>	4.65	2.80	7.34 6.91		
Ser	8.67	4.30	3.63		<i>b</i>	-5.2
Asp	8.10	4.57	2.69 2.52		5.60	-3.8
Ala	7.75	4.27	1.14		6.05	-2.7
Val	7.65	4.06	1.88	0.75	<i>b</i>	-0.6
Phe	8.03	4.65	3.07 2.79	7.15	8.10	-4.4
Thr	7.86	4.09	4.09	1.07	7.85	-5.2
Asp	8.07	4.63	2.70 2.51		<i>b</i>	-8.8
Asn	7.97	4.48	2.51 2.33		7.50	-3.8
Tyr	7.84	4.43	2.96 2.70	7.03 6.62	7.45	-3.4
Thr	7.65	4.20	4.00	1.02	<i>b</i>	-4.4

^a Les constantes de couplage sont données en valeur absolue. ^b signal atténué.

Tableau 2. Déplacements chimiques, constantes de couplage, coefficients de température des protons amides et constantes de couplage $^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}}$ de l'undécapeptide .

L'étude spectroscopique de la structure secondaire de la partie N-terminale du VIP nous a donc permis de préciser différentes hypothèses issues des calculs conformationnels théoriques. Une structure semi-rigide a pu être ainsi établie et un modèle moléculaire a été envisagé.

III.A.2.2.3. Modélisation moléculaire.

Afin d'accéder à notre objectif principal qui est de concevoir des molécules capables de mimer l'action du VIP, nous avons fait appel à l'outil informatique. L'analyse conformationnelle en relation avec nos résultats expérimentaux de RMN a été élaborée selon une procédure permettant de trouver les minima énergétiques de la molécule.

Il existe différentes méthodes de calcul de l'énergie employées en analyse conformationnelle. Elles consistent à calculer à priori l'énergie de conformation d'une molécule, cette valeur étant reliée à la géométrie ainsi qu'à d'autres paramètres comme les charges partielles de la molécule. Ces méthodes sont divisées en deux groupes. Le premier, faisant appel aux méthodes quantiques, s'appuie sur la mécanique quantique (méthodes *ab initio* ou semi-empiriques), le second comprend les méthodes empiriques relevant de la mécanique moléculaire. En raison de la taille de nos molécules, nous avons préféré mener nos premières approches en utilisant la mécanique moléculaire.

Mécanique moléculaire.

Cette technique empirique permet d'optimiser les géométries et de calculer différentes propriétés (enthalpie et propriétés vibrationnelles) pour des molécules de tailles très variables. L'idée de base est que l'énergie potentielle d'une molécule peut être décrite comme une fonction de déformations d'une géométrie d'équilibre idéale.

Les principes de la mécanique moléculaire postulent que l'énergie de conformation totale d'une molécule est la somme de termes indépendants à caractère géométrique explicite ou implicite. Chaque terme est décrit comme une fonction de potentiel (fonction énergétique du champ de force) pour lequel tout écart par rapport à une position optimale se traduit par un accroissement de l'énergie.

Nous avons construit la partie N-terminale du VIP (HSDAVFTDNY) en utilisant le programme SYBYL (TRIPOS ASSOCIATES). Dans un premier temps, la géométrie de la molécule a été optimisée par le champ de force Maximin 2 de façon à obtenir un point de départ raisonnable pour l'étude conformationnelle. Les paramètres utilisés sont les suivants : 5000 itérations avec une convergence sur le gradient à 10^{-3} . Nous avons ensuite élaboré une stratégie de dynamique moléculaire afin de bien explorer l'espace conformationnel accessible à cette molécule et repérer les différents conformères d'énergie minimum.

Dynamique moléculaire (recuit simulé).

Le principe de cette technique est relativement simple. Une molécule se trouvant dans un minimum énergétique ne peut "franchir" une barrière énergétique qu'en "absorbant" suffisamment d'énergie. Celle-ci peut lui être apportée artificiellement sous forme d'énergie calorifique. Lorsque la barrière est franchie, il suffit de redescendre la température de la molécule pour retrouver un autre minimum énergétique qui peut être, dans le cas favorable, plus faible que le précédent. Cette suite d'opérations (montée en température-plateau-redescente-stabilisation) est répétée 200 fois et, à chaque terme, le conformère est enregistré pour fournir un lot représentatif de l'espace conformationnel global. On peut ainsi identifier une conformation d'énergie minimum globale pour une molécule donnée et connaître les différentes conformations de basse énergie.

Le segment 1-10 du VIP a été modélisé selon ces différents critères (**Figure 32**). Les paramètres utilisés pour le recuit simulé sont :

- (i). Palier de haute température : 1400°C pendant 1000 fsec.
- (ii). Temps de refroidissement : 1500 fsec.
- (iii). Palier de basse température : 50°C pendant 500 fsec.
- (iiii). 200 cycles avec enregistrement d'un conformère toutes les 3000 fsec.

Chaque conformation obtenue a été minimisée par le champ de force Maximin 2 avec les paramètres cités précédemment.

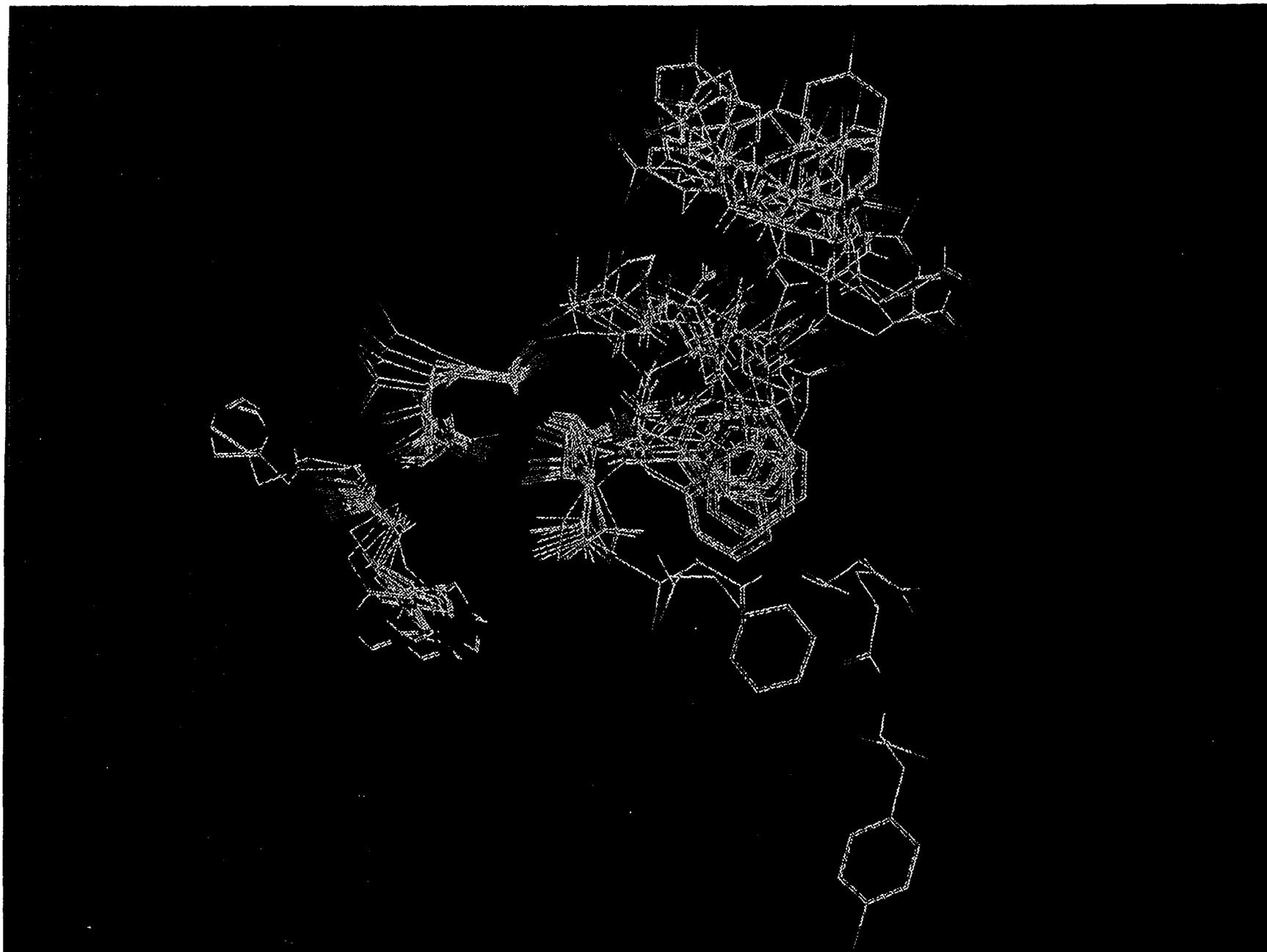


Figure 32. Espace conformationnel du fragment 1-10 du VIP (modélisé avec le logiciel SYBYL).

La structure ordonnée de la molécule obtenue dans un minimum global énergétique confirme les mesures de RMN, c'est-à-dire la présence du premier coude β formé par une liaison hydrogène entre le CO de Ser² et le NH de Val⁵. Le second coude β ne semble pas exister dans la structure de basse énergie. Néanmoins, comme le montre la **Figure 33**, la partie 7-10 est clairement impliquée dans la formation d'une hélice α . Ceci est tout à fait en accord avec l'hypothèse de Fournier A. et coll. (1988) selon laquelle ce segment peptidique serait indispensable pour la formation de l'hélice α composant la partie médiane du VIP.

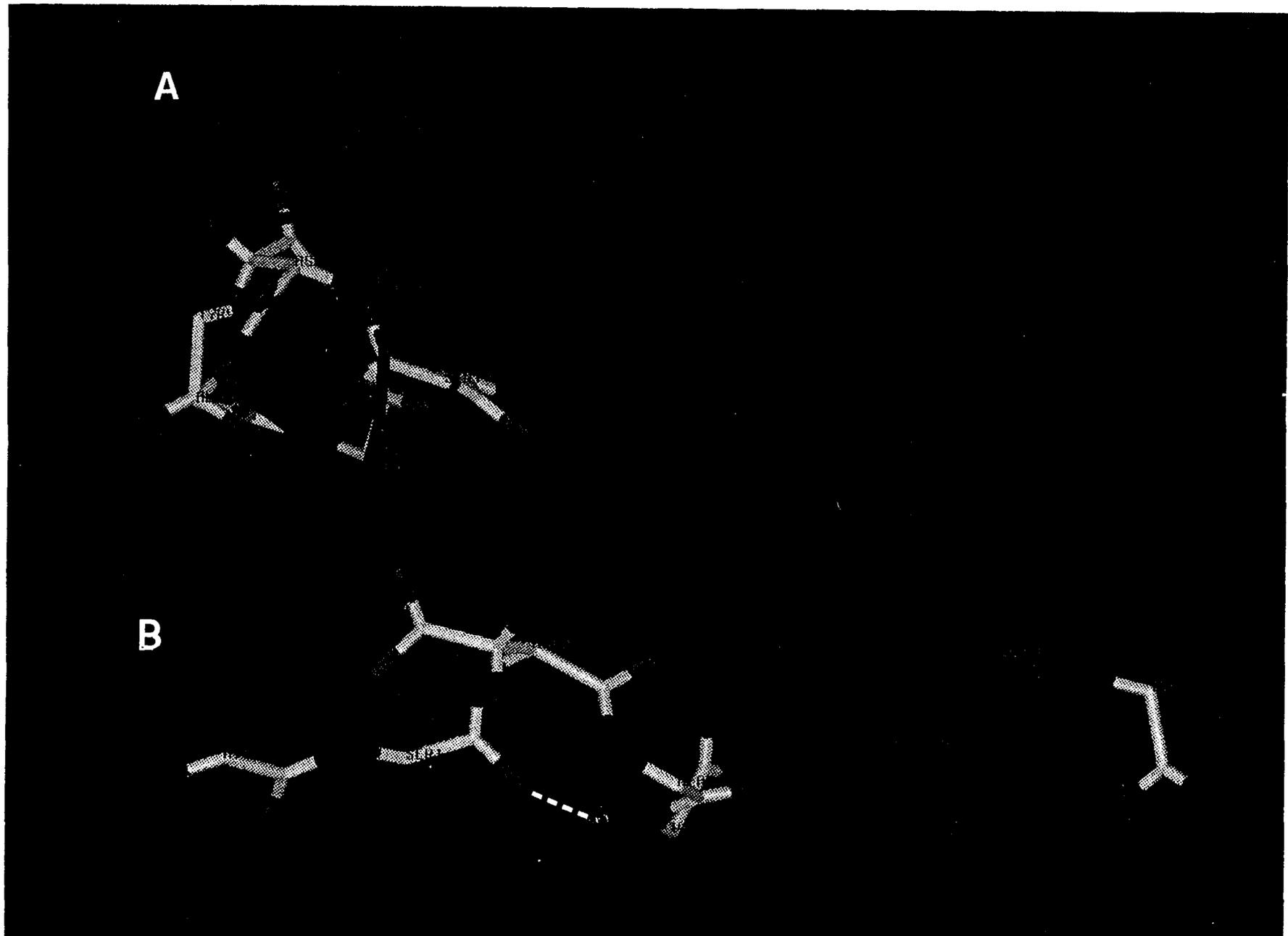


Figure 33. Conformère du VIP(1-10) de plus basse énergie. (angle de rotation de 90° entre les représentations A et B). La partie colorée en vert est en hélice α ; la liaison hydrogène est représentée en pointillés d'après SYBYL. Les acides aminés sont numérotés de 0 à 9.

III.B. RECEPTEUR(S) MEMBRANAIRE(S) DU VIP.

III.B.1. Connaissances bibliographiques.

III.B.1.1. Présentation du récepteur VIP.

Depuis sa découverte en 1970 en tant que molécule endogène, le VIP a été beaucoup étudié quant à sa cible cellulaire, un récepteur membranaire possible. Il est maintenant clairement établi que, comme tout ligand, le VIP se lie à son récepteur spécifique (R) et de cette "collision" bimoléculaire résulte un complexe VIP-R qui engendre un certain nombre de modifications. Tout d'abord, au niveau de la membrane cellulaire, ce complexe est capable d'interagir avec une protéine G (car lie le GTP/GDP) qui est composée d'un hétérotrimère (3 sous-unités : α_s, β et γ). La sous-unité α_s lie le GTP ou le GDP et, de plus, est douée d'activité d'hydrolyse du GTP en GDP. Lors de la formation du complexe ternaire réunissant le VIP, le récepteur et la sous-unité α_s (+GDP), il s'opère un changement conformationnel lent du premier ordre qui accélère l'échange de GDP en GTP au niveau de la sous-unité α . Une cascade d'événements se produit ensuite; il y a dissociation de α_s vis-à-vis de β et γ ; le GTP est hydrolysé en GDP au sein même de α_s ce qui place le récepteur dans un état de faible affinité pour le VIP (Christophe J. et coll., 1988) (**Figure 34**).

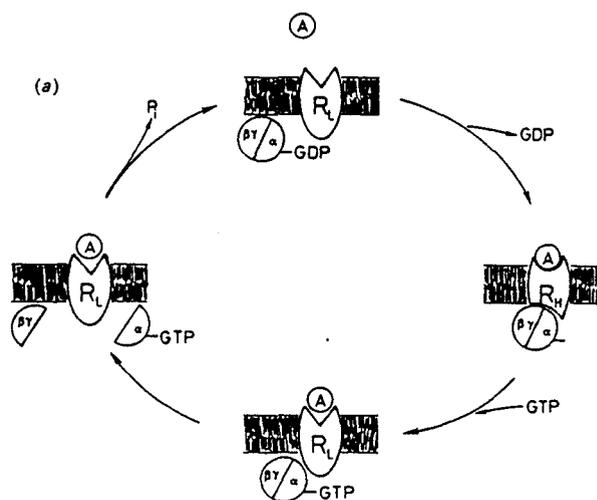


Figure 34. Schéma d'interaction entre un agoniste (A) et un récepteur couplé à une protéine G. (R_L : récepteur de faible affinité; R_H : récepteur de forte affinité; G : protéine G), d'après Taylor C.W., 1990.

Cette figure permet d'expliquer des liaisons spécifiques de faible affinité qui sont en général obtenues si on se trouve en présence de GTP dans le milieu. Dans ce cas, une rapide dissociation du complexe [125 I]-VIP-récepteur est induite par la faible affinité du récepteur pour le radioligand à l'équilibre (Christophe J., 1988; Amiranoff B. et coll., 1980). Possédant ce système de couplage, le récepteur du VIP a été classé a priori parmi les récepteurs à sept segments transmembranaires. La vérification de cette hypothèse a pu être apportée par le clonage du gène du récepteur (Ishihara T. et coll., 1992; Sreedharan S.P. et coll., 1993). La séquence génomique analysée a été traduite en séquence peptidique et cela a permis de mettre en évidence la présence de sept zones à caractère hydrophobe capables de former sept hélices transmembranaires. Ces structures ordonnées participent à la fois à la liaison spécifique et à l'activation du récepteur c'est-à-dire au changement conformationnel qui induit l'interaction avec la protéine G.

Cet aspect moléculaire concourant à l'activité du peptide sera repris au cours de l'exposé de ce travail. La libération de la sous-unité α permet à cette dernière d'activer une enzyme membranaire effectrice qui est principalement dans le cas du VIP, une adénylate cyclase. D'autres études relevées dans la littérature font état de l'activation d'un autre effecteur : la phospholipase C qui possède la propriété de dégrader le phosphoinositoldiphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) d'une part et en diacylglycérol (DAG) d'autre part (Malhotra R.K. et coll., 1989). Cette stimulation peut induire une mobilisation de calcium intracellulaire (Oettling G. et coll., 1990).

Différentes études ont eu comme stratégie d'extraire le récepteur de la membrane cellulaire afin de mieux le décrire. Les nombreuses localisations du récepteur VIP ont conduit les chercheurs à caractériser le récepteur sur différents types cellulaires; les principaux résultats, relativement proches, sont réunis sur le **Tableau 3**. Ces caractérisations utilisent différents agents d'extraction qui sont en fait des molécules ("cross-linkers") capables de fixer le complexe ligand-récepteur en utilisant leurs propriétés chimiques bifonctionnelles .

Tissus	Espèces	"Cross-linker"	Poids moléculaires		Références
			Majeur	Mineur	
Epithélium intestinal (membranes)	rat	DTSP	73 (haute affinité)	33 (basse affinité)	Laburthe M. et coll. (1984)
Epithélium du colon (membranes)	humain	DTSP	63 (haute affinité)	30 (basse affinité)	Couvineau A. et Laburthe M. (1985a)
Foie (membranes)	rat	DTSP	48	86	Couvineau A. et Laburthe M. (1985b)
	rat	DTSP, DSS, HSAB	53	77	Nguyen T.D. et coll. (1986)
Cerveau (membranes)	rat	DTSP	46	57	Couvineau A. et coll. (1986a)
	rat	DSS	47	72	Vasiloff J. et coll. (1986)
Lymphoblaste (Molt 4bT) (cellules)	humain	DSS, EGS SANAH	47		Wood C.L. et O'Dorisio M.S., (1985)
cellules HT-29 (membranes)	humain	DTSP	63		Couvineau A. et coll. (1985)
		DTSP	64	117; 31	Muller J.M. et coll. (1985)
cellules pituitaires GH ₃	rat	DSS, EGS	47		Wood C.L. et coll. (1985)
Poumon (membranes)	humain	DSS	62		Dickinson K.E. et coll. (1986)
	rat		53		
	lapin		61		
	cobaye		63; 57		

Tableau 3. Caractéristiques moléculaires des récepteurs VIP. Différents cross-linkers utilisés : DTSP, dithiobis(succinimidyl propionate); DSS, dissuccinimidyl suberate; HSAB, N-hydroxysuccinimidyl 4-azidobenzoate; EGS, ethylene glycol bis(succinimidyl succinate); SANAH, N-succinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate, d'après Laburthe M. et Couvineau A., 1988.

La caractérisation du récepteur s'est faite en plusieurs étapes, l'une des premières a été de démontrer la présence de structures glycaniques comme partie intégrante du site reconnu par le VIP (Nguyen T.D. et coll., 1986). Une étude du récepteur hépatique chez le rat a permis d'affiner cette observation par l'utilisation de chromatographie d'affinité réalisée avec différentes lectines (Couvineau A. et coll., 1986b). Plus précisément, l'élution spécifique de complexes VIP-R radiomarqués par différents sucres a permis aux auteurs de démontrer que le récepteur VIP possédait des structures glycaniques (reconnues par les lectines) composées de glucose, de mannose et de N-acétyl glucosamine. La particularité de ce dernier sucre cité laisse supposer deux hypothèses qui sont les suivantes. D'une part, il suggère que la liaison entre la structure protéique et glycanique se fasse via des liaisons de type N-glycosidique, la détection de mannose renforçant cette hypothèse. D'autre part, il est généralement accepté que dans le cas de la lectine (WGA : "wheat germ agglutinin") la N-acétyl glucosamine est capable de déplacer des sialoprotéines suggérant ainsi que le récepteur VIP posséderait des résidus d'acide sialique (Bhavanandan V.P. et Katlic A.W., 1979). Ceci a pu être vérifié en utilisant différentes enzymes spécifiques, d'une part une neuraminidase (Dickinson K.E.J. et coll., 1986) et d'autre part une N-glycosidase (El Battari A. et coll., 1987). Dans les deux cas, les auteurs ont pu démontrer une mobilité électrophorétique modifiée. L'absence de N-acétyl galactosamine laisse par ailleurs supposer qu'aucune liaison de nature O-glycosidique n'existe entre la protéine et la structure glycanique. Ceci a pu être démontré par l'utilisation d'endo H qui ne produit aucune modification de mobilité électrophorétique (Nguyen T.D. et coll., 1986).

Ces études ont donc permis, dans un premier temps, de déterminer la nature de la structure glycanique du récepteur VIP et de mettre au point une technique de purification de la protéine tout en conservant son caractère fonctionnel.

Dans un second temps, l'analyse sur gel de polyacrylamide a révélé dans de nombreux cas, la présence à la fois d'une bande majeure et d'une bande mineure correspondant au complexe [¹²⁵I]-VIP-protéine. Les poids moléculaires des protéines majeures décrites s'échelonnent entre 46 kDa et 73 kDa et elles correspondent généralement au récepteur ayant une forte affinité et une grande spécificité pour le peptide. Les composés mineurs sont tout à fait

différents selon le modèle étudié. Dans le cas de l'épithélium intestinal, les auteurs démontrent que la protéine de liaison mineure est un site de faible affinité (Laburthe M. et coll., 1984; Couvineau A. et Laburthe M., 1985a). Par ailleurs, les récepteurs caractérisés au niveau du foie de rat seraient, dans le cas de la fraction mineure, associés à une sous-unité de la protéine G alors que la fraction majeure serait composée du récepteur seul (Nguyen T.D. et coll., 1986; Couvineau A. et Laburthe M., 1985b).

Les différences de poids moléculaire observées dans ces résultats peuvent être expliquées par des conditions expérimentales différentes en ce qui concerne notamment :

(i) La protéolyse partielle ou la déglycosylation du récepteur au cours de la préparation et/ou de l'extraction membranaire. (Nguyen T.D. et coll., 1986).

(ii) L'utilisation de "cross-linkers" variés possédant des caractéristiques différentes comme par exemple leur réactivité vis-à-vis du ligand et /ou du récepteur, ou leur capacité à pénétrer la membrane.

(iii) Dans le cas où différents résultats ont été obtenus avec les mêmes "cross-linkers", on peut envisager que selon le type de préparation (membranes isolées ou cellules entières) l'environnement du récepteur et l'accessibilité pour les réactions de pontage sont modifiés (Marvaldi J. et coll., 1986).

Néanmoins, de nombreux résultats obtenus avec beaucoup de rigueur ont montré une réelle hétérogénéité des récepteurs VIP et ceci pour deux raisons principales :

(i) Différentes formes glycosylées peuvent coexister *in situ*. En effet, le traitement des récepteurs membranaires du poumon par une neuraminidase a permis de ne détecter qu'une seule forme protéique homogène alors que deux fractions sont visualisées lorsque la même expérience est réalisée sans traitement (Dickinson K.E.J. et coll., 1986).

(ii) La mobilité du complexe VIP-R peut être influencée par l'état de phosphorylation du récepteur. Une régulation par la protéine kinase C a été mise en évidence dans des conditions physiologiques (Bozou J.C. et coll., 1987).

Enfin, il convient d'ajouter de nombreuses études qui ont souligné cette hétérogénéité en utilisant des analogues du VIP différemment reconnus selon les tissus considérés. Par exemple, chez l'homme, le fragment 10-28 du VIP est un antagoniste sur les cellules intestinales (HT29) (Turner J.T. et coll., 1986) ou encore vis-à-vis des récepteurs situés dans le système nerveux central (Brenneman D.E. et Eiden L.E., 1986), mais il s'avère incapable de lier le récepteur VIP situé au niveau du système immunitaire (Gozes Y. et coll., 1991). Chez le rat, les récepteurs vasculaires possèdent des propriétés de reconnaissance qui sont distinctes de celles retrouvées au niveau du foie, de la glande thyroïde, de la glande pituitaire ou du cerveau (Rorstad O.P. et coll., 1990; Michalkiewicz M. et coll., 1991). De même, un hybride de la neurotensine et du VIP est un antagoniste reconnu par les cellules de la moelle épinière d'origine humaine (affinité dix fois supérieure à celle du VIP) mais reste totalement inactif sur les lymphocytes humain (Gozes Y. et coll., 1991).

III.B.1.2. Régulation du récepteur VIP.

L'effet du peptide via le récepteur est sous la dépendance de différents paramètres. Tout d'abord, une modulation de la stimulation de l'adénylate cyclase (AC) induite par le récepteur peut être due à l'activation de récepteurs adjacents. Par ailleurs, une régulation cellulaire globale peut intervenir via l'expression des sites de liaison à la surface membranaire (Rosselin G. et coll., 1988).

III.B.1.2.1. Modulation du site de liaison et de l'activité de l'adénylate cyclase.

Mise à part la régulation de l'effet du VIP par des molécules analogues des peptides, agonistes ou antagonistes, la modulation du mécanisme de transduction est un facteur important dans le processus de régulation. En effet, la stimulation de l'adénylate cyclase conduit à une augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire qui peut être régulée par d'autres neurotransmetteurs agissant sur leur propre récepteur. La somatostatine (Arilla E. et coll., 1981; Chneiweiss H. et coll., 1984) ou la dopamine via le récepteur D₂ (Oliva D. et coll., 1984; Weiss S. et coll., 1985) sont capables d'inhiber la stimulation de l'adénylate cyclase par un

mécanisme faisant intervenir une protéine G possédant une sous-unité α inhibitrice (α_i). Par contre, sur un modèle de rétine de lapin, une action synergique entre des récepteurs D_1 et une partie des récepteurs VIP a pu être démontrée vis-à-vis de la stimulation de l'adénylate cyclase (Pachter J.A. et Man-Kit Lam D., 1986). De même, d'autres composés tels que la noradrénaline agissent de façon synergique avec le VIP sur des cellules du cortex cérébral (Magistretti P.J. et Schorderet M., 1984). Par contre, des composés agonistes α_2 sont capables d'inhiber partiellement l'action du VIP sur des cellules du côlon (Boige N. et coll., 1984). Une diminution de la production d'AMPc induite par le VIP a également été obtenue par l'utilisation d'esters de phorbol capables d'activer la PKC (Quilliam L.A. et coll., 1985). Ceci est tout à fait similaire à l'inhibition par un ester de phorbol de la stimulation de l'adénylate cyclase induite par un agoniste β . Dans ces expériences, le mécanisme d'action conduisant à l'inhibition du récepteur aboutit à une phosphorylation de celui-ci (Sibley D.R. et Lefkowitz R.J., 1985). Ces mécanismes de régulation du récepteur rendent compte de la complexité dans l'intégration de l'information extracellulaire. De nombreux paramètres entrent en jeu afin de pouvoir finement réguler l'activité cellulaire. La cellule est capable en réponse à des stimulations de tout ordre d'exprimer un nombre de sites récepteurs pouvant varier de façon très significative (Washeck J.A. et coll., 1989).

III.B.1.2.2. Régulation cellulaire du récepteur VIP.

Le trafic cellulaire du récepteur représente un système très important de régulation de la glycoprotéine membranaire. Des traitements chroniques par le VIP provoquent dans de nombreuses conditions expérimentales des effets biologiques réfractaires (Boissard C. et coll., 1986; Gespach C. et coll., 1984). Ces observations ont été reliées au phénomène de désensibilisation du récepteur puisqu'aucune liaison spécifique ne peut être observée après des traitements répétés au VIP (Staun-Olsen P. et coll., 1982). Les caractéristiques de ce processus de désensibilisation ont été explicitées par une étude réalisée sur des cellules épithéliales de côlon. Tout d'abord, les conséquences de l'addition répétée de VIP dépendent du temps d'exposition et de la concentration en peptide. De plus, la désensibilisation peut être corrélée à la disparition de récepteurs à la surface cellulaire, celle-ci étant tout à fait réversible (Boissard C.

et coll., 1986). Le processus d'internalisation du complexe VIP-R a pu être examiné précisément à l'aide du peptide radiomarqué (Luis J. et coll., 1986). Le schéma général peut être décrit par les étapes successives suivantes (**Figure 35**). Premièrement, après activation de l'adénylate cyclase, le complexe ligand-récepteur est internalisé dans des vésicules : les endosomes. Le temps de demi-vie du complexe à la surface membranaire est de trois minutes. Puis, dans un second temps, le récepteur, toujours fonctionnel, est progressivement libéré du VIP. Le "pool" de récepteurs est alors recyclé en partie à la surface membranaire tandis que le peptide est expulsé dans le milieu extracellulaire sous forme dégradée. Le temps de demi-vie de cette étape a pu être évalué à dix minutes. Néanmoins, une partie des récepteurs est directement transférée dans des structures lysosomales qui dégradent complètement la protéine. Cette dégradation n'excède pas 30% des récepteurs après trois heures de traitement. Ce processus "normal" de recyclage peut être modulé sous l'action de composés chimiques tels les esters de phorbol comme cela a été démontré pour des récepteurs de catécholamines (Quilliam L.A. et coll., 1985). La destruction des récepteurs VIP dans le compartiment lysosomal peut induire à long terme un effet prononcé de "down regulation". La réversibilité du processus peut également s'expliquer par une biosynthèse *de novo* du récepteur et son expression à la surface membranaire.

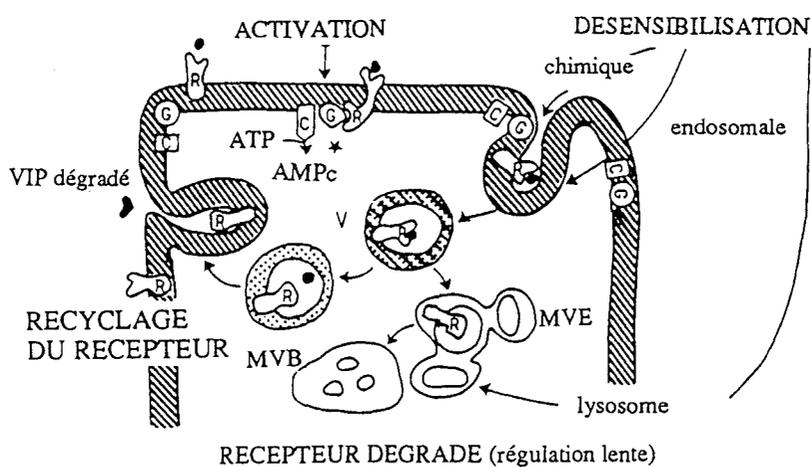


Figure 35. Reconnaissance et processus d'internalisation. (R, récepteur; G, protéine G; C, adénylate cyclase; V, vésicules; MVE : endosome multivésiculaire; MVB : corps multivésiculaires), d'après Rosselin G. et coll., 1988.

La régulation de la biosynthèse du récepteur VIP n'est pas actuellement connue de façon précise. Néanmoins, des modèles existent où la densité et/ou l'activité de liaison des récepteurs est en relation avec les processus de maturation des cellules. L'augmentation de récepteurs VIP à la membrane cellulaire a pu être corrélée avec la différenciation de cellules cancéreuses d'adénocarcinome ou de neuroblastome humains induite par l'acide rétinoïque (Estival A. et coll., 1983; Waschek J.A. et coll., 1989) mais aussi par le VIP lui-même. De même, on a pu noter que les effets du VIP étaient augmentés parallèlement à la maturation des cellules neuronales (Roth L.B. et Beinfeld M.B., 1985). Par contre, une diminution de l'effet du VIP a été observée dans le cas de la différenciation de cellules cancéreuses du côlon (HT 29) et durant la maturation de cellules intestinales prélevées chez le fœtus (Chastre E. et coll., 1985).

III.B.2. Résultats personnels : mise en évidence de récepteurs VIP.

Etant donné l'hétérogénéité des résultats décrits par différents auteurs, nous avons voulu caractériser les récepteurs VIP dans les deux modèles cellulaires retenus.

III.B.2.1. Cellules de neuroblastome. (voir p. 144)

Les deux lignées cellulaires ont été incubées à confluence avec des quantités croissantes en ^{125}I -VIP dans un milieu dépourvu de sérum. Nous avons tout d'abord observé que la liaison était saturable et spécifique. La liaison spécifique a été calculée par différence entre la liaison totale (^{125}I -VIP seul) et la liaison non spécifique (^{125}I -VIP + $1\mu\text{M}$ VIP). La cinétique de liaison montre que l'équilibre est atteint au bout de trois heures à 4°C et demeure constante au moins pendant cinq heures. La liaison spécifique représente 85 à 95% du ^{125}I -VIP total fixé, ce qui représente 2,5 à 4% de la radioactivité totale.

La représentation de Scatchard (1949) nous a permis de déterminer les paramètres de la liaison spécifique pour les deux lignées (**Figure 36**).

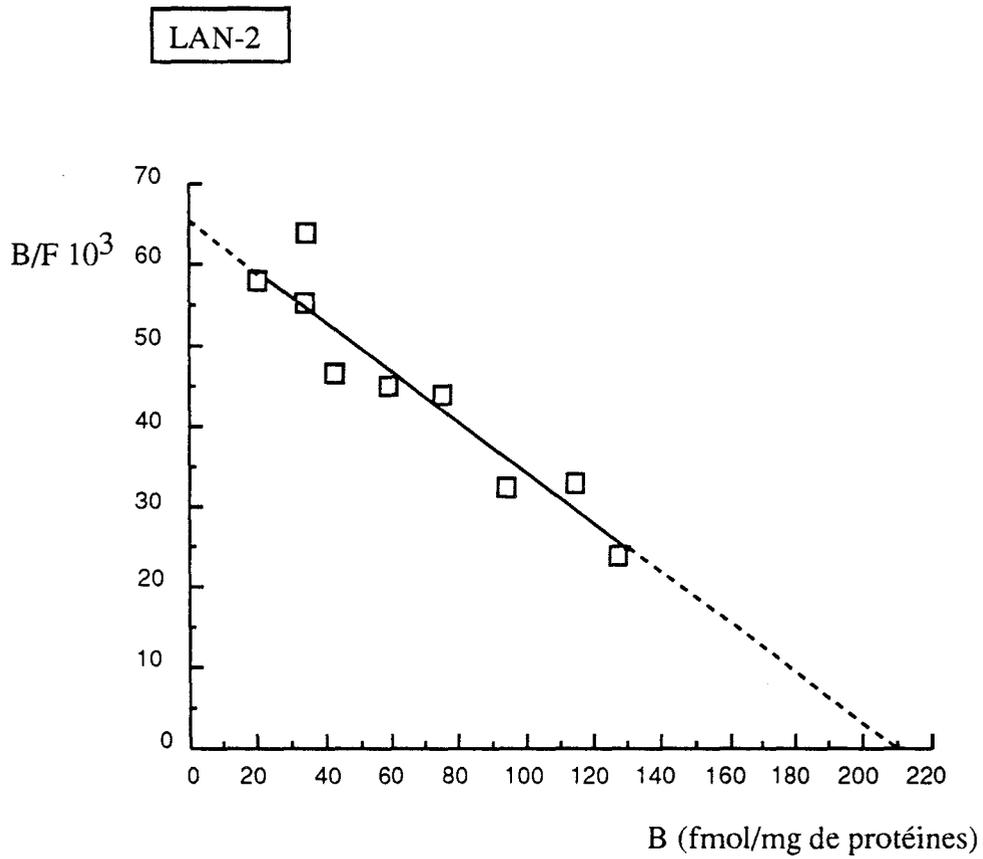
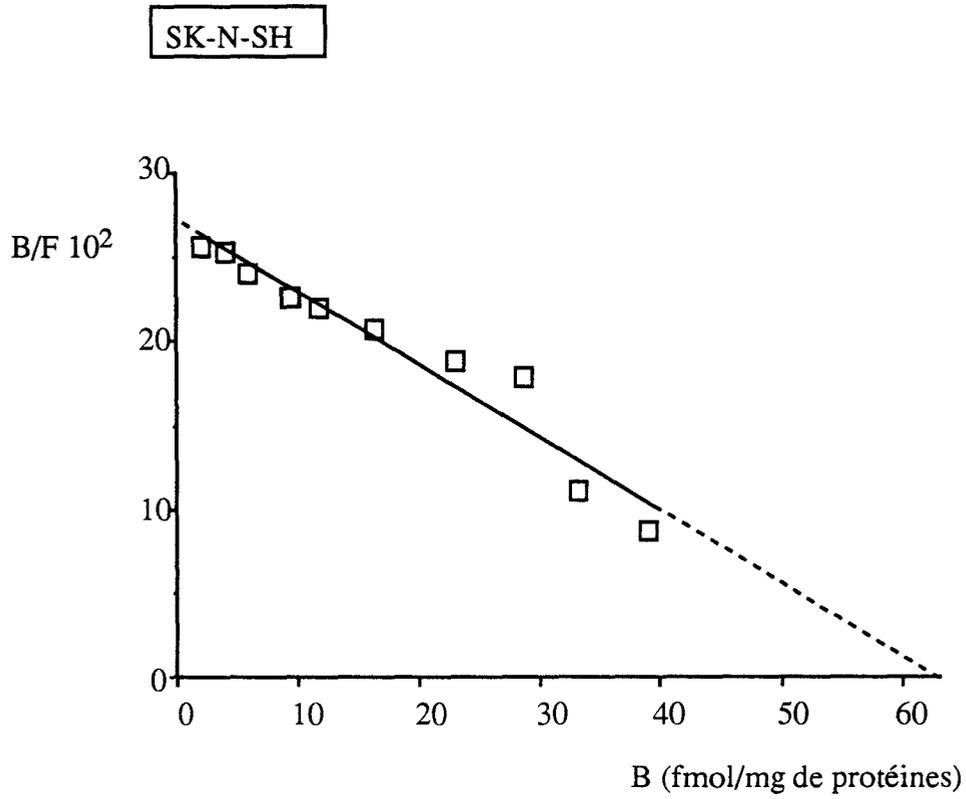


Figure 36. Représentation de Scatchard de la liaison spécifique du ^{125}I -VIP.

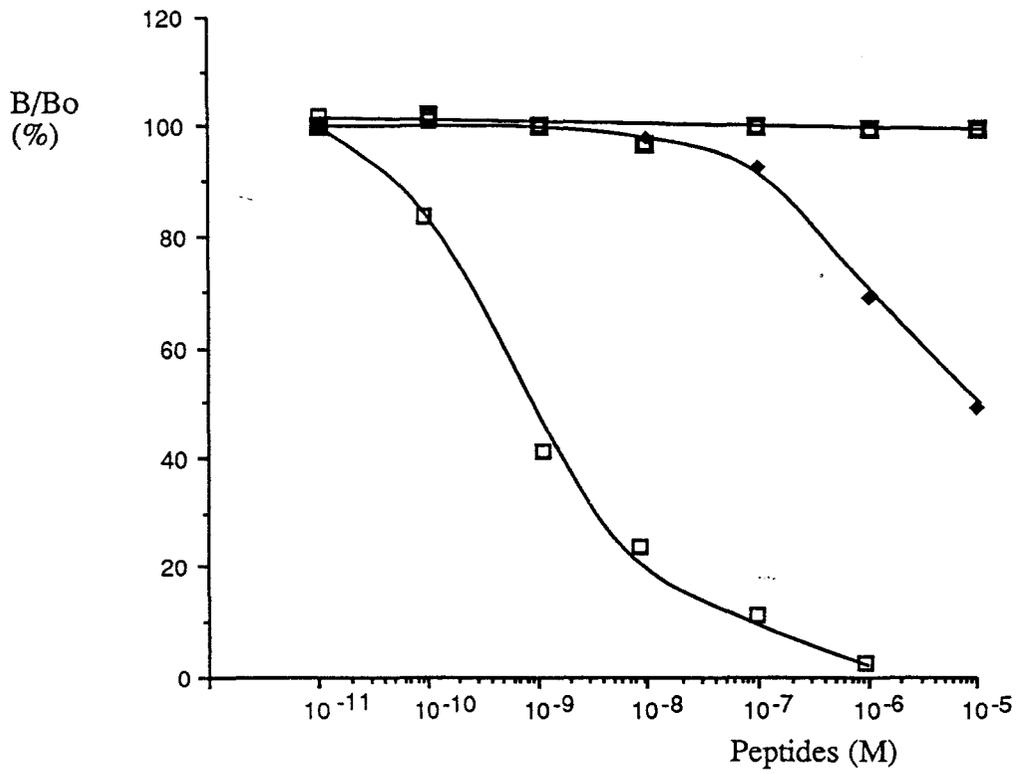
Pour chaque lignée, nous obtenons un alignement des différentes valeurs permettant de déterminer une équation de droite de type $B/F = -1/K_D B + B_{max}/K_D$ (B : radioligand lié; F : radioligand libre) qui est extrapolée afin de déterminer le nombre maximum de sites présents par milligramme de protéine (B_{max}). La pente de cette droite fournit la constante de dissociation du complexe ligand-récepteur à l'équilibre (K_D) qui représente l'affinité du ligand pour le récepteur. Ces résultats obtenus pour les deux lignées sont réunis dans le **Tableau** suivant :

Lignée cellulaire	B_{max} (fmol/mg de protéine)	K_D (nM)
SK-N-SH	64	0,23
LA-N-2	210	0,17

Les valeurs de K_D et de B_{max} sont du même ordre de grandeur pour les deux lignées cellulaires. Elles caractérisent un récepteur spécifique du VIP de forte affinité.

Des expériences de compétition ont ensuite été menées avec les fragments peptidiques du VIP. Les résultats sont tout à fait comparables sur les deux lignées cellulaires. D'une part, le fragment 1-11 n'est pas capable de déplacer le ^{125}I -VIP de son récepteur. D'autre part, le fragment 10-28 semble être reconnu par le récepteur puisqu'il déplace le ^{125}I -VIP de son site de liaison (jusqu'à 50% des sites pour la lignée SK-N-SH et jusqu'à 65% pour la lignée LA-N-2) (**Figure 37**)

SK-N-SH



LAN-2

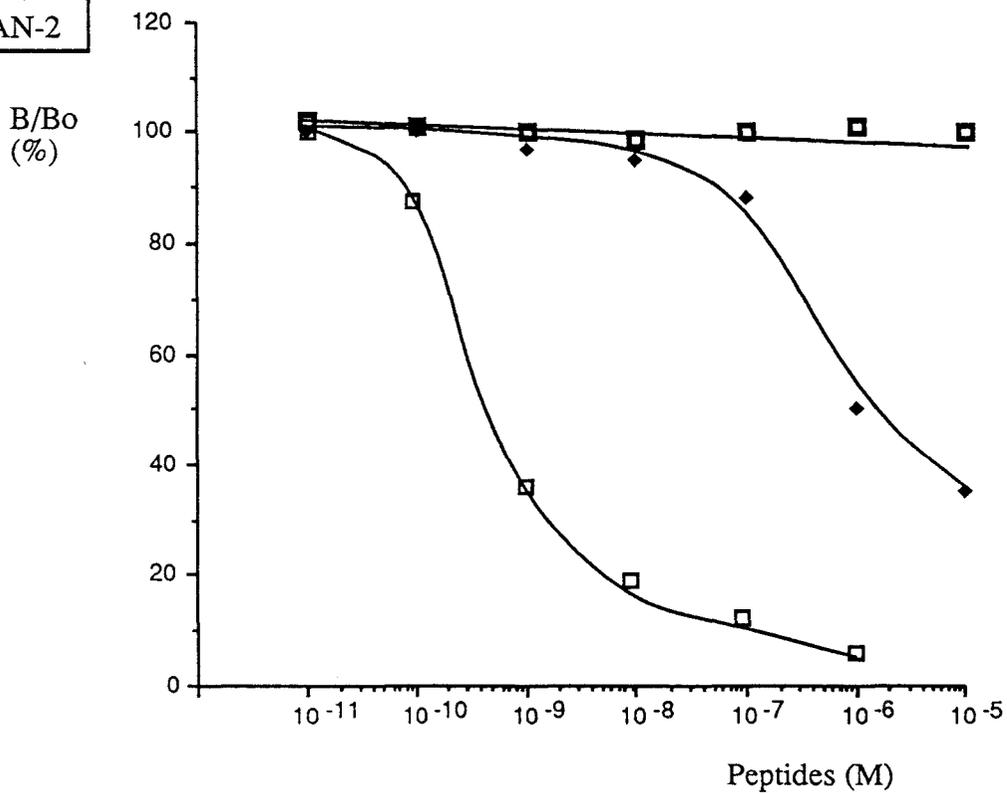


Figure 37. Courbes de déplacement du ^{125}I -VIP par le VIP (\square) et les fragments 1-11 (\blacksquare) et 10-28 (\blacklozenge).

III.B.2.2. Cellules épithéliales de trachée de cobaye. (voir p. 145)

La culture primaire de cellules épithéliales a été obtenue après digestion de la trachée de cobaye par la pronase à 4°C (Wu R., 1986). Les cellules ainsi obtenues ont été placées dans des puits permettant la croissance cellulaire (cupules préalablement recouvertes de collagène de type I). Après 48 heures de culture, les cellules épithéliales parvenues à confluence sont incubées dans un milieu dépourvu de sérum avec du ^{125}I -VIP. Le protocole d'incubation est légèrement différent de celui utilisé pour les cellules de neuroblastome. En effet la cinétique de liaison à 37°C nous a donné de meilleurs résultats. L'équilibre de liaison est atteint au bout de 60 minutes et demeure constant au moins pendant 120 minutes. La liaison saturable et spécifique a été observée à l'aide de concentrations croissantes en ^{125}I -VIP. Dans le cas des cellules épithéliales, la fixation spécifique est comprise entre 60 et 70% du ^{125}I -VIP total et représente entre 6 et 8% de la radioactivité incubée.

La représentation de Scatchard [$B/F = f(B)$] du ^{125}I -VIP lié à l'équilibre montre l'existence de deux sites indépendants (**Figure 38**).

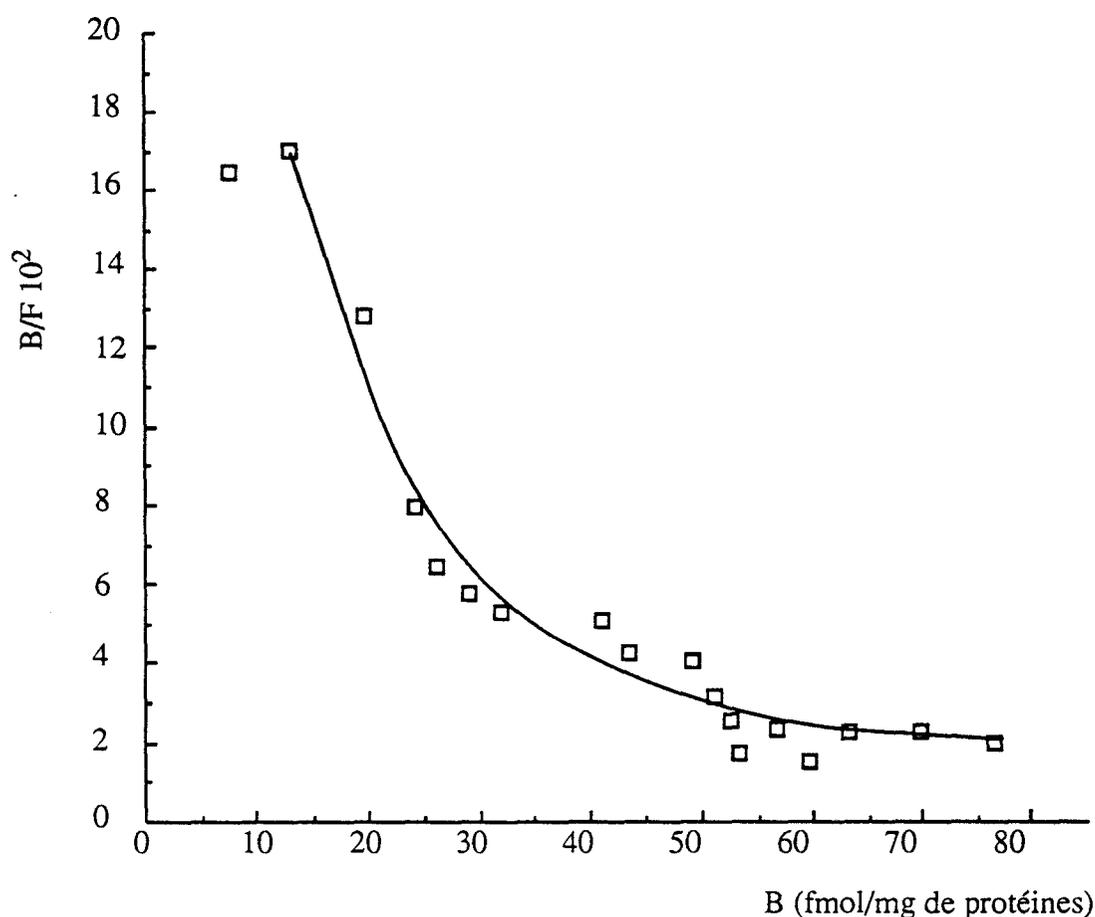


Figure 38. Représentation de Scatchard de la liaison spécifique du ^{125}I -VIP.

Le calcul des pentes respectives et l'extrapolation de ces droites sur l'axe des abscisses a permis de déterminer les paramètres de liaisons. Ces résultats ont été réunis dans le **Tableau** suivant :

	Bmax (fmol/mg de protéine)	K_D (nM)
Site de haute affinité	36	3,4
Site de basse affinité	377	30,2

Des expériences de compétition ont été réalisées sur la culture primaire à l'aide des fragments 1-11 et 10-28 du VIP (**Figure 39**). Les résultats sont tout à fait différents de ceux obtenus sur les lignées de neuroblastome. Tout d'abord, le fragment 1-11 du VIP est capable de déplacer le ^{125}I -VIP de son récepteur. En effet, 35% des sites spécifiques du VIP sont reconnus par le fragment N-terminal. Ensuite, contrairement aux récepteurs des cellules SK-N-SH et LA-N-2, le fragment 10-28 ne reconnaît aucun site de liaison spécifique du VIP.

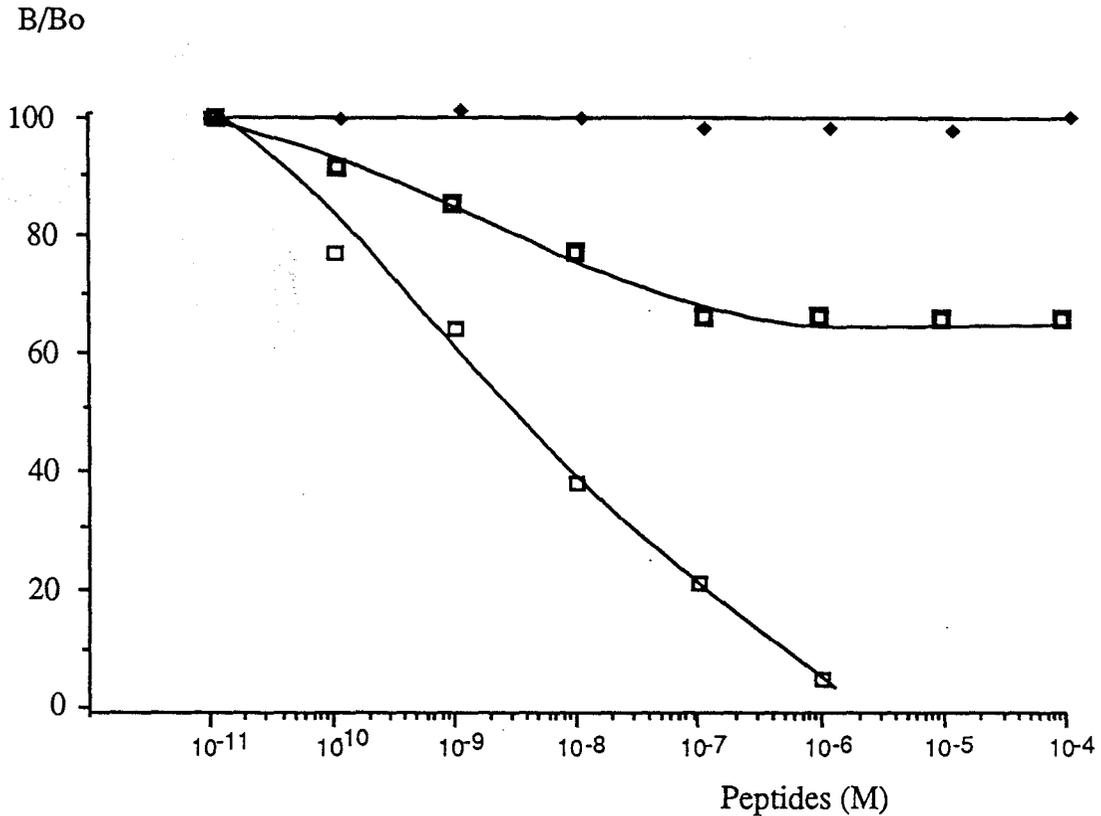


Figure 39. Courbes de déplacement du ^{125}I -VIP par le VIP (□) et les fragments 1-11 (□) et 10-28 (◇).

III.B.2.3. Discussion.

Ces résultats, obtenus à la fois sur deux espèces et deux tissus différents sont difficilement comparables. Néanmoins, le but de cette étude était de montrer l'existence des sites de liaison spécifiques du VIP sur chaque modèle. Cette diversité du mode de reconnaissance du récepteur VIP interspèce est toutefois intéressante. En effet, il faut noter que le fragment 1-11 (HSDAVFTDNYT) synthétisé sur le modèle humain est différent en deux positions (5 et 9) du modèle de cobaye (cf. **Tableau 1**); il est pourtant reconnu par le récepteur de cellules épithéliales de cobaye alors que celui des cellules de neuroblastome humain ne le reconnaît pas. A l'inverse, le fragment 10-28 du VIP humain (YRLRKQMAVKKYLNSILN.NH₂) qui diffère également sur deux positions (19 et 26), n'est pas reconnu par les cellules épithéliales de trachée de cobaye alors qu'il l'est par les cellules SK-N-SH et LA-N-2 .

Les affinités relatives mesurées sont assez homogènes sur les deux modèles en ce qui concerne le site de haute affinité. Contrairement aux cellules épithéliales en culture primaire, nous n'avons pas pu identifier de site de basse affinité dans les cellules de neuroblastome par la représentation de Scatchard. Néanmoins, il semble bien exister un site de basse affinité puisque des concentrations de 10^{-8}M en VIP compétiteur ne permettent pas d'inhiber complètement la fixation spécifique du ^{125}I -VIP (60%). Le déplacement du peptide radiomarqué fixé vraisemblablement sur les sites de basse affinité est obtenu pour des concentrations supérieures à 10^{-8}M .

IV. CONCEPTION ET REALISATION DE PSEUDOPEPTIDES AGONISTES DU VIP

IV. CONCEPTION ET REALISATION DE PSEUDOPEPTIDES AGONISTES DU VIP.

IV.A. ELABORATION DE STRUCTURES PSEUDOPEPTIDIQUES.

IV.A.1. Relations structure-activité.

IV.A.1.1. Résultats de la littérature.

Des analogues du VIP ont été testés sur différents tissus cibles du peptide. Les résultats ne sont pas toujours convergents mais néanmoins certaines caractéristiques du peptide se dégagent. Tout d'abord, en raison de son appartenance à la **superfamille des peptides** impliqués dans des phénomènes de régulation, des études de spécificité ont été réalisées avec des analogues comme le PHI, le PACAP ou le GRF. Par exemple, le dérivé [D^{Phe}⁴]-PHI est un agoniste VIP qui apparaît totalement sélectif du récepteur VIP des cellules pancréatiques (Robberecht P. et coll., 1987). Alors que le VIP, le PHI, la sécrétine inhibent la liaison spécifique à la fois du VIP et de la sécrétine radiomarqués, le composé [D^{Phe}⁴]-PHI inhibe seulement la liaison du ¹²⁵I-VIP. Ce résultat est conforté par la comparaison des courbes de la production d'AMPC qui dans le cas des agonistes naturels s'étend sur trois logarithmes suggérant la présence de deux classes de récepteurs alors que le dérivé [D^{Phe}⁴]-PHI stimule quant à lui l'adénylate cyclase de façon monophasique. L'inhibition de cette production d'AMPC intracellulaire peut être réalisée par un antagoniste du VIP, le [D^{Phe}²]-VIP, et non par un antagoniste de la sécrétine (Robberecht P. et coll., 1986a). L'explication de cette sélectivité peut être apportée par la comparaison des séquences du VIP et de la sécrétine (cf **Figure 1**). L'acide aminé en position 4, Ala pour le VIP et Gly pour la sécrétine, se différencie surtout pour le carbone asymétrique absent dans la sécrétine. L'introduction d'une chiralité sur cette position implique une perte de reconnaissance du récepteur sécrétine.

L'étude d'analogues du PACAP-27 (version courte du PACAP) et du PACAP-38 (version longue) a permis de mettre en évidence l'importance de certains groupements fonctionnels essentiels à la reconnaissance moléculaire et/ou à l'activation du récepteur. Tout d'abord, la délétion systématique de chaque acide aminé (jusqu'au dérivé 9-27 ou 9-38) a

conduit à l'obtention de molécules possédant un potentiel antagoniste, le PACAP(6-38) étant le meilleur dérivé. De façon surprenante, des fragments C-terminaux plus court du PACAP-27 et du PACAP-38 (partie 10-27 jusqu'à 14-27 ou leur équivalent en version longue) sont capables d'activer l'adénylate cyclase (Vandermeers A. et coll., 1992). Ensuite, la synthèse d'analogues utilisant des acides aminés de la série D a permis de démontrer que la position 2 ne tolère pas de groupements fonctionnels encombrants (Robberecht P. et coll., 1992). De plus, cette étude a mis en évidence le rôle essentiel de la fonction acétate portée par Asp³. Enfin, le remplacement de Lys²⁰-Lys²¹ par Gly-Gly conduit à une molécule dont l'affinité est 500 fois plus faible.

L'utilisation d'analogues du GRF montre également une discrimination vis-à-vis des récepteurs de la sécrétine mais ne permet pas de distinguer entre le récepteur VIP et le récepteur GRF. Plus précisément, le déplacement du ¹²⁵I-VIP par des analogues du GRF ou l'inhibition de la stimulation de l'adénylate cyclase sur membranes pancréatiques de rat, nous ont fourni des informations importantes (Robberecht P., 1986b). La conformation de Asp³ est critique puisque l'analogue (DAsp³) GRF₁₋₂₉-NH₂ présente seulement 22% de l'activité agoniste intrinsèque du GRF. La substitution de Ala⁴ par son énantiomère D réduit l'activité intrinsèque alors que la substitution de l'acide aminé naturel L par un résidu plus hydrophobe : le DPhe produit un agoniste meilleur que le GRF lui-même sur les récepteurs VIP. Des modifications sur la position 6 (Phe⁶ remplacée par DPhe⁶ ou pClPhe⁶) ou encore sur la position 7 (Thr⁷ remplacée par DThr⁷) produisent des analogues ayant une affinité et une activité intrinsèque fortement diminuées. Le rôle de l'His¹ a été discuté pour des peptides appartenant à la famille du VIP. Cet acide aminé est en effet très conservé dans les différentes espèces et au sein de la famille. L'histidine est un acide aminé particulier en raison de la propriété du noyau imidazole en tant que groupement à la fois donneur et accepteur d'électrons. Des résultats obtenus sur la sécrétion pancréatique chez le rat, le chat, le furet et le chien ont montré que les analogues [des His¹]-sécrétine ou [Ala¹]-sécrétine ont un potentiel agoniste faible. Le noyau imidazole a ensuite été remplacé par un groupement fonctionnel pyrazole afin d'évaluer le rôle de l'ionisation dans l'activité du peptide (pKa respectifs de l'imidazole et du pyrazole : 6,9 et 11,5). Le dérivé obtenu [Pyr (3) Ala¹]-sécrétine est un agoniste tout à fait comparable au peptide natif. L'énantiomère D ou des analogues ne possédant pas de groupements accepteurs

d'électrons (thiophène, phényle) ne sont pas potentiellement actifs. Par ailleurs, la N-méthylation du noyau imidazole sur l'azote τ ou π conduit à des analogues totalement inactifs chez le furet. Ces résultats suggèrent que dans le cas d'une liaison hydrogène putative, l'imidazole serait plutôt un accepteur d'électrons puisque les deux analogues N-méthylés ne sont plus susceptibles d'engager une telle liaison (Voskamp D. et coll., 1982). Une autre étude réalisée en mesurant la pression artérielle chez le rat montre que le peptide 2-28 du VIP ne possède plus qu'une activité relative de 33% par rapport à celle du peptide natif. La même expérience réalisée *in vivo* en mesurant la pression des artères coronaires chez le lapin montre que le potentiel relatif du VIP(2-28) est encore plus faible (0,7%) (Fournier A. et coll., 1984). Des travaux réalisés sur trachée de cobaye ont montré également que ce peptide était incapable de déplacer le VIP radiomarké de son récepteur et possède une activité intrinsèque faible (20% par rapport au VIP) (O'Donnell M. et coll., 1991). Les différents auteurs de ces travaux concluent leurs études en suggérant que His¹ ne semble pas essentiel pour l'activation du récepteur mais joue sans aucun doute un rôle important dans l'affinité. Des relations structure-activité plus particulières au VIP ont abouti à des résultats tout à fait intéressants. Tout d'abord, des études ont tenté de déterminer les rôles respectifs des différentes structures ordonnées de la molécule. Ainsi, des fragments peptidiques ont été synthétisés et testés sur différents modèles pharmacologiques. On peut citer ici le travail de Bodanszky M. (1988) qui a émis l'hypothèse selon laquelle le VIP pourrait être une prohormone. La présence dans la séquence du VIP de deux doublets basiques (Arg¹⁴-Lys¹⁵ ou Lys²⁰-Lys²¹) suggère un clivage possible pour générer des fragments peptidiques conservant toute l'activité du peptide. Aucune vérification n'a pu jusqu'à aujourd'hui étayer cette hypothèse. Par ailleurs, un travail réalisé avec un analogue de la sécrétine montre que le fragment 5-27 stimule l'activité de relaxation dans différents modèles pharmacologiques avec un potentiel similaire au VIP (Bodanszky M. et Natarajan S., 1978). Cette étude a permis de souligner le rôle important de Lys¹⁵ dans la discrimination des récepteurs du VIP et de la sécrétine. Sur les mêmes modèles pharmacologiques, l'équipe de Said a pu démontrer que le fragment 7-28 du VIP possédait une activité biologique proche du VIP. Par contre, les fragments plus petits, à la fois N- et C-terminaux (1-10, 15-28, 18-28) ont des activités agonistes très faibles (Bodanszky M. et coll.,

1977). Ces auteurs suggèrent que le récepteur du VIP pourrait posséder deux sites de reconnaissance indépendants l'un de l'autre.

Une seconde approche des relations structure-activité est celle qui utilise des **peptides chimériques** synthétisés à partir des séquences N- et C-terminales de deux peptides apparentés. Les premières expériences réalisées dans ce sens ont étudié les propriétés immunologiques et biologiques d'hybrides dans lesquelles la séquence N-terminale de la sécrétine a été remplacée par des fragments de peptides apparentés tels que le VIP, le GIP ou le glucagon (Moroder L. et coll., 1980). Tout d'abord, les propriétés immunologiques de tous ces hybrides ne diffèrent pas de celles de la sécrétine, ce qui démontre que la partie N-terminale n'influence pas le déterminant antigénique de la molécule. Ensuite, différents systèmes biologiques ont permis de montrer que la modification de la partie N-terminale de la sécrétine entraînait une perte d'affinité pour le récepteur de la sécrétine. Dans le cas de l'hybride VIP-sécrétine, le seul changement apporté par le doublet A⁴-V⁵ à la place de G⁴-T⁵ augmente l'affinité de l'hybride pour le récepteur VIP (néanmoins cinquante fois plus faible que le peptide naturel). L'observation la plus intéressante réside dans la très faible affinité des autres composés GIP-sécrétine et glucagon-sécrétine ($4 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^4$ fois plus faible que le VIP). Ceci a été confirmé par d'autres auteurs sur un modèle de cellule épithéliale intestinale de rat. Une meilleure affinité du composé VIP-sécrétine pour le récepteur du VIP par rapport à la sécrétine a été mise en évidence (Prieto J.C. et coll., 1979). De plus, cette molécule est capable de stimuler la production d'AMPC intracellulaire alors que les autres hybrides n'ont aucun effet (Laburthe M. et coll., 1979). La conclusion d'une telle étude laisse supposer que la partie N-terminale de la sécrétine semble essentielle à l'activation du récepteur. Les auteurs de ces études suggèrent en fait que les récepteurs de la famille du VIP seraient plutôt composés de deux sites séparés, l'un permettant la liaison d'une partie du VIP et l'autre assurant le couplage à la protéine G. L'activation de l'adénylate cyclase ne pourrait être efficace qu'à partir de complexes VIP-récepteur de forte affinité. Ainsi, des complexes de plus faible affinité et/ou rapidement réversibles seraient incapables de stimuler la protéine effectrice comme cela a d'ailleurs été montré par Williams et Lefkowitz dans leur étude du récepteur β adrénergique (1977). Des

résultats en contradiction avec ce qui vient d'être énoncé ont été obtenus pour une molécule hybride neurotensine-VIP où la partie N-terminale du VIP (HSDAVF) a été remplacée par la structure KPRRP appartenant à la neurotensine. Cette molécule de synthèse possède une activité antagoniste du VIP sur des cellules de la moelle épinière avec une affinité dix fois supérieure au VIP. Par contre, elle est incapable de déplacer le ^{125}I VIP des récepteurs situés sur les cellules lymphocytaires (Gozes Y. et coll., 1991). L'hétérogénéité des récepteurs est ici clairement démontrée et dans le cas des cellules de la moelle épinière, une bonne affinité pour le récepteur VIP n'implique pas une activation du système de transduction. Bien que très intéressantes, ces deux types d'approches ne permettent pas de conclure quant au rôle précis des différentes régions du VIP et a fortiori des différents acides aminés composant la séquence primaire.

Le **remplacement systématique de chaque acide aminé** composant la séquence peptidique du VIP par une alanine a été effectué afin de repérer les groupements fonctionnels essentiels à la reconnaissance moléculaire du récepteur d'une part et à son activation d'autre part. Le potentiel des nombreux analogues synthétisés a été évalué par différents tests pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* (O'Donnell M. et coll., 1991). Des délétions C-terminales du VIP ont tout d'abord été réalisées. Le fragment 1-26 conserve une affinité relativement acceptable bien que son activité soit fortement diminuée. Les délétions supplémentaires provoquent une perte presque totale à la fois de la liaison spécifique et de l'activité. Ensuite, les délétions N-terminales montrent que très rapidement les analogues tronqués (3-28) sont inactifs. Enfin, les différents résultats obtenus par le remplacement systématique des acides aminés par Ala ont permis aux auteurs de conclure que six acides aminés semblent essentiels à la fois dans les mécanismes de reconnaissance et d'activation du récepteur : Asp³, Phe⁶, Thr⁷, Tyr¹⁰, Tyr²² et Leu²³. Par ailleurs, les acides aminés compris entre Thr¹¹ et Lys²¹ et qui forment la majeure partie de l'hélice π amphiphile ne semblent pas être impliqués dans l'activation du récepteur. D'autres analogues peptidiques ont également été synthétisés par cette même équipe (Bolin D.R. et coll., 1993). La stratégie employée avait pour but de rigidifier la molécule en différents endroits tout en conservant une propriété agoniste. La cyclisation des

peptides de synthèse a été effectuée en remplaçant les acides aminés naturels par des résidus cystéine capables de former des ponts disulfure. Trois stratégies de synthèse ont suivi les critères suivants :

- (i). Positionnement des Cys autour du coude β putatif.
- (ii). Augmentation de la flexibilité des segments N- et C-terminaux par rapport à l'hélice centrale.
- (iii). Remplacement des résidus aromatiques par les cystéines.

Les résultats obtenus sur l'inhibition de la liaison spécifique du ^{125}I VIP ou sur la relaxation du muscle lisse de trachée de cobaye ont amené les auteurs à conclure de la façon suivante :

- (i). La partie N-terminale du peptide n'admet pas de rigidification modifiant la structure secondaire native du peptide.
- (ii). Les parties N- et C-terminales se replient sur la structure en hélice formant le corps rigide de la molécule.
- (iii). Le remplacement des résidus aromatiques par des Cys génère des peptides dont le potentiel agoniste est relativement faible par rapport au VIP.

Cette étude a permis de retenir une structure analogue du VIP : Ac-[Lys¹², Cys¹⁷, Val²⁶, Cys²⁸]-VIP qui possède un potentiel agoniste. Cette molécule a été testée pour son activité d'inhibition de la bronchoconstriction induite par l'histamine. Ce composé possède un caractère agoniste proche du peptide linéaire correspondant pris comme référence : Ac-[Lys¹², Nle¹⁷, Val²⁶, Thr²⁸]-VIP. Dans ce test *in vivo*, l'évaluation de la dégradation des peptides par une mesure indirecte de leur durée d'action a confirmé l'hypothèse selon laquelle le peptide cyclique est beaucoup plus stable que son homologue linéaire.

IV.A.1.2. Discussion.

Il est clair qu'au vu de ces résultats, la conception rationnelle de molécules capables de mimer le VIP ne peut être envisagée qu'à partir d'hypothèses précises et volontairement restreintes. Nous avons donc choisi de focaliser notre attention sur la partie N-terminale du peptide. Le remplacement de cette structure (dix acides aminés) associée au reste de la séquence peptidique a pu être envisagé en tenant compte des différents résultats qui nous ont semblé les plus importants :

(i). La conformation de la partie N-terminale du peptide semble très importante surtout en ce qui concerne la présence du coude β que semble influencer His¹. L'analyse des résultats des relations structures-activités et de nos propres résultats de modélisation moléculaire nous incite à penser qu'au sein de cette structure ordonnée les groupements fonctionnels COOH de Asp³ et Asp⁸, phényl de Phe⁶ et OH de Thr⁷ sont tout à fait accessibles à la surface de la molécule et sont susceptibles d'interagir avec le récepteur.

(ii). La conformation de l'hélice π amphiphile doit être préservée car, entre autres, elle permet à la molécule de se replier de façon à garder une bonne solubilité dans les solvants aqueux. En effet, nous avons pu remarquer que des analogues peptidiques du VIP, pour lesquels la partie 11-19 a été délétée, étaient complètement insolubles dans un milieu aqueux (Leroux F., 1992).

(iii). La séquence C-terminale du peptide est semble-t-il très importante dans la reconnaissance et l'activation du récepteur. Cette structure ordonnée (Fournier A. et coll., 1984) pourrait être responsable, selon notre hypothèse, de l'établissement des liaisons spécifiques avec les résidus des hélices transmembranaires du récepteur entraînant ainsi des changements conformationnels de ce dernier.

En résumé, nous avons établi notre conception rationnelle selon un modèle d'adressage. La partie N-terminale possède des acides aminés qui seraient plutôt impliqués dans



l'affinité pour le récepteur alors que la partie C-terminale constituerait le segment interagissant avec la structure interne (hélices transmembranaires).

Parallèlement aux études de relation structure-activité concernant le ligand, des chercheurs se sont intéressés au récepteur sur le plan moléculaire. L'objectif d'une telle étude a été de disposer de la séquence génomique du récepteur. De nombreux récepteurs couplés aux protéines G ont été ainsi clonés et séquencés (Hibert M.F. et coll., 1991; Findlay J. et Eliopoulos E., 1990). Une première étude concernant le clonage du récepteur VIP a été publiée en 1992 par l'équipe de Nagata S. (Ishihara T. et coll., 1992) qui a isolé l'ADN complémentaire du récepteur dans le poumon de rat. Une forte homologie de séquence avec le récepteur de la sécrétine, clonée par cette même équipe, a pu être observée (Ishihara T. et coll., 1991). Une autre étude menée par Sreedharan S.P. et coll. (1993) a, de nouveau, mis en évidence un clonage du récepteur du VIP à partir de cellules épithéliales intestinales (HT29) et de tissus pulmonaire et rénal humains. Ce récepteur humain possède lui aussi une forte identité de séquence avec le récepteur de la sécrétine. Les deux récepteurs du VIP ainsi clonés possèdent quant à eux 84% d'homologie et forment avec ceux de la calcitonine, de l'hormone parathyroïde et de la sécrétine une nouvelle famille de récepteurs couplés aux protéines G. Les expériences de mutagenèse dirigée ou de construction d'hybride du récepteur VIP sont probablement en cours. Bien que rien n'ait été publié, nous nous sommes intéressés à noter quelques caractéristiques communes à ces récepteurs de peptide amide appartenant à la famille de la sécrétine.

Notre premier objectif a été de comprendre sur le plan moléculaire l'interaction VIP-récepteur. C'est pourquoi, il était important de connaître la protéine réceptrice du VIP. Des caractéristiques spécifiques aux peptides amides ont pu être décelées grâce à l'aide scientifique de l'équipe de M. Hibert (Merrell Dow, Strasbourg). L'alignement des séquences peptidiques primaires des récepteurs couplés aux protéines G permet de visualiser des acides aminés très conservés parmi les différents récepteurs. Plus précisément, l'alignement de séquences des domaines transmembranaires permet de suggérer les positions clés de l'interaction VIP-récepteur (**Figure 40**).

Tout d'abord, nous avons noté, en accord avec d'autres auteurs que l'intégrité du récepteur VIP dépendait de la présence de liaisons disulfure pour le site récepteur (Robberecht P. et coll., 1984; Ottaway C.A., 1992). L'importance des résidus cystéines, très conservés dans tous les récepteurs couplés aux protéines G (hélice 3 et boucle extracellulaire 2), s'explique par une probable interaction entre ces deux acides aminés soufrés. La **Figure 41** permet de visualiser cette liaison disulfure qui provoquerait le repliement de la boucle extracellulaire 2 sur une partie de la cavité réceptrice formée par les sept hélices transmembranaires.

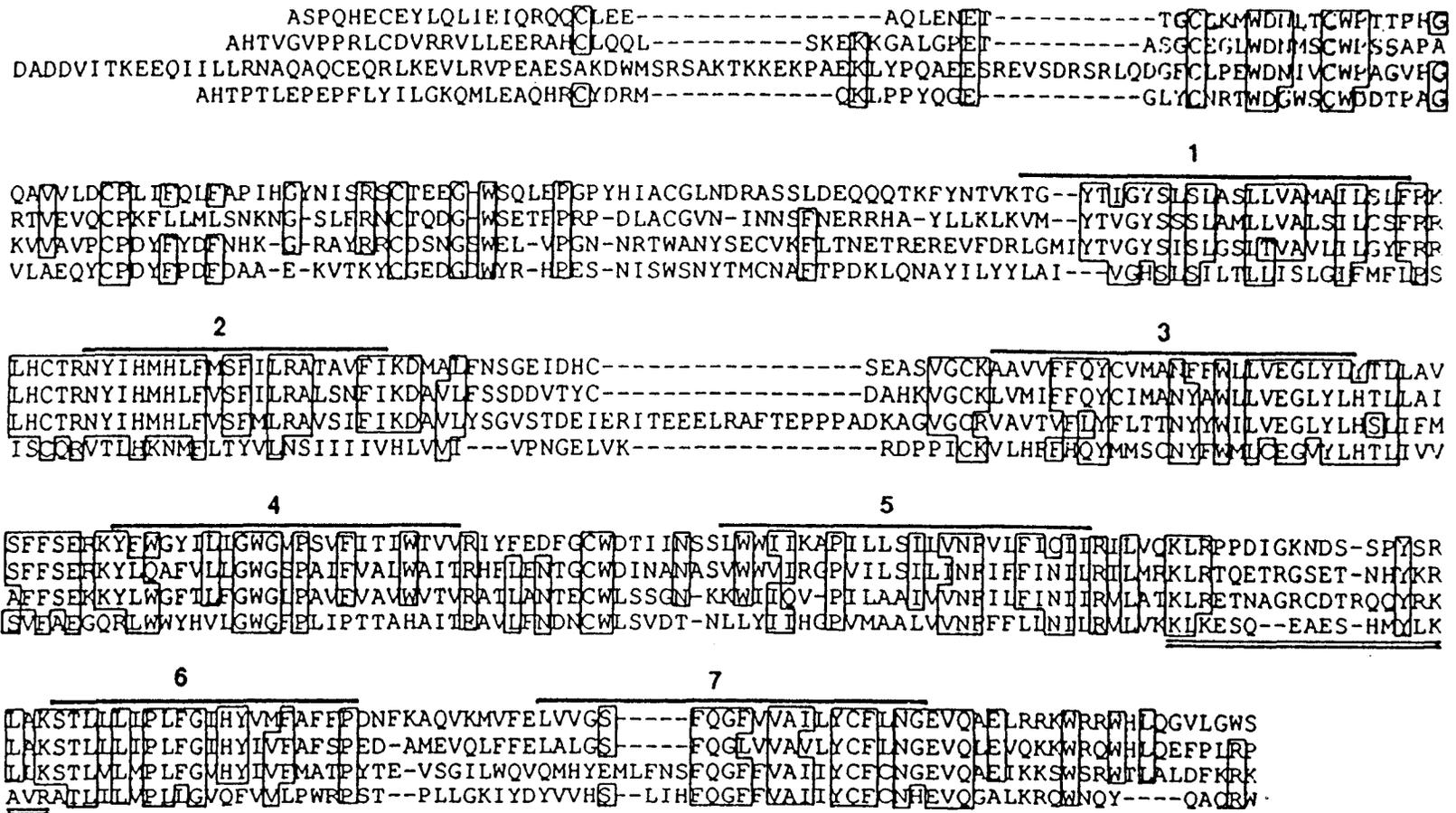


Figure 40. Alignement de séquence des récepteurs du VIP, de la sécrétine, de la calcitonine clonés chez le rat et de l'hormone parathyroïde cloné chez l'opossum. L'optimisation de l'alignement a été réalisée par l'introduction de "gaps" dans la séquence. Les hélices transmembranaires potentielles sont indiquées par des numéros (1 à 7) et les acides aminés conservés sont encadrés, d'après Ishihara T. et coll., 1992.

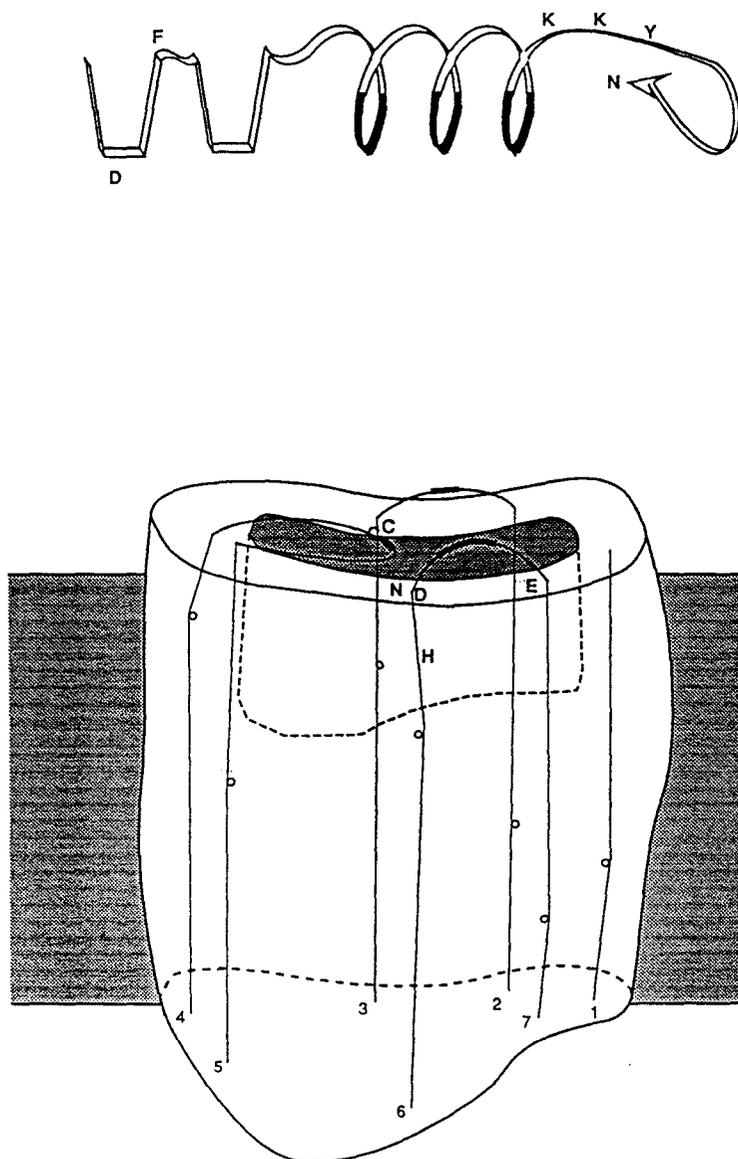


Figure 41. Représentation schématique du VIP (A) et de son récepteur à sept hélices transmembranaires (B). La conformation du peptide est représentée (N_t en coude β , hélice amphiphile et "épingle à cheveu"). Les sept hélices α transmembranaires sont représentées par leur axe principal, numérotées de 1 à 7; Les boucles extracellulaires schématisées, contiennent des zones à caractère hydrophobe (■); Une cavité étroite de 15Å de profondeur est délimitée par des pointillés; Les acides aminés du VIP et du récepteur, susceptibles d'interagir, sont notés (code à une lettre); Les résidus proline sont notés différemment : ○, d'après Hibert M. et coll., (1993).

Outre ces résidus cystéines, l'analyse des acides aminés conservés montre, dans le cas général, que la partie N-terminale porte des sites de glycosylation (résidus asparagine) alors que la partie C-terminale porte des sites de phosphorylation (Ser et Thr) de même que la troisième boucle cytoplasmique. La partie transmembranaire possède le plus haut degré de conservation au sein d'un même groupe de récepteurs. En ce qui concerne les récepteurs de peptides amides tels que substance P, neurokinines, bombésine, galanine, sécrétine, le groupe de M. Hibert a pu remarquer l'importance d'acides aminés aromatiques positionnés sur différentes hélices transmembranaires. Ceux-ci sont probablement importants pour former une poche hydrophobe délimitant la cavité réceptrice : on peut ainsi remarquer, pour le récepteur du VIP et de la sécrétine, la conservation de Trp²⁰³ sur l'hélice 3, de Phe²³⁴ sur l'hélice 4, de Phe²⁸¹ sur l'hélice 5 et de Phe³²² sur l'hélice 6 (cf **Figure 40**). Une particularité des récepteurs de peptide amide réside dans la conservation de His dans le haut de l'hélice 6 transmembranaire. On ne retrouve ce résidu à cette position dans aucun autre récepteur ne reconnaissant pas de peptide amide. Il est fortement suspecté que cet acide aminé puisse interagir avec la fonction amide C-terminale de la molécule. Dans le cas des tachykinines, des études ont montré que des analogues des neurokinines A et B possédant une fonction C-terminale acide présentent de faibles activités (Patacchini R. et coll., 1993). En ce qui concerne le VIP, aucune modification de l'activité n'a été constatée avec un peptide COOH (Fahrenkrug J. et coll., 1989). Ceci n'exclut pas que la fonction COOH terminale du VIP tout comme la fonction CONH₂ puisse établir une liaison hydrogène avec le noyau imidazole de His³²⁵ du récepteur VIP.

Si on essaie de concevoir l'interaction entre le VIP et son récepteur, il faut tenir compte de la profondeur de la cavité formée par les sept hélices transmembranaires (Hibert M. et coll., 1993). Dans le cas du VIP, comme dans celui des autres peptides seuls cinq à six résidus sont capables de pénétrer dans ce puits. Il pourrait donc s'agir du segment C-terminal qui constitue dans notre hypothèse le message de la molécule. Le doublet Lys²⁰-Lys²¹ se trouverait ainsi juste à la surface cellulaire. L'importance de ces résidus dans la reconnaissance moléculaire est suggérée par les résultats précédemment cités sur le peptide PACAP (Robberecht P. et coll., 1992). Par ailleurs, par analogie avec la substance P dans laquelle on trouve un doublet Gln-

Gln à la place des Lys, on a pu remarquer au niveau de l'hélice 7 du récepteur un doublet Gln-Gln susceptible d'interagir avec les résidus du peptide. En ce qui concerne la cavité réceptrice du VIP, Ser²⁵⁷, Ser²⁵⁸, Asp³³⁴, Asn³³⁵ et Glu³⁴⁵ sont susceptibles d'interagir avec le peptide en formant des liaisons hydrogène voire salines. Les résultats obtenus par O'Donnell (1991) viennent conforter cette hypothèse puisque le remplacement des résidus naturels de 11 à 22 par des alanines provoque des modifications dans l'affinité des analogues peptidiques. Les acides aminés chargés (face hydrophile de l'hélice) ont une influence plus marquée, c'est le cas notamment des deux lysines 20 et 21. Le rôle des autres acides aminés concernés (Arg¹², Arg¹⁴, Lys¹⁵) pourrait être lié à une interaction soit avec la partie oligosaccharidique du récepteur soit avec les boucles extracellulaires. Quant à la partie N-terminale du peptide, elle pourrait interagir également avec les boucles extracellulaires afin de constituer les différents points d'ancrage permettant une bonne affinité pour le récepteur.

IV.A.2. Résultats personnels.

IV.A.2.1. Conception des molécules pseudopeptidiques.

A partir des bases que nous venons d'énoncer, nous avons choisi de concevoir des molécules pseudopeptidiques dans lesquelles la partie N-terminale du VIP serait délétée pour être remplacée par un groupement non peptidique. Des critères ont été retenus; il s'agissait tout d'abord de mimer la conformation du segment peptidique et, dans un second temps, d'apporter sur cette structure rigide des groupements fonctionnels adéquats. L'objectif que nous nous sommes fixé était de concevoir des molécules capables de mimer d'une part la chaîne latérale de Phe⁶, et d'autre part différents acides aminés hydrophiles présents dans la séquence du peptide : Asp³, Thr⁷ ou Asp⁸. L'effet agoniste recherché ne pouvait être obtenu que par l'addition du reste de la structure peptidique du VIP.

Parmi les structures capables de mimer un coude β , nous en avons sélectionné une qui avait déjà donné de très bons résultats pour de nombreux peptides tels que la gonadolibérine (LHRH), la Met-enképhaline, l'élédoïsine (tachykinine) ou la gastrine (Ball J.B. et Alewood P.F., 1990). Il s'agit d'une **structure lactame** qui permet de réduire la flexibilité

conformationnelle du peptide hors de la structure en coude β . En effet, comme le montre la **Figure 42**, la rigidification induit une liaison hydrogène contraignant la molécule à adopter une conformation n'admettant que très peu de degrés de liberté. Une analyse cristallographique a d'ailleurs confirmé l'existence de cette liaison hydrogène intramoléculaire pour des dérivés spirolactames (Genin M.J. et coll., 1993).

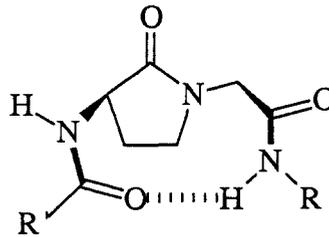


Figure 42. Structure lactame. D'après Genin M.J. et coll., 1993.

La substitution du noyau lactame par des groupements fonctionnels a été réalisée pour obtenir une structure capable de mimer différentes chaînes latérales du peptide naturel. Ainsi, nous avons additionné un groupement aromatique et une fonction acide afin de mimer les chaînes respectives de Phe⁶ et Asp⁸. Les raisons qui ont guidé ce choix ont déjà été énoncées pour le groupement aromatique. Il faut ajouter ici celles concernant la fonction acide. Tout d'abord, en raison de la structure lactame qui mime en fait un enchaînement d'un di- ou d'un tri-peptide (Ball J.B. et Alewood P.F., 1990), nous avons décidé de substituer du côté opposé au noyau aromatique la fonction COOH de Asp⁸. Ensuite, il était intéressant de comprendre si cette fonction latérale pouvait avoir un rôle dans la fixation au récepteur. C'est pourquoi nous avons effectué une pharmacomodulation de cette fonction acétate en la remplaçant soit par une chaîne carbonée occupant le même volume mais sans le caractère acide, soit plus simplement en déléant la structure isopropyle (le groupement méthyle permettant de conserver le carbone asymétrique). La **Figure 43** définit trois dérivés lactames qui sont des pyrrolidinones substituées sur l'azote ou sur le carbone 3. C'est d'ailleurs grâce à cette seconde substitution que nous avons pu par l'intermédiaire de la fonction carbonyle fixer la chaîne peptidique 9-28 du VIP.

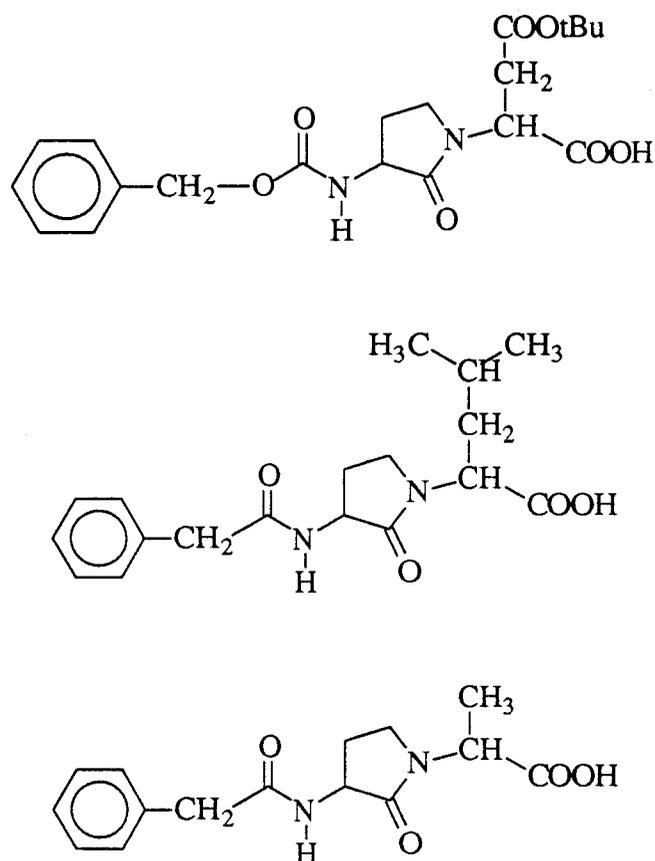


Figure 43. Dérivés pyrrolidinones

La seconde structure employée est beaucoup plus originale dans la conception rationnelle de structures non peptidiques. En effet, elle provient de travaux réalisés dans notre laboratoire sur des structures ligands du petit sillon de l'ADN (Bailly C. et Hénichart J.P., 1991; Bailly F., 1992). La nétropsine (Nt) ou la distamycine (Dst), deux chefs de file de la famille des antibiotiques de type **pyrrole-amidine**, possèdent des structures tridimensionnelles bien établies par RMN et par cristallographie (Turchin K.F. et coll., 1977). Succinctement, il est important de savoir que, dans le cas de Nt, l'ensemble bis-pyrrole n'est pas plan, les deux noyaux pyrrole formant un angle dièdre de 20° (Berman H.M. et coll., 1979). Globalement Nt et Dst présentent une courbure particulière de leur squelette oligopeptidique (**Figure 44**).

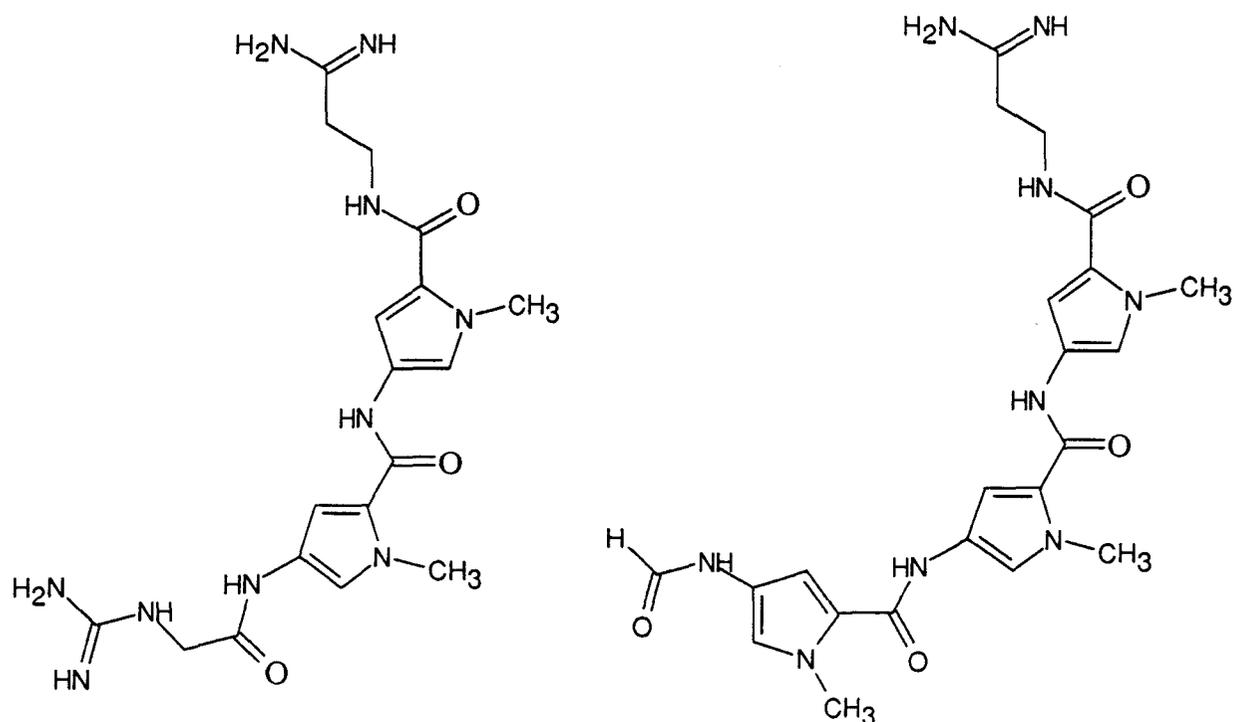


Figure 44. Structures de la Nétropsine et de la Distamycine.

Celle-ci résulte de la répulsion stérique entre le groupement méthyle des pyrroles et les carbonyles des liaisons pseudo-peptidiques adjacentes (Manning M.C. et Woody R.W., 1986).

L'élaboration de nos propres molécules a été réalisée en substituant les groupements méthyle par des chaînes carbonées plus longues ne modifiant vraisemblablement pas la conformation de la structure bis- ou tris-pyrrole. De la même manière que dans la première série de molécules pseudo-peptidiques, nous avons substitué un azote pyrrolique par un groupement benzyle dans le but de permettre à la molécule d'interagir avec une zone hydrophobe hypothétique du récepteur. Le pyrrole couplé en position C-terminale par rapport au premier cycle aromatique précédent n'a volontairement pas été substitué. En effet, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, l'apport de la modélisation moléculaire a été d'une aide très précieuse pour influencer notre synthèse. En raison de la position du groupement NH pyrrolique dans le même environnement qu'occupe la fonction hydroxyle de Thr⁷, nous avons supposé que ces deux groupements étaient équivalents en tant que donneurs de liaison

hydrogène (accepteurs d'électron). Le troisième pyrrole en position N-terminale peut quant à lui être substitué par un groupement fonctionnel mimant la chaîne latérale de Asp³ (Figure 45).

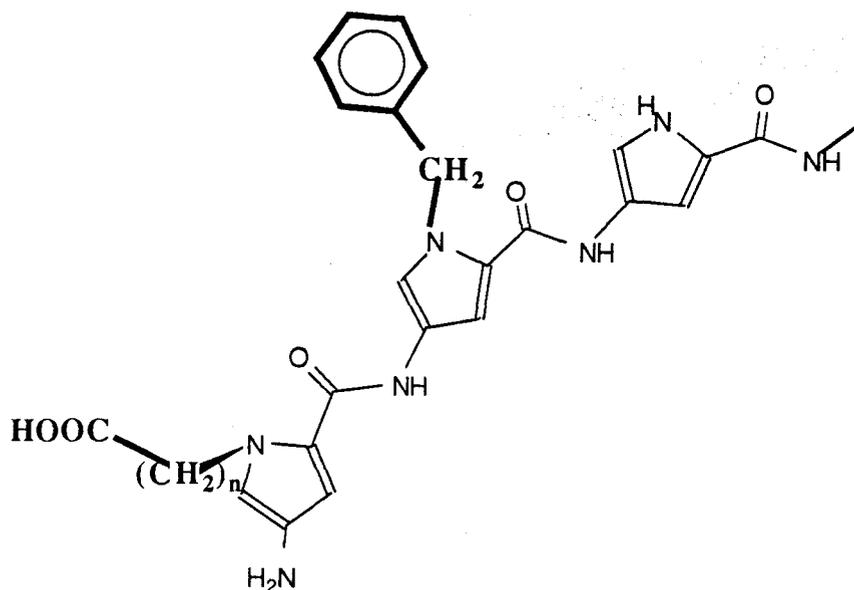


Figure 45. Dérivé pyrrole

Comme nous le verrons au cours des résultats présentés ci-dessous, la synthèse de tels composés a posé quelques problèmes quant à la substitution des noyaux pyrroles. La stratégie de synthèse du pyrrole substitué par une fonction acétate n'ayant pu aboutir, nous avons donc utilisé le groupe bis-pyrrole pour synthétiser un pseudopeptide par l'adjonction de la séquence peptidique 11-28 du VIP. Enfin, dans le but de montrer l'importance du groupement aromatique dans cette structure, nous avons synthétisé un pseudopeptide ne possédant de substitutions sur aucun des deux pyrroles.

IV A.2.2. Modélisation moléculaire

L'utilisation de l'outil informatique s'est révélée une fois encore très importante quant aux informations fournies pour orienter la synthèse de dérivés analogues du VIP. En effet, sur la base à la fois de la modélisation moléculaire du fragment 1-10 et de certaines données issues des relations structures-activités, nous avons tenté d'évaluer le potentiel des différentes molécules capables de mimer certains groupements fonctionnels de la partie N-terminale du VIP.

Génération de l'espace conformationnel des molécules non peptidiques.

Les molécules dérivées de la pyrrolidinone et les dérivés pyrroles ont été construits et optimisés de la même manière que le peptide 1-10. L'espace conformationnel a été produit par une technique aléatoire générant différents conformères ("random search"). Pour chaque dérivé pyrrole, nous avons obtenu 590 conformères alors que les dérivés de la pyrrolidinone en ont généré 300. Chaque conformation a été optimisée par la méthode précédemment décrite pour le segment peptidique.

Recherche de la superposition entre les dérivés non peptidiques et le fragment 1-10 du VIP.

(a). Superposition entre les dérivés pyrroles et le VIP(1-10).

La recherche des superpositions possibles entre les dérivés pyrroles et le VIP(1-10) a été menée systématiquement (macrocommandes) afin de répertorier toutes les possibilités ajustant vingt atomes communs entre les deux molécules à un niveau maximum de RMS de 2,5. Parmi les quelques solutions trouvées, nous avons gardé la plus proche de nos données de RMN. En effet, seule cette structure répondait aux critères suivants :

- (i). Présence d'un coude β de type III dans la partie 2-5 du peptide.
- (ii). Initiation d'une structure en hélice dans la partie 7-10 du peptide.
- (iii). Conformère énergétiquement le plus stable.

Cette solution retenue a été optimisée dans un multifit (fit flexible de SYBYL) portant sur seize ou vingt-deux paires d'atomes pour respectivement le bis-pyrrole ou le tris-pyrrole. La procédure du multifit permet d'optimiser à la fois la géométrie des molécules isolées et d'ajuster la superposition des molécules par les atomes sélectionnés afin de réduire l'énergie totale. Les atomes impliqués sont les suivants et les résultats obtenus sont présentés sur les **Figures 46 et 47**.

bis-pyrrole	tris-pyrrole
Carboxamide terminal (3 atomes)	Carboxamide terminal (3 atomes)
Amine terminale (1 atome)	Amine terminale (1 atome)
-	Carboxylate (3 atomes)
Benzyle (7 atomes)	Benzyle (7 atomes)
Liaison peptidique (3 atomes)	Liaisons peptidiques (2x3 atomes)
-	Amine pyrrolique (2 atomes)

(b). Multifit entre les dérivés pyrrolidinone et le VIP(1-10).

A partir de la structure peptidique optimisée précédemment, nous avons réalisé un multifit entre chacun des dérivés pyrrolidinone et le fragment 1-10. Afin de conserver l'homogénéité de la structure peptidique, seule la conformation du dérivé pyrrolidinone était susceptible d'être modifiée dans cette procédure. Le multifit a été réalisé cette fois sur vingt et un, vingt-deux ou vingt et une paires d'atomes pour respectivement les dérivés pyrrolidinone 1, 2 ou 3 (cf. **Figure 43**). Le détail de ces atomes impliqués est le suivant :

Dérivé pyrrolidinone 1	Dérivé pyrrolidinone 2	Dérivé pyrrolidinone 3
Carboxamide terminal (3 atomes)	Carboxamide terminal (3 atomes)	Carboxamide terminal (3 atomes)
Liaisons peptidiques (2x3 atomes)	Liaisons peptidiques (2x3 atomes)	Liaisons peptidiques (2x3 atomes)
Acétate (4 atomes)	Isobutyle (4 atomes)	Méthyle (4 atomes)
Phényl (6 atomes)	Benzyle (7 atomes)	Phényle (6 atomes)
Carbones asymétriques (2 atomes)	Carbones asymétriques (2 atomes)	Carbones asymétriques (2 atomes)

Les **Figures 48, 49** et **50** représentent les différentes superpositions résultantes.

Les conformations des différentes molécules ainsi obtenues ne s'écartent pas plus de 10 kcal/mol des conformères d'énergie minimum globale, ce qui nous est apparu tout à fait acceptable.

SUPERPOSITION DU VIP 1-10 (ROUGE) ET DU BIS-PYRROLE



Figure 46. Superposition du VIP(1-10) en rouge et du dérivé bis-pyrrole.

SUPERPOSITION DU VIP 1-10 (ROUGE) ET DU TRIS PYRROLE

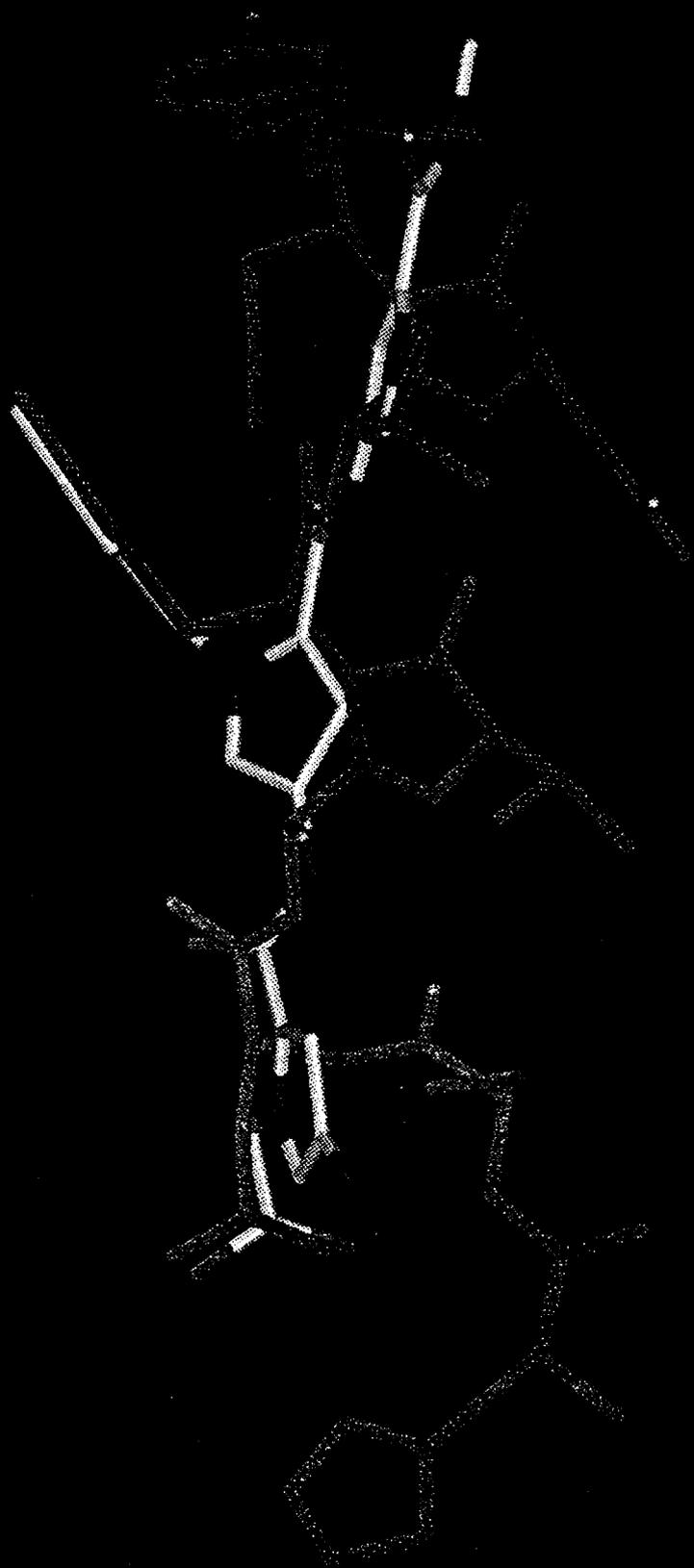


Figure 47. Superposition du VIP(1-10) en rouge et du dérivé tris-pyrrole.

SUPERPOSITION DU VIP 1-10 (ROUGE) ET DU DERIVE PYRROLIDINONE 1

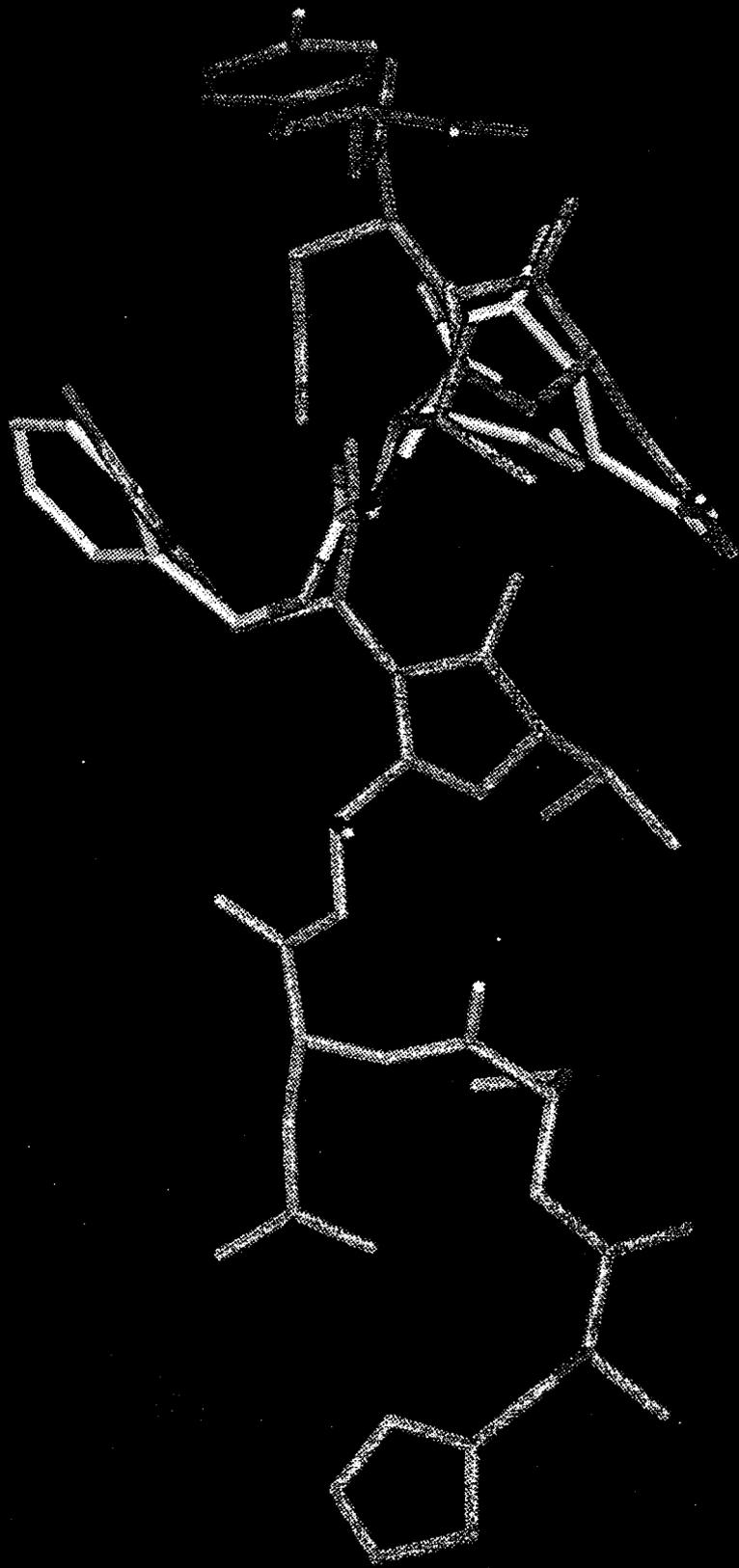


Figure 48. Superposition du VIP(1-10) en rouge et du dérivé pyrrolidinone 1.

SUPERPOSITION DU VIP 1-10 (ROUGE) ET DU DERIVE PYRROLIDINONE 2

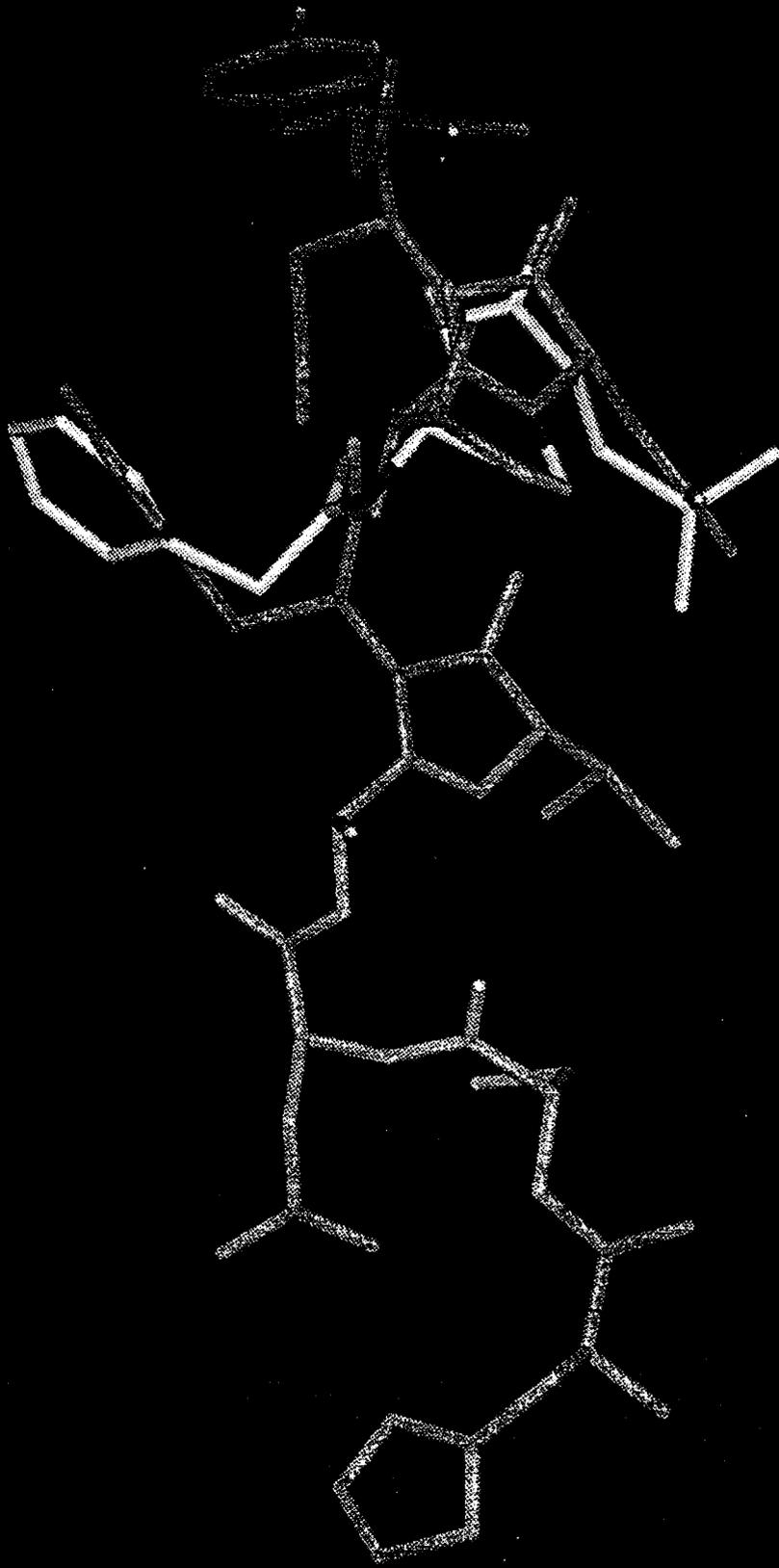


Figure 49. Superposition du VIP(1-10) en rouge et du dérivé pyrrolidinone 2.

SUPERPOSITION DU VIP 1-10 (ROUGE) ET DU DERIVE PYRROLIDINONE 3

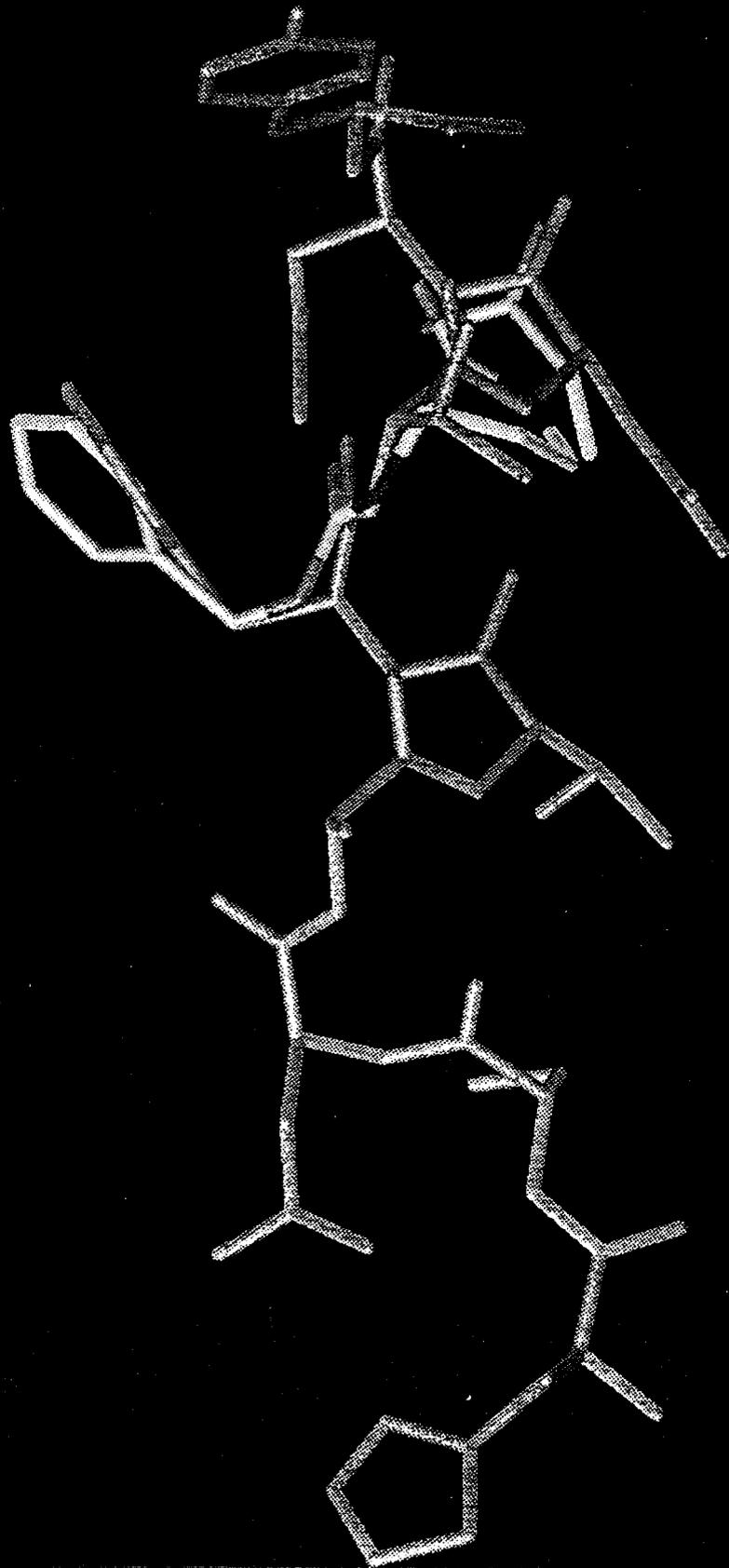


Figure 50. Superposition du VIP(1-10) en rouge et du dérivé pyrrolidinone 3.

IV.B. REALISATION ET POTENTIEL PHARMACOLOGIQUE DES PSEUDOPEPTIDES.

IV.B.1. Synthèse.

La synthèse des pseudopeptides a utilisé les méthodes de chimie organique en phase solide et en phase liquide. La phase solide a permis de réaliser la synthèse de la partie peptidique commune à tous les dérivés (cf § Partie expérimentale). Deux stratégies de synthèse en phase liquide ont été choisies afin d'obtenir les composés dérivés de la pyrrolidinone d'une part et ceux dérivés du pyrrole d'autre part.

IV.B.1.1. Dérivés de la pyrrolidinone. (voir p. 148)

Cette première série de molécules a été réalisée suivant le **Schéma I**. Les trois dipeptides (6), (7) et (8) ont été obtenus à partir d'acides aminés commerciaux selon la méthode de couplage classique de synthèse peptidique en phase liquide : méthode dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole ou DCC/HOBt.

Chaque dipeptide est cyclisé selon la méthode décrite par Williams B.J. et coll. (1993) pour obtenir des dérivés de la pyrrolidinone (1), (9) et (10). Les composés COOH libre (9) et (10) sont estérifiés dans le méthanol saturé par l'acide chlorhydrique gazeux. La fonction amine est déprotégée afin d'y amener le groupement aromatique par une N-substitution à l'aide du chlorure de phénacétyle en présence de triéthylamine pour conduire à l'obtention des dérivés (13) et (14). Enfin la saponification en milieu méthanolique concentré permet d'obtenir les composés (2) et (3).

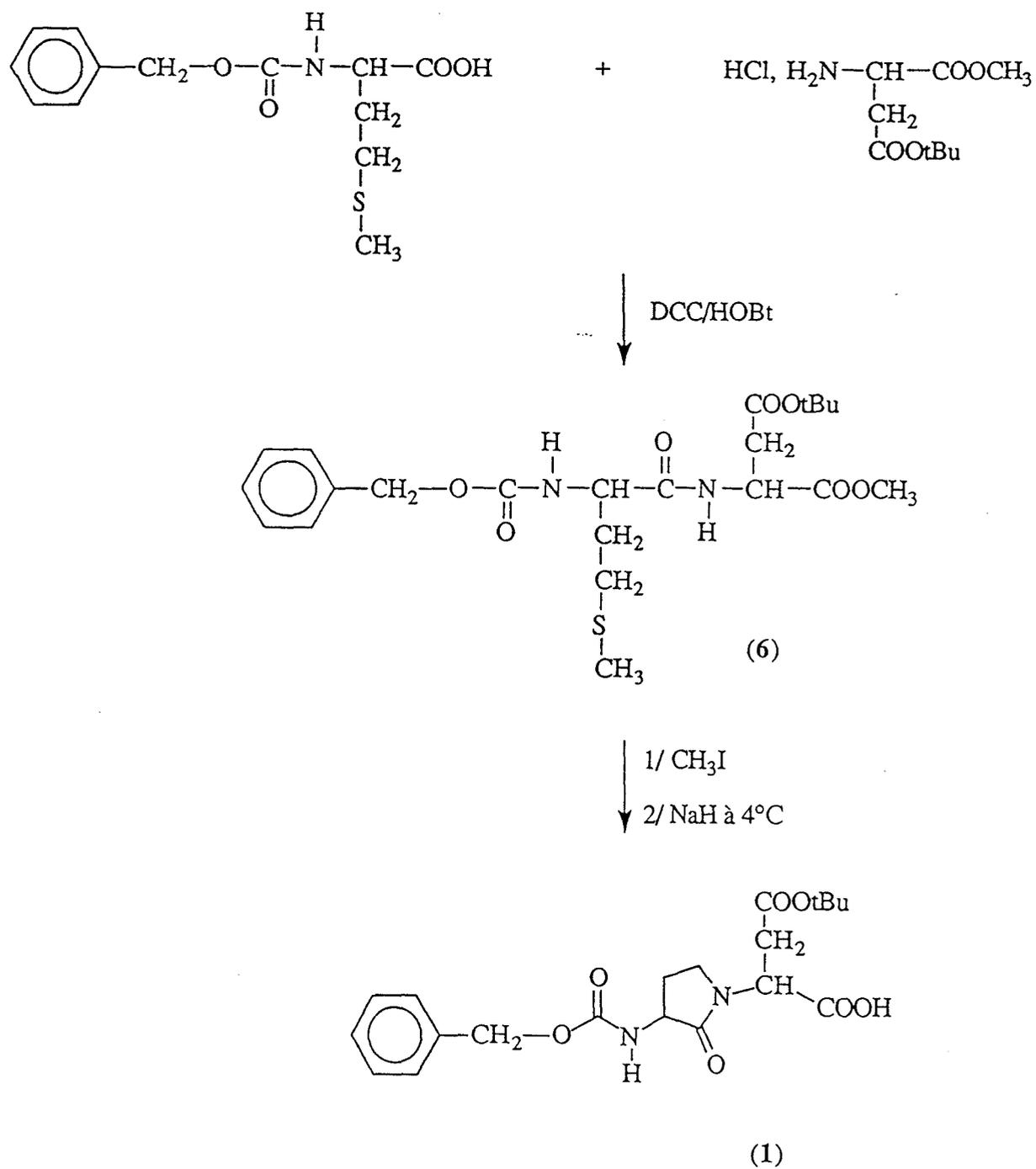


Schéma Ia. Synthèse du composé 1.

IV.B.1.2. Dérivés pyrroliques. (voir p. 160)

L'obtention des molécules bis- et tris-pyrrole nécessite tout d'abord la synthèse des cycles pyrroles non substitués sur l'azote. Ainsi le **Schéma II** présente l'élaboration du cycle pyrrolique, puis après substitution de l'azote cyclique, des couplages de type peptidique ont été réalisés afin d'obtenir les composés (4) et (5) désirés.

A partir de l'acide mucobromique commercial, on prépare le nitromalonaldéhyde (15) selon le protocole décrit par Fanta P.E. (1952). La formation du pyrrole 4-nitro 2-méthoxycarbonyle (16) est obtenue par condensation du dérivé (15) et du chlorure d'ammonium de l'ester méthylique de glycine. Une réduction en présence de nickel de Raney sous faible pression d'hydrogène du dérivé (16) conduit au pyrrole 4-amino 2-méthoxycarbonyle (17). Celui-ci peut être soit isolé sous forme de chlorhydrate afin de le stocker, soit mis en réaction avec un groupement protecteur temporaire classique des fonctions amines, le groupement tertibutyloxycarbonyle (BOC). On accède ainsi au pyrrole 4-(tertibutyloxycarbonylamino) 2-méthoxycarbonyle (18).

A partir du dérivé pyrrole (18), trois voies de synthèse ont permis d'obtenir chaque monomère désiré.

(a). La saponification de (18) en milieu méthanolique conduit au dérivé (19) qui peut être couplé au dérivé (17) pour former la molécule bis-pyrrole non substituée (20). Le produit final (4) est obtenu après une nouvelle saponification.

(b). La substitution du dérivé (18) par le chlorure d'acétonitrile (passage par un sel de sodium intermédiaire) conduit au dérivé (21). Le dérivé (22) n'a pu être obtenu en raison des conditions de saponification trop agressives. Un mélange de composé diacide, amino-acide et du produit (22) n'a pu être séparé.

(c). La substitution du composé (18) par le chlorure de benzyle conduit au dérivé pyrrole N-benzylé (23). La saponification suivie du couplage avec le dérivé (17) conduit au composé (25) attendu. Une nouvelle saponification en milieu méthanolique permet d'obtenir le second dérivé bis-pyrrole (5).

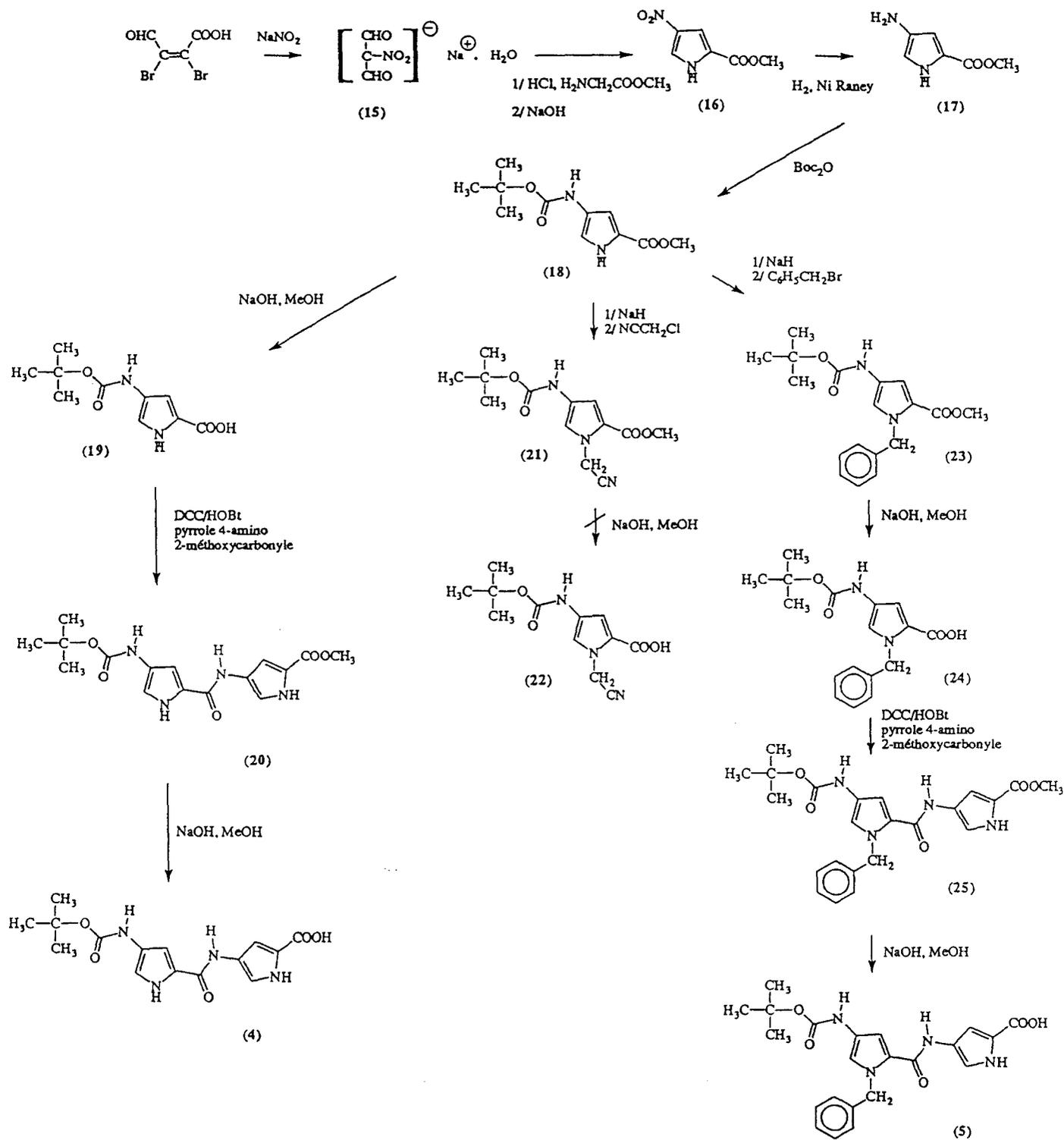


Schéma II. Synthèse des composés 4 et 5.

La synthèse finale des dérivés pseudopeptidiques a été réalisée en phase solide en utilisant un protocole de couplage utilisant un réactif de couplage différent. Il s'agit du BOP/DIPEA ou hexafluorophosphate de benzotriazol N-Oxytrisdiméthylamino phosphonium en présence de diisopropyléthylamine. Cinq pseudopeptides ont été synthétisés :

(i). 3 dérivés de la pyrrolidinone ont été couplés au segment 9-28 du VIP préalablement synthétisé en phase solide (cf § Synthèse peptidique en phase hétérogène) pour donner respectivement :

(1)-VIP(9-28) = pseudopeptide I

(2)-VIP(9-28) = pseudopeptide II

(3)-VIP(9-28) = pseudopeptide III

(ii). 2 dérivés bis-pyrrole ont été couplés au segment 11-28 du VIP. Nous avons obtenu ainsi :

(4)-VIP(11-28) = pseudopeptide IV

(5)-VIP(11-28) = pseudopeptide V

Ces différents pseudopeptides ont été ensuite purifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (cf § Purification des analogues du VIP), avant d'être analysés en spectrométrie de masse (FAB).

IV.B.2. Potentiel pharmacologique : déplacement du VIP radiomarqué et production d'AMPC.

IV.B.2.1. Modèle des cellules de neuroblastome. (voir p. 141 et 145)

Les résultats présentés ici ont été réalisés sur les deux lignées de neuroblastome. Comme nous le verrons, peu de différences sont à noter concernant le comportement de ces deux types cellulaires face aux molécules apparentées au VIP. C'est pourquoi nous avons choisi de présenter nos résultats simultanément afin d'éviter les répétitions.

Dans un premier temps, le déplacement du ^{125}I -VIP par les pseudopeptides de synthèse apporte les premiers résultats quant à l'affinité relative de ces composés (**Figure 51**).

Les dérivés pseudopeptidiques ont été testés sur les deux lignées cellulaires. Tout d'abord, les dérivés de la pyrrolidinone et du pyrrole sont capables de déplacer le ^{125}I -VIP de son récepteur sur les deux lignées cellulaires avec des potentialités différentes. La **Figure 51** montre que le dérivé de la pyrrolidinone I et le dérivé bis-pyrrole substitué semblent avoir un potentiel inhibiteur de la fixation du ^{125}I -VIP plus important que les autres analogues. Les valeurs d'IC₅₀ des cinq pseudopeptides ont été réunies dans le **Tableau** suivant :

	VIP	I	II	III	IV	V
IC ₅₀ (M)	$0,40 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	$2 \cdot 10^{-7}$

La comparaison des IC₅₀ des pseudopeptides de synthèse et du fragment 10-28 du VIP (IC₅₀ = 10^{-6}M), cf page 88, montre que l'affinité relative des composés I, II, III et V est augmentée contrairement au composé IV [bis-pyrrole-VIP(10-28)]. Il est à noter que tout comme le VIP(1-11) les molécules non peptidiques (1 à 5) ne présentent aucune affinité détectable pour le récepteur VIP.

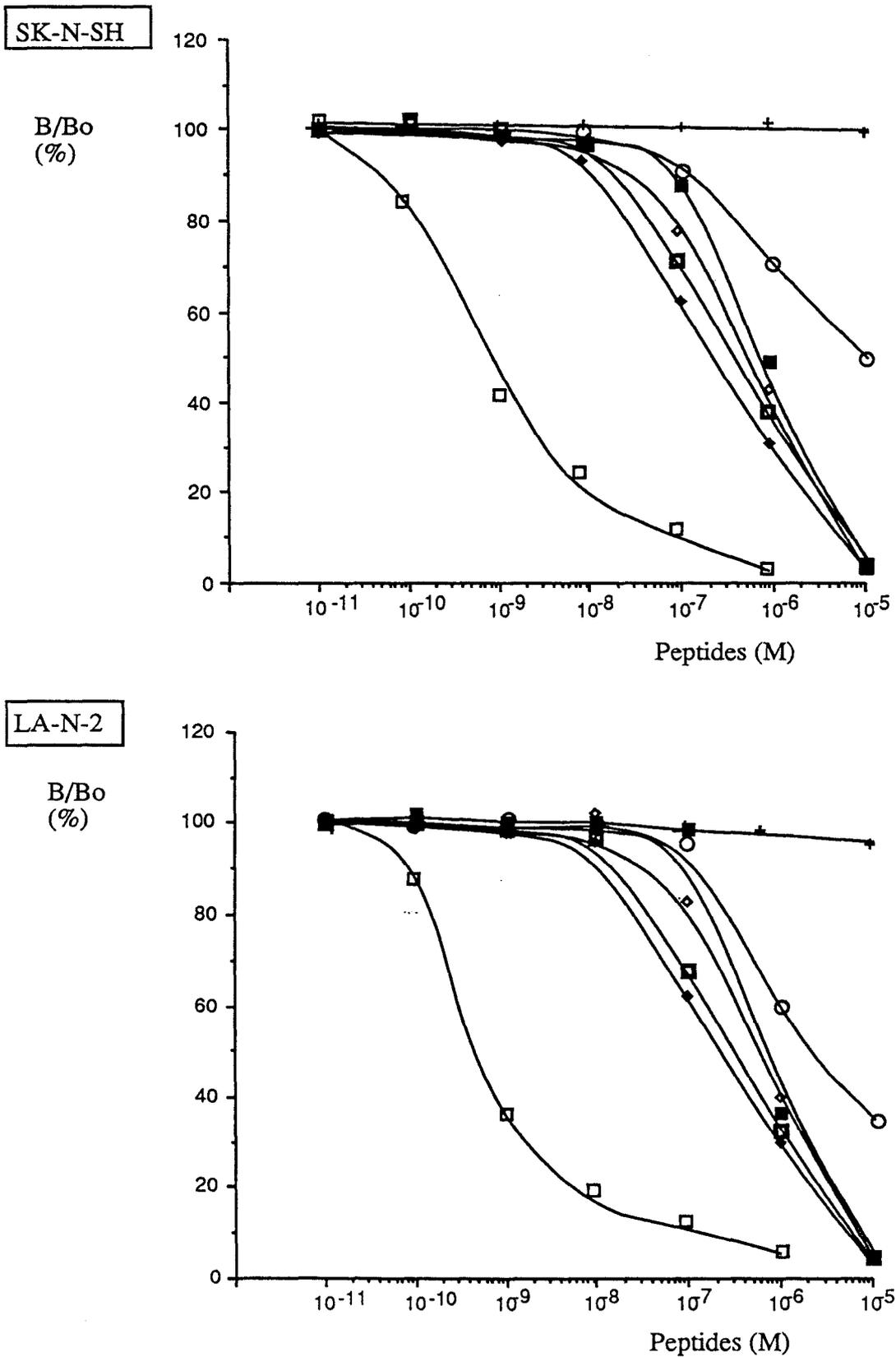


Figure 51. Déplacement du ¹²⁵I-VIP par les pseudopeptides de synthèse. (+), dérivés non peptidiques (1 à 5); Pseudopeptides (□), I; (■), II; (◇), III; (○), IV; (◆), V; (□), VIP.

Ces molécules ont été testées pour leur capacité à stimuler l'activité de l'adénylate cyclase. Parmi ces cinq composés, un seul est capable de stimuler la production d'AMPc intracellulaire. Le pseudopeptide V est un agoniste du VIP sur les lignées cellulaires de neuroblastome SK-N-SH et LA-N-2. Cette stimulation a été mesurée de façon dépendante de la concentration comme le montre la **Figure 52**.

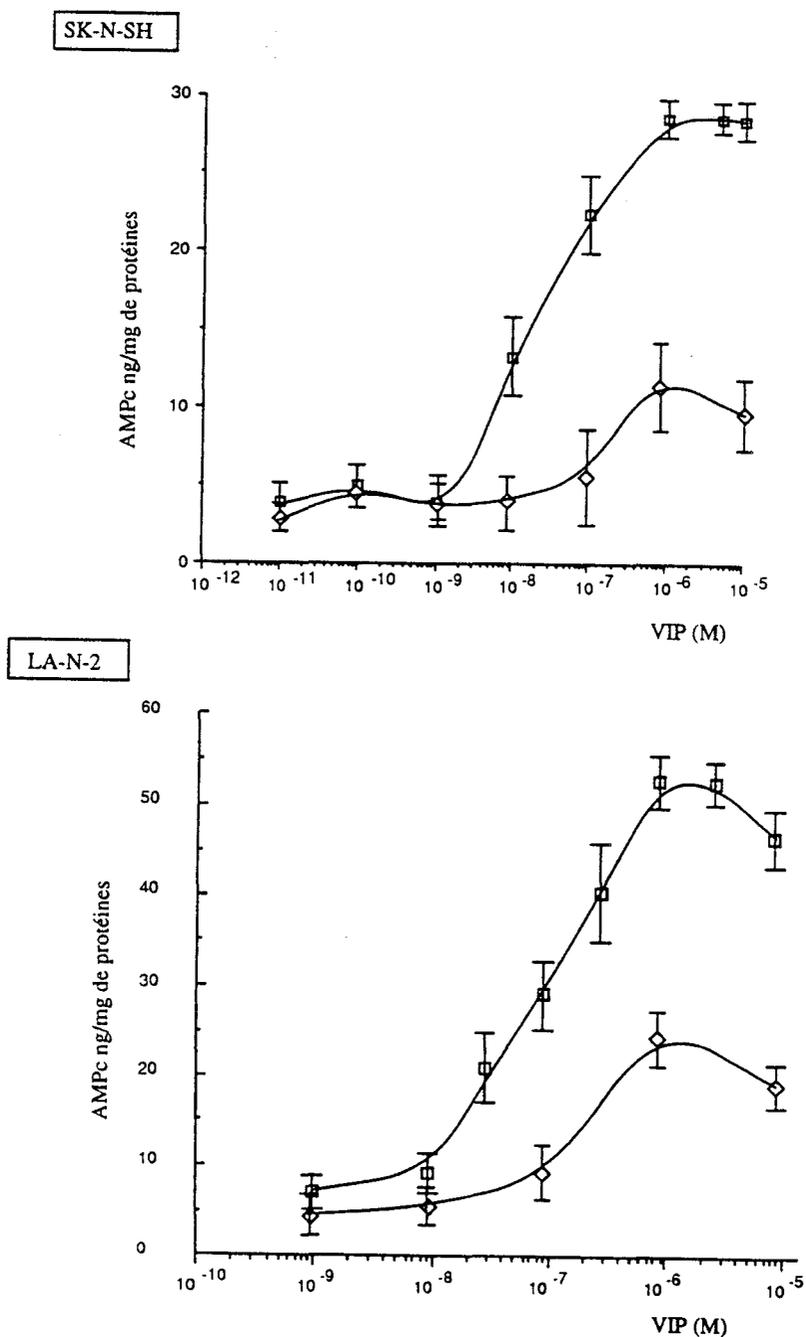


Figure 52. Production d'AMPc induite par le VIP (□) et le pseudopeptide V (◇).

La concentration minimale pour obtenir une réponse significative est de 10^{-8} M tout comme pour le peptide naturel. Néanmoins, la stimulation reste à un niveau inférieur à celui induit par le VIP. La valeur de l'EC₅₀ calculée est de $2,0 \cdot 10^{-7}$ M. En ce qui concerne les autres pseudopeptides, un effet antagoniste a pu être mesuré pour chacun des composés. La **Figure 53** montre que l'inhibition de la synthèse d'AMPC induite par le VIP est obtenue pour des concentrations au moins dix fois supérieures à celle du peptide.

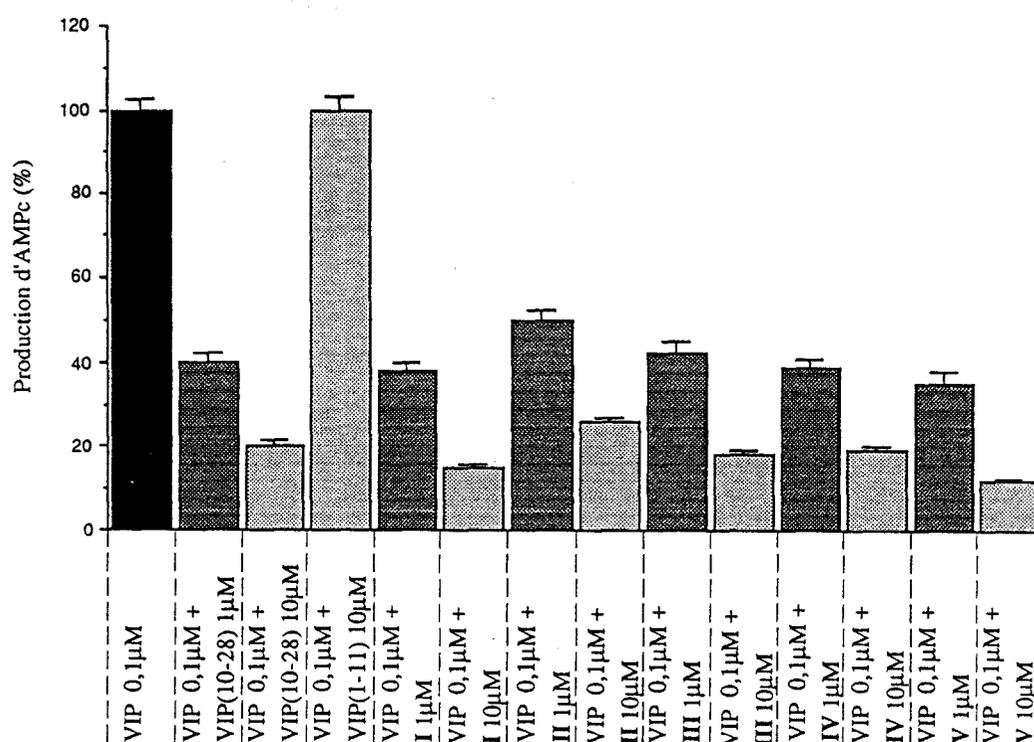


Figure 53. Inhibition de la production d'AMPC induite par le VIP sur les cellules LA-N-2.

Le fragment 1-11 n'a aucun effet détectable sur la production d'AMPC induite par le VIP. Par contre, le VIP (10-28) est capable de réduire la production d'AMPC intracellulaire induite par le peptide naturel sur les cellules SK-N-SH (52% à 10^{-6} M et 78% à 10^{-5} M) et sur les cellules LA-N-2 (60% à 10^{-6} M et 80% à 10^{-5} M). Les résultats obtenus sur les dérivés de la pyrrolidinone (1), (2) et (3) et les dérivés pyrroles (4) et (5) n'ont pas été surprenants. En effet, aucun de ces composés n'est pas capable d'inhiber la stimulation de l'adénylate cyclase induite par le VIP. Les composés pseudopeptidiques (I à V) sont des antagonistes du VIP sur

production d'AMPC mais aucune différence significative avec le fragment 10-28 n'a pu être obtenue.

Discussion.

L'analyse de ces résultats montre clairement différents points :

(i). Tous les pseudopeptides, à l'exception du composé **IV**, ont une affinité qui semble meilleure que le segment 10-28 seul. Il apparaît donc que l'addition d'une structure ordonnée capable de remplacer partiellement la partie N-terminale du peptide soit importante pour la reconnaissance avec le récepteur. A l'intérieur d'une même série, une relation structure-affinité peut être avancée. La pharmacomodulation réalisée sur la chaîne latérale mimant la fonction COOH de Asp⁸ laisse supposer une importance relative de cette fonction acide par la fixation au récepteur. La délétion de celle-ci diminue sensiblement l'affinité de la molécule mais son remplacement par un groupe volumineux ne semble pas altérer outre mesure cette affinité. La différence d'affinité est beaucoup plus nette si on compare les dérivés bis-pyrroles. Le squelette bis-pyrrole améliore l'affinité de la molécule. Ceci nous avait été suggéré par la modélisation moléculaire. En effet, les liaisons peptidiques ainsi que l'azote cyclique du pyrrole situé en C-terminal étaient dans le même environnement que les groupements homologues dans le peptide naturel. L'apport d'un noyau aromatique capable de mimer la chaîne latérale de Phe⁶ améliore sensiblement l'affinité (x5), ce qui témoigne de l'importance majeure de cette substitution sur le pyrrole N-terminal.

(ii). L'effet antagoniste obtenu pour tous les pseudopeptides nous permet de confirmer l'affinité relative de ces molécules pour le récepteur VIP. Le résultat le plus intéressant réside dans l'effet agoniste partiel du pseudopeptide **V**. Bien que les affinités relatives des pseudopeptides **I** et **V** soient tout à fait similaires, la stimulation de l'adénylate cyclase n'a pu être observée que pour le dérivé bis-pyrrole. La comparaison des deux structures non peptidiques est très délicate car à part le noyau aromatique probablement placé dans le même environnement dans les deux pseudopeptides, aucune ressemblance ne peut être avancée. L'apport du second pyrrole qui permet de mimer à la fois la conformation du peptide et un

groupement donneur de liaison hydrogène (OH de Thr⁷) ne peut être considéré comme l'élément primordial à l'activité du pseudo-peptide. En effet, le pseudo-peptide **IV** qui possède la bonne conformation et qui présente le groupement donneur de liaison hydrogène a une affinité identique au VIP(10-28) sans être capable d'activer l'adénylate cyclase.

IV.B.2.2. Modèle des cellules épithéliales de trachée de cobaye. (voir p. 141 et 146)

La production d'AMPC intracellulaire stimulée par le VIP ne semble pas être modifiée ni par le VIP(1-11) ni par le VIP(10-28). La faible affinité du fragment 1-11 pour les récepteurs des cellules épithéliales ne semble pas suffisante pour empêcher l'activation de l'adénylate cyclase par le peptide entier. Néanmoins, nous avons testé ce peptide sur notre modèle d'organe isolé (anneaux de trachée) afin d'observer un éventuel effet du VIP(1-11) ou du VIP(10-28) sur la relaxation du muscle lisse n'ayant pas à notre disposition de culture primaire de cellules musculaires. Sur le tissu entier, le peptide naturel a été placé dix minutes après le segment N-terminal à une concentration induisant 50% de la réponse maximale (10^{-7} M). Le VIP(1-11) a été testé à deux concentrations 50 fois et 100 fois plus fortes que le VIP. L'effet inhibiteur du VIP(1-11) a pu être constaté pour une concentration de 10^{-5} M. Le fragment 10-28 n'a par ailleurs donné aucun résultat sur la relaxation induite par le VIP. Cet effet antagoniste du segment 1-11 sur la relaxation du muscle lisse ne peut pas s'expliquer par une inhibition de la synthèse d'AMPC induite par le VIP sur les cellules épithéliales de la trachée. D'ailleurs, les mêmes expériences réalisées en absence d'épithélium ont permis de montrer que cette inhibition de la relaxation était indépendante de l'épithélium. D'autres récepteurs VIP situés sur les cellules musculaires lisses pourraient donc reconnaître la partie 1-11 du peptide avec plus d'affinité, ce qui pourrait expliquer le résultat obtenu.

Les molécules de synthèse dérivées de la pyrrolidinone ou du pyrrole sont incapables de déplacer la liaison spécifique ¹²⁵I-VIP-récepteur. D'autre part, ces composés ne se sont pas révélés potentiellement actifs sur la production d'AMPC induite par le VIP. En ce qui concerne les dérivés pseudo-peptidiques, des expériences de compétition ont permis de montrer l'affinité

relative de ces composés pour le récepteur du VIP (Figure 54). Les affinités relatives sont très faibles puisqu'en comparaison avec le VIP ($IC_{50} = 3,5nM$), seul le pseudopeptide V semble se distinguer des autres pseudopeptides pour déplacer le peptide radiomarqué.

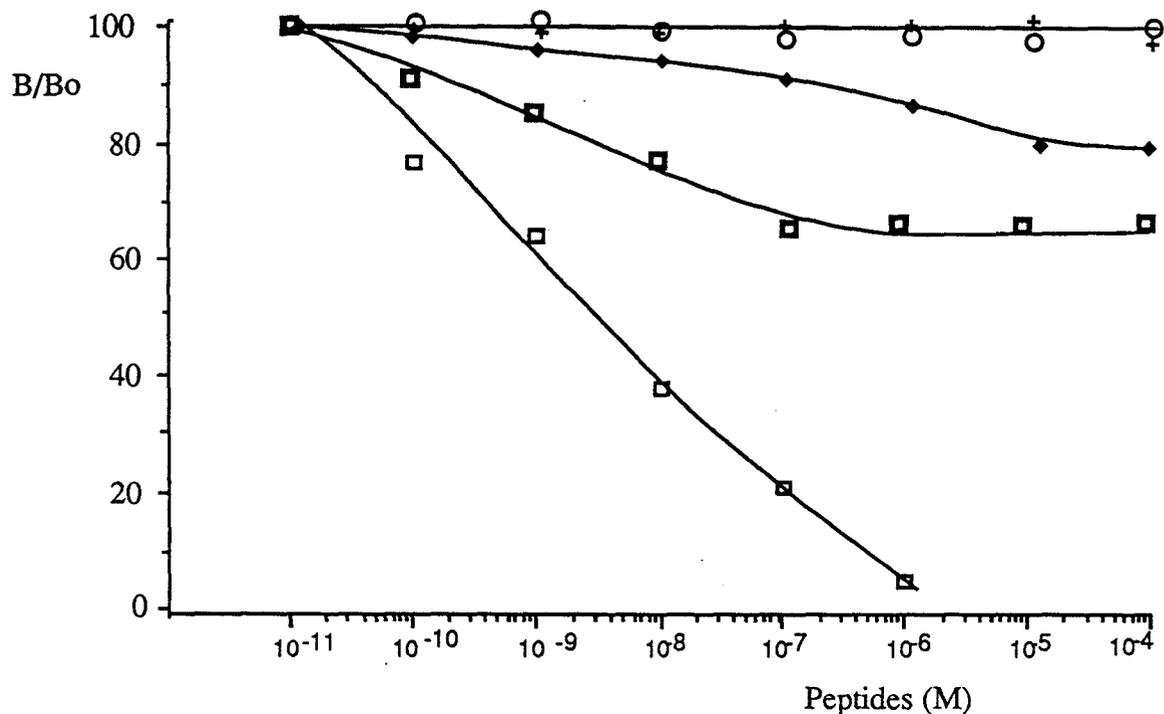


Figure 54. Déplacement du ^{125}I -VIP par les fragments du VIP et par les pseudopeptides. Pseudopeptides (O), I à IV; (◆), V; (□), VIP; (■), VIP(1-11); (+), VIP(10-28).

L'activité potentielle de ces composés sur la production d'AMPC intracellulaire n'a pas permis de montrer de façon significative ni un effet agoniste ni un effet antagoniste pour les pseudopeptides I, II, III et IV. Seul le composé V semble capable d'inhiber la stimulation de l'adénylate cyclase induite par le VIP (Figure 55).

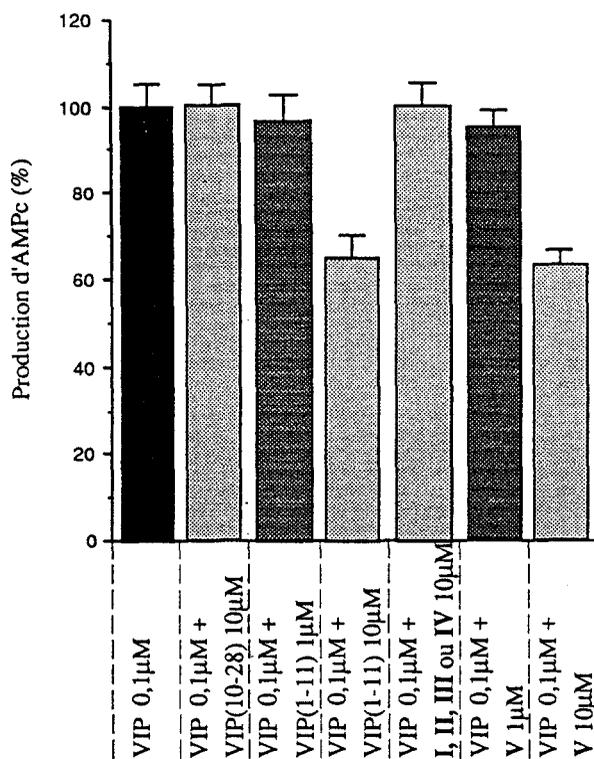


Figure 55. Inhibition de la production d'AMPc induite par le VIP.

Discussion.

Le modèle cellulaire épithélial de trachée permet de suggérer l'hétérogénéité des récepteurs VIP. Il semble que celle-ci existe à l'intérieur même du tissu trachéal. Le fragment 1-11 qui possède une faible affinité vis-à-vis des récepteurs VIP épithéliaux est néanmoins capable d'inhiber la relaxation des cellules musculaires lisses induite par le VIP sur ce même tissu. Le segment 10-28 ne semble pas être reconnu ni par les récepteurs des cellules épithéliales ni par ceux des cellules musculaires. Ceci conforte notre hypothèse selon laquelle la partie adresse du peptide se trouverait plutôt dans la séquence N-terminale, du moins en ce qui concerne les récepteurs appartenant aux voies respiratoires.

Les résultats partiels obtenus avec les pseudopeptides de synthèse ne nous permettent pas de discuter sur d'éventuelles relations structure-affinité ou structure-activité. Le pseudopeptide V est le seul à avoir une activité antagoniste sur la production d'AMPc induite par le VIP; ce qui confirme l'intérêt d'une structure bis-pyrrole et sans doute de la présence d'un groupement aromatique capable de mimer en partie la structure N-terminale. L'affinité de celui-ci n'est cependant pas suffisante pour induire un effet agoniste.

CONCLUSION

Concevoir de manière rationnelle des agonistes non peptidiques du VIP peut être d'une grande utilité en thérapeutique au moins dans deux domaines, celui du cancer en particulier pour le traitement des neuroblastomes, celui des affections pulmonaires, en particulier pour le traitement de l'asthme.

Pour atteindre un tel objectif, il était nécessaire d'élaborer un certain nombre de structures pseudopeptidiques conçues sur la base d'une bonne connaissance de la conformation du VIP et de relations structure-activité et de tester leur activité sur des modèles pharmacologiques adaptés.

L'hypothèse initiale, volontairement simplifiée, d'une notion d'adresse et de message nous a conduit à tenter d'élaborer dans un premier temps des molécules où la partie N-terminale du peptide était remplacée par des structures supposées résistantes face aux protéases. La conformation du peptide et les groupements fonctionnels susceptibles d'être les "points d'ancrages" indispensables à la reconnaissance moléculaire ont constitué nos critères de travail dans le cadre d'un "Drug Design" peptidique du VIP. Une telle démarche nécessitait différentes étapes successives qui nous ont amenés à étudier d'une part les modèles pharmacologiques sur le plan cellulaire et moléculaire et, d'autre part, l'aspect conformationnel du fragment N-terminal à la fois par une étude spectroscopique et une étude de modélisation moléculaire. Les résultats sont assez encourageants et permettent, essentiellement sur le modèle du neuroblastome, la mise en évidence de relations structure-affinité ou structure-activité concernant cette partie N-terminale et notamment sur l'importance de certains groupements fonctionnels dans la séquence peptidique du VIP. Dans chaque série de molécules, la présence de la fonction benzylique semble indispensable pour améliorer l'affinité des composés synthétiques mais ne suffit pas pour obtenir une affinité voisine de celle du peptide entier. La série des composés dérivés de la pyrrolidinone suggère une importance relative du groupement COOH porté par Asp⁸ dans le peptide. En effet, la pharmacomodulation envisagée à partir des résultats de modélisation moléculaire montre que la présence d'une fonction acétate améliore sensiblement l'affinité du composé. Néanmoins, son remplacement par un groupement encombrant (isobutyle) conduit à un composé dont

l'affinité diminue de moitié. Les résultats issus de la série des dérivés du pyrrole montrent des différences d'affinité et d'activité plus prononcées. Le pseudopeptide IV est un antagoniste du VIP tout comme le fragment 10-28. La substitution du noyau pyrrolique N-terminal conduit à un composé (V) possédant une IC_{50} 5 fois plus faible mais surtout conduit à un agoniste partiel.

Ces résultats peuvent paraître encore partiels et des recherches très systématiques sont encore nécessaires pour améliorer cette modélisation de la partie N-terminale du peptide. Ils ont pourtant permis de mettre en évidence un autre aspect du problème à savoir la nécessité de disposer de plusieurs modèles pharmacologiques pour pouvoir prendre en compte l'hétérogénéité des récepteurs du VIP.

Afin d'apprécier l'intérêt pharmacologique de nos molécules, nous avons choisi deux modèles représentant deux cibles totalement différentes pour le VIP en terme de réceptologie, de transmission de message et de réponse cellulaire. Ceci nous a permis de penser qu'une élaboration de molécules agonistes du VIP pouvait amener à une relative sélectivité vis-à-vis du type cellulaire ou tissulaire. Nos résultats ont montré des différences notables entre les deux modèles. Les fragments peptidiques du VIP ont des différences d'affinités relatives selon le type cellulaire considéré. Ceci est d'ailleurs documenté par différents auteurs sur d'autres modèles cellulaires (Gozes Y., 1991). Les pseudopeptides de synthèse tel le N-benzyl (bis-pyrrole)-VIP(11-28) ont également démontré une hétérogénéité de récepteurs. Ce composé, le plus actif des deux séries de synthèse, possède un caractère d'agoniste partiel sur les cellules de neuroblastome alors qu'il présente un effet antagoniste sur les cellules épithéliales de trachée.

Parallèlement à "l'optimisation" de la partie N-terminale du VIP, deux volets majeurs restent à aborder afin d'obtenir une structure plus satisfaisante d'un point de vue thérapeutique. En premier lieu, la nature pseudopeptidique de nos molécules ne permet pas d'envisager une parfaite résistance vis à vis des protéases, c'est pourquoi il sera nécessaire d'envisager une simplification ultérieure du reste de la molécule. La structure médiane hélicoïdale du VIP pourrait être remplacée par une structure conservant à la fois la

conformation et le caractère amphiphile indispensable au maintien d'une bonne solubilité des composés de synthèse et à l'affinité relative à la molécule (par stabilisation à la surface membranaire). L'apport de la modélisation moléculaire et de l'expérience acquise au laboratoire (Hamy F., 1991) pourrait nous permettre d'aborder cette seconde simplification de la structure peptidique.

Un second volet d'étude concerne la recherche de la ou des zone(s) de clivage du peptide. L'hypothèse selon laquelle les doublets basiques Arg¹⁴-Lys¹⁵ ou Lys²⁰-Lys²¹ seraient des cibles privilégiées de peptidases permet d'envisager l'élaboration d'une stratégie double de "drug design" (Bodansky M. et coll., 1979). En effet, afin d'empêcher une telle dégradation, il est possible d'une part de suggérer une modélisation de la structure peptidique correspondant à cette zone de clivage et d'autre part de concevoir des structures non peptidiques susceptibles de mimer le fragment résiduel du VIP. Dans le premier cas, il pourrait s'agir de molécules possédant une durée d'action prolongée. Dans le second, de telles structures pourraient se révéler de bons inhibiteurs des peptidases spécifiques du VIP.

Cette approche pharmacochimique qui consiste à se détacher de la séquence peptidique et à ne prendre en compte que la structure conformationnelle offre un réel intérêt pour l'étude des groupements fonctionnels essentiels à la reconnaissance et/ou à l'activité. Bien que les résultats du présent travail montrent que les pseudopeptides de synthèse décrits ont une affinité voire une activité plus faible que le peptide natif, nous avons clairement démontré qu'une structure bis-pyrrole N-benzylée est capable de remplacer en partie l'enchaînement peptidique du fragment N-terminal du VIP. L'originalité du travail réside dans l'utilisation d'outils et de techniques complémentaires à l'interface entre la chimie de synthèse et la pharmacologie. Ce type de démarche présente l'intérêt supplémentaire de pouvoir être applicable à bon nombre de peptides appartenant à la famille du VIP, comme elle a été appliquée à d'autres peptides d'intérêt pharmacologique. Les données concernant le récepteur du VIP qui seront dans un proche avenir disponibles, restent des éléments indispensables pour concevoir de nouvelles structures.

PARTIE EXPERIMENTALE

1- CULTURE CELLULAIRE

1-1. Cellules de neuroblastomes

Les cellules SK-N-SH sont cultivées en monocouche dans un milieu minimum essentiel (MEM, Gibco) contenant des antibiotiques (pénicilline 100 UI/ml; streptomycine 100 µg/ml), du sérum de veau foetal (10%), du bicarbonate de sodium (1,34 mg/ml) ainsi que 1% de L-glutamine et 1% d'acides aminés non essentiels. Les cellules sont placées à 37°C sous atmosphère humide contrôlée (5% CO₂). Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours.

Les cellules LA-N-2 sont cultivées en monocouche dans un milieu Leibovitz L-15 (Gibco) additionné de façon identique de sérum de veau foetal, de L-glutamine et d'antibiotiques. Elles sont placées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère humide non enrichie en CO₂.

Les cellules SK-N-SH et LA-N-2 ont été obtenues respectivement chez le Dr. C. Lagrou (Institut Pasteur, Lille) et le Dr. R. Massarelli (unité CNRS de neurochimie, Strasbourg).

1-2. Cellules épithéliales de trachée de cobaye

La technique d'obtention d'une culture primaire de cellules épithéliales de trachée de cobaye a été décrite par Wu R. (1986). Les cobayes (mâles, 300-350g, Charles River) sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60mg/kg). La trachée est prélevée et l'extrémité proximale (côté larynx) est canulée à l'aide d'un tube en polyéthylène. La trachée est tout d'abord rincée (à l'aide d'une seringue adaptée sur la canule) par du milieu minimum essentiel (MEM, Gibco) contenant des antibiotiques : pénicilline 100UI/ml streptomycine 100µg/ml et de la fongizone 2µg/ml. Un second rinçage est effectué par du milieu MEM contenant 0,1% de pronase (type 14, Sigma). L'extrémité distale de la trachée est alors ligaturée et la solution de pronase est additionnée jusqu'à un complet remplissage de la trachée. La canule se trouvant à l'extrémité proximale est également obturée et la trachée est immergée dans un milieu MEM froid (4°C).

Après approximativement 16 heures de digestion enzymatique à 4°C, l'extrémité distale est sectionnée et le contenu de la lumière trachéale est recueilli par un lavage avec 10ml de MEM froid.

La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 150g pendant 10mn à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu Dulbecco (DMEM, Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal, de l'hydrocortisone (1 μ M), de l'insuline (5 μ g/ml), de la pénicilline (100UI/ml), de la streptomycine (100 μ g/ml), de la fongizone (2 μ g/ml) et du bicarbonate de sodium (1,34 mg/ml).

Les cellules sont ensuite incubées à 37°C sous atmosphère humide contrôlée (5% CO₂) dans des puits (plaque 24 cupules, diamètre : 16 mm, Costar) préalablement recouverts de collagène (type 1, Sigma) (0,01%, 6 μ g/cm²).

2- TESTS DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE.

2-1. Différenciation morphologique.

L'observation morphologique est réalisée 72 heures après avoir placé 10⁵ cellules dans des puits (plaque 6 puits Corning). Au bout de 24 heures on additionne au milieu de culture (2ml) les différents agents de différenciation (acide rétinoïque, dibutyryl AMPc utilisés comme références et VIP). Après 48 heures la morphologie des cellules est observée au microscope optique par contraste de phase.

2-2. Dosage de l'activité transglutaminase de tissu.

Principe

La réaction est basée sur l'incorporation d'un substrat radioactif aminé, la putrescine tritiée (30Ci/mmol, Amersham) dans une protéine "accepteur", la caséine (Sigma). L'isotope lié à la protéine est précipité par l'acide trichloroacétique puis filtré. L'élimination de la radioactivité libre par des lavages successifs et le comptage de la radioactivité restante constituent les différentes étapes de cette technique décrite par Davies P.J.A. et coll. (1985).

Incubation

Les cellules SK-N-SH (5.10⁴ cellules/ml) sont traitées pendant 48 heures par l'acide rétinoïque, le db AMPc et/ou le VIP dans des boîtes de Pétri (55cm², Corning) contenant 10ml de milieu défini constitué de MEM auquel on ajoute de l'insuline (5 μ g/ml), de la transferrine (5 μ g/ml) et du sélénium (5ng/ml).

Récupération et dosage

Les cellules sont lavées trois fois par du PBS, récupérées par grattage et centrifugées à 1200 tours/mn pendant 10 minutes. Les culots sont ensuite congelés à -20°C.

Pendant la décongélation à température ambiante, 150µl de solution de lyse TET (20mM Tris-HCl; pH 7,5; 1mM EDTA; 0,5% Triton X-100) sont ajoutés aux culots cellulaires. Une fois décongelées, les cellules sont transférées dans une première série de tubes placés dans la glace. Une centrifugation est réalisée à 4°C pendant 10 minutes à 16000tours/mn. Le surnageant est transféré dans une seconde série de tubes puis après homogénéisation on prélève 50µl du lysat cellulaire sur lesquels le dosage sera effectué. Les échantillons sont préparés en duplicate. Le reste est congelé à -20°C pour le dosage des protéines cytosoliques. Le dosage des protéines totales est effectué selon la méthode BCA (Pierce) qui utilise la sérum albumine bovine (SAB) pour établir la gamme étalon.

Deux tubes témoins sont ajoutés au début et en fin de série contenant un chélateur de calcium (EDTA 100mM) empêchant la réaction qui nécessite la présence de calcium. Le mélange réactionnel est constitué de 20mM Tris-HCl; pH7,5; 5mM CaCl₂; 15mM β-mercaptoéthanol; 0,2mg N,N'-diméthylcaséine; 2µCi ³H-putrescine; 0,1mM putrescine dans un volume de 50µl. Au temps 0, le lysat cellulaire est additionné à raison de 0,2mg de protéine pour un volume final de 100µl. La réaction est réalisée pendant 20 minutes à 30°C puis elle est stoppée dans la glace. Un volume de 80µl du mélange réactionnel est déposé sur un filtre de papier Whatman 3 MM que l'on plonge aussitôt dans un bain froid d'acide trichloroacétique à 10% sous agitation douce pendant 20 minutes.

Le complexe ³H-putrescine-N,N'-diméthylcaséine précipite sur le papier filtre. La ³H-putrescine libre est éliminée par lavages successifs, 3 fois dans l'acide trichloroacétique à 5% pendant 10 minutes (4°C), 1 fois dans un mélange éthanol/acétone froid (v/v) pendant 5 minutes et 1 fois dans l'acétone froid pendant 5 minutes. Les filtres sont séchés à température ambiante puis comptés après avoir ajouté 5ml de liquide de scintillation.

Calcul

Les valeurs sont obtenues en soustrayant les valeurs de base obtenues à partir du mélange réactionnel correspondant au témoin blanc. Une unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme liant 1 pmol de putrescine à la N,N'-diméthylcaséine/mn/mg de protéine présente dans le lysat cellulaire.

$$\text{activité (pmol/mn/mg)} = \frac{\text{cpm -cpm blanc}}{r \times 2220 \times AS \times t \times Q}$$

cpm : nombre de coups par mn obtenus à partir de l'échantillon.

cpm blanc : nombre de coups par mn obtenus à partir du témoin blanc.

r : rendement de comptage de la putrescine tritiée.

2220 dpm = 1nCi.

AS : activité spécifique en Ci/mmol/ (nCi/pmol).

t : temps réactionnel en minutes.

Q : quantité de protéine déposée sur le filtre en mg.

2-3. Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée.

Les cellules LA-N-2 en phase exponentielle de croissance sont incubées pendant 48 heures en présence de solution stérile d'acide rétinolique et de VIP (concentrations finales de 10^{-8} à 10^{-6} M). Une incubation avec de la thymidine tritiée à $10\mu\text{Ci/ml}$ (43Ci/mmol , CEA) est alors effectuée pendant 6 heures à 37°C . Les cellules sont lavées 3 fois par du PBS puis décollées par une solution d'EDTA 1mM. Les cellules sont ensuite éclatées par des congélations et des décongélations successives puis reprises par une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 10%. Après 30 minutes d'incubation à 37°C , la solution cellulaire est filtrée sur filtres en fibre de cellulose (Millipore). Ceux-ci sont rincés par le TCA 10% (10ml) puis par l'éthanol (3ml) avant d'être séchés. La radioactivité est comptée en présence d'un liquide de scintillation (Aqualyte).

3- RELAXATION DU MUSCLE LISSE DE TRACHÉE DE COBAYE.

Nous avons utilisé une technique mise au point par l'équipe de N. Frossard (1989). Des cobayes mâles (300-350g) sont sacrifiés par dislocation cervicale. La trachée est prélevée, sans exercer de traction, et immédiatement placée dans un tampon Krebs Henseleit pH 7,4 (composition en mM : NaCl 120,8; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄, 7H₂O 1,2; NaHCO₃ 24,9; CaCl₂, 2H₂O 2,4; Glucose 5,6) en présence d'inhibiteurs de protéases (PMSF 150μM et TPCK 100μM) et sous oxygénation (air + 5% CO₂). Elle est ensuite ouverte longitudinalement au niveau du cartilage puis des segments de 3 anneaux sont découpés.

Chaque segment est ensuite placé dans une cuve à organe isolé (Celaster) (**Figure 56**) contenant 20ml de tampon Krebs-Henseleit.

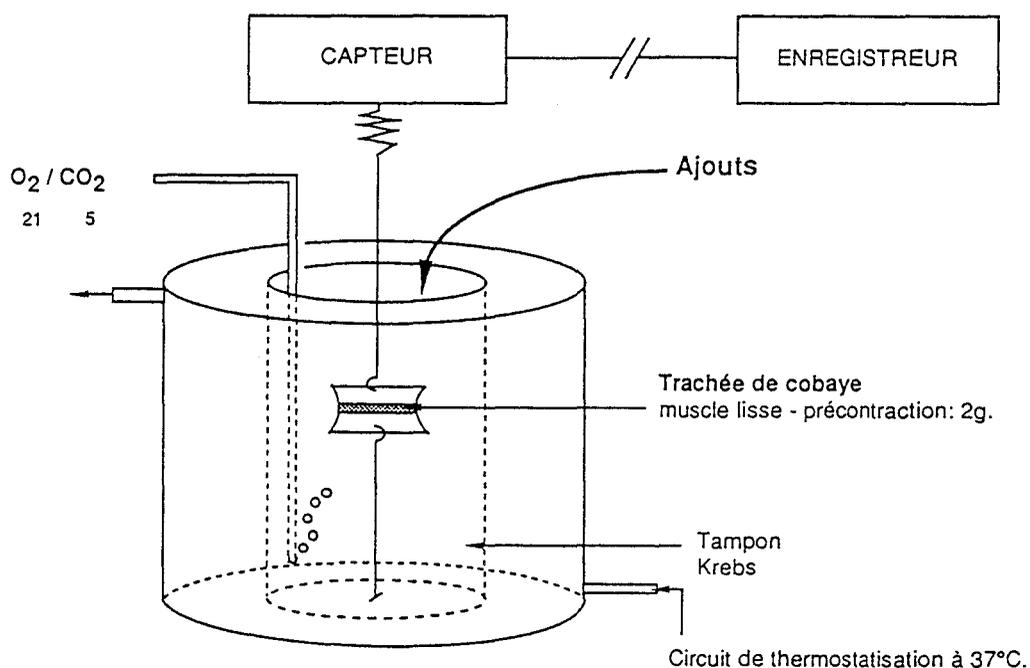


Figure 56. Dispositif d'étude de la bronchomotricité du muscle lisse de trachée de cobaye.

Ce dispositif permet de maintenir une température constante (37°C) et l'arrivée d'un mélange air/CO₂ (95:5). La visualisation des réponses du muscle lisse (contraction ou relaxation) se fait grâce à un système constitué d'un dynamomètre (UF1, Celaster), d'un amplificateur (Celaster) et d'un enregistreur (Linear 1200).

Le tissu est tout d'abord lavé à 3 reprises par du tampon Krebs pH 7,4 sous une tension mécanique de 0,8g. Au cours du dernier lavage, le tissu est amené progressivement à une

tension de 2g. Afin de réaliser les expériences en absence d'épithélium, des segments de trachée sont frottés légèrement au niveau de la surface luminale parallèlement au muscle lisse. Les expériences de compétition ont été menées en suivant le même protocole précédemment cité. Les peptides sont additionnés dans le tampon Krebs-Henseleit 10 minutes avant le VIP. Un segment de trachée est placé dans une cuve de référence où le VIP seul est ajouté. Après chaque expérience les tissus sont lavés deux fois par du tampon Krebs-Henseleit puis l'addition de noradrénaline permet de vérifier et de comparer les relaxations respectives des deux fragments tissulaires.

4- SYSTEMES DE TRANSDUCTION.

4-1. Dosage de l'AMPc intracellulaire par la technique de CLHP.

La technique CLHP a été choisie pour sa facilité d'utilisation. La méthode a permis en effet de déterminer des quantités d'AMPc de l'ordre de la pmole grâce à une détection en fluorescence. Les cellules sont incubées dans des plaques 6 puits (Corning) jusqu'à confluence puis le tapis cellulaire est lavé 3 fois par du milieu de culture dépourvu de sérum de veau foetal et additionné de 1% de sérum albumine bovine. Un ml de ce milieu contenant 1mM d'isobutyl-méthyl-xanthine est placé dans chaque puits. Les agonistes et/ou les antagonistes sont incubés pendant 10 mn à 37°C; le milieu est ensuite éliminé et, après lavage des cellules au PBS, l'extraction d'AMPc est réalisée par addition de propanol froid (1ml). Les cellules éclatées sont placées à 4°C pendant 20 minutes, puis centrifugées à 48g pendant 5 mn. Le surnageant est transféré dans un microtube pour être ensuite évaporé sous vide. L'AMPc extrait est ensuite rendu fluorescent par le protocole suivant: le résidu sec est solubilisé par 20 µl H₂O et 1 µl d'adénosine désaminase est ajouté. Après une incubation de 10 mn à 37°C, 7,5 µl de ZnSO₄ et 7,5 µl de Ba(OH)₂ sont additionnés. Le précipité formé est centrifugé 4 mn à 48g. Le surnageant est additionné de 2 µl d'acétate de sodium pH 4,75 et de 5 µl de chloroacétaldéhyde. Après ébullition du mélange réactionnel pendant 20 mn, l'échantillon est injecté sur une colonne CLHP (système Varian 5000 couplé à un spectrofluorimètre Jasco FP-210). Les conditions opératoires sont les suivantes:

- pré-colonne C₁₈: 20 x 4 mm; colonne C₁₈: 4,6 x 200 mm, RP 300

- solvants : A, acétate d'ammonium 50mM (pH 4,75); méthanol, acétonitrile (250/5/8; v/v)
B, méthanol
- élution isocratique: 93% A, 7% B; débit: 1 ml/mn; détection: λ_{ex} : 265 nm, λ_{em} : 410 nm

Dans ces conditions opératoires, le temps de rétention de l'AMPc est en général compris entre 6 et 10 minutes. La quantité d'AMPc est déduite d'une courbe d'étalonnage (**Figure 57**) établie après l'injection de quantités connues d'AMPc (Sigma) ayant subi l'intégralité du protocole. Les valeurs obtenues sont alors corrigées par le rendement de la manipulation (selon les cas entre 90 et 95%) calculé grâce à l'injection d'AMPc n'ayant subi que la dérivation nécessaire à sa détection en fluorescence. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test de Student (Statview/Macintosh).



Figure 57. Profil CLHP. (a) Solution standard contenant 1ng d'AMPc (temps de rétention : 6'50"). (b) Extrait cellulaire correspondant à 44mg de protéines (cellules LA-N-2), (c) Extrait cellulaire correspondant à 44mg de protéines (cellules LA-N-2) additionné par 1ng d'AMPc. (d) Extrait cellulaire correspondant à 44mg de protéines (cellules LA-N-2) additionné par 2 ng d'AMPc.

4-2. Mise en évidence de l'activité tyrosine kinase pp60^{c-src}.

Obtention des fractions cytoplasmiques.

Les cellules sont incubées en présence de différents agents (VIP, dibutyryl AMPc, acide rétinoïque, [4 Cl D Phe⁶, Leu¹⁷]VIP) pendant 48 heures dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite décollées par du Versène (EDTA 1mM), après centrifugation le culot cellulaire est lavé 2 fois par du PBS puis placé dans un tampon de lyse (RIPA: 1% Triton X-100, 1% DOC, 0,1% SDS, NaCl 0,15M, Tris-HCl 0,05M pH 7,2, PMSF 150 µM, TPCK 100 µM) à 4°C pendant 30 mn. Après sonication pendant 30 secondes, une première centrifugation à 1000g pendant 15 mn permet d'éliminer les noyaux des cellules. Une seconde centrifugation à 100 000g pendant une heure est réalisée pour obtenir la fraction cytoplasmique ainsi que la fraction membranaire.

Mise en évidence de l'activité kinase.

Le mélange réactionnel contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,2; 5 mM MgCl₂ et 1,2 µM [γ ³²P]ATP (310-870 Ci/mmol) est ajouté aux cellules. La réaction a lieu pendant 10 mn à 30°C puis elle est arrêtée par addition d'un volume égal d'une solution dénaturante 2 fois concentrée (0,14 M Tris-HCl pH 6,8; 22,4% glycérol; 6% SDS; 0,02% bleu de bromophénol; 10% β -mercapto-éthanol). Après chauffage pendant 3 mn à 100°C, le mélange est déposé sur un gel de polyacrylamide à 12% contenant 1% de SDS. Des marqueurs de tailles provenant de l'enveloppe virale de l'adénovirus sont également déposés. L'électrophorèse est conduite pendant une nuit sous une tension de 35 Volts.

Les protéines sont ensuite électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (CERA Labo). La membrane est mise au contact avec un sérum spécifique anti-pp60^{c-src}, préparé chez le mouton (Euromedex), puis avec un antisérum couplé à la peroxydase. La révélation est ensuite réalisée par addition d'un mélange réactionnel contenant du chloronaphtol (0,5mg/ml) et du peroxyde d'hydrogène (1µl/ml). La membrane est d'autre part autoradiographiée 16 heures à -70°C afin de visualiser la phosphorylation des protéines intracellulaires.

5- ETUDES SPECTROSCOPIQUES DU FRAGMENT 1-11.

5-1. Dichroïsme circulaire.

Les peptides ont été étudiés à une concentration de $1,3 \cdot 10^{-4}$ M (fraction 1-11) et $2,7 \cdot 10^{-4}$ M (fraction 7-11) dans une solution aqueuse contenant 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'addition de DMSO sert à mimer les conditions physiologiques mais il est à utiliser en faible quantité car il absorbe en UV.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à l'aide d'un dichrographe RJ Mark III Jobin-Yvon, dans des cellules de 0,01cm et 1cm de trajet optique. L'ellipticité est exprimée en $\text{degrés} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

5-2. Résonance magnétique nucléaire du proton.

Les peptides sont dissous dans du DMSO-d₆ (5mg/ml, CEA Gif sur Yvette) sous atmosphère d'Argon. Les déplacements chimiques du proton sont mesurés en partie par million (δ ppm). Chaque spectre est enregistré sur un spectromètre Brüker AM400WB équipé d'un calculateur Aspect 3000 travaillant par transformée de Fourier avec une détection des ^1H à 400MHz. Le signal correspondant aux protons du DMSO qui apparaît à 2,5ppm correspond au signal de référence.

Dans un premier temps, les attributions entre les protons des groupements amide et leur proton $\text{H}\alpha$ sont établis par RMN 2D, COSY : "Correlated Overhauser Spectroscopy".

Ceci nous permet dans un second temps de réaliser une expérience de variation du glissement chimique en fonction de l'élévation de la température (T de 298°K à 313°K).

6- ETUDE DE LA LIAISON AUX RECEPTEURS.

6-1. Cellules de neuroblastome.

La mise en évidence des récepteurs du VIP a été réalisée à partir du protocole décrit par Müller J.M. et coll. (1989). Les cellules de neuroblastome sont cultivées dans des puits (plaques 24 puits, Corning) à 37°C. Les cellules à confluence sont rincées par du tampon PBS et pré-incubées pendant 30 mn à 37°C dans un milieu de culture sans sérum de veau foetal contenant du PMSF (150 μ M), TPCK (100 μ M) et 15 mM d'HEPES (acide N-[2-Hydroxyéthyl]

pipérazine-N'-[2-éthane sulfonique]), pH 7,4, (Sigma) supplémenté de SAB (0,2%). Le pH de ce tampon (TB) est ajusté à 7,4. Les cellules sont ensuite incubées sous agitation douce à 4°C dans le TB avec des concentrations croissantes en ^{125}I -VIP (1 à 300 pM) (2000 Ci/mmol, Amersham Corp.). La fixation non spécifique est obtenue en présence d'un excès de VIP non radioactif (1 μM). Après 3 heures, l'excès de ^{125}I -VIP non fixé est éliminé par 3 lavages successifs. Les cellules sont enfin décollées en présence de NaOH 0,5 M et la radioactivité de la suspension cellulaire est mesurée (compteur gamma LKB).

Caractérisation des récepteurs VIP.

Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de ^{125}I -VIP (0-300pM, 2000 Ci/mmol) en absence ou en présence de VIP non marqué en excès (1 μM). La liaison spécifique aux récepteurs est définie comme la différence entre la liaison totale du VIP radiomarqué et celle mesurée en présence de VIP froid (liaison non spécifique).

Compétition VIP/peptides apparentés au VIP.

Les cellules à confluence sont incubées suivant le même protocole que celui décrit précédemment. Les peptides utilisés pour les expériences de compétitions sont ajoutés en concentrations croissantes pour une concentration fixe de ^{125}I -VIP de 200 pM.

6-2. Cellules épithéliales de trachée de cobaye.

Nous avons utilisé le protocole établi par Van Valen F. et coll. (1989). Après 48 heures de culture, les cellules épithéliales parvenues à confluence (100-120 μg de protéines/puits, dosage selon la méthode BCA Pierce à l'aide d'une gamme étalon de sérum albumine bovine), sont lavées par du tampon HEPES (20mM, pH7,4, Sigma) contenant du PMSF (150 μM), TPCK (100 μM) (Sigma). Elles sont ensuite incubées à 37°C dans ce même tampon contenant 0,2% de sérum albumine bovine (SAB). Le volume d'incubation est de 500 μl .

Après chaque expérience de fixation aux récepteurs, la réaction est stoppée par addition de 500 μl de tampon de "binding" froid (4°C) dont la quantité de SAB est plus importante (1%), puis les cellules sont lavées à trois reprises par ce même tampon.

Le tapis cellulaire est ensuite décollé de la boîte par action de la soude 0,5M. La radioactivité de la suspension cellulaire est mesurée (compteur gamma LKB).

Caractérisation des récepteurs VIP.

Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de ^{125}I -VIP (0-300pM, 2000 Ci/mmol) en absence ou en présence de VIP non marqué en excès (1 μM). La liaison spécifique aux récepteurs est définie comme la différence entre la liaison totale du VIP radiomarqué et celle mesurée en présence de VIP froid (liaison non spécifique).

Compétition VIP/peptides apparentés au VIP.

Les cellules épithéliales sont incubées en présence de ^{125}I -VIP (200pM, 2000Ci/mmol) et de concentrations croissantes en peptide compétiteur.

7- SYNTHÈSE CHIMIQUE

La pureté des produits est vérifiée systématiquement par chromatographie sur couche mince (CCM) dans les conditions suivantes :

- support : gel de silice 60F254 d'épaisseur 0,25mm, référence 5735 Merck
- révélation : UV (254 et 366nm), iode et ninhydrine.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées avec le gel de silice 60 de granulométrie 0,040-0,063mm (230-400 Mesh ASTM), référence 9385 Merck.

Les spectres IR sont réalisés sur des spectrographes Perkin-Elmer 177 et 297 en dispersion dans le KBr pour les solides; les fréquences d'absorption sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}).

Les spectres de RMN ^1H sont enregistrés sur un appareil Brüker WP 80 SY (80MHz), Brüker AM 250 (250MHz) ou Brüker AC 300 P (300MHz), avec le tétraméthylsilane pour référence interne; chaque signal est repéré par son déplacement chimique δ (exprimé en ppm), sa morphologie (s : singulet; d: doublet; t : triplet; q : quadruplet) et son intensité.

Les spectres de masse de type impact électronique (EI) sont réalisés sur un spectromètre quadripolaire Funnigan TSQ 700 (couplé à un système de contrôle DEC); les spectres de type FAB ont été réalisés sur le même appareil en mode "FAB GUN".

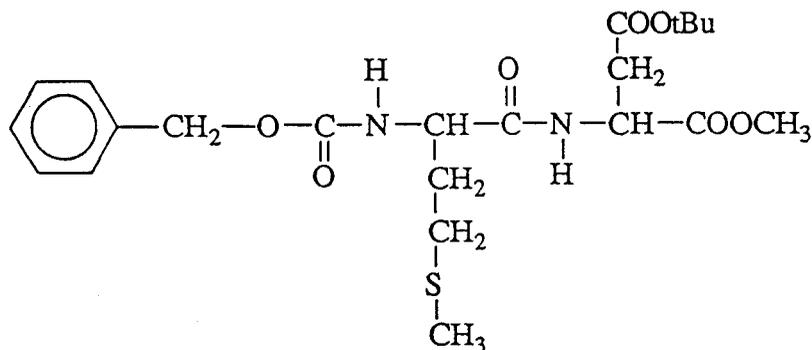
Abréviations utilisées : AcOEt : acétate d'éthyle; AcOH : acide acétique; BOC : tertibutyloxycarbonyle; BOP : benzotriazolyl N-OxytrisdiméthylaminoPhosphonium; DCC : dicyclohexylcarbodiimide; DCU : dicyclohexylurée; DIEA : diisopropyléthylamine; DMF : diméthylformamide; DMSO : diméthylsulfoxyde; HOBt : 1-hydroxybenzotriazole; MeOH : méthanol; tBu : tertibutyle; Z : benzyloxycarbonyle; NEt_3 : triéthylamine.

7-1. Synthèse en phase liquide.

7-1.1. Dérivés de la pyrrolidinone.

7-1.1.1. Pyrrolidinone 1

Z-L-Met-Asp-(OtBu)-OCH₃. (JFL, 6)



Mode opératoire.

A une solution de Z-L-Met-OH (1,5g; 5,3mmol) et HOBT (1,22g; 5,3mmol) dans le DMF (10ml) et le dichlorométhane (CH₂Cl₂, 20ml) refroidie à 0°C, on ajoute une solution de DCC (1,093g; 5,3mmol) solubilisée dans CH₂Cl₂ (5ml). Après 30 mn d'agitation à 0°C, on additionne L-Asp-(OtBu)-OCH₃ (1,27g; 5,3mmol) et la N-méthylmorpholine (0,585ml; 5,3mmol). On laisse le mélange réactionnel sous agitation 30 mn à 0°C puis 16 h à 5°C.

Le précipité de DCU formé dans le milieu réactionnel est filtré, lavé par CH₂Cl₂ (20ml). Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est repris par AcOEt (50ml), le précipité formé est filtré. La solution d'AcOEt est lavée successivement par une solution aqueuse à 10% de NaHCO₃ (40ml, 25ml), puis par une solution aqueuse à 10% d'acide citrique (25ml, 25ml), par H₂O (30ml) et enfin par H₂O saturée en NaCl (30ml).

Toutes les phases aqueuses sont réextraites par l'AcOEt, les phases organiques sont séchées par MgSO₄, évaporées à sec. L'huile obtenue est reprise par un minimum d'éther, il se forme un précipité de JFL, 6 que l'on filtre.

- Formule brute :	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₇ S
- Masse molaire :	468g/mol
- Rendement :	65%

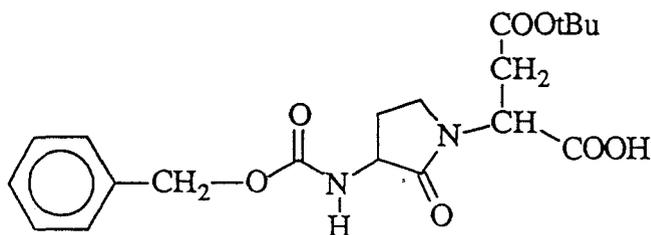
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3340 cm⁻¹ v NH; 3015–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1745 cm⁻¹ v CO (ester); 1715 cm⁻¹ v CO (ester); 1700 cm⁻¹ v CO (uréthane); 1650 cm⁻¹ v CO (amide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,40 (s, 9H, -COOtBu); 1,50-2,15 (m, 2H, CH₂-CH₂-S; m, 2H, CH₂COOtBu); 2,05 (s, 3H, S-CH₃); 2,45 (t, 2H, S-CH₂); 3,65 (s, 3H, O-CH₃); 4,20 (m, 1H, -NH-CH); 4,65 (m, 1H, CH-COOCH₃); 5,05 (s, 2H, CH₂-C₃H₅); 7,30 (signal, 1H, -NH); 8,4 (signal, 1H, -NH)

Acide 2-[3-[(benzyloxycarbonyl) amino]-2-oxopyrrolidin-1-yl]-3-(ter-butoxycarbonyl) propanoïque. (JFL, 1)



Mode opératoire.

Le composé JFL, 6 (1g; 2,13mmol) est mis sous agitation dans CH_3I (3,86ml) à température ambiante pendant 48 heures. L'iodure de méthyle est ensuite évaporé, le résidu est repris trois fois par le CH_2Cl_2 et évaporé à sec. Le sel de sulfonium ainsi obtenu est dissous dans un mélange DMF/ CH_2Cl_2 (30ml; 1 : 1) auquel on ajoute l'hydrure de sodium (180mg; 4,27mmol) ; la solution est mise sous agitation à 0°C pendant 2 heures sous atmosphère d'azote. Après avoir ajouté AcOEt (10ml), AcOMe (8ml) et H_2O (480ml), on laisse agiter le mélange réactionnel sous N_2 à température ambiante pendant 16 heures. La solution est ensuite extraite par H_2O (2 x 50ml) et par une solution aqueuse à 1% de NaHCO_3 (2 x 20ml). Les phases aqueuses sont acidifiées par l'acide citrique jusque $\text{pH} = 4$ puis extraites par CH_2Cl_2 (3 x 50ml). Les phases organiques sont lavées par une solution saturée en sel, séchées par MgSO_4 et évaporées à sec. Le produit brut est obtenu par précipitation du résidu dans un mélange AcOEt/Hexane. JFL, 1 est alors obtenu par recristallisation du produit brut dans un mélange AcOEt/Hexane 50 : 50 (100ml)

- Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$
- Masse molaire : 386g/mol
- Rendement : 50%

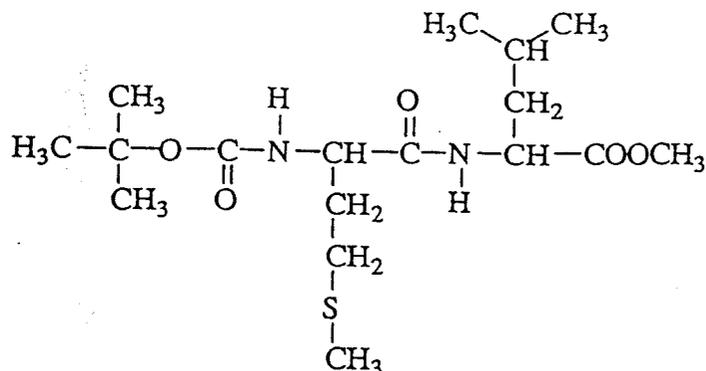
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3340 cm^{-1} v NH; $3015\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ v C-H (alkyles); 1730 cm^{-1} v CO (ester); 1715 cm^{-1} v CO (lactame); 1690 cm^{-1} v CO (uréthane)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,40 (s, 9H, -COOtBu); 1,90 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOtBu}$); 2,15 (m, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-CH}_2\text{-N}$); 2,50 (m, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-CH}_2\text{-N}$); 3,20 (t, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{N}$); 3,44 (dt, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-N}$); 4,22 (signal, 1H, CH-NH); 4,77 (t, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-N}$); 5,05 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_3\text{H}_5$); 7,40 (signal, 5H, C_6H_5); 7,60 (signal, 1H, -NH); 13,10 (signal, 1H, -COOH)

7-1.1.2. Pyrrolidinone 2

Boc-L-Met-Leu-OCH₃. (JFL, 7)**Mode opératoire**

A une solution de Boc-L-Met-OH (2g ; 8,02mmol) et HOBT (1,22g ; 8,02mmol) dans le DMF (10ml) et le CH₂Cl₂ (20ml) refroidie à 0°C, on ajoute une solution de DCC (1,65g ; 8,02mmol) solubilisée dans CH₂Cl₂ (5ml). Après 30 mn d'agitation à 0°C, on additionne Leu OMe-HCl (1,46g ; 8,02mmol) et la N-méthylmorpholine (0,88ml ; 8,02mmol). On laisse le mélange réactionnel sous agitation 30 mn à 0°C puis 16 h à 5°C.

Le précipité de DCU formé dans le milieu réactionnel est filtré, lavé par CH₂Cl₂ (20ml). Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est repris par AcOEt (50ml), le précipité formé est filtré. La solution d'AcOEt est lavée successivement par une solution aqueuse à 10% de NaHCO₃ (40ml, 25ml), puis par une solution aqueuse à 10% d'acide citrique (25ml, 25ml), par H₂O (30ml) et enfin par H₂O saturée en NaCl (30ml).

Toutes les phases aqueuses sont réextraites par l'AcOEt, les phases organiques sont séchées par MgSO₄, évaporées à sec. L'huile obtenue est reprise par un minimum d'éther, il se forme un précipité de JFL, 7 que l'on filtre.

- Formule brute : C₁₇H₃₂N₂O₅S
- Masse molaire : 376g/mol
- Rendement : 78%

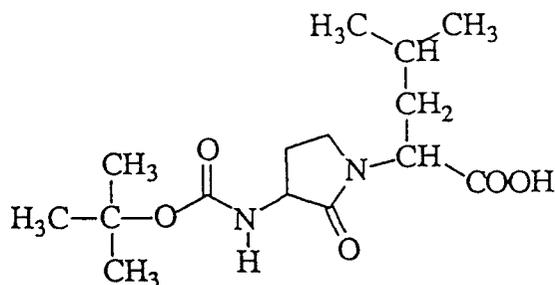
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3310 cm⁻¹ v NH; 3015–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1715 cm⁻¹ v CO (ester); 1700 cm⁻¹ v CO (uréthane); 1650 cm⁻¹ v CO (amide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 0,9 (dd, 6H, (CH₃)₂-CH); 1,40 (s, 9H, -(CH₃)₃); 1,50-2,15 (m, 2H, CH₂-CH₂-S; m, 3H, CH-CH₂-CH-(CH₃)₃); 2,05 (s, 3H, S-CH₃); 2,45 (t, 2H, S-CH₂); 3,65 (s, 3H, O-CH₃); 4,20 (m, 1H, -NH-CH); 4,50 (m, 1H, NH-CH); 6,20 (signal, 1H, O-CO-NH); 7,54 (signal, 1H, CH-CO-NH)

Acide-2-[3-[(ter-butoxycarbonyl) amino]-2-oxopyrrolidin-1-yl]-4-méthyl pentanoïque. (JFL, 9)



Mode opératoire

Le composé JFL, 7 (0,5g ; 1,33mmol) est mis sous agitation dans CH₃I (2,4ml) à température ambiante pendant 48 heures. L'iodure de méthyle est ensuite évaporé, le résidu est repris trois fois par le CH₂Cl₂ et évaporé à sec. Le sel de sulfonium ainsi obtenu est dissous dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (30ml ; 1 : 1) auquel on ajoute l'hydruure de sodium (116mg ; 2,66mmol) ; la solution est mise sous agitation à 0°C pendant 2 heures sous atmosphère d'azote.

Après avoir ajouté AcOEt (5ml), AcOMe (4ml) et H₂O (240ml), on laisse agiter le mélange réactionnel sous N₂ à température ambiante pendant 16 heures. La solution est ensuite extraite par H₂O (2 x 50ml) et par une solution aqueuse à 1% de NaHCO₃ (2 x 20ml). Les phases aqueuses sont acidifiées par l'acide citrique jusque pH 4 puis extraites par CH₂Cl₂ (3 x 50ml). Les phases organiques sont lavées par une solution saturée en sel, séchées par MgSO₄ et évaporées à sec. Le produit brut est obtenu par précipitation du résidu dans un mélange AcOEt/Hexane. JFL, 9 est alors obtenu par recristallisation du produit brut dans un mélange AcOEt/Hexane 50 : 50 (100ml).

- *Formule brute* : C₁₅H₂₆N₂O₅

- *Masse molaire* : 314g/mol

- *Rendement* : 62%

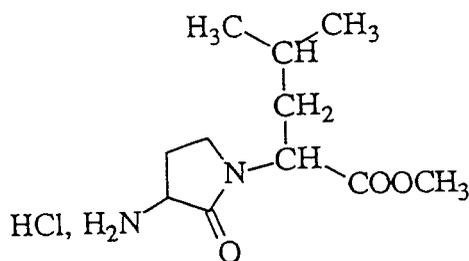
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3260 cm⁻¹ v NH; 3015–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1740 cm⁻¹ v CO (acide); 1715 cm⁻¹ v CO (lactame); 1700 cm⁻¹ v CO (uréthane)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 0,9 (dd, 6H, (CH₃)₂-CH); 1,40 (s, 9H, -(CH₃)₃); 1,49 (m, 1H, CH-(CH₃)₂); 1,7 (t, 2H, CH-CH₂-CH); 1,80 (m, 1H, CH_AH_B-CH₂-N); 2,50 (m, 1H, CH_AH_B-CH₂-N); 3,20 (t, 1H, CH_AH_BN); 3,44 (dt, 1H, CH_AH_B-N); 4,22 (signal, 1H, CH-NH); 4,77 (t, 1H, CH_AH_B-N); 5,05 (s, 2H, CH₂-C₃H₅); 5,70 (signal, 1H, -NH)

2-[(3-amino)-2-oxopyrrolidin-1-yl]-4-méthyl pentanoate de méthyle (chlorhydrate).(JFL, 11)



Mode opératoire

Dans un ballon muni d'appareil de Dean-Stark, on met en solution l'acide JFL, 9 (500mg ; 1,59mmol) dans 75ml de méthanol saturé en acide chlorhydrique. On ajoute 35ml de cyclohexane pour permettre l'entraînement azéotropique de l'eau. Le mélange réactionnel est maintenu à reflux pendant 4 heures.

Après évaporation du solvant, le brut est repris dans l'éthanol et à nouveau débarrassé du solvant. On obtient ainsi JFL, 11 (chlorhydrate).

- Formule brute : $C_{11}H_{19}N_2O_3, HCl$
- Masse molaire : 263g/mol
- Rendement : 85%

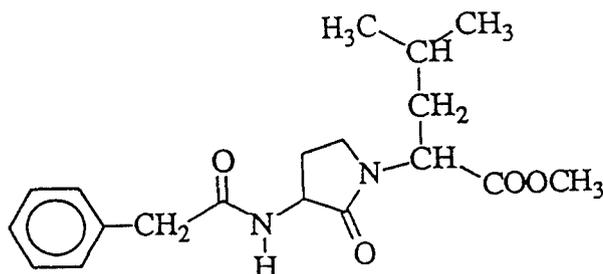
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3400 cm^{-1} v NH; 3015–2840 cm^{-1} v C-H (alkyles); 1730 cm^{-1} v CO (ester); 1715 cm^{-1} v CO (lactame)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 0,9 (dd, 6H, $(CH_3)_2-CH$); 1,49 (m, 1H, $CH-(CH_3)_2$); 1,7 (t, 2H, $CH-CH_2-CH$); 1,80 (m, 1H, $CH_AH_B-CH_2-N$); 2,50 (m, 1H, $CH_AH_B-CH_2-N$); 3,20 (t, 1H, CH_AH_BN); 3,44 (dt, 1H, CH_AH_B-N); 3,65 (s, 3H, $-OCH_3$); 4,22 (signal, 1H, $CH-NH$); 4,77 (t, 1H, CH_AH_B-N); 5,05 (s, 2H, $CH_2-C_3H_5$); 8,60 (signal, 3H, $-NH_3^+$)

2-[(3-phénylacétamido)-2-oxopyrrolidin-1-yl]-4-méthyl pentanoate de méthyle.(JFL, 13)



Mode opératoire

A une solution de JFL, 11 (340mg ; 1,3mmol) dans CH_2Cl_2 (20ml), on ajoute NEt_3 (270 μl ; 1,95mmol). Quand le milieu réactionnel est refroidi jusqu'à 0°C, on additionne goutte à goutte le chlorure de phénacétyle (171 μl ; 1,3mmol).

Au bout de 2 heures on ajoute à nouveau le chlorure de phénacétyle (171 μl ; 1,3mmol) et la NEt_3 (270 μl ; 1,95mmol) et on laisse agiter à température ambiante pendant 2 heures 30. Le mélange réactionnel est ensuite lavé par solution aqueuse à 10% en NaHCO_3 (2 x20ml) puis par H_2O (1 x20ml). La phase organique est séchée par MgSO_4 , évaporée à sec. Le résidu est repris par l'éther, il se forme un précipité blanc de JFL, 13.

- Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$
- Masse molaire : 346g/mol
- Rendement : 90%

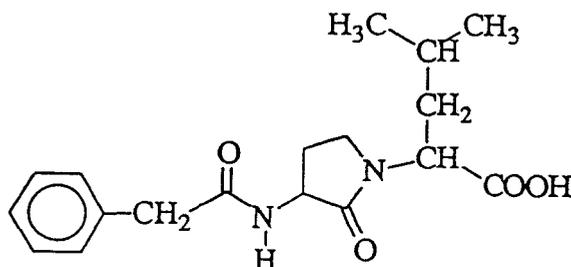
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3300 cm^{-1} v NH; 3015–2840 cm^{-1} v C-H (alkyles); 1730 cm^{-1} v CO (ester); 1715 cm^{-1} v CO (lactame); 1630 cm^{-1} v CO (amide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 0,9 (dd, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$); 1,49 (m, 1H, $\text{CH-(CH}_3)_2$); 1,7 (t, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}$); 1,80 (m, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-CH}_2\text{-N}$); 2,50 (m, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-CH}_2\text{-N}$); 3,20 (t, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{N}$); 3,40 (signal, 2H, CO-CH_2); 3,44 (dt, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-N}$); 3,65 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,22 (signal, 1H, CH-NH); 4,77 (t, 1H, $\text{CH}_A\text{H}_B\text{-N}$); 5,05 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_3\text{H}_5$); 7,25 (signal, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$); 8,5 (signal, 1H, NH)

Acide-2-[(3-phénylacétamido)-2-oxopyrrolidin-1-yl]-4-méthyl pentanoïque.
(JFL, 2)



Mode opératoire

Dans un ballon, on solubilise JFL, 13 (500mg ; 1,5mmol) dans un minimum de MeOH (15ml). On y ajoute une solution de NaOH à 40% (5ml).

Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est porté à sec puis repris par l'eau. La phase aqueuse est extraite par AcOEt (2 x 30ml). Puis la phase organique est séchée par MgSO₄ et évaporée.

Le brut est purifié par chromatographie éclair (éluant : MeOH/CH₂CL₂ 9 : 1). On obtient ainsi un produit pur : JFL, 2.

- Formule brute : C₁₈H₂₄N₂O₄
- Masse molaire : 332g/mol
- Rendement : 50%

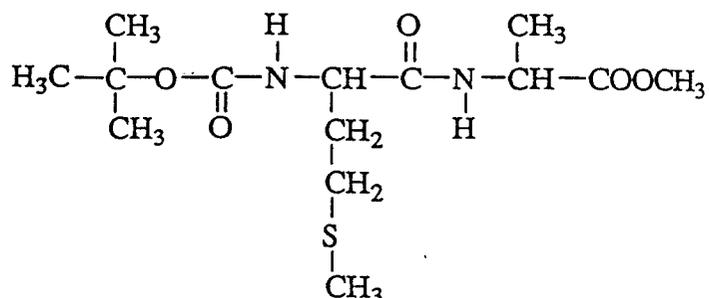
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3200 cm⁻¹ v NH; 3015–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1740 cm⁻¹ v CO (acide); 1715 cm⁻¹ v CO (lactame); 1630 cm⁻¹ v CO (amide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 0,9 (dd, 6H, (CH₃)₂-CH); 1,49 (m, 1H, CH-(CH₃)₂); 1,7 (t, 2H, CH-CH₂-CH); 1,80 (m, 1H, CH_AH_B-CH₂-N); 2,50 (m, 1H, CH_AH_B-CH₂-N); 3,20 (t, 1H, CH_AH_BN); 3,40 (signal, 2H, CO-CH₂); 3,44 (dt, 1H, CH_AH_B-N); 4,22 (signal, 1H, CH-NH); 4,77 (t, 1H, CH_AH_B-N); 5,05 (s, 2H, CH₂-C₃H₅); 7,25 (signal, 5H, -C₆H₅); 8,5 (signal, 1H, NH)

7-1.1.3. Pyrrolidinone 3

Boc-L-Met-Ala-OCH₃ (JFL, 8)**Mode opératoire**

A une solution de Boc-L-Met-OH (2,679 g ; 10,7mmol) et HOBT (1,445g ; 10,7mmol) dans le DMF (10ml) et le CH₂Cl₂ (20ml) refroidie à 0°C, on ajoute une solution de DCC (2,2g ; 10,7mmol) solubilisée dans CH₂Cl₂ (5ml). Après 30 mn d'agitation à 0°C, on additionne AlaOEt-HCl (1,5g ; 10,7mmol) et la N-méthylmorpholine (1,18ml ; 10,7mmol). On laisse le mélange réactionnel sous agitation 30 mn à 0°C puis 16 h à 5°C.

Le précipité de DCU formé dans le milieu réactionnel est filtré, lavé par CH₂Cl₂ (20ml). Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est repris par AcOEt (50ml), le précipité formé est filtré. La solution d'AcOEt est lavée successivement par une solution aqueuse à 10% de NaHCO₃ (40ml, 25ml), puis par une solution aqueuse à 10% d'acide citrique (25ml, 25ml), par H₂O (30ml) et enfin par H₂O saturée en NaCl (30ml).

Toutes les phases aqueuses sont réextraites par l'AcOEt, les phases organiques sont séchées par MgSO₄, évaporées à sec. L'huile obtenue est reprise par un minimum d'éther, il se forme un précipité de JFL, 8 que l'on filtre.

- Formule brute : C₁₅H₂₈N₂O₅S
- Masse molaire : 348g/mol
- Rendement : 70%

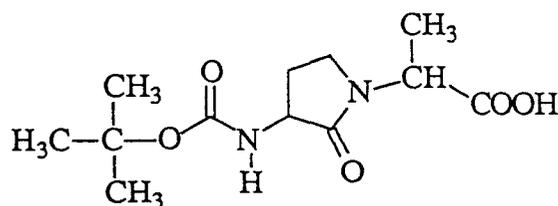
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3270 cm⁻¹ v NH; 3055–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1750 cm⁻¹ v CO (uréthane); 1695 cm⁻¹ v CO (ester); 1650 cm⁻¹ v CO (amide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,3 (d, 3H, CH₃-CH); 1,40 (s, 9H, -(CH₃)₃); 1,8 (m, 2H, CH₂-CH₂-S); 2,05 (s, 3H, S-CH₃); 2,45 (t, 2H, S-CH₂); 3,65 (s, 3H, O-CH₃); 4,20 (m, 1H, -NH-CH); 4,50 (m, 1H, NH-CH); 6,70 (signal, 1H, O-CO-NH); 8,40 (signal, 1H, CH-CO-NH)

**Acide-2-[3-[(ter-butoxycarbonyl)amino]-2-oxopyrrolidin-1-yl] propanoïque.
(JFL, 10)**



Mode opératoire

Le composé JFL, 8 (2g ; 5,7mmol) est mis sous agitation dans CH₃I (10,38ml) à température ambiante pendant 48 heures. L'iodure de méthyle est ensuite évaporé, le résidu est repris trois fois par le CH₂Cl₂ et évaporé à sec. Le sel de sulfonium ainsi obtenu est dissous dans un mélange DMF/CH₂Cl₂ (120ml ; 1 : 1) auquel on ajoute l'hydrure de sodium (459mg ; 11,4mmol) ; la solution est mise sous agitation à 0°C pendant 2 heures sous atmosphère d'azote.

Après avoir ajouté AcOEt (20ml), AcOMe (17ml) et H₂O (7ml), on laisse agiter le mélange réactionnel sous N₂ à température ambiante pendant 16 heures. La solution est ensuite extraite par H₂O (2 x 50ml) et par une solution aqueuse à 1% de NaHCO₃ (2 x 20ml). Les phases aqueuses sont acidifiées par l'acide citrique jusque pH 4 puis extraites par CH₂Cl₂ (3 x 50ml). Les phases organiques sont lavées par une solution saturée en sel, séchées par MgSO₄ et évaporées à sec. Le produit brut est obtenu par précipitation du résidu dans un mélange AcOEt/Hexane. JFL, 10 est alors obtenu par recristallisation du produit brut dans un mélange AcOEt/Hexane 50 : 50 (100ml).

- Formule brute : C₁₁H₂₀N₂O₅
- Masse molaire : 260g/mol
- Rendement : 55%

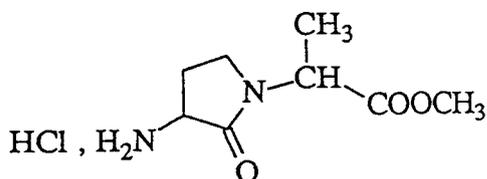
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3370 cm⁻¹ ν NH; 3015–2840 cm⁻¹ ν C-H (alkyles); 1715 cm⁻¹ ν CO (lactame); 1700 cm⁻¹ ν CO (uréthane); 1690 cm⁻¹ ν CO (acide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,3 (d, 3H, CH₃-CH); 1,40 (s, 9H, -(CH₃)₃); 1,8 (m, 2H, CH₂-CH₂-S); 2,50 (m, 1H, CH_AH_B-CH₂-N); 3,20 (t, 1H, CH_AH_BN); 3,44 (dt, 1H, CH_AH_B-N); 4,22 (signal, 1H, CH-NH); 4,77 (t, 1H, CH_AH_B-N); 7,01 (signal, 1H, -NH); 12,9 (signal, 1H, -COOH)

2-[(3-amino)-2-oxopyrrolidin-1-yl] propanoate de méthyle .(JFL, 12)



Mode opératoire

Dans un ballon muni d'appareil de Dean-Stark, on met en solution l'acide JFL, 10 (230mg ; 0,88mmol) dans 75ml de méthanol saturé en acide chlorhydrique. On ajoute 35ml de cyclohexane pour permettre l'entraînement azéotropique de l'eau. Le mélange réactionnel est maintenu à reflux pendant 4 heures.

Après évaporation du solvant, le brut est repris dans l'éthanol et à nouveau débarrassé du solvant. On obtient ainsi le chlorhydrate que l'on reprend par l'eau. La phase aqueuse est alcalinisée par K₂CO₃ et extraite par AcOEt. La phase organique est séchée par MgSO₄ et porté à sec pour donner JFL, 12.

- *Formule brute* : C₈H₁₄N₂O₃
- *Masse molaire* : 186g/mol
- *Rendement* : 61%

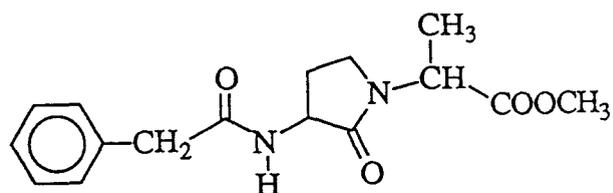
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3450 cm⁻¹ v NH; 3015–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1730 cm⁻¹ v CO (ester); 1715 cm⁻¹ v CO (lactame)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,3 (d, 3H, CH₃-CH); 1,8 (m, 2H, CH₂-CH₂-S); 2,50 (m, 1H, CH_AH_B-CH₂-N); 3,20 (t, 1H, CH_AH_BN); 3,44 (dt, 1H, CH_AH_B-N); 3,65 (s, 3H, -OCH₃); 4,22 (signal, 1H, CH-NH); 4,77 (t, 1H, CH_AH_B-N); 8,4 (signal, 3H, NH₃⁺)

2-[(3-phénylacétamido)-2-oxopyrrolidin-1-yl] propanoate de méthyle.(JFL, 14)



Mode opératoire

A une solution de JFL, 12 (100mg ; 0,53mmol) dans CH_2Cl_2 (20ml), on ajoute NEt_3 (82 μl ; 0,59mmol). Quand le milieu réactionnel est refroidi jusqu'à 0°C, on additionne goutte à goutte le chlorure de phénacétyle (71 μl ; 0,53mmol).

Au bout de 2 heures on ajoute à nouveau le chlorure de phénacétyle (71 μl ; 0,53mmol) et la NEt_3 (82 μl ; 0,59mmol) et on laisse agiter à température ambiante pendant 2 heures 30. Le mélange réactionnel est ensuite lavé par une solution aqueuse à 10% de NaHCO_3 (2 x20ml) puis par H_2O (1 x20ml). La phase organique est séchée par MgSO_4 , évaporée à sec. Le résidu est repris par l'éther, il se forme un précipité blanc de JFL, 14.

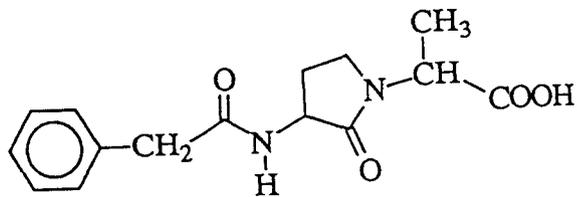
- Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$
- Masse molaire : 304g/mol
- Rendement : 79%

Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm^{-1} v NH; 3015–2840 cm^{-1} v C-H (alkyles); 1730 cm^{-1} v CO (ester); 1715 cm^{-1} v CO (lactame); 1630 cm^{-1} v CO (amide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,3 (d, 3H, $\underline{\text{CH}_3}$ -CH); 1,8 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ -CH₂-S); 2,50 (m, 1H, $\underline{\text{CH}_A}\underline{\text{H}_B}$ -CH₂-N); 3,20 (t, 1H, $\underline{\text{CH}_A}\underline{\text{H}_B}$ N); 3,44 (dt, 1H, $\underline{\text{CH}_A}\underline{\text{H}_B}$ -N); 3,65 (s, 3H, - $\underline{\text{OCH}_3}$); 4,22 (signal, 1H, $\underline{\text{CH}}$ -NH); 4,77 (t, 1H, $\underline{\text{CH}_A}\underline{\text{H}_B}$ -N); 5,1 (signal, 2H, - $\underline{\text{CH}_2}$ -C₆H₅) 7,2 (signal, 5H, -C₆H₅); 8,3 (signal, 1H, $\underline{\text{NH}}$)

Acide-2-[(3-phénylacétamido)-2-oxopyrrolidin-1-yl] propanoïque. (JFL, 3)**Mode opératoire**

Dans un ballon, on solubilise JFL, 14 (127mg ; 0,41mmol) dans un minimum de MeOH (5ml). On y ajoute une solution de NaOH à 40% (5ml).

Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est porté à sec puis repris par l'eau. La phase aqueuse est extraite par AcOEt (2 x 30ml). Puis la phase organique est séchée par MgSO₄ et évaporée. On obtient ainsi un produit pur : JFL, 3.

- *Formule brute* : C₁₅H₁₈N₂O₄
- *Masse molaire* : 290g/mol
- *Rendement* : 41%

Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

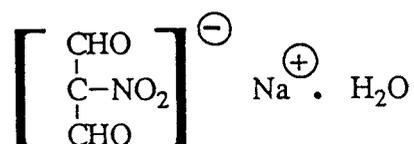
3300 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1740 cm⁻¹ v CO (acide); 1715 cm⁻¹ v CO (lactame); 1630 cm⁻¹ v CO (amide)

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,3 (d, 3H, CH₃-CH); 1,8 (m, 2H, CH₂-CH₂-S); 2,50 (m, 1H, CH_AH_B-CH₂-N); 3,20 (t, 1H, CH_AH_BN); 3,44 (dt, 1H, CH_AH_B-N); 4,22 (signal, 1H, CH-NH); 4,77 (t, 1H, CH_AH_B-N); 5,1 (signal, 2H, CH₂-C₆H₅) 7,2 (signal, 5H, -C₆H₅); 8,3 (signal, 1H, NH)

7-1.2. Dérivés du pyrrole.

Nitromalonalaldéhyde de sodium. (JFL, 15)



Mode opératoire

20g (0,29mol) de nitrite de sodium et 20ml d'eau sont introduits dans un tricol équipé d'une ampoule à brome, d'un réfrigérant et d'un thermomètre, sous agitation magnétique. 20g (0,077mol) d'acide mucobromique dissous dans 50ml d'éthanol à 95% sont placés dans l'ampoule à brome. Après dissolution du nitrite de sodium dans l'eau, l'addition se fait goutte à goutte, pendant 2 heures, à une température proche de 54°C. Le travail s'effectue sous une hotte et se poursuit jusqu'à la fin du dégagement gazeux.

Le mélange est ensuite refroidi à 0°C et filtré. Le solide obtenu est solubilisé dans 150ml de méthanol puis on filtre afin d'éliminer les insolubles. Après évaporation sous vide, on obtient le nitromalonalaldéhyde de sodium JFL 15.

- Formule brute : $\text{C}_3\text{H}_2\text{NO}_4^{-} \cdot \text{Na}^{+}, \text{H}_2\text{O}$
- Masse molaire : 157g/mol
- Rendement : 41%

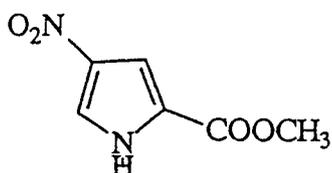
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

1670 cm^{-1} v CO (aldéhyde); 1510 cm^{-1} v C-NO₂; 810 cm^{-1} v NO₂⁻.

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 9,75 (s, 2H, (OHC-C)₂).

Pyrrole 4-nitro 2-méthoxycarbonyle. (JFL, 16)



Mode opératoire

Dans un ballon de 250ml, sous agitation, 4,42g (0,032mol) de JFL-15 et 3,993g (0,032mol) de chlorure d'ammonium de l'ester méthylique de glycine sont dissous dans 100ml de méthanol. Dès que la température du milieu réactionnel atteint 50°C, on ajoute goutte à goutte 10ml (0,05mol) de NaOH à 20%, sous agitation pendant 1 heure. Après évaporation du méthanol, on solubilise dans l'eau et on procède à des extractions au NaCl.

La phase étherée est séchée sur Na₂SO₄ anhydre puis après filtration, on évapore sous vide pour récupérer le produit attendu JFL 16.

- Formule brute : C₆H₆N₂O₄.
- Masse molaire : 170g/mol
- Rendement : 25%

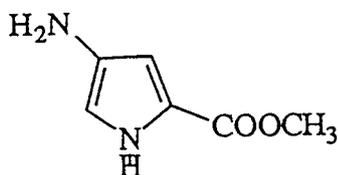
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1700 cm⁻¹ v CO (ester); 1510 cm⁻¹ v C-NO₂.

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 3,90 (s, 3H, O-CH₃); 7,30 (d, 1H, CH-NH); 8,10 (d, 1H, O₂N-C-CH); 13,05 (signal, 1H, NH).

Pyrrole 4-amino 2-méthoxycarbone. (JFL, 17)



Mode opératoire

1,35g (7,9mmol) de JFL, 16 sont dissous dans l'éthanol absolu. La réduction est réalisée pendant une nuit en autoclave sous pression d'H₂ en présence de nickel de Raney (P=50bars, T=50°C). Après élimination du catalyseur, le filtrat recueilli est évaporé sous vide en absence de lumière afin d'éviter la décomposition du produit attendu JFL 17. Ce dérivé est solubilisé dans une solution saturée en HCl gazeux et laissé sous agitation pendant 4 heures. Le chlorhydrate de JFL 17 précipite dans le milieu.

- Formule brute : C₆H₈N₂O₂.
- Masse molaire : 140g/mol
- Rendement : 95%

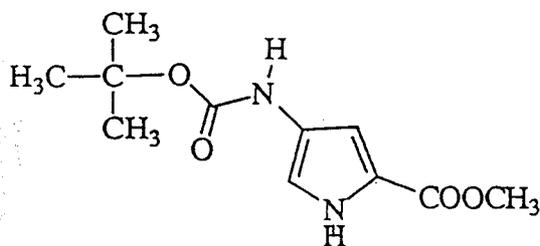
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1700 cm⁻¹ v CO (ester).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 3,90 (s, 3H, O-CH₃); 6,60 (signal, 1H, H₂N-C-CH); 7,15 (signal, 1H, CH-NH); 9,65 (signal, 3H, NH₃⁺); 11,15 (signal, 1H, NH aromatique).

Pyrrole 4-(tertiobutyloxycarbonylamino) 2-méthoxycarbone. (JFL, 18)



Mode opératoire

Le dérivé JFL 17 sous forme de chlorure (1,50g, 8,50mmol) est solubilisé dans un minimum de dichlorométhane (CH_2Cl_2) en présence de NEt_3 (1,77ml) puis on ajoute l'anhydride de tertibutyloxycarbone (5,56g, 25,49mmol) à reflux pendant 12 heures. Le mélange est ensuite lavé à l'eau, la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 anhydre, puis évaporée sous vide pour obtenir le produit JFL 18 attendu.

- Formule brute : $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$.
- Masse molaire : 240g/mol
- Rendement : 80%

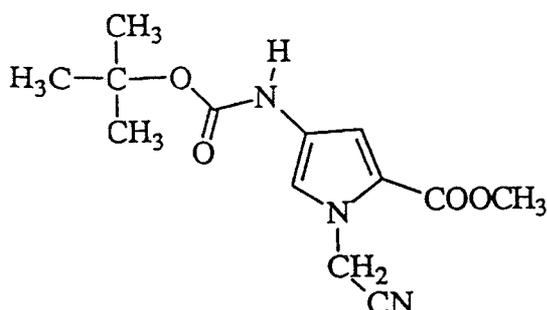
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm^{-1} v NH; $3100\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ v C-H (alkyles); 1690 cm^{-1} v CO (ester); 1680 cm^{-1} v CO (uréthane).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$); 3,90 (s, 3H, O- CH_3); 6,60 (signal, 1H, $\text{H}_2\text{N-C-CH}$); 7,15 (signal, 1H, CH-NH); 9,10 (signal, 1H, -NH); 11,15 (signal, 1H, NH aromatique).

N-acétonitrile pyrrole 4-(tertiobutyloxycarbonylamino) 2-méthoxycarbone.
(JFL, 21)



Mode opératoire

Le composé JFL, 18 (2g, 8,33mmol) est solubilisé dans un minimum de CH_2Cl_2 anhydre, on y ajoute lentement l'hydrure de sodium (0,2g; 8,33mmol). Après 30 mn à température ambiante le précipité formé est filtré puis repris par un minimum de DMF anhydre. A cette solution on additionne goutte à goutte le chlorure d'acétonitrile (0,8ml; 12,5mmol) puis le milieu réactionnel est chauffé à 60°C pendant 16 heures.

Après évaporation du DMF, le résidu est repris par le CH_2Cl_2 . La phase organique est ensuite lavée par une solution aqueuse d'HCl 1N (2 x 20ml), par H_2O (2 x 20ml) puis par une solution aqueuse à 10% en NaHCO_3 (2 x 20ml). Le CH_2Cl_2 est séché par MgSO_4 , évaporé à sec. Le brut est purifié par chromatographie-éclair (éluant : Hexane/AcOEt 7 : 3) permettant d'obtenir le produit JFL, 21.

- Formule brute : $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$.
- Masse molaire : 279g/mol
- Rendement : 40%

Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

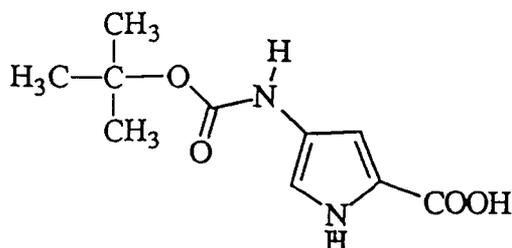
3290 cm^{-1} v NH; $3100\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ v C-H (alkyles); 1730 cm^{-1} v CO (ester); 1680 cm^{-1} v CO (uréthane). Absence de la bande caractéristique de C-N à 2200 cm^{-1} .

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$); 3,90 (s, 3H, O- CH_3); 5,30 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CN}$); 6,60 (signal, 1H, $\text{H}_2\text{N-C-CH}$); 7,15 (signal, 1H, CH-NH); 9,10 (signal, 1H, $-\text{NH}$).

7-1.2.1. Bispyrrole non substitué (4).

Acide pyrrole 4-(tertiobutyloxycarbonylamino) 2-carboxylique. (JFL, 19)

**Mode opératoire**

1,35g (5,62mmol) de JFL 18 est dissous dans 10 ml de méthanol; 4 équivalents de soude (NaOH à 20%) sont additionnés et le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 24 heures. Le mélange est évaporé sous vide puis repris par l'eau. On acidifie par HCl 5N jusqu'à un pH de 3 environ. L'acide JFL 19 précipite dans le milieu et peut être recueilli dans une phase organique (CH₂Cl₂) par plusieurs lavages.

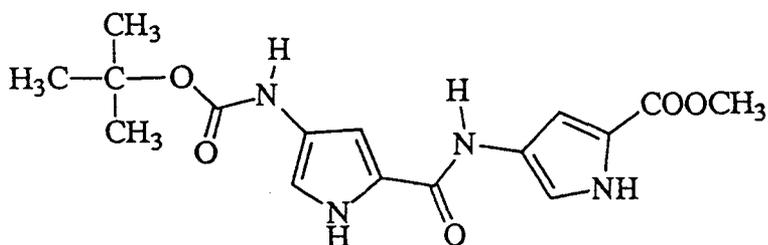
- *Formule brute* : C₁₀H₁₄N₂O₄.
- *Masse molaire* : 226g/mol
- *Rendement* : 75%

Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1740 cm⁻¹ v CO (acide); 1680 cm⁻¹ v CO (uréthane).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃); 6,60 (signal, 1H, H₂N-C-CH); 7,15 (signal, 1H, CH-NH); 9,10 (signal, 1H, -NH); 11,15 (signal, 1H, NH aromatique); 12,25 (signal, 1H, COOH).

Bis-pyrrole non substitué. (JFL, 20)**Mode opératoire**

A une solution de JFL, **19** (1,50g ; 6,64mmol) et HOBt (0,986g ; 7,30mmol) dans le DMF (10ml) et le CH₂Cl₂ (20ml) refroidie à 0°C, on ajoute une solution de DCC (1,5g ; 7,30mmol) solubilisée dans CH₂Cl₂ (5ml). Après 30 mn d'agitation à 0°C, on additionne le pyrrole 4-amino 2-méthoxycarbonyle JFL, **17** (1,02g ; 7,30mmol) et la N-méthylmorpholine (0,80ml ; 7,30mmol). On laisse le mélange réactionnel sous agitation 30 mn à 0°C puis 16 h à 5°C.

Le précipité de DCU formé dans le milieu réactionnel est filtré, lavé par CH₂Cl₂ (20ml). Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est repris par AcOEt (50ml), le précipité formé est filtré. La solution d'AcOEt est lavée successivement par une solution aqueuse à 10% de NaHCO₃ (40ml, 25ml), puis par une solution aqueuse à 10% d'acide citrique (25ml, 25ml), par H₂O (30ml) et enfin par H₂O saturée en NaCl (30ml).

Toutes les phases aqueuses sont réextraites par l'AcOEt, les phases organiques sont séchées par MgSO₄, évaporées à sec. L'huile obtenue est reprise par un minimum d'éther, il se forme un précipité de JFL, **20** que l'on filtre.

- Formule brute : C₁₆H₂₀N₄O₅.
- Masse molaire : 348g/mol
- Rendement : 68%

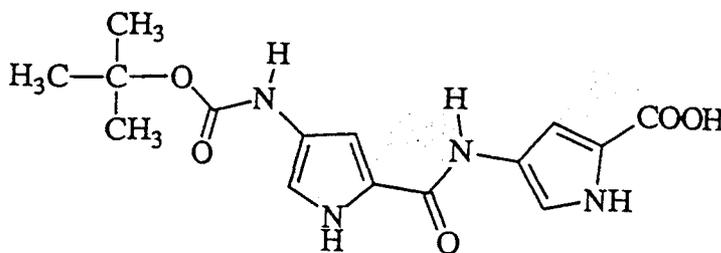
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1730 cm⁻¹ v CO (ester); 1680 cm⁻¹ v CO (uréthane); 1630 cm⁻¹ v CO (amide).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃); 3,90 (s, 3H, O-CH₃); 6,85 (massif, 2H, (HN-C-CH)₂); 7,15 (massif, 2H, (CH-NH)₂); 9,10 (signal, 1H, -NH); 9,85 (signal, 1H, -NH amide); 11,50 (massif, 2H, (NH)₂ aromatiques).

Bis-pyrrole non substitué saponifié. (JFL, 4)



Mode opératoire

1,00g (2,87mmol) de JFL 20 est dissous dans 10 ml de méthanol; 4 équivalents de soude (NaOH à 20%) sont additionnés et le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 24 heures. Le mélange est évaporé sous vide puis repris par l'eau. On acidifie par HCl 5N jusqu'à un pH de 3 environ. L'acide JFL, 4 précipite dans le milieu et peut être recueilli dans une phase organique (CH₂Cl₂) par plusieurs lavages.

- Formule brute : C₁₅H₁₈N₄O₅.
- Masse molaire : 334g/mol
- Rendement : 80%

Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

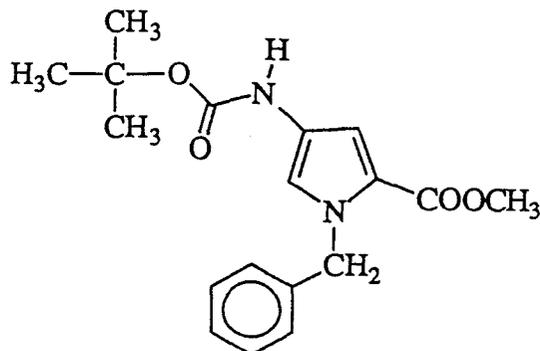
3290 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1740 cm⁻¹ v CO (acide); 1680 cm⁻¹ v CO (uréthane); 1630 cm⁻¹ v CO (amide).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃); 6,85 (massif, 2H, (HN-C-CH)₂); 7,15 (massif, 2H, (CH-NH)₂); 9,10 (signal, 1H, -NH); 9,85 (signal, 1H, -NH amide); 11,50 (massif, 2H, (NH)₂ aromatiques).

7-1.2.2. Bispyrrole monosubstitué (5).

N-benzyl pyrrole 4-(tertiobutyloxycarbonylamino) 2-méthoxycarbonyle. (JFL, 23)

**Mode opératoire**

Le composé JFL, 18 (2g, 8,33mmol) est solubilisé dans un minimum de CH_2Cl_2 anhydre, on y ajoute lentement l'hydrure de sodium (0,2g; 8,33mmol). Après 30 mn à température ambiante le précipité formé est filtré puis repris par un minimum de DMF anhydre. A cette solution on additionne goutte à goutte le bromure de benzyle (1,5ml; 12,5mmol) puis le milieu réactionnel est chauffé à 60°C pendant 16 heures.

Après évaporation du DMF, le résidu est repris par le CH_2Cl_2 . La phase organique est ensuite lavée par une solution aqueuse d'HCl 1N (2 x 20ml), par H_2O (2 x 20ml) puis par une solution aqueuse à 10% en NaHCO_3 (2 x 20ml). Le CH_2Cl_2 est séché par MgSO_4 , évaporé à sec. Le brut est purifié par chromatographie-éclair (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9 : 1) permettant d'obtenir le produit JFL, 23.

- Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$
- Masse molaire : 330g/mol
- Rendement : 55%

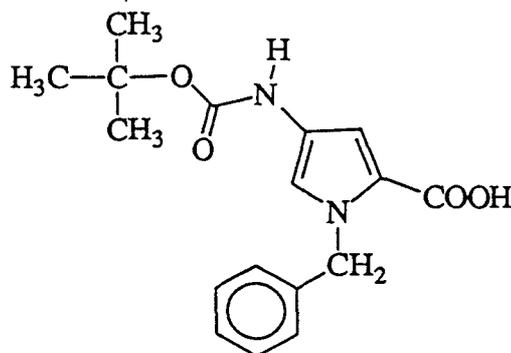
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm^{-1} v NH; $3100\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ v C-H (alkyles); 1730 cm^{-1} v CO (ester); 1680 cm^{-1} v CO (uréthane).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$); 3,90 (s, 3H, O- CH_3); 5,55 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 6,85 (d, 1H, HN-C- CH); 7,15 (d, 1H, CH-NH); 7,35 (massif, 5H, C_6H_5); 9,10 (signal, 1H, -NH).

Acide N-benzyl pyrrole 4-(tertiobutyloxycarbonylamino) 2-carboxylique. (JFL, 24)



Mode opératoire

1g (3,03mmol) de JFL 23 est dissous dans 10 ml de méthanol; 4 équivalents de soude (NaOH à 20%) sont additionnés et le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 24 heures. Le mélange est évaporé sous vide puis repris par l'eau. On acidifie par HCl 5N jusqu'à un pH de 3 environ. L'acide JFL, 24 précipite dans le milieu et peut être recueilli dans une phase organique (CH₂Cl₂) par plusieurs lavages.

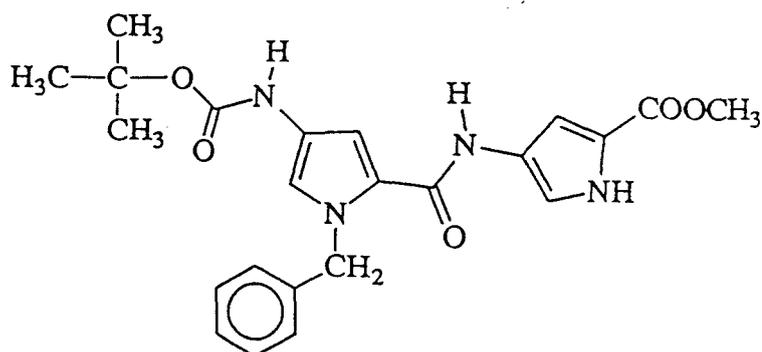
- Formule brute : C₁₇H₂₀N₂O₄
- Masse molaire : 316g/mol
- Rendement : 75%

Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1740 cm⁻¹ v CO (acide); 1680 cm⁻¹ v CO (uréthane).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃); 5,55 (s, 2H, CH₂C₆H₅); 6,85 (d, 1H, HN-C-CH); 7,15 (d, 1H, CH-NH); 7,35 (massif, 5H, C₆H₅); 9,10 (signal, 1H, -NH).

Bis-pyrrole N-benzylé, (JFL, 25)**Mode opératoire**

A une solution de JFL, 24 (0,5g ; 1,58mmol) et HOBT (0,23g ; 1,75mmol) dans le DMF (10ml) et le CH₂Cl₂ (20ml) refroidie à 0°C, on ajoute une solution de DCC (0,36g ; 1,75mmol) solubilisée dans CH₂Cl₂ (5ml). Après 30 mn d'agitation à 0°C, on additionne le pyrrole 4-amino 2-méthoxycarbonyle JFL, 17 (0,25g ; 1,75mmol) et la N-méthylmorpholine (0,2ml ; 1,75mmol). On laisse le mélange réactionnel sous agitation 30 mn à 0°C puis 16 h à 5°C.

Le précipité de DCU formé dans le milieu réactionnel est filtré, lavé par CH₂Cl₂ (20ml). Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est repris par AcOEt (50ml), le précipité formé est filtré. La solution d'AcOEt est lavée successivement par une solution aqueuse à 10% de NaHCO₃ (40ml, 25ml), puis par une solution aqueuse à 10% d'acide citrique (25ml, 25ml), par H₂O (30ml) et enfin par H₂O saturée en NaCl (30ml).

Toutes les phases aqueuses sont réextraites par l'AcOEt, les phases organiques sont séchées par MgSO₄, évaporées à sec. L'huile obtenue est reprise par un minimum d'éther, il se forme un précipité de JFL, 25 que l'on filtre.

- Formule brute : C₂₃H₂₆N₄O₅.
- Masse molaire : 438g/mol
- Rendement : 65%

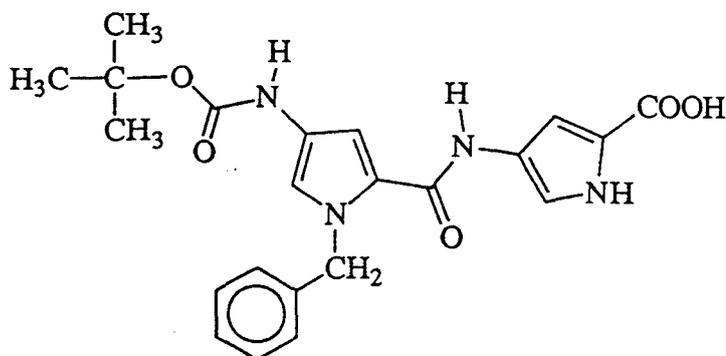
Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm⁻¹ v NH; 3100–2840 cm⁻¹ v C-H (alkyles); 1730 cm⁻¹ v CO (ester); 1680 cm⁻¹ v CO (uréthane); 1630 cm⁻¹ v CO (amide).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃); 3,90 (s, 3H, O-CH₃); 5,55 (s, 2H, CH₂C₆H₅); 6,85 (massif, 2H, (HN-C-CH)₂); 7,15 (massif, 2H, (CH-NH)₂); 7,35 (massif, 5H, C₆H₅); 9,10 (signal, 1H, -NH); 9,85 (signal, 1H, -NH amide); 11,50 (massif, 1H, NH aromatique).

Bis-pyrrole N-benzylé saponifié, (JFL, 5)



Mode opératoire

0,5g (1,14mmol) de JFL 25 est dissous dans 10 ml de méthanol; 4 équivalents de soude (NaOH à 20%) sont additionnés et le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 24 heures. Le mélange est évaporé sous vide puis repris par l'eau. On acidifie par HCl 5N jusqu'à un pH de 3 environ. L'acide JFL, 5 précipite dans le milieu et peut être recueilli dans une phase organique (CH₂Cl₂) par plusieurs lavages.

- Formule brute : C₂₂H₂₄N₄O₅.
- Masse molaire : 424g/mol
- Rendement : 80%

Spectrométrie dans l'Infra-Rouge :

3290 cm⁻¹ ν NH; 3100–2840 cm⁻¹ ν C-H (alkyles); 1740 cm⁻¹ ν CO (acide); 1680 cm⁻¹ ν CO (uréthane); 1630 cm⁻¹ ν CO (amide).

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (DMSO) :

δ (ppm) 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃); 5,55 (s, 2H, CH₂C₆H₅); 6,85 (massif, 2H, (HN-C-CH)₂); 7,15 (massif, 2H, (CH-NH)₂); 7,35 (massif, 5H, C₆H₅); 9,10 (signal, 1H, -NH); 9,85 (signal, 1H, -NH amide); 11,50 (massif, 1H, NH aromatique).

7-2. Synthèse en phase hétérogène.

La synthèse des fragments peptidiques du VIP a été réalisée en phase solide (Synthétiseur de peptides Biolynx 4175 couplé à un détecteur UV Gilson holochrome). Nous rappelons ici brièvement le principe de cette synthèse en phase solide (**Schéma III**).

Le premier acide aminé (C-terminal du peptide à synthétiser) est greffé sur un polymère insoluble (résine de Sheppard) par son extrémité C-terminale. La fonction $\text{NH}\alpha$ de chaque résidu est protégée par un groupement fluorénylméthylxycarbonyle (Fmoc). Ce groupement protecteur possède la particularité d'absorber à 301nm, et cette propriété est utilisée pour suivre la synthèse. Un cycle de synthèse est constitué de quatre étapes successives : l'acide aminé fixé sur la résine est libéré de son groupement Fmoc par action d'une amine primaire ou secondaire; l'excès de réactif est alors éliminé par lavage; l'acide aminé à fixer sur la chaîne peptidique en formation, est ensuite ajouté en tête de colonne; la réaction de couplage terminée, l'excès d'acide aminé non fixé est éliminé par lavage de la résine. Il faut également noter que les acides aminés sont protégés sur leur chaîne latérale lorsque celle-ci possède des groupements fonctionnels, afin d'éviter des réactions secondaires lors des couplages. En fin de synthèse, le peptide complet est séparé du polymère par action de l'acide trifluoroacétique aqueux (95%). Cette étape permet également de libérer le peptide des protections sur les chaînes latérales. Cette méthode de synthèse se caractérise par une simplicité d'opération et une rapidité d'exécution. Les rendements de couplage sont supérieurs à 99%. Cependant, l'existence de couplage imparfait à chaque étape aboutit à la formation de versions tronquées. Une étape de purification s'avère donc nécessaire.

Dans le cas particulier des fragments N-terminaux du VIP, nous avons utilisé une résine du type NovaSyn KA 100 (0,1mmol/g de résine) générant des fragments COOH libre. Les fragments C-terminaux sont synthétisés quant à eux en utilisant une résine du type NovaSyn PR 500 (0,45mmol/g de résine) permettant la synthèse de peptides amides. La synthèse finale des pseudo-peptides est obtenue par couplage des différents dérivés issus de la phase liquide avec le peptide néoformé. La réaction nécessite la présence du réactif BOP en présence de diisopropyléthylamine.

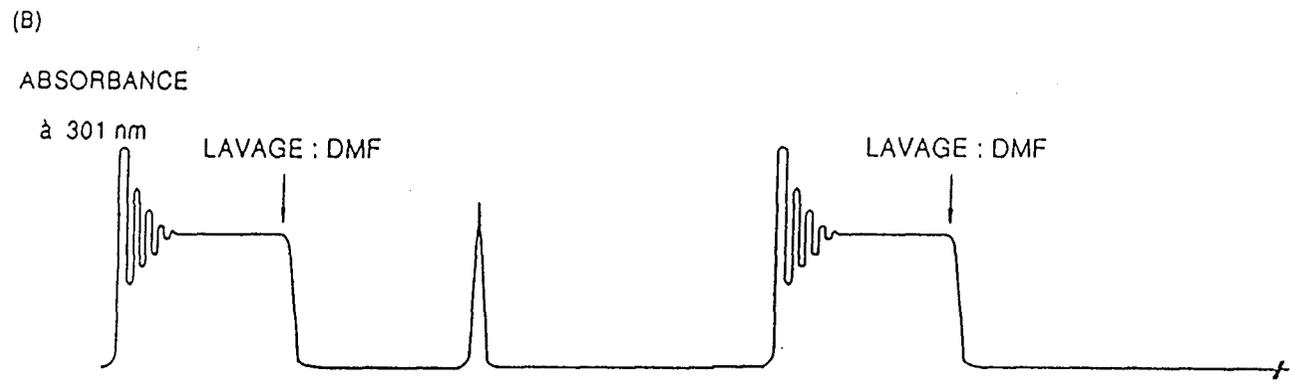
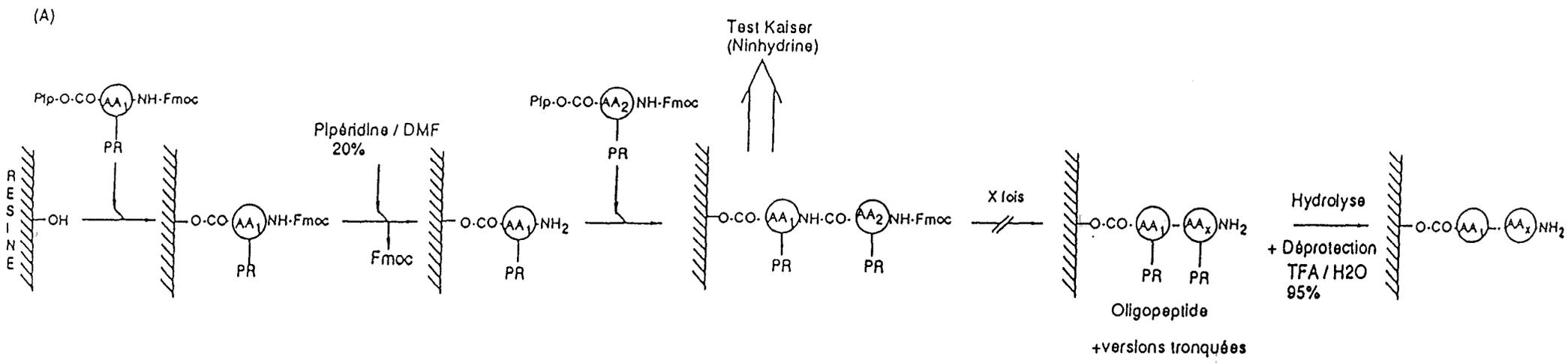


Schéma III. Schéma simplifié du principe de synthèse en phase hétérogène (A) avec suivi en continu de l'absorbance à 301nm en sortie de colonne (B). PR : groupement protecteur; Pfp : pentafluorophénol; Fmoc : fluorénylméthoxyxycarbonyle; DMF : diméthylformamide; TFA : acide trifluoroacétique.

A l'issue de la synthèse, le protocole suivant est identique pour les deux types de résines. La résine est retirée de la colonne de réaction puis lavée successivement par le DMF, le n-butanol, l'acide acétique et de nouveau le n-butanol. Le clivage final du peptide de la résine ainsi que la déprotection des chaînes latérales des acides aminés sont effectués par un traitement à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA/H₂O; 95/5) pendant 1h30. Après filtration de la résine, la solution TFA/H₂O est évaporée sous vide et le peptide est précipité dans l'éther.

7-3. Purification par CLHP.

Les produits obtenus sont purifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP), système Varian 5000, sur colonne C₁₈ RP 10 μ Alltech (25 x 1,2cm). La détection se fait à 210nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV, modèle Shimadzu SPD-6A. La phase mobile est constituée du mélange suivant :

- solvant A : eau/acide trifluoroacétique 0,1%

- solvant B : acétonitrile

Le débit d'élution est de 1,5ml/mn.

Différents gradients d'élution ont été recherchés pour tous les composés synthétisés. Nous avons ainsi recueilli les pics majoritaires lors de chaque injection. Après lyophilisation des différentes fractions, nous avons identifié les produits désirés en spectrométrie de masse (FAB+ : "Fast Atom Bombardment").

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- ABEMAYOR E., SIDELL N. (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. **Environ. Health Persp.** 80, 3-15.
- AGGESTRUP S., UDDMAN R., SUNDLER F., FAHRENKRUG J., HACKANSON R., RAHBEK SORENSEN H., HAMBRAEUS G. (1983). Lack of vasoactive intestinal polypeptide nerves in oesophageal achalasia. **Gastroenterology** 84, 924-927.
- AHREN B., ALUMETS J., ERICSSON M., FAHRENKRUG J., HÄKANSON R., HEDNER I., LONEN I., MELANDER A., RERUP C., SUNDLER F. (1980). VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion. **Nature** 287, 343-345.
- ALM P., ALUMETS J., HÄKANSON R., OWMAN CH., SJÖBERG N.O., SUNDLER F., WALLEB B. (1980). Origin and distribution of VIP-nerves in genito-urinary tract. **Cell Tissue Res.** 205, 337-347.
- AMARA S.G., JONES B., ROSENFELD M.G., ONG E.S., EVANS R.M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression regulates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature** 298, 240-244.
- AMIRANOFF B., LABURTHE M., ROSSELIN G. (1980). Characterization of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat intestinal epithelial cell membranes. **Biochem. Biophys. Acta** 267, 215-224.
- AMREIN K.E., SEFTON B.M. (1988). Mutation of a site of tyrosine phosphorylation in the lymphocyte specific tyrosine protein kinase, p56^{lck} reveals its oncogenic potential in fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85, 4247-4251.
- ANFENSEN C.B., HABER E., SELA M., WHITE F.H. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 47, 1309-1314.
- ARILLA E., PRIETO J.C., LOPEZ-MARTINEZ J.M., GOBERNA R. (1981). Somatostatin action on insulin secretion induced by chicken and porcine vasoactive intestinal peptide in the perfused rat pancreas. **Horm. Metab. Res.** 13, 314-317.
- BAILLY C., HENICHART J.P. (1991). DNA recognition by intercalator-minor-groove binder hybrid molecules. **Bioconjugate Chem.** 2, 379-393.
- BAILLY F. (1992). Le motif de reconnaissance spécifique de l'ADN, SPKK et son utilisation pour l'élaboration d'hybrides peptide-intercalant. Thèse de doctorat en chimie organique (Lille I).

- BAILLY F., BAILLY C., HELBECQUE N., POMMERY N., COLSON P., HOUSSEIER R., HENICHART J.P. (1992). Relationship between DNA-binding and biological activity of anilinoacridine derivatives containing the nucleic acid-binding unit SPKK. **Anti-Cancer Drug Design** 7, 83-100.
- BALL J.B., ALEWOOD P.F. (1990). Conformational constraints : nonpeptide β -turn mimics. **J. Mol. Recogn.** 3, 55-64.
- BARNES P.J. (1986a). Non-adrenergic non-cholinergic neural control of human airways. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 280 (suppl.), 208-228.
- BARNES P.J. (1986b). Asthma as an axon reflex. **Lancet** 1, 242-244.
- BARNES P.J. (1986c). Neural control of human airways in health and disease. **Am. Rev. Respir. Dis.** 134, 1289-1314.
- BARNES P.J. (1987). Neuropeptides in human airways : function and clinical implications. **Am. Rev. Respir. Dis.** 136, S77-S83.
- BARNES P.J. (1992). Neural mechanisms in asthma. **Brit. Med. Bull.** 48, 149-168.
- BARNES P.J., DIXON C.M.S. (1984). The effect of inhaled vasoactive intestinal peptide on bronchial hyperreactivity in man. **Am. Rev. Respir. Dis.** 130, 162-166.
- BARROWCLIFFE M.P., MORICE A., JONES J.G., SEVER P.S. (1986). Pulmonary clearance of vasoactive intestinal peptide. **Thorax** 41, 88-93.
- BATES S.E., MICKLEY L.A., CHEN Y.N., RICHERT N., RUDICK J., BIEDLER J.L., FOSO A.T. (1989). Expression of a drug resistance gene in human neuroblastoma cell lines : modulation by retinoic acid-induced differentiation. **Mol. Cell Biol.** 9, 4337-4344.
- BEINFELD M.C., BRICK P.L., HOWLETT A.C., HOLT I.L., PRUSS R.M., MOSKAL J.R., EIDEN L.E. (1988). The regulation of vasoactive intestinal peptide synthesis in neuroblastoma and chromaffin cells. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 527, 68-76.
- BELL G.I., SANCHEZ-PESCADOR R., LAYBOWN P.J., NAJARIAN R.C. (1983). Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. **Nature** 304, 368-371.
- BELVISI M.G., STRETTON D., YACOUB M., BARNES P.J. (1992). Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. **Eur. J. Pharmacol.** 210, 221-222.

- BELVISI M.G., MIURA M., STRETTON D., BARNES P.J. (1993). Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 97-102.
- BERISHA H., FODA H., SAKAKIBARA H., TROTZ M., PAKBAZ H., SAID S.I. (1990). Vasoactive intestinal peptide prevents lung injury due to xanthine/xanthine oxidase. *Amer. J. Physiol.* 259, L151-L157.
- BERMAN H.M., NEIDLE S., ZIMMER C., THRUM H. (1979). Netropsin, a DNA binding oligopeptide. Structural and binding studies. *Biochem. Biophys. Acta* 561, 124-131.
- BESSON J., ROTSZTEJN W., LABURTHE M., EPELBAUM J., BEAUDET A., KORDON C., ROSSELIN G. (1979). VIP : brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in male rats. *Brain Res.* 165, 79-85.
- BHAVANANDAN V.P., KATLIC A.W. (1979). The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. The role of sialic acid. *J. Biol. Chem.* 254, 4000-4008.
- BIANCINI P., WELSH J.H., BEHAR J. (1984). Vasoactive intestinal polypeptide : a neurotransmitter for lower oesophageal sphincter relaxation. *J. Clin. Invest.* 73, 963-967.
- BIANCINI P., WELSH J.H., SAID S.I. (1985). Vasoactive intestinal polypeptide : a neurotransmitter for relaxation of the internal anal sphincter. *Gastroenterology* 89, 867-874.
- BIEDLER J.L., HELSON L., SPENGLER B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics on human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33, 2643-2652.
- BITAR K.N., JENSEN R.T. (1983). Binding of ¹²⁵I-VIP to isolated gastric smooth muscle cells. *Gastroenterology* 84, 1107.
- BITAR K.N., MAKHLOUF G.M. (1982). Relaxation of isolated gastric smooth muscle cells by vasoactive intestinal peptide. *Science* 216, 531-533.
- BLOOM F.E., BATTENBERG E., FERRON A., MANSILLAS J., MILNER R.J., SIGGINS G.R., SUTCLIFFE J.G. (1985). Neuropeptides : interactions and diversities. In *Recent progress in hormone research*. Academic press. New York. R. GREEP, Ed., 41, 339-367.

- BLOOM S.R., EDWARDS A.V. (1980). Effects of autonomic stimulation on the release of vasoactive intestinal peptide from the gastrointestinal tract in the calf. *J. Physiol. (Lond.)* 299, 437-452.
- BODANSZKY M. (1988). Synthesis of vasoactive intestinal peptide and related peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 527, 20-28.
- BODANSZKY M., NATARAJAN S. (1978). Synthesis and some pharmacological properties of the 23-peptide 15-lysine-secretin-(5-27). Special role of the residue in position 15 in biological activity of the vasoactive intestinal peptide. *J. Med. Chem.* 21, 1171-1173.
- BODANSZKY M., BODANSZKY A., KLAUSNER Y.S., SAID S.I. (1974). A preferred conformation in the vasoactive intestinal peptide (VIP). Molecular architecture of gastrointestinal hormones. *Bioorg. Chem.* 3, 133-140.
- BODANSZKY M., HENES J.B., YIOTAKIS A.E., SAID S.I. (1977). Synthesis and pharmacological properties of the N-terminal decapeptide of the vasoactive intestinal peptide (VIP). *J. Med. Chem.* 20, 1461-1464.
- BODANSZKY M., BODANSZKY A., DESHMANE S. S., MARTINEZ J. (1979). Is the vasoactive intestinal peptide a prohormone? *Bioorg. Chem.* 8, 399-407.
- BOIGE N., MUNCK A., LABURTHE M. (1984). Adrenergic versus VIPergic control of cyclic AMP in human colonic crypts. *Peptides* 5, 379-383.
- BOISSARD C., MARIE J.C., HEJBLUM G., GESPACH C., ROSSELIN G. (1986). Vasoactive intestinal peptide receptor regulation and reversible desensitization in human colonic carcinoma cells in culture. *Cancer Res.* 46, 4406-4413.
- BOLEN J.B. (1991). Research Capsule : Signal transduction by the SRC family of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Cell Growth Differ.* 2, 409-414.
- BOLIN D.R., COTTRELL J.M., GARIPPA R., O'NEILL N., SIMKO B., O'DONNELL M. (1993). Structure activity studies of vasoactive intestinal peptide (VIP) : cyclic disulfide analogs. *Int. J. Peptide Protein Res.* 41, 124-132.
- BOURAS C., MAGISTRETTI P.J., MORRISON J.H., CONSTANDINIS J. (1987). An immunohistochemical study of prosomatostatin-derived peptides in the human brain. *Neuroscience* 22, 781-800.

BOZOU J.C., COUVINEAU A., ROUYER-FESSARD C., LABURTHE M., VINCENT J.P., KITABGI P. (1987). Phorbol ester induces loss of VIP stimulation of adenylate cyclase and VIP-binding sites in HT-29 cells. *FEBS Lett.* 211, 151-154.

BRADBURY A.F., FINNEY M.D.A., SMYTHE D.G. (1982). Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* 298, 686-690.

BRAUNSTEIN G., LABAT C., BRUNELLESCHI S. (1988). Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of the guinea pig isolated trachea are modulated by epithelial prostaglandin E₂ production. *Br. J. Pharmacol.* 95, 300-308.

BRENNEMAN D.E., EIDEN L.E. (1986). Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1159-1162.

BRICK P.L., HOWLETT A.C., BEINFELD M.C. (1985). Synthesis and release of vasoactive intestinal peptide (VIP) by mouse neuroblastoma cells : Modulation by cyclic nucleotides and ascorbic acid. *Peptides* 6, 1075-1078.

BRUGGE J.S., COTTON P.C., QUERAL A.E., BARRETT J.N., NONNER D., KEANE R.W. (1985). Neurones express high levels of a structurally modified activated form of pp60^{c-src}. *Nature* 316, 554-557.

BRUM J.M., BOVE A.A., VANHOUTTE P. (1985). Participation of the endothelium in the vasodilator effects of vasoactive intestinal peptide and substance P in the coronary arteries. *Circulation* (Suppl. III) III, 83.

BRUM J.M., GO V.L.W., VANHOUTTE P.M., BOVE A.A. (1986). Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation : evidence for non adrenergic, non cholinergic coronary regulation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 7, 406-413.

BUTLER G.B., ADLER K.B., EVANS J.N. (1987). Modulation of rabbit airway smooth muscle responsiveness by respiratory epithelium. *Am. Rev. Resp. Dis.* 135, 1099-1104.

CANTLEY L.C., AUGER K.P., CARPENTER C., DUCKWORTH B., GRAZIANI A., KAPPELLER R., SOLTOFF S. (1991). Review : Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64, 281-302.

CARLQUIST M., JÖRNVALL H. (1982). A porcine brain polypeptide is identical to the vasoactive intestinal polypeptide. *Gastroenterology* 83, 245-249.

CARSTAIRS J.R., BARNES P.J. (1986). Visualization of vasoactive intestinal peptide receptors in human and guinea pig lung. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 239 : 249-255.

CAUGHEY G.H., LEIDIG F., VIRO N.F., NADEL J.A. (198). Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 244, 133-137.

CAUVIN A., BUSCAIL L., GOURLET P., DE NEEF P., GOSSEN D., ARIMURA A., MIYATA A., COY D.H., ROBBERECHT P., CHRISTOPHE J. (1990). The novel VIP-like hypothalamic polypeptide PACAP interacts with high affinity receptors in the human neuroblastoma cell line NB-OK. **Peptides** 11, 773-777.

CHANG M.M., LEEMAN S.E., NIALL H.D. (1971). Amino acid sequence of substance P. **Nature New Biol. (London)** 232, 86-87.

CHASTRE E., GESPACH C., ROSSELIN G., BROER Y. (1985). Récepteurs fonctionnels et spécifiques du peptide intestinal vasoactif dans les entérocytes isolés chez le rat à l'âge fœtal ou adulte. **C. R. Acad. Sci. Paris** 300, 399-404.

CHNEIWEISS H., GLOWINSKI J., PREMONT J. (1984). Vasoactive intestinal polypeptide receptors linked to an adenylate cyclase, and their relationship with biogenic amine- and somatostatin-sensitive adenylate cyclase on central neuronal and glial cells in primary cultures. **J. Neurochem.** 44, 779-786.

CHOU P.Y., FASMAN G.D. (1978). Empirical predictions of protein conformation. **Annu. Rev. Biochem** 47, 251-276.

CHRISTOPHE J., WAELBROECK M., CHATELAIN P., ROBBERECHT P. (1984). Heart receptors for VIP, PHI and secretion are able to activate adenylate cyclase and to mediate inotropic and chronotropic effects. Species variations and physiopathology. **Peptides** 5, 341-353.

CHRISTOPHE J., SVOBODA M., WAELBROECK M., WINAND J., ROBBERECHT P. (1988). Vasoactive intestinal peptide receptors in pancreas and liver. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 527, 238-256.

CICCARONE V., SPENGLER B.A., MEYERS M.B., BIEDLER J.L., ROSS R.A. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells : expression of distinct neural crest lineages. **Cancer Res.** 49, 219-225.

COMB M., BIRNBERG N.C., SEASHOLTZ A., HERBERT E., GOODMAN H.M. (1986). A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature* 323, 353-356.

CONNOR J.R., PETERS A. (1984). Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in rat visual cortex. *Neuroscience* 12, 1027-1044.

COSTA M., FURNESS J.B. (1983). The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea pig small intestine. *Neuroscience* 8, 665-676.

COTELLE N., LOHEZ M., COTELLE P., HENICHART J.P. (1990). Conformational study of the threonine-rich C-terminal pentapeptide of peptide T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 596-602.

COUVINEAU A., LABURTHE M. (1985a). The human vasoactive intestinal peptide receptor : Molecular identification by covalent cross-linking in colonic epithelium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61, 50-55.

COUVINEAU A., LABURTHE M. (1985b). The rat liver vasoactive intestinal peptide (VIP) binding site : Molecular characterization by covalent cross-linking and evidence for differences from the intestinal receptor. *Biochem. J.* 225, 473-479.

COUVINEAU A., ROUSSET M., LABURTHE M. (1985). Molecular identification and structural requirement of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the human colon adenocarcinoma cell line HT-29. *Biochem. J.* 231, 139-143.

COUVINEAU A., GAMMELTOFT S., LABURTHE M. (1986a). Molecular characteristics and peptide specificity of vasoactive intestinal peptide receptors from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 47, 1469-1475.

COUVINEAU A., AMIRANOFF B., LABURTHE M. (1986b). Solubilization of the liver VIP receptors : Hydrodynamic characterization and evidence for an association with a functional GTP regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 261, 14482-14489.

COX C.P., LINDEN J., SAID S.I. (1984). VIP elevated platelet cyclic AMP (cAMP) levels and inhibits *in vitro* platelet activation induced by platelet-activating factor (PAF). *Peptides* 5, 325-328.

CULOTTA E., KOSHLAND Jr. D.E. (1992). NO news is good news. *Science* 258, 1862-1865.

CUSHING H., WOLLBACH S.B. (1927). The transformation of a malignant paravertebral sympathicoblastoma into a benign ganglioneuroma. **Am. J. Pathol.** 3, 203-215.

DAHLEN S.E., RAUD J., SERHAN C.N. (1987). Biological activities of lipoxin A include lung strip contraction and dilatation of arterioles. **Acta. Physiol. Scand.** 130, 343-347.

DAIL W.G., MOLL M.A., WEBER K. (1983). Localization of vasoactive intestinal polypeptide in penile erectile tissue and in the major pelvic ganglion of the rat. **Neuroscience** 10, 1379-1386.

DANEK A., O'DORISIO M.S., O'DORISIO T.M., GEORGE J.M. (1983). Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on non adherent peripheral blood lymphocytes. **J. Immunol.** 131, 1173-1177.

D'ANGIO G.J. (1987). Neuroblastoma overview. **Med. Pediatr. Oncol.** 15, 159-162.

DAVIES P.J.A., MURTAUGH M.P., MOORE Jr W.T., JOHNSON G.S., LUCAS D. (1985). Retinoic acid-induced expression of tissue transglutaminase in human promyelocytic leukemia (HL 60) cells. **J. Biol. Chem.** 260, 5166-5174.

DEHAYE J.P., CHRISTOPHE J., ERNST F., POLOCZEK P., VAN BOGAERT P. (1985). Binding in vitro of vasoactive intestinal peptide on isolated acini of rat parotid glands. **Arch. Oral. Biol.** 30, 827-832.

DELLA N.G., PAPKA R.E., FURNESS J.B., COSTA M. (1983). Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in nerves associated with the cardiovascular system of guinea pigs. **Neuroscience** 9, 605-619.

DEY R.D., SHANNON W.A.Jr., SAID S.I. (1981). Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dog, cat and human subjects. **Cell Tissue Res.** 220, 231-238.

DHARMSATHAPHORN K., MANDEL K.G., MASUI H., Mc ROBERTS J.A. (1985). VIP-induced chloride secretion by a colonic epithelial cell line : direct participation of a basolaterally localized Na⁺, K⁺, Cl⁻ cotransport system. **J. Clin. Invest.** 75, 462-471.

DIAMOND L., SZAREK J.L., GILLESPIE M.N., ALTIENE R.J. (1983). *In vivo* bronchodilator activity of vasoactive intestinal peptide in the cat. **Am. Rev. Resp. Dis.** 128, 827-832.

- DICKINSON K.E.J., SCHACHTER M., MILES C.M.M., COY D.H., SEVER P.S. (1986). Characterization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in mammalian lung. **Peptides** 7, 791-800.
- DREW P.A., SHEARMAN J.C. (1985). Vasoactive intestinal peptide : a neurotransmitter which reduces human NK cell activity and increases Ig synthesis. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** 63, 313-318.
- DU B.H., ENG J., HULMES J.D., CHANG M., PAN Y.C.E., YALOW R.S. (1985). Guinea pig has a unique mammalian VIP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 128, 1093-1098.
- EDVINSSON L., FAHRENKRUG J., HANKS J., OWMAN C., SUNDLER F., UDDMAN R. (1980). VIP-containing nerves of intracranial arteries in mammals. **Cell Tissue Res.** 208, 135-142.
- EIDEN L.E., HOTCHKISS A.J. (1983). Cyclic adenosine monophosphate regulates vasoactive intestinal peptide and enkephalin biosynthesis in cultured bovin chromaffin cells. **Neuropeptides** 4, 1-9.
- EL BATTARI A., MARTIN J.M., FANTINI J., MULLER J.M., MARVALDI J., PICHON J. (1987). The vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor on intact human colonic adenocarcinoma cells (HT-29-D4). Evidence for its glycoprotein nature. **Biochem. J.** 242, 185-191.
- ESTIVAL A., MOUNIELOU P., TROCHERIS V., SCEMAMA J.L., CLEMENTE F., HOLLANDE E., RIBET A. (1983). Presence of VIP receptors in a human pancreatic adenocarcinoma cell line, modulation of the cAMP response during cell proliferation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 111, 958-963.
- FAHRENKRUG J., HOLST PEDERSEN J., YAMASHITA Y., OTTESEN B., HÖKFELT T., LUNDBERG J.M. (1987). Occurrence of VIP and PHM in human pancreas and their influence on pancreatic endocrine secretion in man. **Regul. Peptides** 18, 51-61.
- FAHRENKRUG J., OTTESEN B., PALLE C. (1989). Non amidated forms of VIP (glycin extended VIP and VIP-free acid) have full bioactivity on smooth muscle. **Regul. Peptides** 26, 235-239.
- FANTA P.E. (1952). Sodium nitromalonaldehyde monohydrate. **Org. Syntheses** IV, 844-845.

- FARMER S.G., TOGO J. (1990). Effects of epithelium removal on relaxation of airway smooth muscle induced by vasoactive intestinal peptide and electrical field stimulation. **Br. J. Pharmacol.** 100, 73-78.
- FAUCHERE J.L. (1986). Elements for the rational design of peptide drugs. **Adv. Drug Res.** 15, 29-69.
- FEWTRELL C.M.S., FOREMAN J.C., JORDAN C.C., OEHME P., RENNER H., STEWART J.M. (1982). The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in rat. **J. Physiol. (London)** 330, 393-411.
- FISHER J.T., ANDERSON J.W., WALDRON M.A. (1993). Nonadrenergic noncholinergic neurotransmitter of feline trachealis : VIP or nitric oxide? **J. Appl. Physiol.** 74, 31-39.
- FINDLAY J., ELIOPOULOS E. (1990). Three-dimensional modelling of G protein-linked receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 11, 492-499.
- FLAVAHAN N.A., AARRHUS L.L., RIMELE T.J., VANHOUTTE P.M. (1985). The respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. **J. Appl. Physiol.** 58, 834-838.
- FOOTE S.L., MORRISON J.H. (1987). Extrathalamic modulation of cortical function. **Ann. Rev. Neurosci.** 10, 67-95.
- FORSSMAN W.G., TRIEPEL J., DAFFNER C., CUEVAS P., NOBLE M.I.M., YANAIHARA N., HEYM CH. (1988). Vasoactive intestinal peptide in the heart. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 527, 405-420.
- FOURNIER A., SAUNDERS J.K., St PIERRE S. (1982). 400 MHz NMR study on C-terminal fragment 21-28 of vasoactive intestinal peptide. **Peptides** 3, 345-352.
- FOURNIER A., SAUNDERS J.K., St PIERRE S. (1984). Synthesis, conformational studies and biological activities of VIP and related fragments. **Peptides** 5, 169-177.
- FOURNIER A., SAUNDERS J.K., BOULANGER Y., St PIERRE S.A. (1988). Conformational analysis of vasoactive intestinal peptide and related fragments. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 527, 51-67.
- FROSSARD N., MULLER F. (1986). Epithelial modulation of tracheal smooth muscle responses to antigenic stimulation. **J. Appl. Physiol.** 61, 149-1156.

FROSSARD N., RHODEN K.J., BARNES P.J. (1989). Influence of tachykinins : role of endopeptidases and cyclooxygenases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 248, 292-298.

FRY D.C., MADISON U.S., BOLIN D.R., GREELEY D.N., TOOME V., WEGRZYNSKI B.B. (1989). Solution structure of an analogue of vasoactive intestinal peptide as determined by two-dimensional NMR and circular dichroism spectroscopies and constrained molecular dynamics. **Biochemistry** 28, 2399-2409.

GABORIAUD C., BISSERY V., BENCHETRIT T., MORNON J.P. (1987). Hydrophobic cluster analysis : an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. **FEBS Lett.** 224, 149-155.

GENIN M.J., GLEASON W.B., JOHNSON R.L. (1993). Design, synthesis, and X-ray crystallographic analysis of two novel spirolactam systems as β -turn mimics. **J. Org. Chem.** 58, 860-866.

GESPACH C., EMANI S., ROSSELIN G. (1984). Gastric inhibitory peptide (GIP), pancreatic glucagon and vasoactive intestinal peptide (VIP) are cAMP-inducing hormones in the human gastric cancer cell line HGT-1. Homologous desensitization of VIP receptor activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 120, 641-649.

GINSBERG A.L. (1978). The VIP controversy : S.R. Bloom vs. J.D. Gardner. **Dig. Dis.** 23, 370-376.

GLASER T., BESSON J., ROSSELIN G., HEMPRECHT B. (1983). Vasoactive intestinal polypeptide : presence in neuroblastoma x glioma hybrid cells. **Eur. J. Pharmacol.** 90, 121-123.

GNIDER J.R., CABLE M.B., BITAR K.N., SAID S.I., MAKHLOUF G.M. (1985). Vasoactive intestinal peptide. Relaxant transmitter in tenia coli of the guinea pig. **Gastroenterology** 89, 36-42.

GOETZL E.J., SREEDHARAN S.P., TURCK C.W., BRIDENBAUGH R., MALFROY B. (1989). Preferential cleavage of amino- and carboxy-terminal oligopeptides from vasoactive intestinal polypeptide by human recombinant enkephalinase (neutral endopeptidase (E.C. 3.4.24.11.)). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 158, 850-854.

GOLDEN A., BRUGGE J.S. (1988). The src oncogene. **The oncogene handbook**, 149-173.

GOLDIE R.G., PAPADIMITRIOU J.M., PATERSON W.J. (1986). Influence of the epithelium on responsiveness of guinea pig isolated trachea to contractile and relaxant agonists. **Br. J. Pharmacol.** 87, 5-14.

GOOSSENS J.F. (1990). Vasoactive intestinal peptide : notion d'adresse et de message. DEA des Sciences de la Vie et de la Santé (Lille I).

GOOSSENS J.F. (1991). Vasoactive intestinal peptide (VIP) : agent de différenciation du neuroblastome. Contribution à la recherche de molécules agonistes. Mastère en Drug Design (Lille II).

GOOSSENS J.F., POMMERY N., LOHEZ M., POMMERY J., HELBECQUE N., COTELLE P., LHERMITTE M., HENICHART J.P. (1992). Antagonist effect of a vasoactive intestinal peptide(1-11), on guinea pig trachea smooth muscle relaxation. **Mol. Pharmacol.** 41, 104-109.

GOOSSENS J.F., MANECHEZ D., POMMERY N., FORMSTECHEP P., HENICHART J.P. (1993). VIP potentiates retinoic-acid effect on tissue transglutaminase activity in human neuroblastoma, the SK-N-SH cells. **Neuropeptides** 24, 99-103.

GOOSSENS J.F., LEROUX F., POMMERY N., POMMERY J., HENICHART J.P. (1993). High-performance liquid chromatographic determination of 3',5' -AMP with fluorescence detection. -VIP-induced modification of its concentration in neuroblastoma cells.- **J. Chromatogr.** (soumis pour publication, août 93).

GOYAL R.K., RATTAN S., SAID S.I. (1980). VIP as a possible neurotransmitter of non adrenergic, non cholinergic inhibitory neurons. **Nature** 288, 378-380.

GOZES I. (1988). Biosynthesis and regulation of expression : the vasoactive intestinal peptide gene. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 527, 77-86.

GOZES I., BRENNEMAN D.E. (1989). VIP : molecular biology and neurobiological fonction. **Mol. Neurobiol.** 3, 201-205.

GOZES Y., BRENNEMAN D.E., FRIDKIN M., ASOFSKY R., GOZES I. (1991). A VIP antagonist distinguishes VIP-receptors on spinal cord cells and lymphocytes. **Brain Res.** 540, 319-321.

GREENBERG B., RHODEN K., BARNES P.J. (1987). Vasoactive intestinal peptide causes non-endothelial dependent relaxation in human and bovine pulmonary arteries. **Blood Vessels** 24, 45-50.

HACHISU M.T., HIRANUMA T., TANI S., ISUKA T. (1991). Enzymatic degradation of helodermine and vasoactive intestinal peptide. **J. Pharmacobio-dyn.** 14, 126-131.

HAFFKE S.C., SEADS N.W. (1975). Neuroblastoma : the E. Coli of neurobiology? **Life Sci.** 16, 1649-1657.

HAMASAKI Y., MOJARAD M., SAID S.I. (1983). Relaxant action of VIP on cat pulmonary artery : comparison with acetylcholine, isoproterenol and PGE₁. **J. Appl. Physiol.** 54, 1607-1611.

HAMY F. (1991). Eléments peptidiques de reconnaissance dans la structure de récepteurs nucléaires. Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé (Lille I).

HATAKEYAMA M., KONO T., KOBAYASHI N., KAWAHARA A., LEVIN S.D., PERLMUTTER R.M., TANIGUCHI T. (1991). Interaction of the IL-2 receptor with the src family kinase p56^{lck} : identification of novel intermolecular association. **Science** 252, 1523-1528.

HAUSSLER M., SIDELL N., KELLY M., DONALDSON C. (1983). Specific high-affinity binding and biologic action of retinoic acid in human neuroblastoma cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80, 5525-5529.

HAYAKAWA Y., OBATA K.I., ITOH N., YANAIHARA N., OKAMOTO H. (1984). Cyclic AMP regulation of pro-vasoactive intestinal peptide/PHM-27 synthesis in human neuroblastoma cells. **J. Biol. Chem.** 259, 9207-9211.

HIBERT M.F., TRUMPP-KALLMEYER S., BRUINVELS A., HOFLACK J. (1991). Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. **Mol. Pharmacol.** 40, 8-15.

HIBERT M.F., HOFLACK J., TRUMPP-KALLMEYER S., BRUINVELS A. (1993). Modèle tridimensionnel des récepteurs couplés aux protéines G. **médecine/sciences** 9, 31-40.

HILL J.M., FARRAR W.L., PERT C.B. (1986). Localization of the T4 antigen/AIDS virus receptor in monkey and rat brain : prominence in cortical regions. **Psychopharmacol. Bull.** 22, 686-689.

HOLST J.J., FAHRENKRUG J., KRUGHTSEN S., JENSEN S.L., SEIER POULSEN S., VAGN NIELSEN O. (1984). Vasoactive intestinal peptide (VIP) in the pig pancreas : role of VIPergic nerves in control of fluid and bicarbonate secretion. **Regul. Peptides** 8, 245-259.

- HONMA Y., TOKENAGA K., KASUKABE T., HOZUMI M. (1980). Induction of differentiation of cultured man promyelocytic leukemia cells by retinoids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 95, 507-512.
- HUNTER T., SEFTON B. (1978). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77, 1311-1315.
- HUNTER J.A., FINKBEINER W.E., NADEL J.A. (1985). Predominant generation of 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by epithelial cells from human trachea. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82, 4633-4637.
- ISHIHARA T., NAKAMURA S., KAZIRO Y., TAKAHASHI T., TAKAHASHI K., NAGATA S. (1991). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. **EMBO J.** 10, 1635-1641.
- ISHIHARA T., SHIGEMOTO R., MORI K., TAKAHASHI K., NAGATA S. (1992). Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. **Neuron** 8, 811-819.
- ITOH N., OKATA K., YANAIHARA N., OKAMOTO H. (1983). Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains novel PHI-27-like peptide, PHM27. **Nature** 304, 547-549.
- IZZO R.S., SCIPIONE R.A., PELLECCIA C., LOKCHANDER. R.S. (1991). Binding and internalization of VIP in rat intestinal epithelial cells. **Regul. Peptides** 33, 21-30.
- JONAS V., LIN C.R., KAWASHIMA E., SEMON D., SWANSON L.W., MERMOD J.J., EVANS R.M., ROSENFELD M.G. (1985). Alternative RNA processing events in human calcitonin/calcitonin gene-related peptide gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82, 1994-1998.
- KNITTEL J.J., SAWYER T.K., HRUBY V.J., HADLEY M.E. (1983). Structure/activity studies of highly potent cyclic [Cys⁴, Cys¹⁰] melanotropine analogues. **J. Med. Chem.** 26, 125-129.
- KOH S.W.M. (1989). Modulation of a 190-kD microtubule-associated protein in pigment epithelium by VIP. **Peptides** 10, 1089-1099.
- KOH S.W.M. (1991). Signal transduction through the vasoactive intestinal peptide receptor stimulates phosphorylation of the tyrosine kinase pp60^{c-src}. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 174, 452-458.

KOH S.W.M. (1992). The pp60^{c-src} in retinal pigment epithelium and its modulation by vasoactive intestinal peptide. *Cell. Biol. Int. Rep.* 16, 1003-1014.

KOH S.W.M., KANE G.J. (1992). VIP stimulates proliferation and differentiation of the cultured retinal epithelium with disparate potencies. *Cell. Biol. Int. Rep.* 16, 175-183.

KREJS G.J., FORDTRAN J.S., FAHRENKRUG J., SCHAFFALITZKY DE MUKADELL O., FISCHER J.E., HUMPHREY C.S., O'DORISIO T.M., SAID S.I., WALSH J.H., SHULKES A.A. (1980). Effect of VIP infusion on water and ion transport in the human jejunum. *Gastroenterology* 78, 722-727.

KREJS G.J. (1988). Effect of vasoactive intestinal peptide in man. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 527, 501-507.

LABURTHE M., COUVINEAU A. (1988). Molecular analysis of vasoactive intestinal peptide receptors. A comparison with receptors for VIP-related peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527, 296-313.

LABURTHE M., BREANT B., ROUYER-FESSARD C. (1984). Molecular identification of receptors for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelium by covalent cross-linking. *Eur. J. Biochem.* 139, 181-187.

LABURTHE M., PRIETO J.C., AMIRANOFF B., DUPONT C., HUI BON HOA D., ROSSELIN G. (1979). Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 2. Characterization and structural requirements of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3' : 5'-monophosphate. *Eur. J. Pharmacol.* 96, 239-248.

LACEY S.R., GRIBBLE T.J., HOSLOSKE A. M. (1989). Favorable prognosis of vasoactive intestinal peptide-secreting ganglioneuroblastoma. *Pediatr. Surg. Int.* 4, 217-219.

LACROIX A., LIGGMAN M.E. (1980). Binding of retinoids to human breast cancer cell lines and their effects on cell growth. *J. Clin. Invest.* 65, 586-591.

LAITINEN L.A., HEINO M., LAITINEN A., KARA T., HAAHTELA T. (1985). Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 599-606.

LANDO M., ABEMAYOR E., SIDELL N. (1989). In vitro effects of cyclic-AMP elevating agents and retinoic acid on the growth differentiation and cyclic AMP content of human neuroblastoma cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 30, 42.

LANDO M., ABEMAYOR E., VERITY M.A., SIDELL N. (1990). Modulation of intracellular cyclic adenosine monophosphate levels and the differentiation response of human neuroblastoma cells. **Cancer Res.** 50, 722-727.

LANE M.C., FAUCI A.S. (1985). Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. **Annu. Rev. Immunol.** 3, 477-500.

LARSSON L.I., FAHRENKRUG J., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL O.B., SUNDLER F., HAKANSON F., REHFELD J.F. (1976). Localisation of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73, 3197-3200.

LARSSON L.I., FAHRENKRUG J., HOLST J.J., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL O.B. (1978). Occurrences of nerves containing vasoactive intestinal peptide immuno reactivity in the male genital tract. **Life Sci.** 22, 773-780.

LAVERY I.C. (1984). The surgery of Hirschsprung disease. **Surg. Clin. North Am.** 63, 161-175.

LAZARUS S.C., BASBAUM C.P., BARNES P.J., GOLD W.N. (1986). cAMP immunocytochemistry provides evidence for functional VIP receptors in trachea. **Am. J. Physiol.** 251, C115-C119.

LEBOULENGER F., LEROUX P., TONON M.C., COY P.H., VAUDRY H., PELLETIER G. (1983). Coexistence of vasoactive intestinal peptide and enkephalins in the adrenal chromaffin granules of the frog. **Neurosci. Lett.** 37, 221-225.

LEMESLE-VARLOOT L., HENRISSAT B., GABORIAUD C., BISSERY V., MORGAT A., MORNON J.P. (1990). Hydrophobic cluster analysis : procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. **Biochimie** 72, 555-574.

LEROUX F. (1992). Analogues peptidiques du vasoactive intestinal peptide et différenciation des cellules de neuroblastomes. DEA des Sciences de la Vie et de la Santé (Lille I).

LEVINSON A.D., COUTNEIDGE S.A., BISHOP J.M. (1981). Structural and fonctionnal domains of the Rous sarcoma virus transforming protein (pp60^{c-src}). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78, 1624-1628.

LILLY C.M., MARTINS M.A., DRAZEN J.M. (1993). Peptidase modulation of vasoactive intestinal peptide pulmonary relaxation in tracheal superfused guinea pig lungs. **J. Clin. Invest.** 91, 235-243.

LIPTON S.A., KATER S.B. (1989). Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci.* 12, 265-270.

LIU L.W., SATA T., KUBOTA E., PAUL S., SAID S.I. (1987). Airway relaxant effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) : selective potentiation by phosphoramidon, an enkephalinase inhibitor. *Am. Rev. Resp. Dis.* 135, A86.

LONG R.G., BISHOP A.E., BARNES A.J., ALBUQUERQUE R.H., O'SHAUGHNESSY O.J., Mc GREGOR G.P., BANNISTER R., POLAK J.M., BLOOM S.R. (1980). Neural and hormonal peptides in rectal biopsy specimens from patients with Chagas's disease and chronic autonomic failure. *Lancet* 1, 559-562.

LONG R.G., BRYANT M.G., MITCHELL S.J., ADRIAN T.E., POLAKAND J.M., BLOOM S.R. (1981). Clinicopathological study of pancreatic and ganglioneuroblastoma tumors secreting vasoactive intestinal polypeptide (VIPomas). *Br. Med. J.* 282, 1767-1771.

LUIS J., MULLER J.M., ABADIE B., MARTIN J.M., MARVALDI J., PICHON J. (1986). Cycle of the vasoactive intestinal peptide and its binding site in a human adenocarcinoma cell line (HT29). *Eur. J. Biochem.* 156, 631-636.

LUNDBERG J.M. (1981). Evidence for coexistence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine in neurons of cat exocrine glands. *Acta Physiol. Scand.* 496, 1-57.

LUNDBERG J.M., ANGGARD A., FAHRENKRUG J., HOKFELT T., MUTT V. (1980). Vasoactive intestinal polypeptide in the cholinergic neurons of exocrine glands : functional significance of coexisting transmitters for vasodilatation and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1651-1655.

LUNDBERG J.M., HEDLUND B., BARTFAI T. (1982). Vasoactive intestinal peptide enhances muscarinic ligand binding in cat submandibular salivary gland. *Nature* 295, 147-149.

MAGISTRETTI P.J. (1986). VIP containing-neurons in the cerebral cortex : cellular actions and interaction with the noradrenergic system. In *Ionic channels in neural membranes*. J.M. RICHIE, R.D. KEYNES, C.L. BOLIS, Eds. Alan R. Liss. Inc. New York, 323-331.

MAGISTRETTI P.J., MORRISON J.H., SHOEMAKER W.J., SAPIN V., BLOOM F.E. (1981). Vasoactive intestinal peptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices : a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6535-6539.

- MAGISTRETTI P.J., SCHORDERET M. (1984). VIP and noradrenaline act synergistically to increase cyclic AMP in cerebral cortex. *Nature* 308, 280-282.
- MALHOTRA R.K., WAKADA T.D., WAKADA A.R. (1989). Cross communication between acetylcholine and VIP in controlling catecholamine secretion by affecting cAMP, inositol Triphosphate, protein Kinase C, and calcium in rat adrenal medulla. *J. Neurosci.* 9, 4151-4157.
- MANNING M.C., WOODY R.W. (1986). Molecular orbital calculations on the oligopeptides netropsin, distamycin and related compounds. *Biopolymers* 25, 2065-2082.
- MARVALDI J., LUIS J., MULLER J.M., EL BATTARI A., FANTINI J., MARTIN J.M., ABADIE B., TIRARD A., PICHON J. (1986). Characterization of the vasoactive intestinal peptide (VIP) binding sites : A biochemical and an immunological approach. *Peptides* 7 (suppl. 1), 137-145.
- MATSUDA M., MAYER B.J., FUKUI Y., HANAFUSA H. (1990). Binding of transforming protein p47^{gag-crk} to a broad range of phosphotyrosine containing proteins. *Science* 248, 1537-1539.
- MATSUNAGA T., TAKAHASHI H., OHNUMA N., TANABE M., YOSHIDA H., IWAI J., SHIRASAWA H., SIMIZU B. (1991). Expression of *N-myc* and *c-src* protooncogenes correlating to the undifferentiated phenotype and prognosis of primary neuroblastomas. *Cancer Res.* 51, 3148-3152.
- MELINO G., FARRACE M.G., CERN M.P., PIACENTINI M. (1988). Correlation between transglutaminase activity and polyamine levels in human neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.* 179, 429-445.
- MICHALKIEWICZ M., HUFFMAN L.J., HEDGE G.A. (1991). Lack of effect of vasoactive intestinal peptide antagonist on blood flow in the rat thyroid. *Peptides* 12, 1181-1186.
- MILNER-WHITE J. (1989). Predicting the biologically active conformation of short polypeptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 70-74.
- MISBIN R.I., WOLFE M.M., MORRIS P., BUYNITZKY S.J., GUIGEN J.E. (1982). Uptake of vasoactive intestinal peptide by rat liver. *Am. J. Physiol.* 243, G103-G111.
- MORICE A., UNWIN R.J., SEVER P.S. (1983). Vasoactive intestinal peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Lancet* 2, 1225-1226.

MORODER L., JAEGER E., DREES F, GEMEINER M., KNOF S., STELZEL H.P., THAMM P., BATAILLE D., DOMSCHKE S., SCHLEGEL W., SCHULZ I., WÜNSCH E. (1980). Structure-function studies on gastrointestinal hormones. **Bioorg. Chem.** 9, 27-54.

MORRISON J.H., GRZANNA H.R., MOLLIVER M., COYLE J.T. (1978). The distribution and orientation of noradrenergic fibers in neocortex of the rat : An immunofluorescence study. **J. Comp. Neurol.** 181, 17-40.

MORRISON J.H., MAGISTRETTI P.J., BENOIT R., BLOOM F.E. (1984). The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP-positive cell : an immunohistochemical analysis. **Brain Res.** 292, 269-282.

MULLER J.M., LUIS J., FANTINI J., ABADIE B., GIANNELLINI F., MARVALDI J., PICHON J. (1985). Covalent cross-linking of vasoactive intestinal peptide (VIP) to its receptor in intact colonic adenocarcinoma cell in culture (HT-29). **Eur. J. Biochem.** 151, 411-417.

MULLER J.M., LOLAIT S.J., YU V.C., SADEE W., WASCHEK J.A. (1989). Functional vasoactive intestinal polypeptide (VIP) receptors in human neuroblastoma subclones that contain VIP precursor mRNA and release VIP-like substances. **J. Biol. Chem.** 264, 3647-3650.

MUSSO G.F., PATTHI S., RYSKAMP T.C., PROVOW S., KAISER E.T., VELICELEBI G. (1988). Development of helix based vasoactive intestinal peptide analogues : identification of residues required for receptor interaction. **Biochemistry** 27, 8174-8181.

MUTT V. (1988). Vasoactive intestinal polypeptide and related peptides. Isolation and chemistry. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 527, 1-19.

MUTT V., SAID S.I. (1974). Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. **Eur. J. Biochem.** 42, 582-589.

NADEL J.A., BARNES P.J. (1984). Autonomic regulation of the airways. **Ann. Rev. Med.** 35, 451-467.

NATHANSON I., WIDDICOMBE J.H., BARNES P.J. (1983). Effect of vasoactive intestinal peptide on ion transport across dog tracheal epithelium. **J. Appl. Physiol.** 55, 1844-1848.

NGUYEN T.D., WILLIAMS J.A., GRAY G.M. (1986). Vasoactive intestinal peptide receptor on liver plasma membranes : Characterization as a glycoprotein. **Biochemistry** 25, 361-368.

NILSSON A. (1974). Isolation, amino acid composition and terminal amino acid residues of the vasoactive octacosapeptide from chicken intestine. Partial purification of chicken secretin. **FEBS Lett.** 47, 284-289.

NOVOTNY J., AUFRAY C. (1984). A program for prediction of protein secondary structure from nucleotide sequence data : application to histocompatibility antigens. **Nucleic Acids Res.** 12, 243-255.

O'DONNELL M., GARIPPA R.J., O'NEILL N.C., BOLIN D.R., COTRELL J.M. (1991). Structure-activity studies of vasoactive intestinal peptide. **J. Biol. Chem.** 266, 6389-6392.

O'DORISIO M.S., FLESHMAN D.J., QUALMAN S.J., O'DORISIO T.M. (1992). Vasoactive intestinal peptide : autocrine growth factor in neuroblastoma. **Regul. Peptides** 37, 213-226.

OBATA K.I., ITOH N., OKAMOTO H., YANAIHARA C., YANAIHARA N., SUZUKI T. (1981). Identification and processing of biosynthetic precursors to vasoactive intestinal peptide in human neuroblastoma cells. **FEBS Lett.** 136, 123-126.

OETTLING G., BRUCHELT G., LOHMANN F., TEUFEL M., NIETHAMMER D., TREUNER J., DREWS U. (1990). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) induces calcium mobilization in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. **Cancer Lett.** 50, 203-207.

OHSAWA K., HAYAKAWA Y., NISHIZAWA M., YAMAGAMI T., YAMAMOTO H., YANAIHARA N., OKAMOTO H. (1985). Synergistic stimulation of VIP/PHM-27 gene expression by cyclic AMP and phorbol esters in human neuroblastoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 132, 885-891.

OLASMARA M., PAHLMAN S., TERENIUS L. (1987). β adrenoreceptor, vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide tyrosine receptors functionally coupled to adenylate cyclase in the human neuroblastoma SK-N-MC cell line. **Neurosci. Lett.** 83, 161-166.

OLIVA D., VALLAR L., GIANNATTASIO G., SPADA A., NICOSIA S. (1984). Combined effects of vasoactive intestinal peptide and dopamine on adenylate cyclase in prolactin-secreting cells. **Peptides** 5, 1067-1070.

OLLERENSHAW S., JARVIS D., WOOLCOCK A., SULLIVAN C., SCHEIBNER T. (1989). Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma. **N. Engl. J. Med.** 320, 1244-1248.

OTTAWAY C.A. (1985). Evidence for local neuromodulation of T cell migration in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.* 186, 637-645.

OTTAWAY C.A. (1992). Role of sulfhydryl groups in the binding of vasoactive intestinal peptide to its receptor on murine lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 39, 49-56.

OTTAWAY C.A., GREENBERG G.R. (1984). Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes : specific binding and the modulation of mitogen responses. *J. Immunol.* 132, 417-423.

OTTESEN B., LARSEN J.J., FAHRENKRUG J., STJERNQUIST M., SUNDLER F. (1981). Distribution and motor effect of VIP in female genital tract. *Am. J. Physiol.* 240, E32-E36.

PACHTER J.A., MAN-KIT LAM D. (1986). Interactions between vasoactive intestinal peptide and dopamine in the rabbit retina stimulation of a common adenylate cyclase. *J. Neurochem.* 46, 257-264.

PAHLMAN S., ODELSTAD L., GROTTÉ G., NILSSON K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int. J. Cancer* 28, 583-589.

PAHLMAN S., RUUSALA A.-I., ABRAHAMSSON L., MATTSSON M. E. K., ESSCHER T. (1984). Retinoic-acid induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells : a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell. Differ.* 14, 135-144.

PALMER J.B., SAMPSON A.P., BARNES P.J. (1985). Cholinergic and non-adrenergic inhibitory responses in bovine airways : distribution and functional association. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, A282.

PALMER J.B., CUSS F.M.C., BARNES P.J. (1986a). VIP and PHM and their role in non-adrenergic inhibitory responses in isolated human airways. *J. Appl. Physiol.* 61, 1322-1328.

PALMER J.B., CUSS F.M.C., WARREN J.B., BARNES P.J. (1986b). The effect of infused vasoactive intestinal peptide on airway function in normal subjects. *Thorax* 41, 663-666.

PATACCHINI R., QUARTARA L., ROVERO P., GOSO C., MAGGI C.A. (1993). Role of the C-terminal amidation on the biological activity of neurokinin A derivatives with agonist and antagonist properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 17-21.

- PAVELIC K., SPAVENTI S. (1987). Nerve growth factor induced differentiation of human neuroblastoma cells. *Int. J. Biochem.* 19, 1237-1240.
- PAYAN D.B., BREWSTER D.R., MISSIRIAN-BASTIAN A., GOETZL E.J. (1984). Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 74, 1532-1539.
- PAYAN D.B., GOETZL E.J. (1985). Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.* 135, 783s-786s.
- PEATFIELD A.C., BARNES P.J., BRATCHER C., NADEL J.A., DAVIS B. (1983). Vasoactive intestinal peptide stimulates tracheal submucosal gland secretion in ferret. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 89-93.
- PENCE J.C., SHORTER N.A. (1990). In vitro differentiation of human neuroblastoma cells caused by vasoactive intestinal peptide. *Cancer Res.* 50, 5177-5183.
- PENCE J.C., SHORTER N.A. (1993). The autocrine function of vasoactive intestinal peptide on human neuroblastoma cell growth and differentiation. *Arch. Surg.* 128, 591-595.
- PEREZ-POLO J.R., TIFFANY-CASTIGLIONI E., ZIEGLER M.G., WERRBACH-PEREZ K. (1982). Effect of nerve growth factor on catecholamine metabolism in a human neuroblastoma clone (SY-5Y). *Dev. Neurosci.* 5, 418-423.
- PERT C.B., HILL J.M., RUFF R.F., BERGMAN R.M., ROBEY W.G., ARTHUR L.O., RUSCETTI F.W., FARRAR W.L. (1986). Octapeptides deduced from the neuropeptide receptor-like pattern of antigen T₄ in brain potently inhibit human immunodeficiency virus receptor binding and T-cell infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9254-9258.
- PETERS A., KIMERER L.M. (1981). Bipolar neurons in rat visual cortex : a combined Golgi-electron microscope study. *J. Neurocytol.* 10, 921-946.
- PIACENTINI M., FESUS L., FARRACE M.G., GHIBELLI L., PIREDDA L., MELINO G. (1991). The expression of 'tissue' transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur. J. Cell Biol.* 54, 246-254.
- PICONE D., TEMUSSI P.A., MARASTONI M., TOMATIS R., MOTTA A. (1988). A 500 MHz study of peptide T in a DMSO solution. *FEBS Lett.* 231, 159-163.

- PINCUS D.W., DICICCO-BLOOM E.M., BLACK I.B. (1990). Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature* 343, 564-567.
- POWER R.F., BISHOP A.E., WHARTON J., INYAMA C.O., JACKSON R.H., BLOOM S.R., POLAK J.M. (1988). Anatomical distribution of vasoactive intestinal peptide binding sites in peripheral tissues investigated by in vitro autoradiography. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527, 314-325.
- PRASAD K.N. (1975). Differentiation of neuroblastoma cells in culture. *Biol. Rev.* 50, 129-165.
- PRASAD K.N., KUMAR S. (1975). Role of cyclic AMP in differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Cancer* 36, 1338-1343.
- PRIETO J.C., LABURTHE M., ROSSELIN G. (1979). Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 1. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 96, 229-237.
- PRUSS R.M., MOSKAL J.R., EIDEN L.E., BEINFELD M.C. (1985). Specific regulation of vasoactive intestinal peptide biosynthesis by phorbol ester in bovin chromaffin cells. *Endocrinology* 117, 1020-1026.
- QUILLIAM L.A., DOBSON P.R.M., BROWN B.L. (1985). Modulation of cyclic AMP accumulation of GH₃ cells by a phorbol ester and thyroliberin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 898-903.
- RAEBURN D., HAY D.W., FARMER S.G., FEDAN J.S. (1986). Epithelium removal increases the reactivity of human isolated tracheal muscle to methacholine and reduces the effect of verapamil. *Eur. J. Pharmacol.* 123, 451-453.
- RAID A.M., SHULKES A., TITCHEN D.A. (1985). Gastric and intestinal release of vasoactive intestinal polypeptide in the milk-fed lamb. *Regul. Peptides* 12, 43-50.
- RICHARDSON J.B. (1979). Nerve supply to the lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119, 785-802.
- RICHARDSON J.B. (1981). Nonadrenergic inhibitory innervation of the lung. *Lung* 159, 315-322.

ROBBERECHT P., CHATELAIN P., DE NEEF P., CAMUS J.C., WAELBROECK M., CHRISTOPHE J. (1981). Presence of vasoactive intestinal peptide receptors coupled to adenylate cyclase in rat lung membranes. **Biochim. Biophys. Acta** 678, 76-82.

ROBBERECHT P., WAELBROECK M., CAMUS J.C., DE NEEF P., CHRISTOPHE J. (1984). Importance of disulfide bonds in receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin in rat pancreatic plasma membranes. **Biochem. Biophys. Acta** 773, 271-278.

ROBBERECHT P., COY D., DE NEEF P., CAMUS J.C., CAUVIN A., WAELBROECK M., CHRISTOPHE J. (1986a). Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) and N-terminally modified VIP analogs with rat pancreatic hepatic and pituitary membranes. **Eur. J. Biochem.** 159, 45-49.

ROBBERECHT P., WAELBROECK M., COY D., DE NEEF P., CAMUS J.C., CHRISTOPHE J. (1986b). Comparative structural requirements of thirty GRF analogs for occupancy of GRF- and VIP-receptors and coupling to adenylate cyclase in rat adenopituitary, liver and pancreas. **Peptides** 7 (Suppl. 1), 53-59.

ROBBERECHT P., COY D., DE NEEF P., CAMUS J.C., CAUVIN A., WAELBROECK M., CHRISTOPHE J. (1987). [DPhe⁴]-peptide histidine isoleucinamide ([DPhe⁴]-PHI), a highly selective vasoactive intestinal peptide (VIP) agonist, discriminates VIP-preferring from secretin-preferring receptors in rat pancreatic membranes. **Eur. J. Biochem.** 165, 243-249.

ROBBERECHT P., DE NEEF P., WAELBROECK M., TASTENOY M., CHRISTOPHE J. (1989). VIP and related peptides induced rapid homologous desensitization in the human lymphoma SUP T1 cell line. **Peptides** 10, 441-446.

ROBBERECHT P., GOURLET P., DE NEEF P., WOUSSEN-COLLE M.C., VANDERMEERS-PIRET M.C., VANDERMEERS A., CHRISTOPHE J. (1992). Structural requirements for the occupancy of PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes : discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. **Eur. J. Biochem.** 207, 239-346.

ROLA-PLESZCZYNSKI M , BOLDUC D., St PIERRE S. (1985). The effects of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cell function. **J. Immunol.** 135, 350-354.

ROQUES B.P., GARBAY-JAUREGUIBERRY C., BAJUSZ S., MAIGRET B. (1980). Studies of the conformational behaviour and preferential interactions with opiate receptors of the cis and trans forms of [D Met², Pro⁵] enkephalinamide by ¹H and ¹³C NMR theoretical calculations and ¹³C relaxation measurements. **Eur. J. Biochem.** 113, 105-119.

RORSTAD O.P., WANKE I., COY D.H., FOURNIER A., HUANG M. (1990). Selectivity for binding of peptide analogs to vascular receptors for vasoactive intestinal peptide. *Mol. Pharmacol.* 37, 971-977.

ROSSELIN G., ANTEUNIS A., ASTESANO A., BOISSARD C., GALI P., HEJBLUM G., MARIE J.C. (1988). Regulation of the vasoactive intestinal peptide receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527, 220-237.

ROTH B.L., BEINFELD M.C., HOWLETT A.C. (1984). Secretin receptors on neuroblastoma cell membranes : characterization with cell ¹²⁵I-labeled secretin binding and association with adenylate cyclase. *J. Neurochem.* 42, 1145-1152.

ROTH L.B., BEINFELD M.B. (1985). The postnatal development of VIP binding sites in rat forebrain and hindbrain. *Peptides* 6, 27-30.

RUFF M.R., MARTIN B.M., GINNS E.I., FARRAR W.L., PERT C.B. (1987). CD₄ receptor binding peptides that block HIV infectivity cause human monocyte chemotaxis. *FEBS Lett.* 211, 17-22.

SACERDOTE P., RUFF M.R., PERT C.B. (1988). VIP₁₋₁₂ is a ligand for the CD₄/human immunodeficiency virus receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527, 574-578.

SAID S.I. (1982). Vasoactive peptides in the lung, with special reference to vasoactive intestinal peptide. *Exp. Lung Res.* 3, 343-348.

SAID S.I. (1984). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) : current status. *Peptides* 5, 143-150.

SAID S.I. (1989). Vasoactive intestinal polypeptide and asthma. *N. Engl. J. Med.* 320, 1271-1273.

SAID S.I., MUTT V. (1970) Polypeptide with broad biological activity : isolation from small intestine. *Science* 169, 1217-1218.

SAID S.I., FALOONA G. (1975). Elevated plasma levels of VIP in the watery diarrhea syndrome due to pancreatic, bronchogenic and other tumors. *N. Engl. J. Med.* 293, 155-160.

SAUSVILLE E., CARNEY D., BATTEY J. (1985). The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J. Biol. Chem.* 260, 10236-10241.



SCATCHARD G. (1949). Attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.

SCHEBALIN M., SAID S.I., MAKHLOUF G.M. (1977). Stimulation of insulin and glucagon secretion by vasoactive intestinal peptide. *Am. J. Physiol.* 232, E197-E200.

SEEGER R.C., RAYNER S.A., BANERJEE A., CHUNG H., LANG W.E., NEUSTEIN H.B., BENEDICT W.F. (1977). Morphology, growth chromosomal pattern, and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 37, 1364-1371.

SHORT J.M., WYNSHAW-BORIS A., SHORT H.P., HANSON R.W. (1986). Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. Identification of cAMP and glucocorticoid regulatory domains. *J. Biol. Chem.* 261, 9721-9726.

SIBLEY D.R., LEFKOWITZ R.J. (1985). Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature* 317, 124-129.

SIDELL N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 68, 589-593.

SIDELL N., HORN R. (1985). Properties of human neuroblastoma cells following induction by retinoic acid. In *Advances in neuroblastoma research*. A.E. EVANS, G.J. D'ANGIO, R.C. SEEGER, Eds. Alan R. Liss. New York, 39-53.

SINGH I.N., SORRENTINO G., Mc CARTNEY D.G., MASSARELLI R., KANFER J.N. (1990). Enzymatic activities during differentiation of the human neuroblastoma cells, LA-N-1 and LA-N-2. *J. Neurosci. Res.* 25, 476-485.

SMITHERMAN T.C., SAKIO H., GEUMEI A.M., YOSHIDA T., OYAMADA M., SAID S.I. (1982). Coronary vasodilator action of VIP. In *Vasoactive Intestinal Peptide*. S.I. SAID, Ed. Raven Press. NEW YORK, 169-176.

SMITHERMAN T.C., SAID S.I., KREJS G.J., DREHMER G.J. (1986). Coronary vasodilator action of vasoactive intestinal peptide in man. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34, 212A.

SREEDHARAN S.P., PATEL D.R., HUANG .X., GOETZL E.J. (1993). Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 546-553.

STANISZ A.M., BEFUS D., BIENENSTOCK J. (1986). Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol.* 136, 152-156.

STAUN-OLSEN P., OTTESEN B., BARTELS P.D., NIELSEN M.H., GAMMELTOFT S., FAHRENKRUG J. (1982). Receptors of vasoactive intestinal polypeptide on isolated synaptosomes from rat cerebral cortex. Heterogeneity of binding and desensitization of receptors. *J. Neurochem.* 39, 1242-1251.

STUART-SMITH K., VANHOUTTE P.M. (1987). Heterogeneity in the effects of epithelium removal in the canine bronchial tree. *J. Appl. Physiol.* 63, 2510-2515.

SUNDLER F., EKBLAD E., GRUNDITZ T., HAKANSON R., UDDMAN R. (1988). Vasoactive intestinal peptide in the peripheral nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 527, 143-167.

SUZUKI M. (1989). SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J.* 8, 797-804.

SYBYL de TRIPOS ASSOCIATES, Inc., Filiale d'EVANS ET SUTHERLAND, 1699 S. Hanley road, suite 303, St LOUIS (MISSOURI), MI 63144, USA.

TAM E.K., FRANCONI G.M., NADEL J.A., CAUGHEY G.H. (1990). Protease inhibitors potentiate smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in isolated human bronchi. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2, 449-452.

TAYLOR C.W. (1990). The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem J.* 272, 1-13.

THIELE C.J., REYNOLDS C.P., ISRAEL M.A. (1985). Decrease expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404-406.

THIELE C.J., DEUTSCH L.A., ISRAEL M.A. (1988). The expression of multiple protooncogenes is differentially regulated during retinoic acid induced maturation of human neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 3, 281-288.

TISCHLER A.S., LEE Y.C., PERLMAN R.L., COSTAPOULOS D., SLAYTON V.W., BLOOM S.R. (1984). Production of "ectopic" vasoactive intestinal peptide-like and

neurotensin-like immunoreactivity in human pheochromocytoma cell cultures. *J. Neurosci.* **4**, 1398-1404.

TISCHLER A.S., LEE Y.C., PERLMAN R.L., COSTAPOULOS D., BLOOM S.R. (1985). Production of "ectopic" vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in normal human chromaffin cell cultures. *Life Sci.* **37**, 1881-1886.

TSCHIRHART E., BERTRAND C. (1988). Médiateurs endothéliaux et épithéliaux : régulation paracrine des muscles lisses. Pharmacologie moléculaire. Mécanisme d'action des médicaments. Y. LANDRY, J.P. GIES, Eds. *Med. Scien.* **28**, 535-544.

TSCHIRCHART E., FROSSARD N., BERTRAND C., LANDRY Y. (1987). Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **243**, 310-313.

TSUTO T., OKAMURA H., FUKUI K., OBATA H.L., TERUBAYASHI H., IWAY N., MEJIMA S., YENAIHARA N., IBATA Y. (1982). An immunohistochemical investigation of vasoactive intestinal peptide in the colon of patients with Hirschsprung's disease. *Neurosci. Lett.* **34**, 57-62.

TUMILOWICZ J.J., NICHOLS W.W., CHOLON J.J., GREENE A.E. (1970). Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastome. *Cancer Res.* **30**, 2110-2118.

TURCHIN K.F., GROKHOVSKY S.L., ZHUZE A.L., GOTTIKH B.P. (1977). DNA base pair specific ligands. II. Studies of distamycin A chromophore stereochemistry by ¹H-NMR spectroscopy. *Bioorgan. Khim.* **4**, 1065-1077 (*Chem. Abstr.* (1978) **89**, 179107c).

TURNER J.T., JONES S.B., BYLUND D.B. (1986). A fragment of vasoactive intestinal peptide, VIP(10-28), is an antagonist of VIP in the colon carcinoma cell line, HT 29. *Peptides* **7**, 849-854.

UNWIN R.J., CALAM J., PEART W.S. (1982). VIPoma and watery diarrhea. *New Engl. J. Med.* **307**, 377-378.

VANDERMEERS A., VANDENBORRE S., HOU X., DE NEEF P., ROBBERECHT P., VANDERMEERS-PIRET M.C., CHRISTOPHE J. (1992). Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur. J. Biochem.* **208**, 815-823.

VAN VALEN F., JURGENS H., WINKELMANN W., KECK E. (1989). Vasoactive intestinal peptide receptor regulation of cAMP accumulation and glycogene hydrolysis in the human Ewing's sarcoma cell line WE-68. *Cellular Signalling* **1**, 435-446.

VASILOFF J., O'DORISIO M.S., CAMPOLITO L.B., BRESNAHAN J.C., BEATTIE M.S., O'DORISIO T.M. (1986). Vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat brain : characterization by binding and covalent cross-linking. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **461**, 172.

VEBER D.F., HOLLY F.W., PALEVEDA W.J., NUTT R.F., BERGSTRAND S.I., TOCHIANA M., GLITZER M.S., SAPERSTEIN R. (1979). Highly active cyclic and bicyclic somatostatine analogues of reduced ring size. *Nature* **280**, 512-514.

VERNER J.V., MORRISON A.B. (1958). Islet cell tumor and a syndrome of refractory watery diarrhea and hypokaliema. *Am. J. Med.* **25**, 374-380.

VOSKAMP D., KRANENBURG P., BEYERMAN H.C. (1982). The role of histidine in the gastrointestinal hormon secretin. *Recueil. J. R. Netherlands Chem. Soc.* **101**, 393-396.

WALTERS E.H., O'BYRNE P.M., FABBRI L.M. (1984). Control of neurotransmission by prostaglandins in canin trachealis smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* **57**, 129-134.

WASCHEK J.A., PRUSS R.M., SIEGLE R.E., EIDEN L.E., BADER M.F., AUNIS D. (1987). Regulation of enkephalin, VIP and chromagranin biosynthesis in actively secreting chromaffin cells : Multiple strategies for multiple peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **493**, 308-323.

WASCHEK J.A., MULLER J.M., DUAN D.S., SADEE W. (1989). Retinoic acid enhances VIP receptor expression and responsiveness in human neuroblastoma cell, SH-SY-5Y. *FEBS Lett.* **250**, 611-614.

WEBBER S.E., WIDDICOMBE J. G. (1987). The effect of vasoactive intestinal peptide on smooth muscle tone and mucus secretion from the ferret trachea. *Br. J. Pharmacol.* **91**, 139-148.

WEIHE E., REINECKE M., FORSSMAN W.G. (1984). Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart. Interrelation with neurotensin- and substance P-like immunoreactive nerves. *Cell Tissue Res.* **236**, 527-540.

- WEISS S., SEBBEN M., GARCIA-SAINZ J.A., BOCKAERT J. (1985). D₂-dopamine receptor-mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture. **Mol. Pharmacol.** 27, 595-599.
- WETLAUFER D.B., RISTOW S. (1973). Acquisition of three-dimensional structure of proteins. **Ann. Rev. Biochem.** 42, 135-158.
- WIJK P. (1989). Vasoactive intestinal peptide inhibits the respiratory burst by cyclic AMP-mediated mechanism. **Regul. Peptides** 25, 187-197.
- WIJK P., OPSTAD P.K., BOYUM A. (1985). Binding of vasoactive intestinal polypeptide by human blood monocytes : demonstration of specific binding sites. **Regul. Peptides** 12, 145-153.
- WILLIAMS B.J., CURTIS N.R., MCKNIGHT A.T., MAGUIRE J.J., YONG S.C., VEBER D.F., BAKER R. (1993). Cyclic peptides as selective tachykinin antagonists. **J. Med. Chem.** 36, 2-10.
- WILLIAMS L.T., LEFKOWITZ R.J. (1977). Slowly reversible binding of catecholamine to a nucleotide sensitive state of the β -adrenergic receptor **J. Biol. Chem.** 252, 7207-7213.
- WOLFE M.M., MISBIN R.I., GARDNER D.F., Mc GUIGAN J.E. (1983). Enteric release of vasoactive intestinal peptide after a peptone meal in the dog. **Regul. Peptides** 5, 103-109.
- WOOD C.L., O'DORISIO M.S. (1985). Covalent cross-linking of vasoactive intestinal polypeptide to its receptor on intact human lymphoblasts. **J. Biol. Chem.** 260, 1243-1247.
- WOOD C.L., O'DORISIO M.S., VASSALO L.M., MALARKEY W.B., O'DORISIO T.M. (1985). Vasoactive intestinal peptide effects on GH₃ pituitary tumor cells : high affinity binding, affinity labeling, and adenylate cyclase stimulation. Comparison with peptide histidine isoleucine and growth hormone releasing factor. **Regul. Peptides** 12, 237-248.
- WU H., REYNOLDS A.B., KANNER S.B., VINES R.R., PARSONS J.T. (1991). Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60^{src} substrate. **Mol. Cell. Biol.** 11, 5113-5124.
- WU R. (1986). *In vitro* differentiation of airways epithelial cells. *In vitro models of respiratory epithelium*. L.J. Schiff, Ed. CRC Press. 1-24.

WYBRAN J., APPLEBOOM T., FAMAHEY J., GOVAERTS A. (1979). Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephaline on normal human blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 123, 1068-1070.

YAMAGAMI T., OHSAWA K., NISHIZAWA M., INOUE C., GOTOH E., YANAIHARA N., YAMAMOTO H., OKAMOTO H. (1988). Complete nucleotide sequence of human vasoactive intestinal peptide/PHM-27 and its inducible promoter. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 527, 87-102.

YANAIHARA N., NOKIHARA K., YANAIHARA C., IWANAGA T., FUJITA T. (1983). Immunocytochemical demonstration of PHI and its coexistence with VIP in intestinal nerves of the rat and pig. *Arch. Histol. Jpn* 46, 575-581.

ABSTRACT

Nowadays, the design of heterocyclic molecules able to mimic a peptide structure represent a very important field for research. The elaboration of new compounds, based on conformation and molecular modelling studies, can be used to show the role of certain functionalities in molecules required for the binding and/or the biological activity of this drug.

The vasoactive intestinal peptide (VIP) belongs to a family of neuromediators with neuromodulative activities relevant to numerous physiological processes. Due to its peptide structure, VIP is rapidly degraded in vivo by various peptidases; in certain pathologies, such as asthma, an over-degradation of the VIP may contribute to the physiological disorder. Two pharmacological models have been considered in this work to study the activity of the peptide. The models of the neuroblastoma and the guinea pig trachea were used to study the VIP receptor heterogeneity and the peptide-induced transduction systems.

In parallel, the N-terminal part of the VIP was studied at the molecular level both from a theoretical (algorithms, molecular modelling) and practical (CD and NMR spectroscopy) point of view. This approach led to the design and synthesis of molecular structures (Pyrrolidinone and pyrrol derivatives) which mimic part of the conformation of the VIP N-terminal moiety.

The results obtained with the neuroblastoma cells SK-N-SH and LA-N-2 showed that an ordered and rigid bis-pyrrol structure, N-substitued with a benzyl group, can partially mimic the VIP N-terminal peptide sequence.

