



ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DU GLUCAGON-LIKE PEPTIDE ET DE SON RECEPTEUR. OPTIQUE D'UNE NOUVELLE THERAPEUTIQUE POUR LE DIABETE DE TYPE II

Cyril Sarrauste de Menthère

► To cite this version:

Cyril Sarrauste de Menthère. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DU GLUCAGON-LIKE PEPTIDE ET DE SON RECEPTEUR. OPTIQUE D'UNE NOUVELLE THERAPEUTIQUE POUR LE DIABETE DE TYPE II. Biochimie [q-bio.BM]. Université Montpellier I, 1999. Français. NNT: . tel-00003484

HAL Id: tel-00003484

<https://theses.hal.science/tel-00003484>

Submitted on 4 Oct 2003

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER I

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DU GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 ET DE SON RECEPTEUR.

OPTIQUE D'UNE NOUVELLE THERAPEUTIQUE POUR LE DIABETE DE TYPE II.

Thèse présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

ECOLE DOCTORALE : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS²)

FORMATION DOCTORALE : Interface Chimie-Biologie :
 Systèmes Moléculaires à Visée Thérapeutique.

N° DISCIPLINE : 50

N° DE SECTION DU CNU : 44

SPECIALITE : Biochimie.

PAR

M. Cyril Sarrauste de Menthère

soutenue le 5 novembre 1999 devant le jury composé de :

M. Bernard Calas	Directeur de Recherche CNRS, Montpellier	Directeur de thèse
M. Gérard Grassy	Professeur à l'Université Montpellier I	Président
M. Alain Kervran	Directeur de Recherche CNRS, Montpellier	Examineur
M. Alain Ktorza	Professeur à l'Université Paris 7	Rapporteur
M. Bruno Pfeiffer	Société ADIR, Courbevoie	Examineur
M. Pierre Renard	Société ADIR, Courbevoie	Rapporteur

Dans la perspective de trouver de nouvelles thérapies dans le traitement du diabète de type II, non insulino-dépendant, le Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) constitue un excellent candidat. Si son mécanisme d'action est bien connu, il reste toutefois à résoudre de grands problèmes fondamentaux, avant de le substituer aux molécules utilisées pour une telle pathologie. En particulier, la compréhension de la liaison du GLP-1 à son récepteur demeure un point crucial. Une meilleure connaissance des structures du ligand et du récepteur sont nécessaires. De plus, ce peptide ne peut être utilisé dans sa forme native, dû à une inactivation rapide par les protéases.

Pour essayer d'augmenter la stabilité du peptide, et en tenant compte des positions clés définies dans la littérature, plusieurs analogues du GLP-1-(7-37) sont conçus, et synthétisés. Ils possèdent principalement des pharmacomodulations au niveau de la partie N-terminale. Des substitutions sont également réalisées dans la partie centrale du peptide, permettant de vérifier certaines hypothèses concernant sa conformation. Considérant les résultats de liaison et d'efficacité *in vitro*, certains analogues sont sélectionnés pour des études *in vivo* d'activité et de stabilité métabolique. Le [a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37) se distingue des autres tant par sa grande stabilité que son efficacité, supérieure à la molécule native. Ce composé est en phase de développement pré-clinique.

Parallèlement, la conformation de chaque analogue est étudiée (CD, IR) et ainsi, confrontée aux résultats *in vitro*, il est possible de proposer une conformation bioactive.

Enfin, pour appréhender plus en avant les mécanismes de liaison du peptide avec son récepteur spécifique, la modélisation moléculaire du récepteur fait ressortir quelques hypothèses quant à la localisation probable de l'interaction hormone-récepteur. Des analyses biophysiques et la synthèse de fragments du récepteur, ont permis d'étayer de telles hypothèses.

Mots-clés : Glucagon-like peptide-1, GLP-1, diabète, pharmaco-conception, relations structure/fonction, modélisation moléculaire, bio-informatique, CD, Récepteur couplé aux protéines G, Synthèse Peptidique en Phase Solide.

UNIVERSITE MONTPELLIER I

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE MONTPELLIER I : Président Professeur Alain UZIEL

FACULTE DE PHARMACIE : Doyen Professeur Jean-Louis CHANAL

**UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES**

Directeur : Professeur Jean-Louis CHANAL

**UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN MATIERE
ALIMENTAIRE OENOLOGIE-ENVIRONNEMENT**

Directeur : Professeur Jean-Claude CABANIS

**UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE
INDUSTRIELLE**

Directeur : Professeur Jean-Pierre BALI

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M	ANDARY	Claude	Botanique et Cryptogamie
M.	AUDRAN	Michel	Physique et Biophysique
M.	BALI	Jean-Pierre	Biochimie générale et Clinique
M.	BASTIDE	Jean-Marie	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	BERLAN	Jacques	Hématologie
M.	BONNE	Claude	Physiologie
M.	BONNET	Pierre	Chimie Organique
M.	BONTOUX	Jean	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	BOIJDE VILLE	Philippe	Chimie Générale et Minérale
Mme	BRES	Janine	Pharmacocinétique
M.	CABANIS	Jean-Claude	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	CANO	Jean-Paul	Toxicologie
Mme	CASSANAS	Geneviève	Physique Industrielle et Traitement de l'information
M.	CASTEL	Jean	Chimie Thérapeutique
M.	CHANAL	Jean-Louis	Physique et Biophysique
M.	CHAPAT	Jean-Pierre	Chimie Organique
M.	CROS	Gérard	Pharmacologie
M.	DELARBRE	Jean-Louis	Physique Moléculaire et Structurale
M.	DELONCA	Henri	Technique Pharmaceutique industrielle
M.	DOREE	Marcel	Biologie Cellulaire
M.	ESCALE	Roger	Chimie Organique
Mlle	PABRE	Huguette	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	FULCRAND	Pierre	Chimie Thérapeutique
M.	GELIS	Christian	Physique et Biophysique
M.	GIAIMIS	Jean	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	GORENFLOT	André	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	GRASSY	Gérard	Chimie Organique
M.	GRIMMONPREZ	Louis	Biochimie Générale et Clinique
M.	JACOB	Maurice	Pharmacie Galénique
Mme	JULLIEN	Magali	Milieus denses et matériaux
Mme	MAILLOLS	Hélène	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mme	MALLIE	Michèle	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
Mlle	MANDROU	Bernadette	Chimie Analytique
M.	MAURY	Luc	Physique Moléculaire et Structurale
M.	MICHEL	Alain	Pharmacologie
M.	MODAT	Guy	Physiologie
Mme	MONLEAUD	Jacqueline	Droit et Economie de la Santé

.../...

M.	PAU	Bernard	Immunologie
M.	PELLECUER	Jacques	Pharmacognosie
Mme	PICOT	Bernadette	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	RAMBAUD	André	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	ROBBE	Yves	Chimie Organique
M.	ROSSI	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	ROUSSEL	Jean-Louis	Botanique et Cryptogamie
M.	SERRANO	Jean-Jacques	Pharmacologie
Mme	SIMEON DE BUOCHBERG	Michèle	Bactériologie et Virologie
Mlle	SOLERE	Maryse	Biochimie Générale et Clinique
ML	TEROL	Main	Chimie Générale et Minérale

MAITRES DE CONFERENCES

M.	ALBEROLA	Serge	Chimie Générale et Minérale
Mme	ARTIS	Anne-Marie	Chimie Thérapeutique
M.	AUSSEL	Paul	Physique et Biophysique
Mlle	AZAY	Jacqueline	Pharmacologie
M.	BATAILLE	Bernard	Pharmacie Galénique
M.	BEGEL	Michel	Didactique Physiologie
M.	BELON	Charles	Biochimie Générale et clinique
M.	BERGE	Gilbert	Chimie Thérapeutique
Mme	BILAK	Estelle	Bactériologie et Virologie
M.	BLACHE	Yves	Chimie Organique
M.	BLAISE	Alain	Chimie Analytique et Bromatologie
Mlle	BLANCHIN	Marie-Dominique	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	BOMPART	Jacques	Chimie Organique
M.	BOUDARD	Frédéric	Immunologie
Mme	BOURRET	Evelyne	Physique Moléculaire et Structurale
Mlle	BRESSOLLE	Françoise	Pharmacocinétique
Mme	CABANIS	Marie-Thérèse	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	CARCY	Bernard	Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mme	CASADEBAIG	Jacqueline	Pharmacie Galénique
Mme	CASELLAS	Claude	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
Mme	CASTEX	Françoise	Immunologie
Mme	CHARLOT	Colette	Chimie Analytique et Bromatologie
Mlle	CHATEAU	M. Thérèse	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	CHAUVET	Alain	Chimie Générale et Minérale
Mlle	CHOQUET	Armelle	Toxicologie
Mme	COCIGLIO	Marylène	Pharmacologie
Mlle	COHEN	Pascale	Immunologie
M.	COOPER	Jean-François	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	COSSON	Laurence	Botanique et Cryptogamie
M.	COUDANE	Jean	Chimie des Matériaux
Mlle	COURET	Isabelle	Biophysique
M.	CRASSOUS	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	CUQ	Pierre	Toxicologie
Ml.	DARMANADEN	Roland	Chimie Thérapeutique
M.	DEVOISSELLE	Jean-Marie	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	DURU	Christian	Pharmacie Galénique
Mlle	DUSART	Ghislaine	Bactériologie et Virologie
M.	ENGEL	Robert	Chimie des Matériaux
Mlle	ENJALBERT	Françoise	Botanique et Cryptogamie
Mme	FABRBGUE	Eliane	Physique Industrielle et traitement de l'Information
Mlle	FENET	Hélène	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	FLORAC	Marie-Elisabeth	Botanique et Cryptogamie
Mme	FOURCROY	Stella	Physiologie

.../...

Mme	FOURRNAJOUX	Josyane	Physique et Biophysique
M.	GAGNE	Didier	Biochimie Générale et Clinique
M.	GALLEYRAND	Jean-Claude	Physique et Biophysique
M.	GARREAU	Henri	Chimie des Matériaux
Mme	GOZE	Catherine	Chimie Thérapeutique
M.	GRIS	Jean-Philippe	Hématologie
Mme	GUIBAL	Jacqueline	Immunologie
Mme	GUIBERT	Marie-Sophie	Physique et Biophysique
Mme	GUIDICELLI	Claudette	Physique et Biophysique
Mlle	HANSEL	Sylvie	Pharmacie Clinique
Mme	ILLES	Suzanne	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	JEANJEAN	Bernard	Chimie Générale et Minérale
Mme	LACOSTE	Anne-Marie	Bactériologie et Virologie
M.	LAGET	Jean-Pierre	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	LARROQUE	Michel	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	LASSERRE	Yves	Pharmacie Galénique
Mlle	LAURENT	Florence	Pharmacologie
Mme	LIUTKUS	Martine	Pharmacologie
Mme	MARION	Chantal	Pharmacognosie
Mme	MENAGE	Karina	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	MESTRES	Jean-Paul	Chimie Analytique
Mme	MESTRES	Gilberte	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	MILHAVET	Jean-Claude	Chimie Organique
Mme	MULLER	Agnès	Physiologie
Mme	NIELLOUD	Françoise	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mlle	NURIT	Josiane	Chimie Générale et Minérale
M.	PELISSIER	Yves	Pharmacognosie
M.	PERSONNE	Christian	Bactériologie et Virologie
Mme	PHAM	Tuyet Nga	Physique et Biophysique
Ml.	POUCHERET	Patrick	Pharmacologie
M.	PRECIGOUT	Eric	Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mme	RAMBAUD	Joëlle	Chimie Générale et Minérale
Mlle	RAPIOR	Sylvie	Botanique et Cryptogamie
M.	RASCOL	Jean-Pierre	Botanique et Cryptogamie
M.	RAYNAUD	Eric	Biochimie
M.	SABATIER	Robert	Physique Moléculaire et Structurale
Mme	SALHI	Sharon	Immunologie
Mme	SOULIE	Marie-Louise	Biochimie générale et Clinique
Mme	SUSPLUGAS	Claudine	Pharmacognosie
M.	SUSPLUGAS	Paul	Pharmacognosie
M.	TEISSEDRE	Pierre-Louis	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	VALENTIN	Alexis	Parasitologie et Mycologie Médicale
Mlle	VIAN	Laurence	Toxicologie
Mlle	VIE	Marie-Thérèse	Physique et Biophysique
Mme	VIVERGE	Danièle	Biochimie générale et Clinique

*« L'Art c'est je, la Science c'est nous. »
(Cl. Bernard)*

A la mémoire de Pierre, mon grand-père.

Remerciements.

Le travail présenté ici a été réalisé au Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM - CNRS UPR1086, Montpellier, France), dans l'équipe « Conception et synthèse de peptides biologiquement actifs » du Docteur B. CALAS.

Je tiens à remercier Messieurs les Professeurs J. DEMAILLE directeur de l'Ecole Doctorale et M. DOREE directeur du CRBM, de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse dans les meilleures conditions.

Je tiens à adresser toute ma gratitude au Docteur B. CALAS, qui depuis quatre ans dirige et encadre ce travail. Je le remercie pour sa rigueur scientifique nécessaire à l'aboutissement de cette thèse, et pour sa sympathie ; l'ensemble des deux créant une ambiance de travail des plus agréable. J'en profite pour remercier tous les « collègues », anciens ou actuels, de l'équipe : Ch. Mendre, A. Chavanieu, M. Afshard, F. Wojcik et D. Lafitte, qui m'ont fait une place à la paillasse, et avec qui j'ai partagé des grands moments.

Je souhaite remercier le Professeur A. KTORZA qui m'a fait l'honneur d'accepter de tenir le rôle ingrat de rapporteur, sans connaître, au préalable, ni le contenu ni les aboutissants de ce travail. Je le remercie pour ses suggestions pertinentes.

Je remercie également Monsieur P. RENARD des Laboratoires Servier pour avoir mis en œuvre le partenariat industriel, qui a permis de breveter ces travaux. Je ne saurais que trop lui exprimer ma gratitude pour avoir accepté d'en être rapporteur.

*Je tiens à exprimer tous mes remerciements à Monsieur B. PFEIFFER qui me fait l'honneur de sa présence dans ce jury, et pour toutes les études *in vivo*, qu'il a dirigées dans les Laboratoires Servier.*

Pour m'avoir accepté dès le début dans la formation doctorale Interface chimie-Biologie, pour m'avoir fait confiance et m'avoir soutenu tout au long de la thèse, pour m'honorer de sa présence dans ce jury, je voudrais remercier vivement le Professeur G. GRASSY, sans qui tout ce travail n'aurait jamais vu le jour.

*Enfin, je tiens particulièrement à témoigner ma reconnaissance au Docteur A. KERVYRAN, pour sa gentillesse, sa patience, son soutien. Je le remercie également pour ses conseils avisés de part sa grande expérience du diabète, et pour tout les tests *in vitro* de ce manuscrit, qu'il a dirigé d'une « main de maître ».*

Je ne pourrai finir, sans remercier toutes les personnes qui ont suivi de près ou de moins près, de part leur différentes compétences, leurs remarques et suggestions, la progression de ce travail. Leur amitié est de surcroît des plus appréciée. Merci à L. Chaloin, P. Vidal, M. Adenot, G. Divita, P. Pellegrin, X. Magne, L. Héron et R. Bennes.

Il va de soit que si je ne cite ici que les « acteurs » de cette aventure, je garde une profonde reconnaissance pour toutes les autre personnes, qu'elles soient scientifiques ou non, qu'elles soient du CRBM, de l'IGMM, de l'U128, du CBS, de l'IGH et d'ailleurs avec qui j'ai eu des relations privilégiées.

Pour me supporter au quotidien (et c'est pas toujours facile), Muriel, je te remercie !

A vous tous et vous toutes, un grand MERCI !

Terminologies et Conventions.

Un certain nombre de termes anglo-saxons, couramment utilisés, et/ou n'ayant pas de traduction significative en français ont été laissés tel quel : *Glucagon-like peptide*, *Ala-scan*, *drug design*, *random coil*, *fit*...

Par convention, les 20 acides aminés canoniques seront notés avec leur code 3 lettres (Glu, Leu, ...) dans le texte, et leur code 1 lettre (E, L, ...) dans les formules. Le code 1 lettre, écrit en caractère minuscule (e, l, ...) dans les illustrations, où précédé d'un « D » (D-E, D-L, ...) dans le texte, représente l'acide aminé dans sa configuration dextrogyre.

Nous avons utilisé la convention selon laquelle le premier acide aminé, de la séquence du Glucagon-like peptide (GLP), est numérotée 7. De plus, afin de simplifier la lecture du manuscrit les deux formes, GLP-1-(7-37) amide et GLP-1-(7-36) seront, de façon générique, notées GLP-1 sauf spécifications contraires ; les mutants du glucagon-like peptide auront les nomenclatures suivantes :

- **[x^y]GLP-1** pour le mutant ayant l'acide aminé X, dans sa forme énantiomérique D (dextrogyre), en position y.
- **[desX^y]GLP-1** pour le mutant où l'acide aminé X natif, en position y, est supprimé.
- **[X^y]GLP-1** pour le mutant présentant l'acide aminé X, à la place de l'acide aminé natif, à la position y.

Les unités utilisées sont celles du système International d'unités (SI). La liste des abréviations utilisées dans ce manuscrit est donnée en annexe.

Table des Matières.

TERMINOLOGIES ET CONVENTIONS.

TABLE DES MATIERES. 1

AVANT-PROPOS...... 5

LE DIABETE DANS LE MONDE. 5

DIABETE ET GLP-1...... 5

INTRODUCTION. LE DIABETE. QUELQUES RAPPELS SUR LA MALADIE.

TRAITEMENTS CLASSIQUES ET NOUVELLES PISTES THERAPEUTIQUES..... 8

I.1. LE DIABETE DE TYPE I (DID)...... 8

I.2. LE DIABETE DE TYPE II (DNID)...... 9

I.3. TRAITEMENTS CLASSIQUES DU DIABETE NON-INSULINO-DEPENDANT (DNID). 11

i.3.1. Les biguanides. 11

i.3.2. Les sulfonylurées hypoglycémiantes. 12

i.3.3. Les inhibiteurs d'alpha-glucosidases. 14

I.4. NOUVELLES PISTES THERAPEUTIQUES...... 16

i.4.1. Les agents diminuant l'insulino-résistance. 16

i.4.2. Les agents insulino-sécréteurs. 17

i.4.3. Les médicaments n'agissant pas directement sur la glycémie. 18

i.4.5. Les antidiabétiques peptidiques. 19

I.5. AUTRES TYPES DE DIABETE...... 20

I.6. TRAITEMENT DU DNID...... 21

CHAPITRE I. GLP-1-(7-37) ET (7-36) AMIDE : ORIGINE PHYSIOLOGIQUE ET PROPRIETES INSULINO-SECRETRICES. Données Biblographiques. 23

1.1. ACTIVITES ANTIDIABETIQUES *IN VITRO*. 25

1.2. ACTIVITES ANTIDIABETIQUES <i>IN VIVO</i>.....	26
1.3. PROPRIETES COMPLEMENTAIRES.....	27
1.4. INTERET THERAPEUTIQUE DES DEUX FORMES ACTIVES DU GLP-1.....	27

<i>CHAPITRE II.</i> GLP-1 ET ANALOGUES : ACTIVITE BIOLOGIQUE ET STABILITE METABOLIQUE. De la conception de l'étude à la discussion des résultats.....	29
--	-----------

2.1. PEPTIDASES IMPLIQUEES DANS LA DEGRADATION ET L'INACTIVATION DU GLP-1-(7-36).	30
2.2. GLP-1-(7-36) : RELATIONS STRUCTURE-FONCTION A L'ORIGINE DU TRAVAIL.	31
2.3. ETUDES STRUCTURALES.....	33
2.3.1. Résonance Magnétique Nucléaire - Etat de la question.	33
2.3.2. Dynamique moléculaire - Résultats.	35
2.4. SYNTHESSES DE QUELQUES ANALOGUES DU GLP-1-(7-37) ET ETUDE DE LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE.	38
2.4.1. Mutations au niveau de His7.	43
2.4.2. Mutations au niveau de Ala8.	45
2.4.3. Mutations au niveau de Glu9.....	48
2.4.4. Délétion de Arg 36.....	50
2.4.5. Mutations susceptibles d'affecter la structure des hélices 14-20 et 24-36.	50
2.4.6. Mutations susceptibles d'affecter la structure tertiaire globale du GLP-1-(7-37).	53
2.4.7. Modifications de la partie centrale de la séquence du GLP-1.	54
2.4.8. Mutations complémentaires basées sur des homologies de séquence avec d'autres membres de la famille du GRF.	56
2.5. STABILITE METABOLIQUE ET ACTIVITE IN VIVO.....	56

<i>CHAPITRE III.</i> DISCUSSION DES RESULTATS SUR LA BASE DE CARACTERISTIQUES STRUCTURALES. CONFORMATION BIOACTIVE.	61
---	-----------

3.1. PREAMBULE AUX ETUDES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE.....	61
3.2. RESULTATS DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DES ANALOGUES DU GLP-1-(7-37) MODIFIES EN POSITION 7, 8 ET 9.....	65
3.3. INTERPRETATION DE L'ACTIVITE DES ANALOGUES DU GLP-1-(7-37) SUBSTITUES EN POSITION 7, 8 ET 9 AVEC ET SANS DELETION DE L'ARGININE 36.....	69

CHAPITRE IV. RECEPTEURS DU GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1. RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (RCPG).Etat de la question. 74

4.1. RECEPTEUR DU GLP-1.....	74
4.1.1.Mise en évidence du récepteur du GLP-1.	74
4.1.2. Clonage et expression du récepteur du GLP-1.....	75
4.1.3. Effecteurs du récepteur du GLP-1.	75
4.2. LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G	76
4.2.1.Structure des RCPG.	76
4.2.2. Transmission de l'information.....	77
4.2.3 Classification des RCPG.	78
4.2.3.1. Classement selon la séquence primaire.	78
4.2.3.2. Classement selon le site de liaison.....	79
4.3.3. Modèles 3D des RCPG : « Les grands courants de pensée ».....	79
4.3.3.1. Le modèle de base : la bactériorhodopsine.	80
4.3.3.2.Modélisation des RCPG.....	81
4.3.3.3. Validation des différents modèles.....	82

CHAPITRE V. MODELISATION DU RECEPTEUR SPECIFIQUE DU GLP-1.

Stratégie – Résultats et discussion..... 86

5.1. MODELISATION DU RECEPTEUR DU GLP-1 (GLPr).	86
5.1.1. Localisation et construction des segments transmembranaires.....	87
5.1.2. Analyse des segments transmembranaires.	90
5.1.2.1. Séquences consensus des HTM.....	90
5.1.2.2. Profil hydropatique des HTM.....	93
5.1.3. Construction du modèle.....	95
5.1.3.1. Positionnement des hélices.....	95
5.1.3.2. Orientation relative des hélices.	95
5.1.3.3. Positionnement des chaînes latérales.....	96
5.1.3.4. Minimisation d'énergie du modèle.....	96
5.2. MODELISATION DU GLPr - DISCUSSION.	97
5.3. MODELISATION DU GLPr - CONCLUSION.....	100

CHAPITRE VI. ETUDES DES INTERACTION GLP-1/GLPR ET ACTIVITE DE

LIAISON DU RECEPTEUR. 102

6.1. INTERACTIONS BOUCLES EXTRACELLULAIRES - GLP-1.....	104
6.1.1. Interactions e1, e2 et GLP-1.....	104
6.1.2. Interaction GLP-1:e3.....	106
6.1.3. Conclusion.....	107
6.2. INTERACTION FRAGMENT N-TERMINAL DU RECEPTEUR - GLP-1.....	107
6.3. ACTIVITE INTRINSEQUE DE LIAISON DU GLPr.	110

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	114
---	------------

BIBLIOGRAPHIE.	119
----------------------------	------------

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS.	II
-------------------------------------	-----------

MATERIELS ET METHODES.	IV
------------------------------------	-----------

I. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE.....	IV
--	-----------

Synthèse.....	iv
Déprotection.....	v
Purification.....	vii
Identification et contrôle.....	vii
Réactifs utilisés.....	vii

II. SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN ELECTROSPRAY.....	IX
--	-----------

Principe.....	ix
Nature des ions multichargés et spectres de masse.....	x
Procédure expérimentale.....	xi

III. TESTS IN VITRO.....	XIII
---------------------------------	-------------

Cultures Cellulaires et préparation de membranes.....	xiii
Etudes de liaison au récepteur.....	xiii
Production d'AMPC.....	xiv
Réactifs utilisés.....	xiv

IV. DICHROÏSME CIRCULAIRE.....	XV
---------------------------------------	-----------

Principes de base.....	xv
Procédure expérimentale.....	xvii

V. L'INFRAROUGE A TRANSFORMÉE DE FOURRIER.....	XVIII
---	--------------

Principe.....	xviii
Procédure expérimentale.....	xix

VI. FLUORESCENCE.....	XX
------------------------------	-----------

Principe.....	xx
Procédure expérimentale.....	xxi

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	XXII
-------------------------------------	-------------

LES FIGURES.....	xxii
LES TABLEAUX.....	xxv

ABSTRACT.....	XXVI
----------------------	-------------

Avant-propos.

Le Diabète dans le monde.

Parmi les pathologies affectant la population mondiale, on cite le plus souvent le paludisme, l'hypertension artérielle, différents cancers (sein, pancréas, ...), le SIDA, l'hépatite C et dernièrement les encéphalopathies spongiformes transmissibles. De grands efforts ont été consentis, à juste titre, pour le dépistage, le traitement ou la prévention de ces fléaux. Mais on oublie souvent le diabète dont le coût humain et économique est, soit équivalent, soit très supérieur à celui de ces pathologies, peut-être plus médiatisées.

En 1995, le nombre de diabétiques à travers le Monde était supérieur à 100 millions et devrait plus que doubler dans la vingtaine d'années à venir (Rapport sur la Santé dans le Monde 1997, OMS). Les complications à long et à moyen terme du diabète sont les risques cardiovasculaires (2 à 4 fois supérieurs à la normale) et neurologiques. La gravité et la fréquence de ces complications constituent un problème préoccupant de santé publique. La prise en charge du diabète est un enjeu humain et économique majeur, rendant urgent la mise en place de stratégies de dépistage et la découverte de nouveaux médicaments, efficaces et d'administration aisée.

On distingue différents types de diabètes. L'*American Diabetes Association* a officiellement présenté à Boston le 22 juin 1997 une nouvelle classification, approuvée par le *National Institute of Health* et l'Organisation Mondiale pour la Santé. La forme de diabète la plus fréquemment rencontrée (90%) est le diabète non-insulino-dépendant (DNID), dit diabète de type II et aussi appelé « *adult-onset diabetes* » ; il est essentiellement défini comme un état d'hyperglycémie franche et chronique. Son traitement fait appel à différentes familles de molécules, dont les sulfonylurées hypoglycémiantes. Leur efficacité n'est plus à démontrer, mais leur prescription présente un certain nombre d'inconvénients dont le plus alarmant est le coma hypoglycémique.

Diabète et GLP-1.

Depuis une dizaine d'année, l'accent est mis sur la recherche de nouveaux composés susceptibles de traiter le DNID sans induire trop d'effets secondaires. Parmi ceux-ci, le

Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) est en très bonne position pour d'éventuelles applications thérapeutiques. D'une part, contrairement aux sulfonylurées, l'effet de ce peptide est glucose-dépendant ce qui évite tout risque de coma diabétique, et d'autre part, il est capable de contrôler le niveau de glucose sanguin dans le cas où les autres agents hypoglicémiants sont inefficaces. Malheureusement, le GLP-1 est rapidement inactivé *in vivo* (environ 5 minutes) par des enzymes protéolytiques telles que la DPP IV.

Malgré ses grandes potentialités thérapeutiques, il est clair que le GLP-1 ne peut être utilisé tel quel. Il doit être modifié afin d'augmenter sa stabilité métabolique, tout en conservant une bonne activité. Dans ce travail, nous nous sommes tout d'abord attachés à synthétiser des analogues plus résistants aux protéases. Ensuite, nous avons essayé de mieux comprendre le mode d'interaction de l'hormone avec son récepteur. Pour cela deux approches ont été utilisées.

- ❑ Dans la première, nous avons préparé une série d'analogues afin de tester un certain nombre d'hypothèses concernant l'incidence de la conformation du GLP-1 sur d'une part, la capacité de liaison, et d'autre part, la production intracellulaire d'AMPc, image de l'activation du récepteur suite à la fixation du ligand.
- ❑ Dans la seconde, nous avons essayé de déterminer les parties du récepteur impliquées dans la liaison avec le ligand.

Ce manuscrit s'articulera autour de sept chapitres :

- *In limine*, une courte introduction traitera succinctement du diabète sous ses différentes formes. L'accent sera plus particulièrement mis sur les traitements « classiques » du diabète de type II ainsi que sur les potentialités thérapeutiques offertes par le GLP-1.
- Le premier chapitre sera consacré à des rappels bibliographiques concernant l'origine et l'activité (*in vivo et in vitro*) du GLP-1.
- Le chapitre suivant exposera en premier lieu les relations structure-activité décrite à l'origine du travail. Puis, en fonction de ces données et d'études structurales menées préalablement, il

sera discuté des propriétés et de la stabilité de quelques nouveaux analogues du GLP-1, synthétisés au cours de la thèse, et faisant l'objet d'un brevet en partenariat avec l'industrie {Calas, B. *et al.* 1998}

- Dans le troisième chapitre, nous essayerons de relier les activités observées à des paramètres structuraux, et proposerons une conformation bioactive pour le GLP-1, dont les résultats devraient très prochainement être publiés {Sarrauste de Menthère, C. *et al.* en préparation}.
- On ne peut parler du GLP-1 sans parler de son récepteur. Dans cette seconde partie du manuscrit nous présenterons, en guise d'introduction, ce récepteur spécifique et le situerons dans la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les grands courants de pensées quant aux modèles 3D de ces RCPG seront également exposés.
- Forts des données bibliographiques générales concernant la modélisation moléculaire, nous proposons dans le sixième chapitre, une stratégie et un modèle pour le récepteur spécifique du GLP-1.
- A partir de ce modèle, nous avons montré que certains fragments ont une affinité non négligeable pour le ligand endogène, ce qui a permis de mettre en évidence des zones potentielles d'interactions. Les résultats sont donnés dans le septième et dernier chapitre.

La dernière partie de l'ouvrage conclura sur l'ensemble du travail présenté, et mettra l'accent sur des perspectives de travaux complémentaires.

Les procédures expérimentales sont, quant à elles, détaillées en annexe et ce, après un rappel théorique succinct de chacune des méthodes utilisées.

Introduction.

LE DIABETE. QUELQUES RAPPELS SUR LA MALADIE. TRAITEMENTS CLASSIQUES ET NOUVELLES PISTES THERAPEUTIQUES.

Le diabète est défini comme étant un trouble glucidique lié à un déficit d'insuline, et à une résistance anormale des tissus à cette hormone. Il en résulte une concentration exagérée de glucose dans le sang : hyperglycémie caractérisée à jeun par un taux de sucre supérieur à 1,4 g/l de sang. Des troubles du métabolisme protidique et surtout lipidique y sont souvent associés. La nomenclature internationale actuelle distingue le diabète de *type I* insulino-prive ou insulino-dépendant (DID), et le diabète de *type II* non insulino-prive ou non-insulino-dépendant (DNID) {*Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 1997*}. A ces deux formes majeures, il convient d'associer le diabète gestationnel (GDM) beaucoup moins fréquent, ainsi qu'une catégorie regroupant tous les autres cas qui ne peuvent être classés ni dans le type I, ni dans le type II.

i.1. Le diabète de type I (DID).

Le diabète de type I est observé le plus souvent chez le sujet jeune. Il apparaît soudainement, généralement avant l'âge de 15 ans. Il provient d'une destruction des cellules bêta des îlots pancréatiques, productrices de l'insuline. Ce diabète est appelé insulino-dépendant car l'administration d'insuline est le seul moyen de survivre à cette pathologie.

Pour la plupart des chercheurs, cette destruction serait d'origine auto-immune, apparaissant à la suite d'une infection sur un terrain favorable (facteur génétique) {Delcourt, C *et al.* 1996}. En effet, il a été observé que les cas de DID augmentent de manière très significative après les épidémies virales. Les virus impliqués seraient ceux des oreillons, de la rougeole et de la poliomyélite. Dans les affections auto-immunes, le système immunitaire qui normalement protège l'individu en éliminant tout ce qui est « non soi », se retourne contre l'organisme lui-même ne

reconnaissant plus certaines de ses composantes comme appartenant au « soi ». Ceci entraîne l'intervention de lymphocytes et d'auto-anticorps qui détruisent les cellules non tolérées. Dans le cas du DID, un corps étranger (bactérie ou virus ...) que l'organisme a reconnu comme « ennemi », peut posséder sur son enveloppe des protéines semblables à des protéines membranaires présentes à la surface des cellules bêta. Dans ces conditions, le système immunitaire élimine à la fois l'envahisseur et les cellules alors reconnues comme « infectées ». Une autre possibilité est que l'infection virale modifie la structure des auto-antigènes portés par les cellules pancréatiques : ces dernières n'étant plus reconnues sont tuées.

Le DID ne présente pas de difficulté majeure en ce qui concerne son diagnostic, qui se pose sur un tableau clinique sévère et évocateur : des anomalies biologiques hautement spécifiques, comme une glycémie très élevée, la présence de corps cétoniques dans les urines sont révélateurs d'un diabète insulino-dépendant {Delcourt, C *et al.* 1996}.

Les personnes atteintes de diabète de type I doivent s'administrer quotidiennement une ou plusieurs injections sous-cutanées d'insuline afin de contenir l'acidocétose et l'hyperglycémie. Il est en effet hors de question d'administrer l'insuline *per os* car, comme tout peptide, elle est rapidement dégradée par les sucs gastriques.

i.2. Le diabète de type II (DNID).

Le diabète non-insulino-dépendant (DNID, diabète de type II) représente environ 90% de la population diabétique et touche essentiellement des personnes de plus de 40 ans ; il est considéré comme une maladie de l'âge mur. Ce type de diabète est en fait divisé en deux sous-types : le IIa (non obèse, 15% des DNID) et le IIb (obèse, poids > 120% du poids idéal). Contrairement au DID (Cf. paragraphe précédent), les patients atteints de DNID produisent de l'insuline mais en quantité insuffisante, rendant inadéquat la réponse compensatoire de l'hormone à des élévations du taux de glucose, et aboutissant ainsi à une hyperglycémie rapide {Polonsky, K. S. 1995}. A cette anomalie de l'insulino-sécrétion, est associée une insulino-résistance des tissus périphériques dont la capacité à utiliser le glucose est amoindrie.

Il est à noter que l'hyperglycémie associée au DNID, si elle n'est pas traitée, tend à en accentuer le déficit de sécrétion d'insuline. En effet, des taux élevés de glucose circulant sont

toxiques (glucotoxicité) et entraînent, à la fois, une diminution de la fonction sécrétrice des cellules bêta et une augmentation de la résistance à l'insuline {Rossetti, L. *et al.* 1990}.

L'expression du phénotype DNID résulte d'une combinaison d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux. Le mode de transmission serait polygénique dans une population importante et génétiquement hétérogène (monde occidental), et plus probablement monogénique dans les isolats humains à très haut risque (indiens Pimas de l'Arizona ou habitants de certaines îles du Pacifique sud) {Halimi, S. *et al.* 1998}.

De plus, la célèbre « *Twin study* » conduite en Grande-Bretagne par le groupe de BARNETT {Barnett, A. H. *et al.* 1981} apporte la démonstration que l'hérédité est une composante importante dans l'apparition du DNID. Parmi une paire de jumeaux homozygotes, si l'un des jumeaux est atteint, le risque pour l'autre jumeau de développer la maladie est de 95%. D'autre part, des analyses génétiques et le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier de nombreuses mutations dans des « gènes candidats ».

L'environnement aussi, peut conduire à des situations métaboliques que l'organisme ne peut plus contrôler. Ainsi, une alimentation riche en graisses animales et en sucre, pauvre en fibres, telle que nous la connaissons dans les pays développés, peut conduire à l'obésité reconnue depuis longtemps comme favorisant l'apparition du DNID {West, K. H. 1978}. Comme tous les obèses ne sont pas diabétiques, il est probable qu'un facteur différent de celui de l'obésité soit nécessaire quant au développement de ce type de diabète.

Le diabète de type II est le plus souvent asymptomatique. Il peut être présent depuis plus de 10 ans lors du diagnostic. Les symptômes apparaissent graduellement. On retiendra malgré tout qu'il est souvent associé à une hypertension (61% des porteurs de DNID non diagnostiqués), à une dyslipidémie et à une obésité androïde (abdominale). Le patient présentera des sensations de fatigue, de soif exacerbée, d'engourdissement et de picotement des pieds et des mains. Il sera confronté à des problèmes dermatologiques fréquents (sécheresse, démangeaisons, lésions) avec lenteur de cicatrisation ; il sera également sujet à une envie d'uriner fréquente particulièrement la nuit, à de nombreuses infections, et présentera des troubles de la vision {Halimi, S. *et al.* 1998 ; Delcourt, C *et al.* 1996}.

Le DNID constitue un facteur de risque cardio-vasculaire et neurologique important. Aux USA comme en Suède le diabète de type II représente plus de 45% des causes d'amputations non traumatiques, 13% des cécités et de 13 à 30% des insuffisances rénales au stade de la dialyse {Halimi, S. *et al.* 1998}.

La fréquence du DNID est très variable d'un pays à l'autre (1% au Japon contre 6% aux USA), en France elle est évaluée à environ 2% de la population. Elle dépend donc de l'origine ethnique (35% pour les indiens Pimas aux USA) et de l'environnement (habitudes alimentaires). Comme nous l'avons indiqué plus haut, l'OMS a estimé à plus de 100 millions de personnes la population atteinte de DNID à travers le monde.

En conclusion, les obèses de plus de 40 ans ayant des antécédents diabétiques dans leur famille, n'ont que peu de chances d'échapper au DNID.

i.3. Traitements classiques du diabète non-insulino-dépendant (DNID).

Dans de nombreux cas et en particulier dans le cas de patients obèses, le taux de glucose peut être contrôlé à l'aide de diètes équilibrées et d'exercices physiques. Si cela s'avère inefficace, ils devront combiner à une bonne hygiène de vie, la prise d'antidiabétiques oraux. Le but principal du traitement est de maintenir l'homéostasie du glucose afin de protéger, à long terme, les tissus sensibles comme les artères.

Les années 90 ont été marquées par des avancées majeures dans le domaine des médicaments hypoglycémisants oraux, qui peuvent être regroupés en trois classes :

1. **les biguanides,**
2. **les sulfonylurées,**
3. **les inhibiteurs des alpha-glucosidases.**

i.3.1. Les biguanides.

Le seul composé de cette famille encore commercialisé en France est la metformine (1,1-diméthylbiguanide) (*Figure 1*).

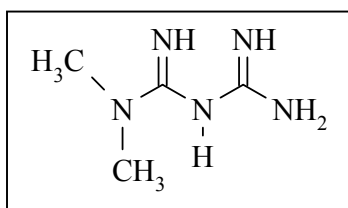


Figure 1. Structure de la metformine.

Ce médicament joue sur la glycémie de deux façons {Larger, E. 1998}:

- ❑ il diminue la production de glucose en freinant la néoglucogenèse hépatique. Cet effet hépatique est synergique à celui de l'insuline.
- ❑ il augmente la captation de glucose par les tissus, en particulier le muscle, diminuant l'insulino-résistance.

Les biguanides ne sont jamais responsables d'hypoglycémie. On comprendra alors aisément l'intérêt de leur utilisation dans une bithérapie associée avec les sulfonylurées hypoglycémiantes (Cf. paragraphe suivant).

Les accidents hépatiques et rénaux sont actuellement exceptionnels. L'écueil principal du traitement à la metformine réside, en fait, dans sa faible tolérance intestinale (nausée, gastralgie, diarrhée, inappétence) {Charbonnel, B. *et al.* 1998}. Les contre-indications sont les maladies du foie (hépatites, cirrhoses, ...), les maladies cardiaques, ainsi que le mauvais fonctionnement rénal.

i.3.2. Les sulfonylurées hypoglycémiantes.

Les sulfonylurées hypoglycémiantes ont été découvertes à Montpellier, au début des années 40, par le Dr. JANBON. L'effet de ces molécules a été mis en évidence par A. LOUBATIERES qui montra, en 1946, qu'elles provoquaient une hypoglycémie comparable à l'effet d'une injection d'insuline chez le chien normal ou (partiellement pancréatectomisé), mais qu'elles étaient inefficaces chez l'animal ayant subi une pancréatectomie totale {Loubatieres, A. 1946 ; Loubatieres, A. 1944}. La cible des sulfonylurées est donc la cellule bêta des îlots de Langerhans.

Les sulfonylurées représentent à ce jour les antidiabétiques oraux les plus prescrits. Elles diffèrent les unes des autres, par leur activité, par leur durée d'action (courte pour le tolbutamide,

intermédiaire pour le gliclazide et longue pour le glibenclamide) et aussi par leurs effets secondaires.

Actuellement, on divise les sulfonylurées hypoglycémiantes en deux groupes :

- ❑ Les sulfonylurées de première génération (tolbutamide et chlorpropamide) (*Figure 2*) de moins en moins utilisées, car nécessitant des doses importantes pour une efficacité maximale.
- ❑ Les sulfonylurées de deuxième génération (gliclazide, glipizide et glibenclamide) (*Figure 3*) efficaces à des doses plus faibles, diminuant ainsi les risques d'hypoglycémie.

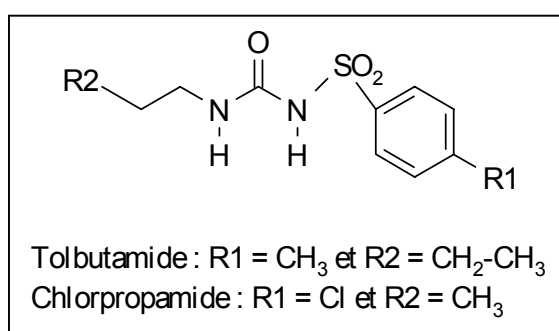


Figure 2. Structures du tolbutamide et de la chlorpropamide, sulfonylurées hypoglycémiantes de première génération.

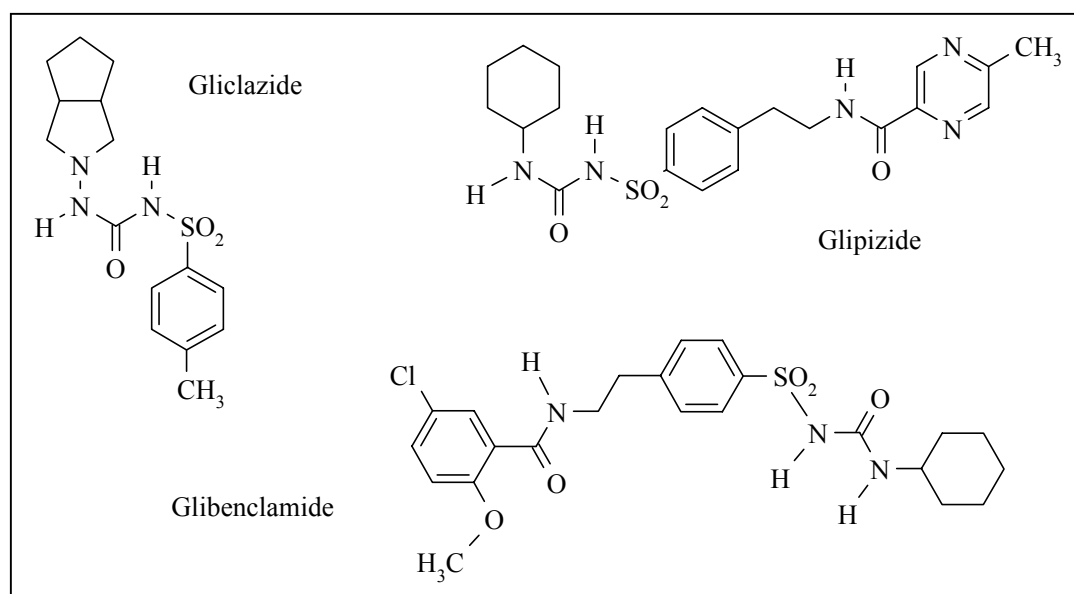


Figure 3. Structures de quelques sulfonylurées hypoglycémiantes de deuxième génération.

Le glibenclamide, environ 100 fois plus puissant que les drogues de première génération telle que le tolbutamide {Giannaccini, G. *et al.* 1998 ; Lebovitz, H. E. *et al.* 1983}, est considéré aujourd'hui comme « la » sulfonylurée hypoglycémiante de référence.

Les sulfonylurées agissent sur un récepteur appartenant à la famille des transporteurs membranaires ATP-dépendants. Ce récepteur a été isolé et cloné en 1995 par AGUILAR-BRYAN *et al.* {Larger, E. 1998}. Il constitue une des deux sous-unités nécessaires à une activité de canal potassique régulé par l'ATP et les sulfonylurées. La liaison du ligand sur le récepteur ferme le canal, créant ainsi un courant de dépolarisation de la membrane qui ouvrira les canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol conduit à la migration des vésicules d'insuline et à son exocytose.

L'action des sulfonylurées hypoglycémiantes s'exerçant en l'absence de nutriments (glucose) et autres sécrétagogues, elles peuvent induire un coma diabétique où la glycémie diminue en dessous de 0,5 g/l. Ces accidents peuvent avoir de graves conséquences, notamment laisser des séquelles neurologiques ou même conduire à une issue fatale. Un autre inconvénient est le phénomène d'échappement, ou échec du traitement. L'échec primaire concerne 5% des sujets pour lesquels le traitement n'a plus d'effet au bout de quelques semaines. Dans le cas d'un échec secondaire, les patients voient apparaître au bout de quelques mois (ou années) une disparition de l'effet hypoglycémiant. Ce phénomène d'échappement concerne environ 15% des sujets traités.

1.3.3. Les inhibiteurs d'alpha-glucosidases.

Les inhibiteurs des alpha-glucosidases représentent la classe médicamenteuse contre le DNID, la plus récente. L'absorption intestinale de l'amidon et des dissacharides requiert l'action d'alpha-glucosidases situées à la périphérie des cellules épithéliales de l'intestin et hydrolysant les liaisons alpha-glucosides. Des composés ayant une activité inhibitrice de ces alpha-glucosidases ont été isolés ou synthétisés. Le principal représentant de cette nouvelle classe thérapeutique est l'acarbose {Donckier, J. *et al.* 1994} (Figure 4).

Isolé à partir d'une bactérie (*Actinoplanaceae*), l'acarbose présente une structure apparentée à celle des oligosaccharides ; c'est un inhibiteur compétitif (affinité de liaison 10^4 à 10^5 fois supérieure à celle des carbohydrates) et réversible de la glycoamylase et de la sucrase. L'acarbose ralentit l'absorption des hydrates de carbone au niveau de l'intestin et améliore les glycémies

élevées en post-prandial. Son action est dose-dépendante ; on retrouve moins de 1% d'acarbose dans le sang après absorption orale, et près de 80% de celui-ci est éliminé dans les selles. De plus, les inhibiteurs des alpha-glucosidases n'entraînent jamais d'hypoglycémie.

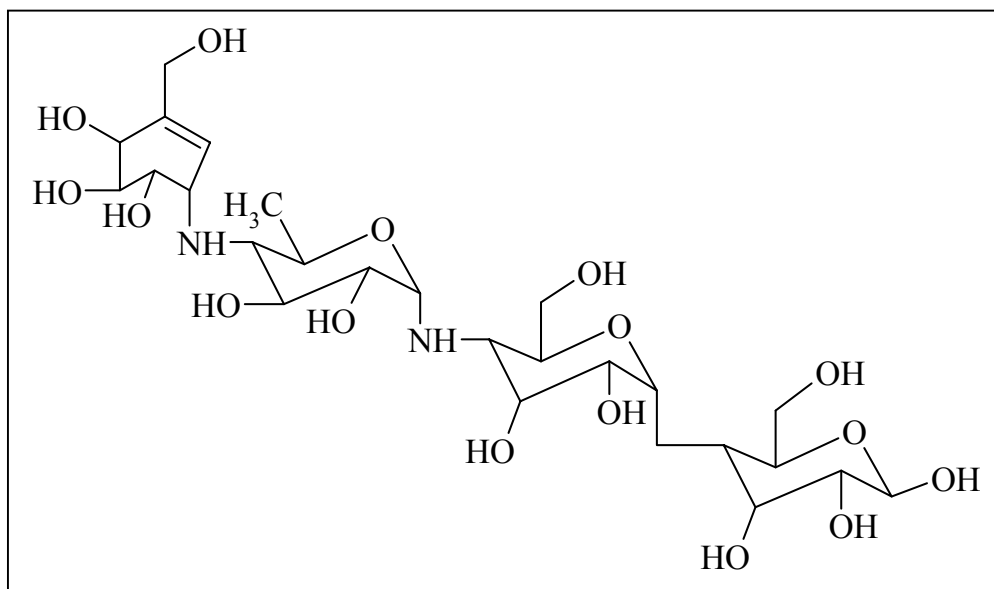


Figure 4. Structure de l'acarbose, inhibiteur d'alpha-glucosidases.

Ces médicaments sont indiqués lorsque la glycémie est constamment élevée après les repas ; ils empêchent l'hydrolyse des glucides complexes en monosaccharides et retardent ainsi l'absorption du glucose qui se fera au niveau de l'iléon plutôt que dans le jéjunum {Larger, E. 1998}. Mais la présence d'oligosaccharides dans le côlon favorise une croissance bactérienne qui par fermentation, est responsable des effets secondaires observés : flatulences, douleurs digestives et diarrhées.

Un autre inhibiteur d'alpha-glucosidase de structure beaucoup plus simple : le miglitol (Figure 5) a reçu l'agrément de la FDA en 1996. C'est le seul inhibiteur de cette famille à être totalement absorbé et à franchir la barrière intestinale. Il présente de plus beaucoup moins d'effets secondaires indésirables.

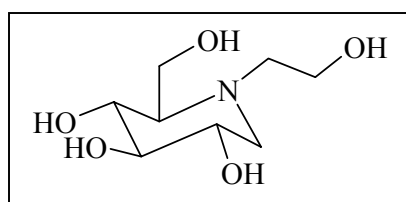


Figure 5. Structure du miglitol, inhibiteur d'alpha-glucosidases..

i.4. Nouvelles pistes thérapeutiques.

De nombreuses molécules sont en cours d'évaluation clinique ; le but est bien évidemment de mettre sur le marché des médicaments plus actifs, facilement administrables et présentant moins d'effets secondaires que les biguanides, les sulfonylurées ou les inhibiteurs d'alpha-glycosidases. Ces antidiabétiques « de demain » sont classés en fonction de leur mode d'action.

i.4.1. Les agents diminuant l'insulino-résistance.

C'est le cas notamment des sels de vanadyle (V^{4+}) qui possèdent des effets insulino-sensibilisateurs en agissant *in vitro* sur les tissus adipeux, les muscles squelettiques et le foie. Mais, malheureusement, ces produits ont des effets toxiques rédhibitoires.

Plus intéressants sont les dérivés des thiazolidinediones, et en particulier la troglitazone (Figure 6) qui diminue l'insulino-résistance périphérique de façon encore plus spécifique, semble-t-il, que les biguanides.

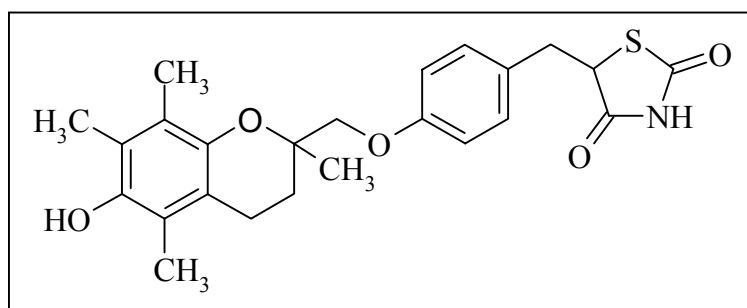


Figure 6. Structure de la troglitazone, dérivée des thiazolidinediones, diminuant l'insulino-résistance.

Ce composé est actuellement en phase clinique III, mais les premières données chez le patient DNID montrent un effet très modeste {Larger, E. 1998 ; Saltiel, A. R. *et al.* 1996}. De plus des problèmes de cardiomyopathies et d'anémies sont décrits comme effets secondaires pour plusieurs d'entre eux.

i.4.2. Les agents insulino-sécréteurs.

Le glimépiride (Figure 7), une nouvelle sulfonylurée, augmente l'insulino-sécrétion en bloquant les canaux K^+ ATP-dépendants, mais son site de fixation semble être différent de celui des sulfonylurées classiques. Il a une action insulino-mimétique et/ou insulino-sensibilisatrice, et n'est responsable que de peu d'effets secondaires indésirables.

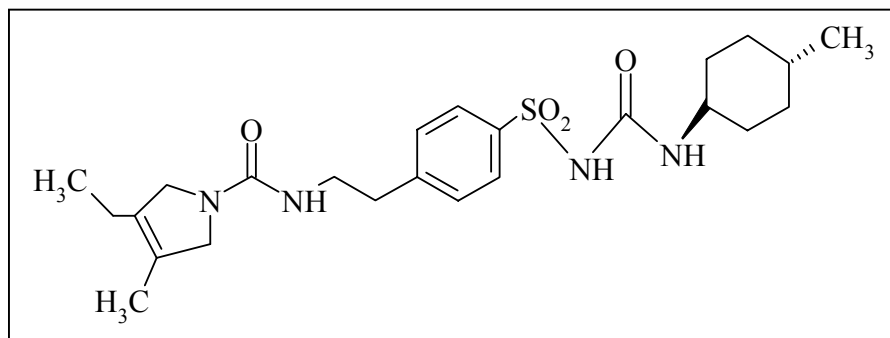


Figure 7. Structure du glimépiride, sulfonylurée de dernière génération.

Le répaglinide (Figure 8), amide proche de la classe des sulfonylurées, est un bon insulino-sécréteur. Il a une courte durée de vie dans le sang, ce qui diminue le risque d'hypoglycémie et il s'élimine exclusivement par la bile ; ceci laisse pressentir une action plus facile chez le sujet âgé ou avec une fonction rénale insuffisante.

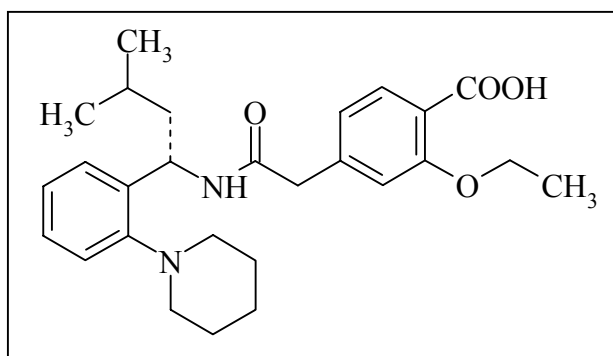


Figure 8. Structure du répaglinide, amide proche de la classe des sulfonylurées et agent insulino-sécréteur.

Après plusieurs années d'étude sur les graines de fénugrec (*Trigonella foenum graecum* L.), légumineuse du pourtour méditerranéen et d'Asie, des équipes montpelliéraines {Sauvaire, Y. *et al.* 1998} ont mis en évidence la présence dans ces graines d'un acide aminé non conventionnel,

la 4-hydroxyisoleucine (*Figure 9*), aux propriétés insulino-stimulantes particulièrement intéressantes.

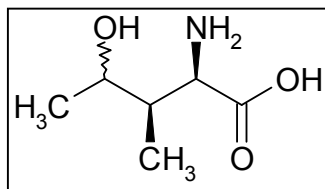


Figure 9. Structure de la 4-hydroxyisoleucine. Acide aminé non conventionnel, issu des graines de fénugrec.

En effet, cet acide aminé en agissant sur la cellule bêta-pancréatique, stimule la sécrétion d'insuline uniquement lorsque la concentration en glucose du milieu augmente. Cette insulino-sécrétion glucose-dépendante présente un profil biphasique et cet effet se produit sans changement d'activité des cellules pancréatiques (sécrétion de glucagon et de somostatine). De plus, il a été démontré que cette molécule n'interagissait pas avec d'autres agonistes de l'insulino-sécrétion comme le tolbutamide par exemple. L'amélioration de la tolérance au glucose a été démontrée sur modèle animal. Cette molécule agit à des concentrations micromolaires sur les îlots pancréatiques isolés de rats ou humains. Les essais cliniques (phase II) viennent de débiter.

i.4.3. Les médicaments n'agissant pas directement sur la glycémie.

Comme nous l'avons souligné plus haut, l'obésité constitue un facteur aggravant pour les patients souffrant de DNID ; en effet, il augmente l'insulino-résistance des tissus périphériques. Il est donc évident que toute molécule agissant sur le métabolisme des lipides peut amener une amélioration sensible de l'état des diabétiques.

L'orlistat (*Figure 10*) qui est un inhibiteur de la lipase, agit au niveau de l'intestin en diminuant d'environ 30% l'absorption des graisses. Ce composé qui est en phase clinique III devrait avoir d'intéressantes applications {Hollander, P. A. *et al.* 1998 ; Drent, M. L. *et al.* 1995}.

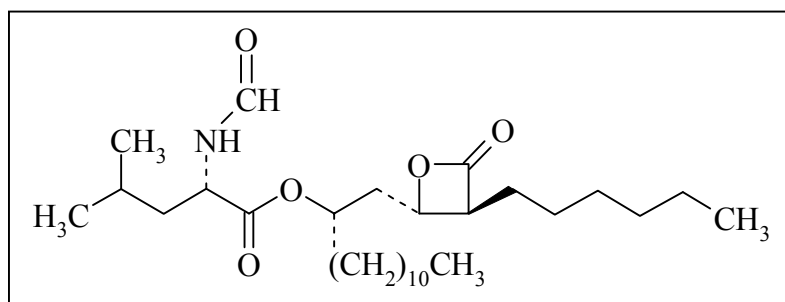


Figure 10. Structure de l'orlistat, inhibiteur de lipase.

L'aminoguanidine (Figure 11) et ses dérivés, dont la pimagedine, pourraient constituer une véritable révolution thérapeutique. Ces composés diminuent les risques de cytotoxicité, liés à un taux de glucose cellulaire trop important ; ils réduisent ainsi le risque de complications, même dans les cas où la glycémie n'est pas parfaitement contrôlée.

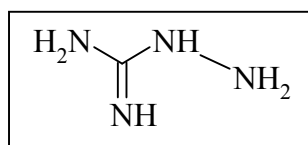


Figure 11. Structure de l'aminoguanidine, évitant les problèmes de glucotoxicité.

i.4.5. Les antidiabétiques peptidiques.

Parmi les peptides à activité antidiabétique potentiellement utilisables, on retiendra l'IGF-1 (*insulin-like growth factor*), qui présente de fortes analogies de séquence avec la proinsuline. Son utilisation abaisse le taux de glucose sanguin et augmente la sensibilité cellulaire à l'insuline. Toutefois, ce peptide est responsable, sous sa forme injectable (sous-cutanée), de nombreux effets secondaires indésirables.

Beaucoup plus intéressant est le Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1), peptide endogène de 30 ou 31 résidus (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG ou HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR~NH₂) qui fait actuellement l'objet d'études intensives. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, exclusivement dédié à cette molécule, le GLP-1 améliore l'insulino-résistance des tissus, mais surtout il a une action insulino-sécrétoire glucose-dépendante (d'où absence de risque de coma hypoglycémique) tout en diminuant la sécrétion de glucagon,

hormone hyperglycémiant. Son action sur les cellules bêta pancréatiques est différente de celle des sulfonylurées, puisque n'agissant pas sur les canaux K^+ ATP-dépendants. Après liaison à un récepteur spécifique, il active, *via* l'AMPc, la protéine kinase A (PKA) qui, en phosphorylant divers éléments de la voie de signalisation du glucose, amplifie la réponse insulino-sécrétoire.

i.5. Autres types de diabète.

Il existe d'autres cas de diabète sucrés dont la prévalence est beaucoup plus rare. Ils sont appelés « autres types spécifiques » et regroupent tous les diabètes associés à des maladies génétiques (ex. ataxie de Friedreich, défaut génétique de la fonction bêta cellulaire...), les diabètes d'origine médicamenteuse (stéroïdes) ou chimique. Signalons à ce propos que des composés (Figure 12), proches structurellement des guanidines, tels que le pyriminil (raticide) {Taniguchi, H. *et al.* 1989 ; Wilson, G. L. *et al.* 1983} et la pentamidine (utilisée dans le traitement de certaines pneumonies) {Assan, R. *et al.* 1995 ; Sai, P. *et al.* 1983} induisent des DID en détruisant sélectivement les cellules bêta des îlots de Langerhans.

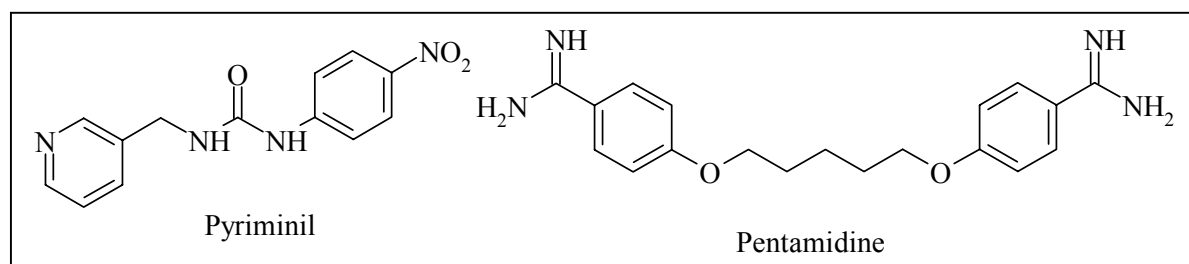


Figure 12. Structures du pyriminil (raticide) et de la pentamidine, induisant des cas de DID.

Sont également classés dans cette catégorie les diabètes associés à toutes autres raisons causant une hyperglycémie, comme l'endocrinopathie, les diabètes pancréatoprives (pancréatectomie, pancréatite chronique, fibrose kystique ...), ou les formes inhabituelles de diabète d'origine immunologique.

Enfin, tout diabète contracté pendant une grossesse sera appelé diabète gestationnel (GDM). Il se développe chez certaines femmes enceintes (2 à 5% des grossesses d'après le *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*) ; les risques pour contracter la maladie disparaissent après accouchement. Mais ce type de diabète est un facteur-risque pour un développement de DNID.

i.6. Traitement du DNID.

En attendant l'avènement de nouvelles molécules comme le GLP-1 par exemple, l'organigramme rapporté sur la *Figure 13* schématise le chemin décisionnel du traitement du DNID {Charbonnel, B. *et al.* 1998}. Il résume les étapes successives du traitement chez un même patient, étapes généralement couronnées de succès mais pour quelques mois ou quelques années, du fait de la progression de la maladie.

Ce schéma fait suite à une très grande étude menée au Royaume Uni sur plusieurs années (et dont les résultats définitifs devraient être incessamment publiés) : *United Kingdom Prospective Diabetes Study* {UKPDS Group 1995}. Elle porte sur plus de 5000 diabétiques nouvellement diagnostiqués non insulino-dépendants, d'âge moyen (52 ans) et dont certains sont obèses. Cette étude avait essentiellement deux buts :

- ❑ Evaluer si le bon contrôle prolongé du diabète était capable de réduire le risque de complications vasculaires.
- ❑ Comparer les avantages et les inconvénients des différents traitements possibles (régime, insuline, sulfonylurées, biguanides, acarbose).

On notera, au regard du schéma rapporté sur la *Figure 13*, qu'en France l'insuline est sous-utilisée dans le traitement du DNID ; elle est réservée en cas d'échappement au traitement par sulfonylurées.

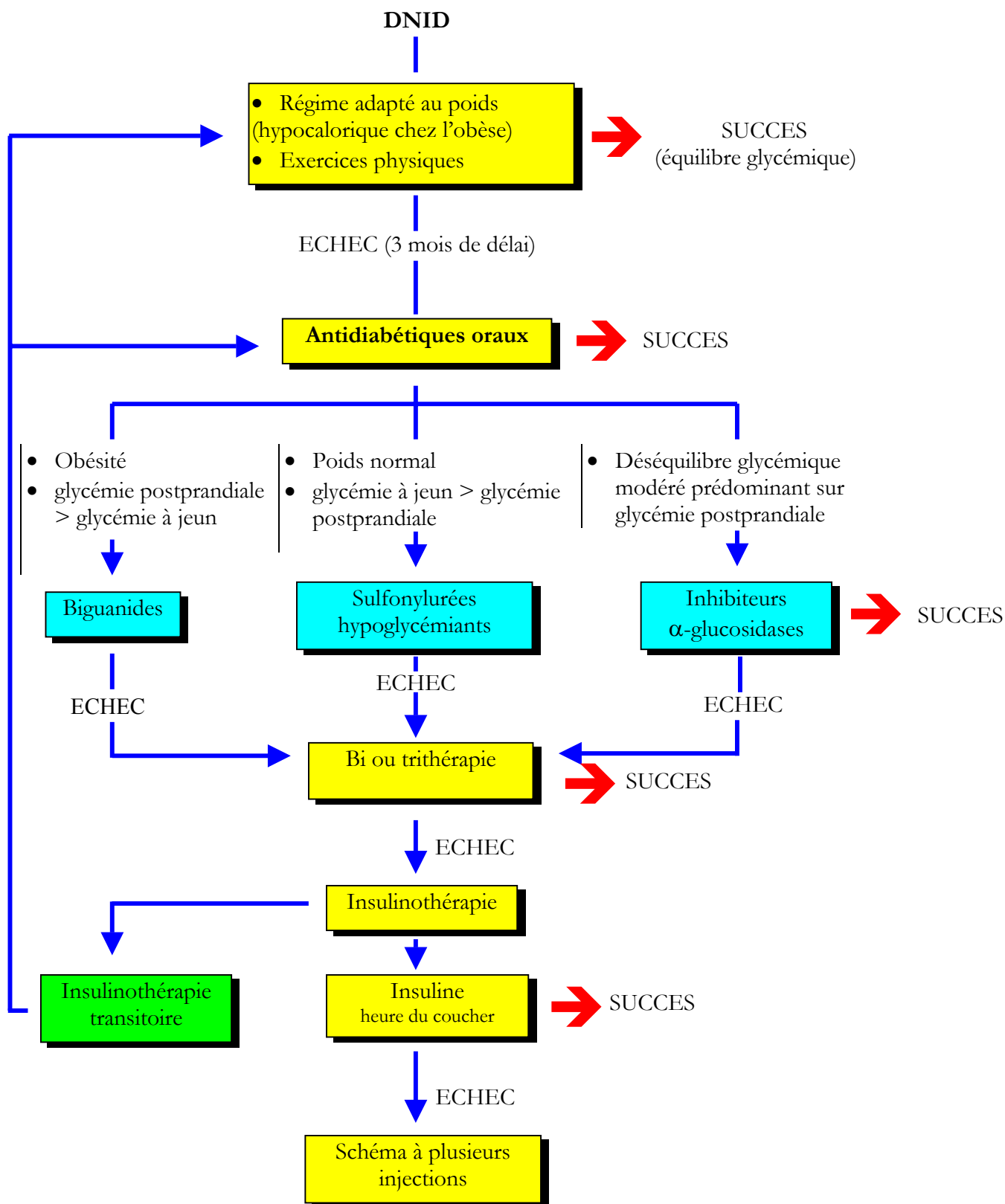


Figure 13. Arbre décisionnel concernant le traitement du diabète non-insulino-dépendant. Différentes étapes de la thérapie en fonction de la progression de la maladie.

Chapitre I.

GLP-1-(7-37) ET (7-36) AMIDE : ORIGINE PHYSIOLOGIQUE ET PROPRIETES INSULINO-SECRETRICES.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.

Le glucagon, hormone peptidique hyperglycémiant, et le GLP-1, hormone peptidique hypoglycémiant, sont tous deux codés par le gène du glucagon (9,3 kb) localisé sur le chromosome 2, bande q36-q37 {Ahren, B. 1998}. La traduction de l'ARN messager conduit au précurseur endogène des deux hormones : le préproglucagon, protéine de 179 acides aminés chez l'homme {Conlon, J. M. 1988 ; Bell, G. I. *et al.* 1983}. Le préproglucagon, fait d'abord l'objet d'une coupure protéolytique (clivage du peptide signal) au niveau de la liaison Gln²⁰- Arg²¹ pour donner le proglucagon (159 résidus). Ce dernier, sous l'action de protéases, subit une maturation, variable selon les tissus, donnant naissance à de nombreux peptides dont les principaux sont répertoriés dans le *Tableau 1* {Conlon, J. M. 1988}.

Au niveau des cellules alpha-pancréatiques, le proglucagon est clivé en GRPP (*Glicentin-Related Pancreatic Peptide*) et en glucagon, alors qu'au niveau des cellules L intestinales, il est principalement clivé en glicentine, oxyntomoduline, GLP-1-(72-108), GLP-1-(72-107) amide (*Tableau 2*) et glucagon-like peptide-2 (GLP-2) {Thorens, B. 1992 ; Gutniak, M. *et al.* 1992 ; Orskov, C. *et al.* 1989}. Sous la forme GLP-1-(72-108) ou GLP-1-(72-107) amide, le peptide est sans effet biologique connu, particulièrement sur l'insulino-sécrétion {Thorens, B. 1992 ; Mojsov, S. *et al.* 1987 ; Schmidt, W. E. *et al.* 1985}. Il doit subir une dernière coupure protéolytique au niveau des cellules L intestinales, pour conduire aux GLP-1-(7-37) et GLP-1-(7-36) amide (*Tableau 2*), seules formes actives du peptide {Mojsov, S. *et al.* 1990 ; Kreyman, B. *et al.* 1987 ; Bell, G. I. *et al.* 1983}. Le GLP-1-(7-37) possède une glycine C-terminale qui est absente dans le GLP-1-(7-36) amide.

Proglucagon Résidus	Noms Triviaux	Représentation Structurale
(1 - 159)	Proglucagon	H₂N CO₂H KR KR KR R RR RR R
(1 - 69)	Glicentine entéroglucagon	
(1 - 30)	GRPP	
(33 - 69)	Oxyntomoduline	
(33 - 61)	Glucagon	
(72 - 108)	GLP-1-(72-108)	
(78 - 108)	GLP-1-(7-37) insulindropine	
(126 - 158)	GLP - 2	

Tableau 1. Principaux peptides issus du proglucagon, par l'action de protéases, dans les cellules alpha-pancréatiques, et les cellules L intestinales.

Chez l'homme et le porc, on trouve environ deux fois plus de GLP-1-(7-36) amide que de GLP-1-(7-37), toutefois ces deux peptides ont globalement la même activité {Kreymann, B. *et al.* 1987 ; Holst, J. J. *et al.* 1987 ; Mojsov, S. *et al.* 1986}.

Séquences	1	7	37
GLP-1-(72-108)	HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG~COOH		
GLP-1-(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG~COOH		
GLP-1-(72-107)-NH₂	HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR~NH ₂		
GLP-1-(7-36) amide	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR~NH ₂		

Tableau 2. Séquences primaires des différentes formes de GLP-1. Seules les formes GLP-1 (7-37) et (7-36) amide sont actives.

La séquence du GLP-1 est fortement conservée entre les différentes espèces ce qui est l'indice d'un rôle physiologique majeur {Adelhorst, K. *et al.* 1994 ; Mojsov, S. *et al.* 1990 ; Drucker, D. J. *et al.* 1987}. Cette séquence présente d'ailleurs de fortes homologues avec celles du glucagon, du GIP (*Gastric Inhibitory Polypeptide*) du VIP (*Vaso active Intestinal Peptide*), de la sécrétine, du GRF (*Growth hormone Releasing Factor*), du PACAP-38 (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*). Tous ces peptides (Tableau 3), ayant une activité différente de celle du GLP-1, appartiennent à la « superfamille » du GRF, dont plus précisément le GLP-1, le GLP-2, le glucagon et le GIP forment une seule et même branche {Adelhorst, K. *et al.* 1994 ; Campbell, R. M. *et al.* 1992}. Il est à noter également des similitudes avec l'exendine-4, un peptide isolé du venin de *Heloderma suspectum*, qui est un puissant agoniste du GLP-1 alors que la forme tronquée, l'exendine-(9-39), est un antagoniste spécifique {Montrose-Rafizadeh, C. *et al.* 1997b ; Schepp, W. *et al.* 1994 ; Fehmann, H. C. *et al.* 1994 ; Goke, R. *et al.* 1993 ; Thorens, B. *et al.* 1993a ; Raufman, J. P. *et al.* 1992}.

GLP-1-(7-36)-NH ₂	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR ~NH ₂
GLP-1-(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG ~COOH
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQD FVQWLMNT
GIP	YAEGTFTSDYS IAMDKIHQQD FVQWN WLLAQKGKKNDWKHNITQ
VIP	HSDAVFTD NYTRLRKQ MAV KKYLN SI LN~NH ₂
Secretine	HSDGTFTSEL SRLRDSARLQRL LQGLV ~NH ₂
PACAP-38	HSDGIFTDSY SRYRKQ MAV KKYLA AV LGK RY KQ RV KNK~NH ₂
GRF	YADAIFT NSYRK VL GQ LS ARKLLQDIMS RQ QGES NQ ERG AR ARL
Exendine-4	HGEGTFTSD LSKQ ME EE AV RL FIE WLK NG GPSSGAPPPS~NH ₂
Exendine (9-39)	DLSKQME EE AV RL FIE WLK NG GPSSGAPPPS~NH ₂

Tableau 3. Séquences primaires des deux formes actives du GLP-1 comparées à celles d'autres peptides de la famille du GRF, et comparées à celles de l'exendine. Les zones en gras représentent les régions homologues.

1.1. Activités antidiabétiques *in vitro*.

En 1987, MOJSOV *et al.* {Mojsov, S. *et al.* 1987} ont montré que le GLP-1-(7-37) augmentait très fortement (20 fois à 5.10^{-9} M et 6 fois à 5.10^{-11} M) l'insulino-sécrétion de pancréas de rats perfusés, en présence de glucose, et ce à des concentrations compatibles avec les concentrations physiologiques déterminées *in vivo* (15 pM au niveau périphérique, et 50 pM au

niveau portal). Le GLP-1-(7-36) amide se comporte strictement de la même manière {Holst, J. J. *et al.* 1987}.

Selon HOLZ *et al.* {Holz, G. G 4th *et al.* 1993}, le GLP-1-(7-37) redonnerait aux cellules bêta des îlots de Langerhans, initialement résistantes, une sensibilité au glucose appelée « compétence au glucose ». Ceci est à rapprocher du fait que ce peptide stimule l'expression du gène de l'insuline dans des cellules en culture {Drucker, D. J. *et al.* 1987}.

Il a été également montré que le GLP-1-(7-37) augmentait très significativement les concentrations d'AMPc des cellules bêta-pancréatiques, même à des concentrations aussi faibles que 5.10^{-11} M {Drucker, D. J. *et al.* 1987}.

1.2. Activités antidiabétiques *in vivo*.

Les effets stimulants sur l'insulino-sécrétion du GLP-1 *in vivo* sont maintenant parfaitement démontrés chez l'homme, diabétique ou non. Entre autre, KREYMANN *et al.* {Kreymann, B. *et al.* 1987} ont montré qu'une perfusion de GLP-1-(7-36) amide reproduisant les variations de concentrations postprandiales, induit une nette élévation des concentrations plasmiqes en insuline, accompagnée dans le même temps d'une diminution des concentrations de glucose et de glucagon. Ces effets sont encore plus francs lorsque la perfusion est effectuée parallèlement à une administration *i.v.* de glucose.

Le GLP-1-(7-37) stimule l'insulino-sécrétion et diminue la glycémie, après un repas standard, chez les patients atteints de DNID {Nathan, D. M. *et al.* 1992}. Il en est de même pour le GLP-1-(7-36) amide, qui en plus diminuerait l'insulino-résistance. En effet, une perfusion de ce peptide chez des sujets diabétiques diminue les besoins en insuline {Gutniak, M. *et al.* 1992}.

Une administration exogène de GLP-1-(7-36) amide normalise la glycémie à jeun d'un patient diabétique, et celle-ci reste stable pendant plus d'une heure après interruption de la perfusion. L'effet est lié à la présence de glucose {Nauck, M. A. *et al.* 1993b}.

1.3. Propriétés complémentaires.

Entre autres propriétés, il peut être intéressant de noter que le GLP-1-(7-36) amide inhibe au moins partiellement la libération de glucagon par les cellules alpha-pancréatiques, et stimule la libération de somatostatine par les cellules delta-pancréatiques {Fehmann, H. C. *et al.* 1992 ; Suzuki, S. *et al.* 1989}. De plus, une perfusion chez l'homme de ce peptide aux concentrations physiologiques, provoque une diminution des sécrétions acides gastriques (-50%) et de la vidange gastrique (-33%) {O'Halloran, D. J. *et al.* 1990}.

On notera que le GLP-1-(7-36) amide exerce également un effet lipolytique au niveau des adipocytes isolés de rats {Ruiz-Grande, C. *et al.* 1992}.

La mise en évidence du GLP-1 et de son récepteur spécifique dans les tissus cérébraux, a poussé un certain nombre d'équipes à lui chercher un rôle autre qu'insulino-sécréteur. Des injections intracérébro-ventriculaires prouveraient que le GLP-1 serait un médiateur physiologique de la satiété. En particulier, ce neuropeptide interviendrait dans la régulation hypothalamique de prise de nourriture et d'eau {Shughrue, P. J. *et al.* 1996 ; Navarro, M. *et al.* 1996 ; Tang-Christensen, M. *et al.* 1996 ; Turton, M. D. *et al.* 1996}.

Enfin, d'autres études font ressortir le fait que le GLP-1 serait impliqué dans la régulation thermique {O'Shea, D. *et al.* 1996}, et dans la transmission du signal nerveux dans le système peptidergique-non-adrénergique-non-cholinergique, au niveau de l'innervation des voies respiratoires supérieures {Richter, G. *et al.* 1993}.

En fait, si la fonction antidiabétique du GLP-1 est particulièrement bien établie et ne souffre plus aucune discussion, il n'en est pas de même de ces autres effets physiologiques qui font l'objet de vives controverses {Scrocchi, L. A. *et al.* 1996}.

1.4. Intérêt thérapeutique des deux formes actives du GLP-1.

Comme le GIP, les deux formes du GLP-1 sont des incrétines {La Barre, J. *et al.* 1930 ; Zunz, E. *et al.* 1929}, c'est à dire des substances effectrices endocrines, libérées au niveau des cellules intestinales sous l'influence de nutriments et qui stimulent l'insulino-sécrétion au niveau du pancréas. Mais, contrairement au GIP, l'effet incrétine du GLP-1 se manifeste chez les patients atteints de DNID {Rachman, J. *et al.* 1996 ; Nauck, M. A. *et al.* 1993b}.

Ainsi les GLP-1-(7-37) et (7-36) amide, de part leur action antidiabétique (stimulation de l'insulino-sécrétion, diminution de la résistance à l'insuline et possible restauration de l'activité des cellules bêta-pancréatiques) {Nauck, M. A. *et al.* 1993a ; Fehmann, H. C. *et al.* 1992 ; Orskov, C. *et al.* 1991 ; Kreymann, B. *et al.* 1988 ; Kreymann, B. *et al.* 1987 ; Nauck, M. *et al.* 1986} présentent un grand intérêt thérapeutique et ce, d'autant plus, qu'il n'y a pas de risques d'hypoglycémie comme cela peut être le cas avec les sulfonylurées hypoglycémiantes (Cf. Introduction) {Creutzfeldt, W. *et al.* 1985 ; Creutzfeldt, W. 1979}.

Dans ce travail, nous nous sommes tout d'abord attaché à mettre en évidence les caractéristiques structurales du GLP-1, nécessaires à l'établissement d'une liaison entre ce peptide et le récepteur. Ceci permet de définir de manière rationnelle des analogues plus résistants à l'action des protéases et, si possible, plus actifs que l'hormone naturelle. Cette dernière agissant à des concentrations voisines de 10^{-9} M, il peut sembler illusoire de vouloir augmenter son efficacité. Toutefois, il faut avoir présent à l'esprit que le GLP-1 est un peptide relativement long, onéreux à produire, en conséquence, toute amélioration de l'activité (ne serait ce que d'un facteur 2) se ressentira de manière positive sur le coût du traitement du DNID. Il n'en reste pas moins vrai que l'obstacle majeur à une future utilisation thérapeutique du GLP-1, mis à part les problèmes de biodisponibilité et de cinétique, est sa faible stabilité métabolique (< 5 min.), qu'il soit sous forme amidée ou non.

Chapitre II.

GLP-1 ET ANALOGUES : ACTIVITE BIOLOGIQUE ET STABILITE METABOLIQUE.

DE LA CONCEPTION DE L'ETUDE A LA DISCUSSION DES RESULTATS.

Comme indiqué à la fin du chapitre précédent, il paraît important d'augmenter le temps de demi-vie du GLP-1-(7-36) amide (ou 7-37) afin d'en faire un médicament utilisable. Pour cela, il est nécessaire de substituer les acides aminés cibles des protéases responsables de l'inactivation, par d'autres acides aminés (codés ou non-codés) non-reconnus par l'arsenal enzymatique.

Cette étape est délicate. En effet, les modifications effectuées ne doivent affecter ni la capacité de l'hormone à se lier au récepteur, ni celle de l'activer. Il est bien connu en chimie peptidique que toute délétion ou mutation risque de modifier les interactions ligand-récepteur. Il est facile de comprendre que le changement d'une lysine par une valine, par exemple, peut diminuer considérablement l'activité biologique, en supprimant une liaison ionique entre le ligand et un résidu acide (aspartique ou glutamique) situé dans le site actif de la protéine cible. D'autre part, ce changement peut influencer aussi sur la conformation du peptide qui devient incapable, du fait d'un changement de « forme », de s'adapter à la protéine réceptrice. *A contrario*, mutations et/ou délétions peuvent, bien sur, avoir des effets favorables en stabilisant par exemple la conformation bioactive.

Afin de rationaliser le choix des mutations pour la synthèse d'analogues « stables » du GLP-1, la connaissance des enzymes responsables de l'inactivation du peptide *in vivo*, ainsi que des résidus cibles, est de première importance si l'on veut améliorer le temps de demi-vie du peptide. De même, connaître la structure adoptée par le ligand lors de l'interaction avec le récepteur serait un atout majeur pour la synthèse d'analogues pharmacologiquement intéressants.

2.1. Peptidases impliquées dans la dégradation et l'inactivation du GLP-1-(7-36).

Des travaux rapportés dans la littérature, il ressort que les deux principales protéases impliquées dans l'hydrolyse du GLP-1-(7-36) amide sont la Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) et l'Endopeptidase Neutre 24.11 (Neutral Endopeptidase 24.11, NEP 24.11).

La DPP IV est une aminopeptidase hautement spécifique qui attaque essentiellement au niveau d'une alanine ou d'une proline, située en deuxième position d'une séquence peptidique, libérant ainsi un dipeptide du type H-X-Ala-OH ou H-X-Pro-OH (X pouvant être n'importe quel résidu). La DPP IV est ubiquiste ; on la rencontre circulante dans le sérum humain et comme ectoenzyme fixée à la membrane cellulaire de nombreux tissus. Elle est responsable de la dégradation de la plupart des peptides de structure H-X-Ala- ou H-X-Pro-, tels que la substance P ou le GRF. Comme nous le verrons par la suite, l'activité du GLP-1 nécessite obligatoirement la présence d'une partie N-terminale intacte, ainsi il a été suggéré que la DPP IV pouvait avoir un rôle majeur dans le catabolisme *in vivo* de cette hormone {Drucker, D. J. 1998 ; Holst, J. J. *et al.* 1998 ; Deacon, C. F. *et al.* 1998a ; Kieffer, T. J. *et al.* 1995}.

L'autre enzyme responsable de l'endoprotéolyse du GLP-1 est la NEP 24.11, ectopeptidase impliquée dans les processus de maturation de nombreuses hormones peptidiques {Hupe-Sodmann, K. *et al.* 1997 ; Hupe-Sodmann, K. *et al.* 1995}. Chez l'homme on la rencontre dans le cerveau, les reins, les poumons et les neutrophiles. C'est une métalloprotéine à zinc de 94 kDa qui hydrolyse les substrats peptidiques du côté amine des résidus hydrophobes. Il a été montré que le GLP-1 est un bon substrat de la NEP 24.11. *In vitro*, l'attaque se fait au niveau de Val¹⁶, de Tyr¹⁹, de Leu²⁰, de Phe²⁸, de Ile²⁹ et de Leu³² conduisant ainsi à la formation de neuf fragments inactifs (Tableau 4). En fait, il semble qu'*in vivo*, l'hydrolyse s'effectue de manière très largement prépondérante au niveau des liaisons Asp²⁷-Phe²⁸ et Trp³¹-Leu³² qui constitueraient les vrais cibles de l'enzyme.

Si l'on s'en tient aux données de la littérature rapportées ci-dessus et concernant l'action de la DPP IV et de la NEP 24.11 sur le GLP-1-(7-36) amide, il apparaît que des modifications au niveau des positions 2, 28 et 32 devraient permettre, en réduisant la sensibilité à ces deux protéases, d'améliorer la stabilité métabolique. Encore faut-il que ces changements soient effectués de manière judicieuse pour maintenir et, si possible, améliorer l'activité biologique. C'est

pourquoi nous avons entrepris un examen systématique des relations structure-fonction réalisées sur le GLP-1-(7-36) et rapportées dans la littérature.

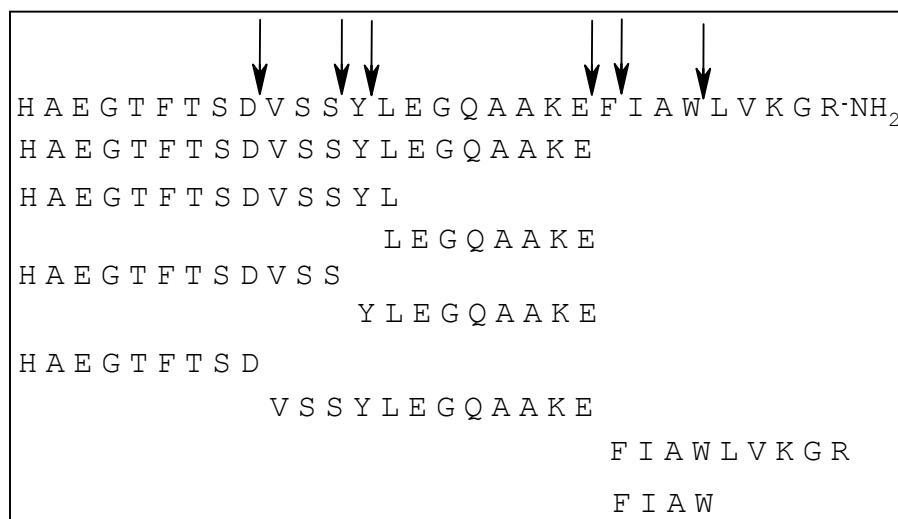


Tableau 4. Séquences des fragments générés par action de la NEP 24.11 sur le GLP-1-(7-36). Les flèches indiquent les sites de coupure.

2.2. GLP-1-(7-36) : relations structure-fonction à l'origine du travail.

Plusieurs études effectuées sur les deux formes actives du GLP-1 ont clairement démontrées l'importance des résidus situés aux deux extrémités de la molécule. Ainsi, la délétion de l'histidine N-terminale ou des quatre acides aminés C-terminaux conduit à une perte presque complète de la capacité à se lier au récepteur {Goke, R. *et al.* 1997 ; Mojsov, S. 1992} et, par voie de conséquence, à une diminution importante de l'activité biologique {Gefel, D. *et al.* 1990 ; Suzuki, S. *et al.* 1989}.

Des peptides chimères GLP-1-(7-36) amide/glucagon ou GIP {Gallwitz, B. *et al.* 1996 ; Hjorth, S. A. *et al.* 1994}, ont permis de mettre en évidence le rôle respectif des parties N et C-terminales dans les processus de reconnaissance et d'activation du récepteur. Il apparaît que le N-terminal serait plutôt impliqué dans le processus d'activation et le C-terminal dans celui de reconnaissance (liaison). Ceci est en accord avec le fait que dans les peptides appartenant à la famille du GRF (Tableau 3), les séquences N-terminales sont beaucoup mieux conservées que les C-terminales. De même, on peut noter que l'antagoniste spécifique du GLP-1, l'exendine (9-39), est dépourvu de cette partie N-terminale conservée au sein de la famille.

L'importance de chaque acide aminé, pris individuellement, sur le comportement biologique du GLP-1-(7-36) amide a été étudiée à partir du remplacement systématique de chacun des résidus de la séquence par une alanine (Ala-scan) {Goke, R. *et al.* 1997 ; Adelhorst, K. *et al.* 1994 ; Gallwitz, B. *et al.* 1994}, ou par l'acide aminé correspondant dans la séquence du glucagon si le résidu est déjà une alanine. Cette méthode de l'Ala-scan est souvent utilisée dans ce type d'étude, car l'alanine, comme nous le verrons plus tard, ne détruit généralement pas les structures secondaires (hélice alpha, feuillet bêta ...).

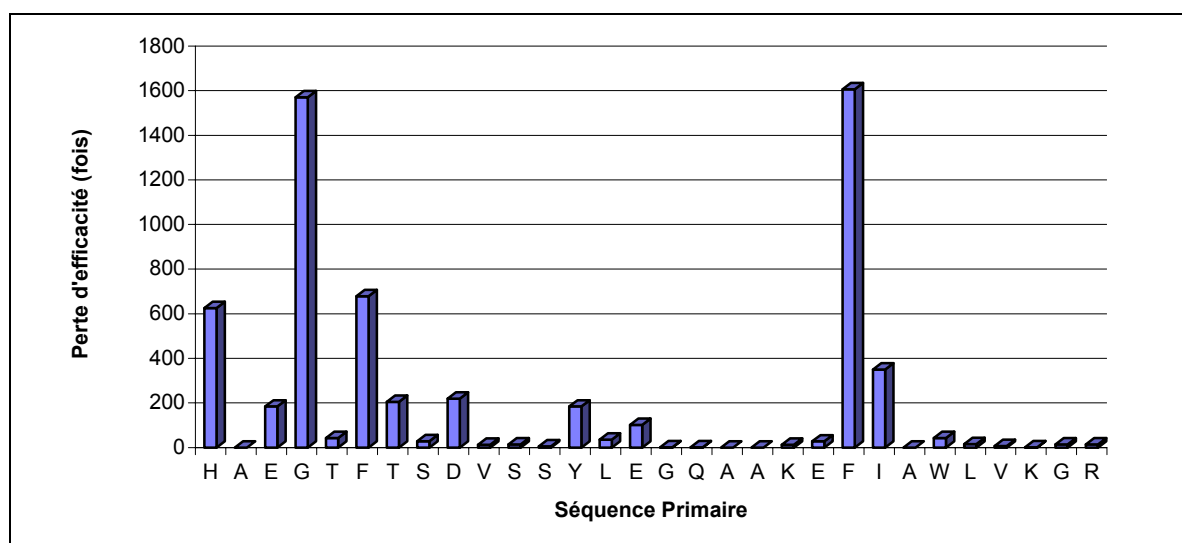


Figure 14. Ala-scan du GLP-1-(7-36). Représentation des positions de mutation induisant une perte d'efficacité par rapport au peptide natif.

De la Figure 14, il ressort que les acides aminés impliqués dans l'activité biologique sont d'abord : His⁷, Gly¹⁰, Phe¹² et Phe²⁸, puis dans une moindre mesure Ile²⁹ ainsi que Glu⁹, Thr¹³, Asp¹⁵, Tyr¹⁹ et Glu²¹. Selon PARKER *et al.* {Parker, J. C. *et al.* 1998}, il faudrait rajouter à cette liste Leu³². Ces résultats sont relativement encourageant puisqu'ils permettent d'envisager une stabilisation du GLP-1 vis à vis de la plus importante des protéases : la DPP IV. En effet, la cible de cette enzyme est l'alanine en position 2 dont la substitution par n'importe quel acide aminé (sauf évidemment la proline reconnue aussi par la DPP IV), ne devrait avoir aucune incidence ni sur la liaison au récepteur, ni sur la production intracellulaire d'AMPc. Il a d'ailleurs été montré que [Ser⁸]GLP-1 était métaboliquement plus stable que le peptide natif {Deacon, C. F. *et al.* 1998b}.

Il apparaît beaucoup plus difficile de bloquer l'hydrolyse par la NEP 24.11, puisque la phénylalanine 28 ne peut être changée sans perte complète d'activité. Quoiqu'il en soit, la NEP 24.11 apparaît beaucoup moins impliquée dans la dégradation du GLP-1 que la DPP IV.

2.3. Etudes structurales.

2.3.1. Résonance Magnétique Nucléaire - Etat de la question.

THORNTON et GORENSTEIN {Thornton, K. *et al.* 1994} ont étudié, par résonance magnétique nucléaire du proton, la structure en solution du $[N^{15}]$ GLP-1-(7-36), analogue dans lequel l'acide aspartique en position 15 a été remplacé par une asparagine. Selon ces auteurs, ce peptide n'est pratiquement pas structuré dans l'eau ; il acquiert une conformation stable uniquement dans les environnements membranomimétiques, tels que les micelles de dodécylphosphocholine (DPC). Là, il se compose d'une partie N-terminale (résidus 7-13) « *random coil* » et de deux hélices alpha (résidus 14-20 et 24-36) reliées par une charnière conformationnellement labile (résidus 21-23) (*Figure 15*).

7 14 21 . . 24 36
 H A E G T F T S N V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R

Résidus 7-13 « random coil »

Résidus 14-20 hélice alpha

Résidus 21-23 charnière conformationnellement labile

Résidus 24-36 hélice alpha

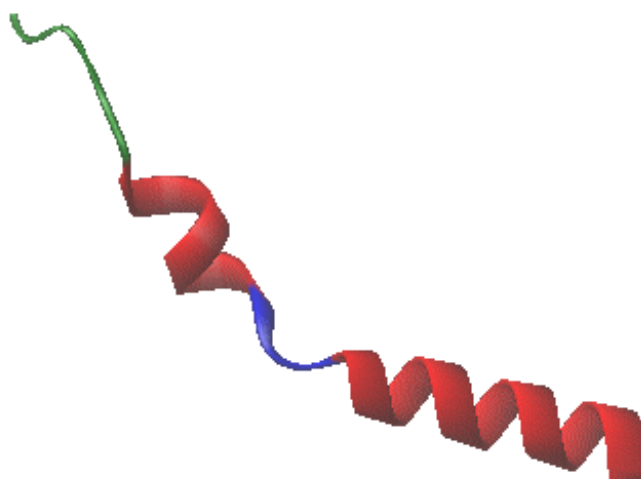


Figure 15. A/ Position des éléments structuraux dans la séquence primaire du GLP-1 selon Thornton et Gorenstein. B/ Modèle minimisé du GLP-1, à partir de ces éléments structuraux.

Des résultats RMN, il apparaît que l'hélice 24-36 est plus stable que la 14-20. En projection d'EDMUNDSON {Schiffer, M. *et al.* 1967}, ces deux hélices et surtout la C-terminale présentent un caractère amphipatique marqué (*Figure 16*). THORNTON et GORENSTEIN ont émis l'hypothèse que la charnière -Glu-Gly-Gln- pourrait permettre, par rotation au niveau de la glycine 22, un positionnement précis des deux parties hélicoïdales de façon à exposer les zones hydrophobes vers l'extérieur de la molécule, permettant ainsi une interaction avec les phospholipides membranaires. Ceci laisserait supposer qu'avant de se lier au récepteur, le GLP-1 pourrait s'incorporer dans la membrane.

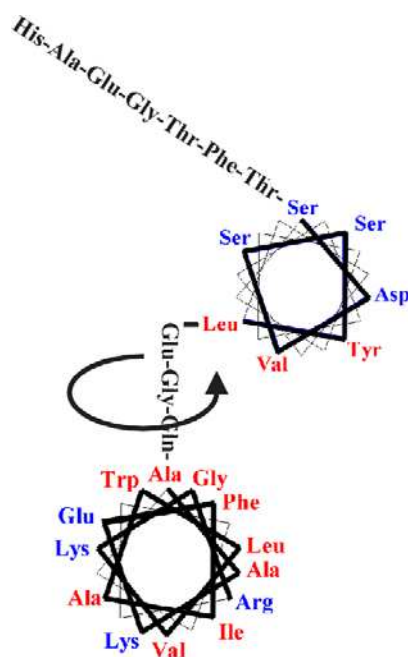


Figure 16. Projection d'Edmundson du GLP-1-(7-37) montrant le caractère amphipatique des deux hélices 14-20 et 24-36. Les résidus polaires des hélices (Arg, Asp, Glu, Lys, Ser) sont notés en bleu.

De plus, dans la conformation « initiale » de THONTON et GORENSTEIN (*Figure 17*), le GLP-1-(7-36) amide est une molécule parfaitement amphipatique dans laquelle les zones de polarité différente sont spatialement séparées. En effet, on distingue clairement sur la *Figure 17* une face lipophile et une face hydrophile. Cette caractéristique, rencontrée dans de nombreux peptides antibiotiques, pourrait rendre compte de l'interaction du GLP-1 avec les micelles et les membranes.

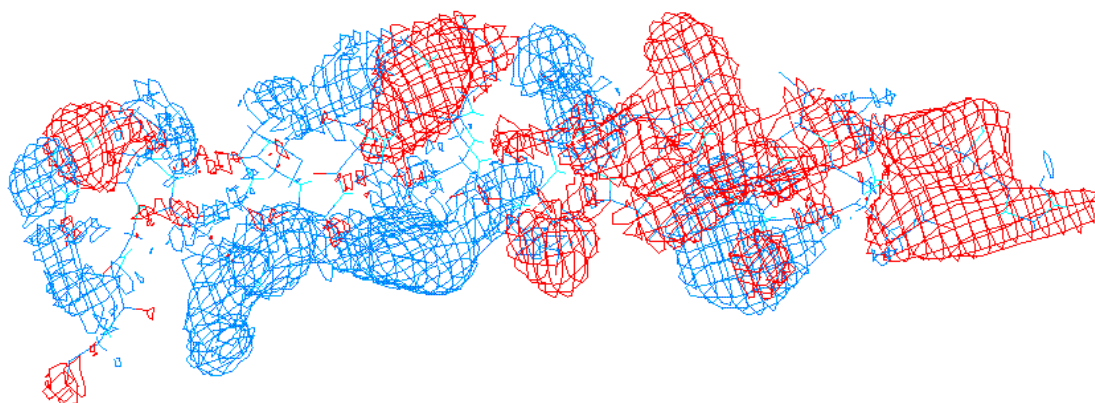


Figure 17. Vue latérale des potentiels de lipophilie positifs (en bleu) et négatifs (en rouge) du GLP-1-(7-36) amide en milieu micellaire, montrant le caractère amphipatique de la molécule.

Il paraît anormal qu'une hormone agissant sur un récepteur membranaire doive transiter par la bicouche lipidique. Toutefois, il est clair que la recherche d'une cible membranaire par un peptide ou tout autre molécule, par diffusion dans un espace bidimensionnel (la bicouche lipidique), est un processus énergétiquement favorisé par rapport à une recherche dans un espace tridimensionnel (le milieu extracellulaire). Il est connu depuis longtemps que la reconnaissance entre le glucagon, étroitement apparenté au GLP-1 (*Tableau 3*), et son récepteur dépend de l'environnement lipidique. Des travaux relativement récents {Maurer, T. *et al.* 1991} ont montré que le tryptophane C-terminal du glucagon était capable de s'enfouir à l'intérieur de vésicules phospholipidiques.

2.3.2. Dynamique moléculaire - Résultats.

Afin de vérifier si la partie centrale du GLP-1 était conformationnellement labile, nous avons effectué avec Marc ADENOT {Adenot, M. 1998} une étude de dynamique moléculaire. La conformation initiale du GLP-1-(7-36) amide correspond à celle rencontrée en milieu micellaire, et rapportée par THORNTON et GORENSTEIN qui nous ont aimablement fourni le fichier au format PDB. Le peptide a été immergé dans un volume d'eau T13P (modèle le plus simple et représenté par trois points), tronqué rectilinéairement à 10 Å du soluté selon les trois directions de l'espace. Cette boîte de solvant est préalablement équilibrée par une procédure Monte-Carlo et l'ensemble du système a été minimisé avec AMBER 4.0. Une trajectoire de 250

ps a été générée avec AMBER 4.0. Dans ces conditions, le peptide subit une flexion très marquée de part et d'autre de la tyrosine 19, et ce dès 125 ps (*Figure 18*).

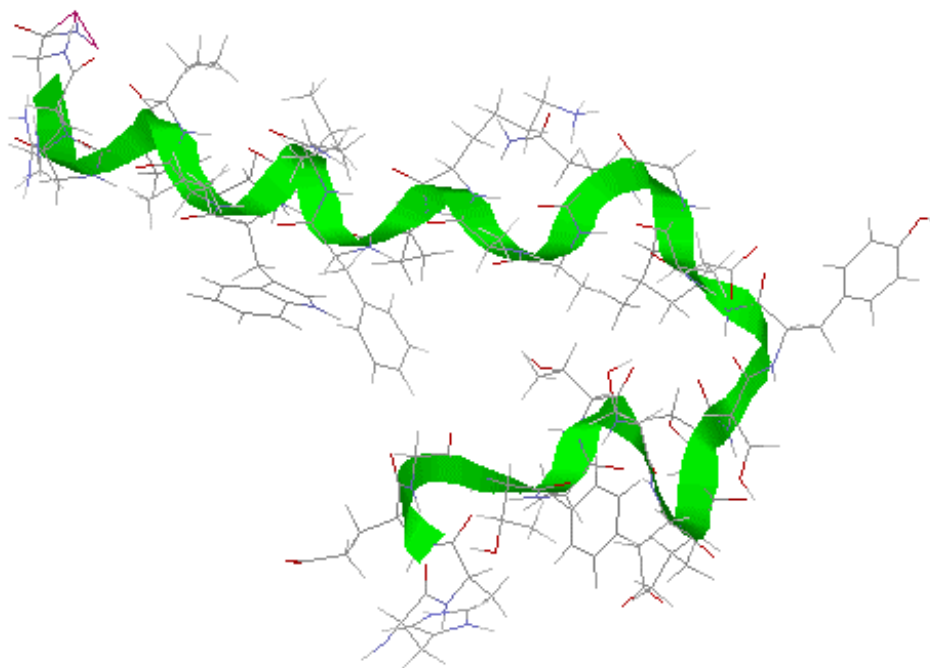


Figure 18. Conformation repliée du GLP-1-(7-36) amide après 250 ps de dynamique en conditions périodiques.

Comme le résultat de la dynamique pouvait dépendre de la conformation de départ choisie, nous avons réexaminé la dynamique du GLP-1-(7-36) amide en partant d'une structure étendue. Le mouvement moléculaire représenté sur la *Figure 19*, montre cette fois encore un repliement au niveau de la partie centrale. Ainsi, il semble bien que le repliement du GLP-1 dans sa partie centrale soit lié à un caractère intrinsèque du peptide.

La dynamique moléculaire (partant des données bibliographiques de RMN) indique clairement que le squelette peptidique du GLP-1-(7-36) amide est capable de se plier autour de Tyr¹⁹. (*Figure 18*) Mais, en fait, il semble bien que ce soit dans la zone 21-23 que l'enchaînement des acides aminés se courbe (*Figure 19*).

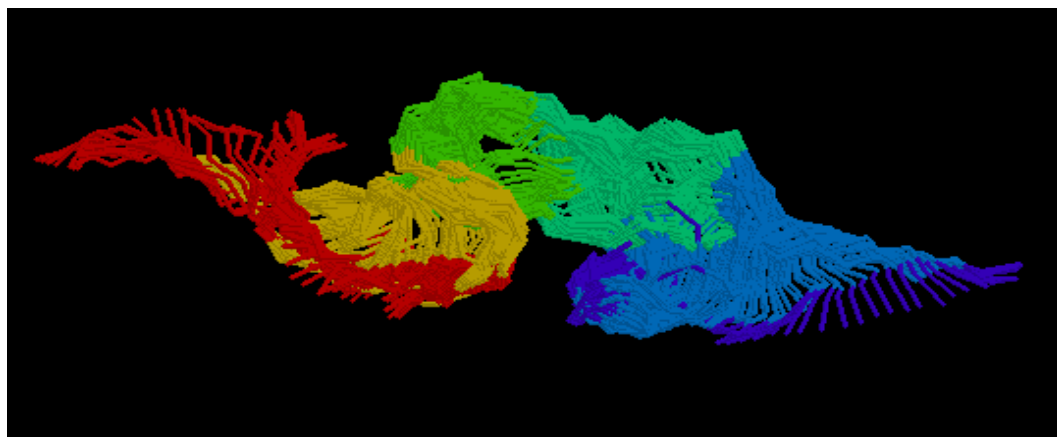


Figure 19. Représentation du mouvement moléculaire lors d'une simulation de 250 ps à partir de la conformation étendue du GLP-1-(7-36) amide. Partie N-terminale en rouge (à gauche).

En effet, dans une étude récente PARKER *et al.* {Parker, J. C. *et al.* 1998} ont examiné la structure par RMN du $[A^{23}]$ GLP-1-(7-36) amide. Tout d'abord, ces auteurs confirment la validité, à quelques détails mineurs près, de la structure de THORNTON et GORENSTEIN. Ensuite, ils montrent que les deux hélices de $[A^{23}]$ GLP-1-(7-36) amide font entre elles un angle voisin de 60° , angle qui n'avait pu être mis en évidence sur le GLP-1-(7-36) amide. L'explication est simple : le remplacement de la glutamine 23 par un acide aminé plus petit : l'alanine, en augmentant la labilité conformationnelle de la zone centrale, permet aux deux hélices de se positionner plus facilement l'une par rapport à l'autre. Comme $[A^{23}]$ GLP-1-(7-36) amide est un agoniste complet (*full agonist*) du récepteur du GLP-1, on peut admettre que $[A^{23}]$ GLP-1-(7-36) amide et l'hormone native doivent avoir la même conformation bioactive « repliée ». Sur la base d'analogues repliés par contraintes, PARKER *et al.* concluent que, les groupements fonctionnellement importants du GLP-1, se distribuent au sommet d'un triangle équilatéral, dont le côté ferait environ 30 Å. Par comparaisons bibliographiques, et sans autres données concernant le récepteur, ils en déduisent que si ces trois « clusters » sont nécessaires pour une réponse biologique (le C-terminal pour la liaison et les deux autres pour l'activation) alors, la surface d'interaction entre le GLP-1 et son récepteur devrait être importante.

2.4. Synthèses de quelques analogues du GLP-1-(7-37) et étude de leur activité biologique.

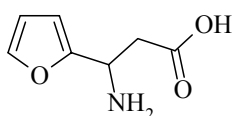
Des études structurales réalisées par THORNTON et GORENSTEIN d'une part, et PARKER *et al.* d'autre part, il ressort que le fragment 7-13 du GLP-1 n'est pas structurée. On peut faire alors l'hypothèse que des mutations réalisées dans cette partie ne devraient pas affecter la conformation globale de la molécule, qui devrait ainsi conserver une bonne activité biologique. Malgré son absence de structure, cette zone est extrêmement importante dans la mesure où His⁷, d'après les données de la littérature, est obligatoirement requis. Rappelons également que le résidu Ala⁸ est la cible de la DPP IV, responsable en grande partie de l'inactivation du GLP-1.

C'est pourquoi dans un premier temps, nous avons décidé d'étudier l'incidence de substitutions réalisées sur les trois premiers acides aminés (His⁷-Ala⁸-Glu⁹) (*Tableau 5*), à la fois sur la liaison au récepteur et sur l'activité biologique. Les substitutions en positions 7 devaient nous renseigner sur la réelle implication de l'histidine N-terminale, dont le rôle, malgré le grand nombre de dérivés synthétisés, est loin d'être élucidé. Il est évident que l'alanine en 8 est la clé de la stabilité métabolique. De plus, il était intéressant d'examiner l'influence du glutamique en 9. En effet, bien que ce résidu n'intervienne pas directement dans le processus de coupure par la DPP IV, son remplacement par des acides aminés de structure différente, pouvait ralentir la vitesse d'hydrolyse.

Ensuite, des modifications ont été réalisées dans la partie centrale du GLP-1, afin de vérifier ou d'infirmer un certain nombre d'hypothèses concernant l'incidence des hélices 14-20 et 24-36, celle de la charnière labile 21-23, ainsi que celle de la conformation globale (*Tableau 6*).

	7	15	20	25	30	35	
GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[F ⁷]GLP-1-(7-37)	F AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[F ⁷ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	F AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[Y ⁷]GLP-1-(7-37)	Y AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[W ⁷]GLP-1-(7-37)	W AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[Z ⁷]GLP-1-(7-37)	Z AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[a ⁸]GLP-1-(7-37)	H AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[a ⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[S ⁸]GLP-1-(7-37)	H SEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[L ⁸]GLP-1-(7-37)	H LEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[L ⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H LEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[V ⁸]GLP-1-(7-37)	H VEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[V ⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H VEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[e ⁹]GLP-1-(7-37)	H A E GTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[e ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H A E GTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[D ⁹]GLP-1-(7-37)	H ADGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[D ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H ADGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[S ⁹]GLP-1-(7-37)	H ASGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[S ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H ASGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[L ⁹]GLP-1-(7-37)	H ALGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[L ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H ALGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[M ⁹]GLP-1-(7-37)	H AMGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[M ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H AMGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[K ⁹]GLP-1-(7-37)	H AKGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[K ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	H AKGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
Exendine-4	HGEGTFTS	DLSKQ	MEEEA	VRLFI	EWLKN	GGPSS	GAPPP S

Tableau 5. Séquences des analogues du GLP-1-(7-37) mutés en position 7, 8 et 9 synthétisés dans ce travail, pour essayer d'améliorer la stabilité du peptide. Les mutations sont représentées par des caractères gras. On donne également la séquence de l'exendine-4, agoniste naturel du GLP-1. Le résidu Z correspond à l'acide 3-(2-furyl) 3-aminopropionique de structure :



	7	15	20	25	30	35	
GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[²⁰]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	L EGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[³²]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AW L VK	GRG	~NH ₂
[W ⁷ ,I ³²]GLP-1-(7-37)	W AEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AW L VK	GRG	~NH ₂
RIGLP-1-(7-37)	GRGKVLWA	IFEKA	AQ EL	YSSVD	STFTG	EAH	~NH ₂
[h ⁷ -I ²⁰]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	L EGQA	AKEFI	AWLVK	GRG	~NH ₂
[F ⁷ ,a ⁸ ,K ¹⁸ ,V ²⁵ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	F AEGTFTS	DV S KY	LEGQA	V KEFI	AWLVK	G.G	~NH ₂
[P ¹⁷ ,R ²² ,P ³⁰ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DV P SY	LE R QA	AKEFI	P WLVK	G.G	~NH ₂
[I ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE I I	AWLVK	G.G	~NH ₂
[V ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE V I	AWLVK	G.G	~NH ₂
[W ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE W I	AWLVK	G.G	~NH ₂
[H ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HADGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE H I	AWLVK	G.G	~NH ₂
[D ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AK E D I	AWLVK	G.G	~NH ₂
[L ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE F L	AWLVK	G.G	~NH ₂
[V ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE F V	AWLVK	G.G	~NH ₂
[Y ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE F Y	AWLVK	G.G	~NH ₂
[R ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE F R	AWLVK	G.G	~NH ₂
[E ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	DVSSY	LEGQA	AKE F E	AWLVK	G.G	~NH ₂
HBGLP-1-(7-37)	HAEGTFTS	D	GEW TYDDATK TFTVTE		WLVK	GRG	~NH ₂

Tableau 6. Séquences des analogues du GLP-1-(7-37) contenant des mutations dans la partie centrale. Les mutations sont représentées par des caractères gras. Ces peptides vont permettre d'étudier l'incidence des bélices et de la flexibilité de l'une par rapport à l'autre, tant sur la liaison au récepteur que sur l'activité biologique.

Bien que les effets sur le pancréas endocrine et les vitesses d'excrétion (principalement rénale) soient identiques, quelques différences existent entre le GLP-1-(7-36) amide le GLP-1-(7-37) {Wettergren, A. *et al.* 1998 ; Pridal, L. *et al.* 1996}. Selon PRIDAL *et al.* {Pridal, L. *et al.* 1996}, ce dernier peptide pourrait avoir une durée d'action plus importante que le GLP-1-(7-36) amide dans les utilisations cliniques. C'est pourquoi, nous avons choisi de ne considérer dans ce travail, que des analogues du GLP-1-(7-37) avec le groupement COOH C-terminal amidé afin de réduire les dégradations induites par les carboxypeptidases. Les séquences des peptides synthétisés en phase solide, et étudiés ici, sont rapportées dans les *Tableaux 5 et 6*. Ces peptides ont fait l'objet d'un dépôt de brevet par un partenaire industriel {Calas, B. *et al.* 1998}.

Les activités biologiques *in vitro* des analogues du GLP-1-(7-37), ont été étudiées en collaboration avec le docteur A. KERVRAN (méthodologie décrite en annexe), sur des membranes de cellules RIN T3 : lignée cellulaire issue d'un sous-clônage d'insulinome (radio-induit) de rat, et sécrétant somatostatine et insuline {Gazdar, A.F. *et al.* 1980}. L'affinité de liaison est mesurée par des expériences de compétition (caractérisée par l'IC₅₀) ; l'activité biologique est, quant à elle, évaluée par la production d'AMPc (caractérisée par l'ED₅₀). En effet, comme nous l'avons laissé entendre, et se sera détaillé dans la partie dédiée au récepteur, la transduction du signal a pour effecteur l'adénylate cyclase, qui induit la production d'AMPc (second messenger).

L'IC₅₀ et l'ED₅₀ pour le GLP-1-(7-37), pris comme référence, sont respectivement de 0.26 ± 0.01 nM (n = 82) et 0.8 ± 0.1 nM (n = 48) (*Tableau 7*).

Analogues	Affinité de liaison, IC ₅₀ (nM)	Activité de l'adénylate cyclase, ED ₅₀ (nM)
GLP-1-(7-37)	0.26 ± 0.01	0.8 ± 0.1
[desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0.18 ± 0.02	0.6 ± 0.1
[F ⁷]GLP-1-(7-37)	0.38 ± 0.06	1.1 ± 0.4
[F ⁷ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	1.6 ± 0.2	6.8 ± 0.3
[W ⁷]GLP-1-(7-37)	3.3 ± 0.6	127 ± 35
[Y ⁷]GLP-1-(7-37)	2.71 ± 0.28	9.8 ± 3.2
[Z ⁷]GLP-1-(7-37)	10.9 ± 1.1	22 ± 3
[a ⁸]GLP-1-(7-37)	0.15 ± 0.01	0.8 ± 0.4
[a ⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0.33 ± 0.1	1.4 ± 0.6
[S ⁸]GLP-1-(7-37)	2.9 ± 0.3	15.1 ± 6.3
[L ⁸]GLP-1-(7-37)	5.7 ± 1.7	180 ± 62
[L ⁸ ,des-R ³⁶]GLP-1-(7-37)	16.8 ± 1.9	218 ± 31
[V ⁸]GLP-1-(7-37)	0.47 ± 0.04	2.6 ± 0.8
[V ⁸ ,des-R ³⁶]GLP-1-(7-37)	1.37 ± 0.06	3.5 ± 0.2
[e ⁹]GLP-1-(7-37)	9.29 ± 0.33	102.7 ± 20.0
[e ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	19.51 ± 1.70	97.9 ± 10.9
[D ⁹]GLP-1-(7-37)	0.09 ± 0.03	0.4 ± 0.3
[D ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0.15 ± 0.01	0.22 ± 0.1
[S ⁹]GLP-1-(7-37)	1.5 ± 0.4	4.9 ± 0.4
[S ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	4.9 ± 0.2	6.4 ± 0.2
[L ⁹]GLP-1-(7-37)	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.6
[L ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0.24 ± 0.03	0.5 ± 0.1
[M ⁹]GLP-1-(7-37)	0.09 ± 0.01	0.7 ± 0.4
[M ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0.19 ± 0.02	0.8 ± 0.3
[K ⁹]GLP-1-(7-37)	216 ± 21	126 ± 26
[K ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	231 ± 12	354 ± 43
Exendine-4	0.22 ± 0.01	0.3 ± 0.1

Tableau 7. *Activité biologique in vitro* du GLP-1-(7-37), de l'exendine-4 et des analogues substitués en position 7, 8 et 9, synthétisés dans ce travail. L'affinité de liaison est étudiée par compétition de liaison. La production d'AMPc, induite par l'activité de l'adénylate cyclase, permet de quantifier l'activité biologique des analogues. Les procédures expérimentales sont exposées en annexes. On remarquera que la suppression de Arg en position 36 n'a que peu d'effets sur les propriétés biologiques.

2.4.1. Mutations au niveau de His⁷.

Comme précédemment rapporté dans la littérature, il apparaît qu'une histidine en N-terminal est strictement nécessaire, puisque sa délétion ou sa mutation conduit à la perte presque complète de l'activité biologique {O'Harte, F. P. *et al.* 1998 ; Hareter, A. *et al.* 1997 ; Mojssov, S. 1992 ; Gefel, D. *et al.* 1990 ; Suzuki, S. *et al.* 1989}. L'importance de ce résidu pourrait être liée à la formation d'une liaison électrostatique entre le groupement imidazol protoné de l'histidine, et le carboxyle porté par la chaîne latérale de l'acide aspartique en 15, comme cela a été envisagé dans le cas du glucagon {Unson, C. G. *et al.* 1994a ; Unson, C. G. *et al.* 1994b ; Unson, C. G. *et al.* 1993 ; Unson, C. G. *et al.* 1991}. Une telle interaction nécessitant un positionnement précis des chaînes latérales des deux résidus par rapport au squelette peptidique, il est évident que tout changement en position 7 doit induire une réduction importante des interactions ligand-récepteur. Ceci est conforté par le fait que le remplacement de His⁷ par son stéréoisomère D-His ou par tout autre acide aminé basique (arginine, lysine ou acide diaminobutyrique) {Hareter, A. *et al.* 1997} abaisse par au moins deux ordres de grandeur, l'activité.

Cependant, on peut s'interroger sur l'implication réelle de His⁷. En effet, ce résidu peut être remplacé, sans perte notable d'activité biologique, par une phénylalanine : [F⁷]GLP-1-(7-37) présente aux erreurs expérimentales près, un IC₅₀ et un ED₅₀ tous deux semblables à ceux du GLP-1-(7-37) (Tableau 7, Figures 20 et 21). Il apparaît donc que le caractère aromatique de l'acide aminé en position N-terminale est le facteur déterminant gouvernant, à la fois, l'affinité pour le récepteur et l'activité.

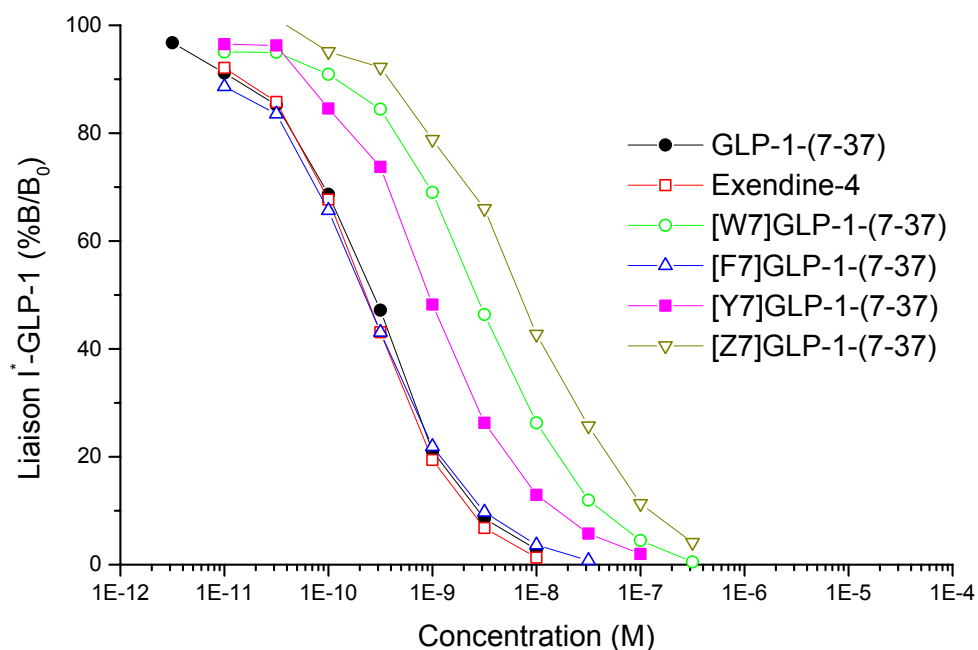


Figure 20. Substitutions en position 7. Déplacement de ^{125}I GLP-1(7-37) fixé sur des membranes de cellules RIN T3. L'affinité de liaison est la même qu'il y ai une His ou une Phe en position 7.

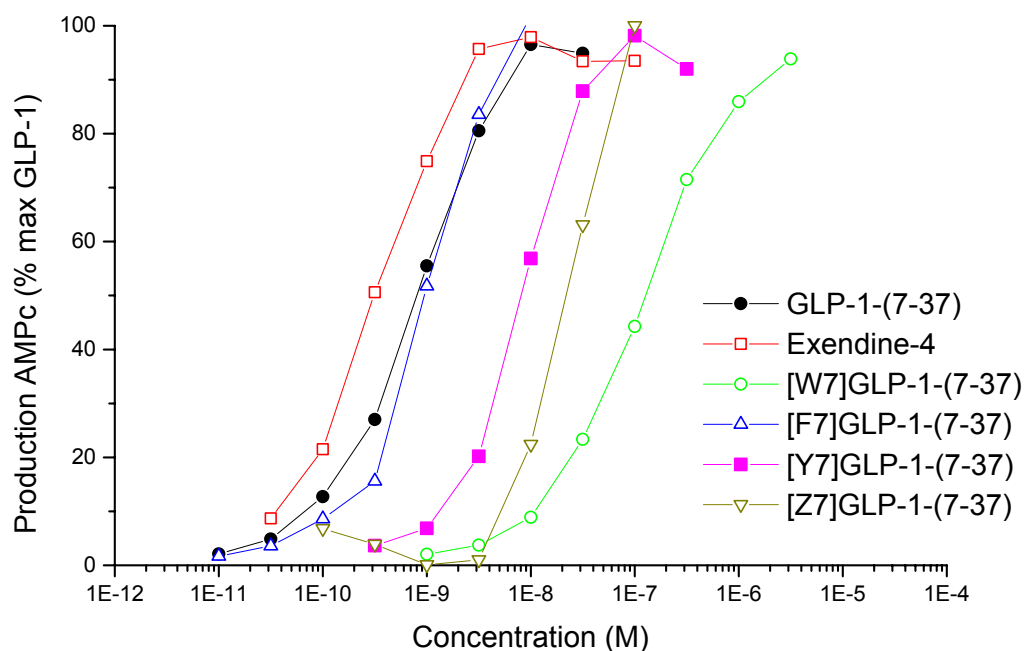


Figure 21. Substitutions en position 7. Production d'AMPc. L'His⁷ peut être remplacée par une Phe sans perte notable d'activité du peptide. L'exendine-4, molécule naturelle, se comporte comme un parfait agoniste.

Afin de tester cette hypothèse, His⁷ a été remplacé par un tryptophane, acide aminé aromatique encombrant ; l'affinité pour le récepteur de [W⁷]GLP-1-(7-37) est dix fois plus faible que celle mesurée pour le [F⁷]GLP-1-(7-37) ou pour le GLP-1-(7-37), et sa capacité à activer l'adénylate cyclase est réduite d'environ 150 fois, comparée à celle du peptide natif (*Tableau 7, Figures 20 et 21*). Le [W⁷]GLP-1-(7-37) se comporte donc comme un antagoniste faible. De plus, il est à noter que l'utilisation en position 7 d'une tyrosine qui porte sur le noyau aromatique un groupement hydroxyle, conduit à une réduction significative de l'activité biologique (*Tableau 7, Figures 20 et 21*). Cet analogue [Y⁷]GLP-1-(7-37) est largement étudié dans la littérature, car la tyrosine est l'acide aminé en position 7 du GRF (chef de file de ce groupe de peptides) et du GIP (connu pour son effet incrétine). Les différents auteurs présentent des résultats, quant à son activité biologique, comparables aux nôtres {Parker, J. C. *et al.* 1998 ; Hareter, A. *et al.* 1997 ; Gallwitz, B. *et al.* 1994}.

Curieusement, l'analogue [Z⁷]GLP-1-(7-37) dans lequel His⁷ a été substituée par l'acide 3-(2-furyl) 3-aminopropionique - acide bêta aminé aromatique de structure très éloignée de celle de l'histidine - conserve encore une potentialité non négligeable, bien que faible par rapport à celle du peptide natif (*Tableau 7, Figures 20 et 21*).

En conclusion, il apparaît que l'acide aminé N-terminal dans le GLP-1-(7-37) doit être aromatique, moins encombrant qu'un tryptophane et ne posséder aucun substituant polaire : comme la tyrosine. Comme nous le verrons par la suite, ces nécessités physico-chimiques s'interprètent facilement à l'aide d'un modèle faisant intervenir l'existence d'interactions entre His⁷, Asp¹⁵ et Phe¹².

2.4.2. Mutations au niveau de Ala⁸.

Cette position est d'un grand intérêt puisque c'est la cible de la DPP IV qui, comme nous l'avons vu plus haut, est le facteur responsable de l'inactivation du GLP-1. Comme il a été précédemment rapporté {Burcelin, R. *et al.* 1999 ; Deacon, C. F. *et al.* 1998b ; Goke, R. *et al.* 1997}, les analogues du GLP-1-(7-36) amide ayant des petits acides aminés (Gly, Aib et D-Ala) en position 8, se lient au récepteur avec des affinités comparables à celle de l'hormone native et sont aussi actifs sur le pancréas isolé. Au contraire, le remplacement de Ala⁸ par une sérine, rencontrée à la même position dans plusieurs peptides appartenant à la famille du GRF (*Tableau 3*), réduit

l'affinité pour le récepteur d'un facteur 10 et la production d'AMPc d'environ un facteur 20 (*Table 7, Figures 22 et 23*).

En plus, il a été montré {Deacon, C. F. *et al.* 1998b} que le [T⁸]GLP-1-(7-36) amide est significativement moins actif que le [S⁸]GLP-1-(7-36) amide. Cette réduction d'activité pour les dérivés ayant une sérine ou une thréonine en position 8 pourrait être reliée, soit à une augmentation de volume, soit encore à une augmentation de la polarité.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons synthétisé deux analogues dans lesquels Ala⁸ est remplacée par une valine et par une leucine. [V⁸]GLP-1-(7-37) conserve une importante activité biologique, son affinité pour le récepteur et le niveau d'AMPc produit sont réduits d'un facteur 2 et 3 seulement (*Table 7, Figures 22 et 23*). Bien que le volume de Van der Waals de la valine (105 Å³) soit supérieur à celui de la sérine (73 Å³), [V⁸]GLP-1-(7-37) est plus actif que [S⁸]GLP-1-(7-37) (*Table 7, Figures 22 et 23*). Au contraire, [L⁸]GLP-1-(7-37), avec une leucine en position 8 plus encombrante que la valine (volume de Van der Waals = 125 Å³), présente une affinité pour le récepteur réduite d'environ 20 fois associée à une activation de l'adénylate cyclase réduite de plus de 200 fois. Comme [W⁷]GLP-1-(7-37), [L⁸]GLP-1-(7-37) se comporte comme un antagoniste faible.

Ces résultats mettent en évidence l'importance, à la fois des interactions stériques et de la polarité associés aux chaînes latérales des acides aminés placés en seconde position de la séquence du GLP-1-(7-37).

Nous confirmons également que la stéréochimie en position 8 n'a aucune incidence sur l'activité. Comme l'avait précédemment rapporté GOKE *et al.* {Goke, R. *et al.* 1997}, [a⁸]GLP-1-(7-37) présentent les mêmes IC₅₀ et ED₅₀ que le GLP-1 natif (*Tableau 7, Figures 22 et 23*).

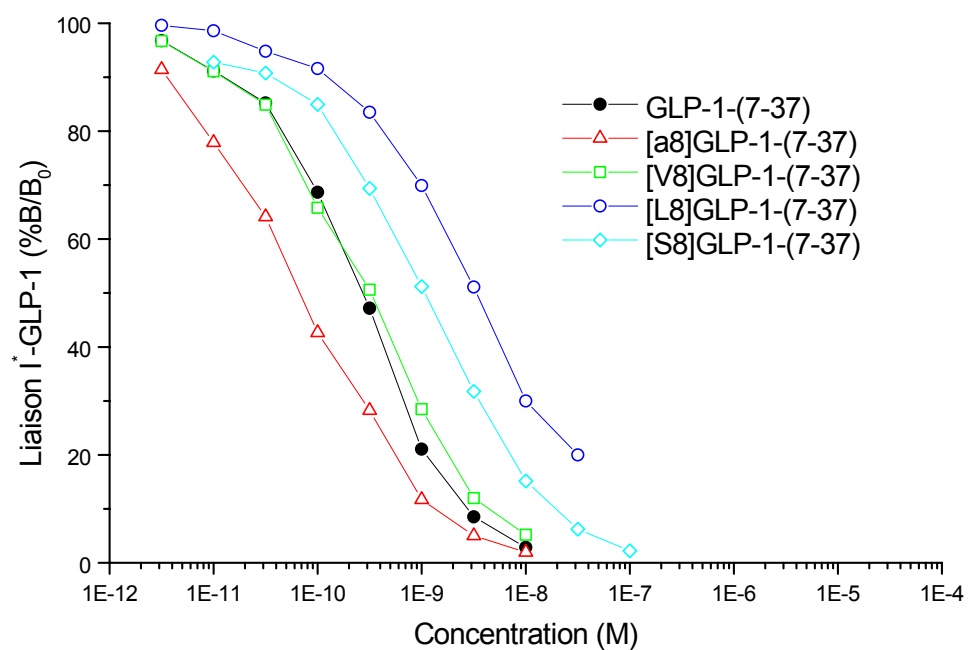


Figure 22. Substitutions en position 8. Déplacement de ^{125}I -GLP-1(7-37) fixé sur les membranes de cellules RIN T3. Le remplacement de Ala^8 par son stéréoisomère améliore l'affinité de liaison.

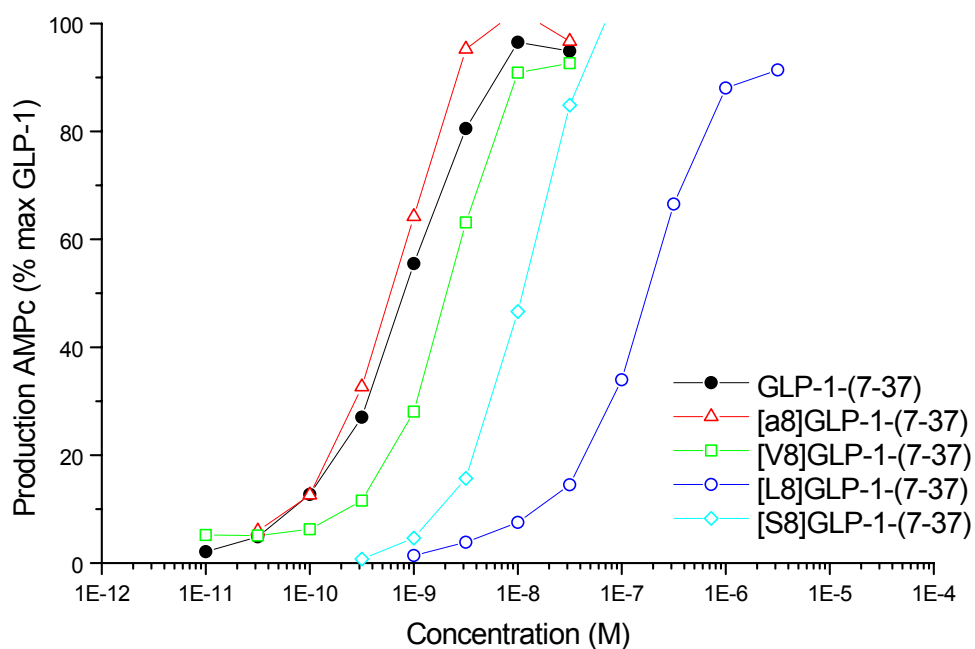


Figure 23. Substitutions en position 8. Production d'AMPc. L'activité de l'adénylate cyclase est améliorée en mutant Ala^8 par son isomère dextrogyre.

2.4.3. Mutations au niveau de Glu⁹.

Parmi les représentants de la famille du GRF : GLP-2, PHI (*Peptide Histidine-Isoleucine*) {Adelhorst, K. *et al.* 1994}, et les peptides du *Tableau 3* (GLP-1, glucagon, VIP, secretine, GIP, GRF, PACAP), exception faite du *seul* glucagon qui possède une glutamine, tous ces peptides ont un acide aspartique ou glutamique en position 9. Ceci suggère que, dans cette famille, la présence d'un résidu acide en 9 est nécessaire. Toutefois, cela n'est certainement pas vrai dans le cas du GLP-1. En effet, [S⁹]GLP-1-(7-37) conserve une bonne activité (*Tableau 7, Figures 24 et 25*). Ceci peut signifier qu'il suffit d'un résidu polaire en 9, comme dans le glucagon, pour maintenir une bonne affinité pour le récepteur. Cependant, des analogues dans lesquels Glu⁹ a été substitué par des acides aminés hydrophobes tels que la méthionine ou la leucine, sont aussi puissants que l'hormone native. Ainsi, [L⁹]GLP-1-(1-37) et [M⁹]GLP-1-(1-37) présentent la même activité que le GLP-1-(1-37) (*Tableau 7, Figures 24 et 25*), contrairement à [K⁹]GLP-1-(1-37) qui est lui presque totalement inactif (*Tableau 7, Figures 24 et 25*).

Il est à noter que le changement mineur Glu⁹ → Asp⁹ augmente à la fois l'IC₅₀ et l'ED₅₀ (*Tableau 7, Figures 24 et 25*). Une diminution de l'encombrement de la chaîne latérale en position 9, semble avoir une incidence positive sur l'activité biologique.

Alors que nous avons montré dans le paragraphe précédent qu'un changement de stéréochimie en position 8 n'avait aucune incidence sur l'activité, il n'en est pas de même pour la position 9. En effet, comme il est rapporté sur le *Tableau 7 (Figures 24 et 25)* [e⁹]GLP-1-(7-37) est environ 100 fois moins actif que le GLP-1-(7-37).

La position 9 apparaît être à la fois plus « permissive » et plus « restrictive » que la 8. Si elle s'accommode de résidus acides, polaires, hydrophobes, petits ou plus volumineux à l'exception des basiques, elle ne tolère pas l'inversion de stéréochimie.

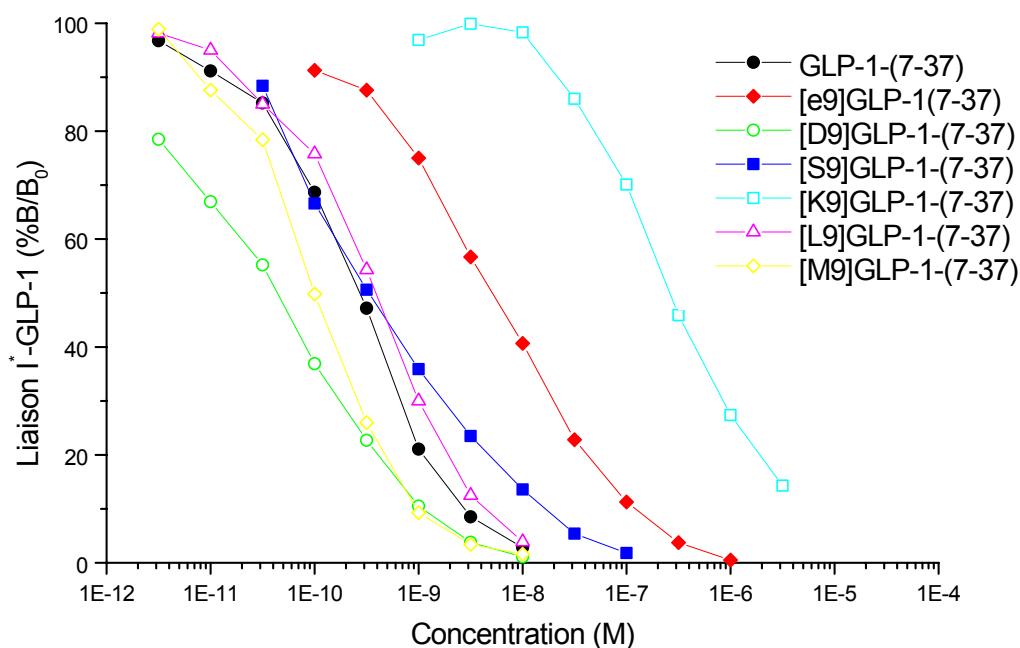


Figure 24. Substitutions en position 9. Déplacement de ^{125}I GLP-1-(7-37) fixé sur des membranes de cellules RIN T3. Une diminution de l'encombrement stérique ($\text{Glu}^9 \rightarrow \text{Asp}^9$) est favorable à l'affinité de liaison. Mais la polarité n'est pas un critère obligatoire à cette position : composé $[\text{M}^9]$ et $[\text{L}^9]$ GLP-1-(7-37).

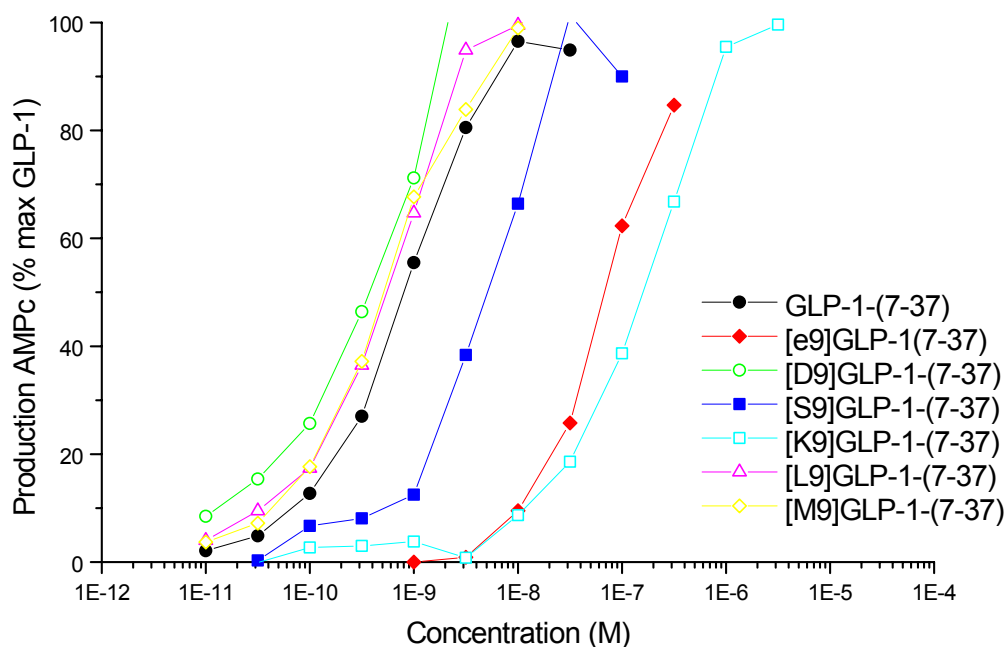


Figure 25. Substitutions en position 9. Production d'AMPc. Les constatations faites pour l'affinité de liaison, restent de mise pour l'activité biologique : la polarité n'est pas obligatoire ; un faible encombrement est favorable.

2.4.4. Délétion de Arg³⁶.

Nous nous sommes posés le problème du rôle de l'arginine en position 36. Dans la plupart des peptides cet acide aminé est important, soit qu'il établisse des liaisons ioniques avec la protéine cible, soit qu'il contribue à stabiliser une conformation. Comme, la partie C-terminale du GLP-1 semble être impliquée dans le processus de reconnaissance, on pouvait penser que la délétion de Arg³⁶ conduirait inmanquablement à une perte d'affinité pour le récepteur. En fait, c'est loin d'être le cas. Quelle que soit la nature des substitutions réalisées sur les positions 7, 8 et 9, la suppression de la *seule* arginine de la séquence du GLP-1-(7-37) n'a que très peu d'effets sur les propriétés biologiques (*Tableau 7*). Il est à noter que de nombreux analogues dépourvus de Arg³⁶ sont aussi actifs que l'exendine-4 (*Tableau 7*), le plus puissant agoniste du GLP-1 connu à ce jour, et ne possédant pas cette arginine C-terminale {Goke, R. *et al.* 1993}.

Pour certains auteurs, le fait que les parties N et C-terminales soient importantes pour l'activité fonctionnelle du GLP-1 serait l'indice d'une proximité spatiale entre ces deux parties {Gallwitz, B. *et al.* 1994}. Ce rapprochement interviendrait grâce à la formation d'un coude au milieu de la molécule. De tels coudes ont été mis en évidence dans le PP (*Pancreatic Polypeptide*), le PYY (Peptide Tyrosine-Tyrosine) et le NPY (NeuroPeptide Y) {Fuhlendorff, J. *et al.* 1990} où les différentes parties de la chaîne peptidique se trouvent pratiquement en contact. Il était logique de penser que Arg³⁶ en créant une liaison ionique avec un des résidus acides présent dans la séquence, pouvait contribuer à la stabilisation d'une conformation compacte. Ce n'est évidemment pas le cas. Le rôle de cette arginine n'est pas, pour le moment, élucidé.

2.4.5. Mutations susceptibles d'affecter la structure des hélices 14-20 et 24-36.

En présence de phospholipides, la structure du GLP-1 se compose de deux segments hélicoïdaux (14-20 et 24-36) reliés par une charnière labile s'articulant autour de Gly²². Dans ces conditions, si cette structure a une réelle signification biologique, l'introduction au centre des hélices (position 17 et 30) de proline (résidu « briseur d'hélice ») accompagné d'une rigidification de la charnière centrale, obtenue en substituant Gly²² par une arginine, devrait conduire à un composé totalement inactif. C'est ce que l'on observe, puisque comme rapporté sur le *Tableau 8*, [P¹⁷,R²²,P³⁰]GLP-1-(7-37) ne se fixe pas sur le récepteur et est incapable d'activer l'adénylate cyclase.

	Affinité de liaison, IC ₅₀ (nM)	Activité de l'adénylate cyclase, ED ₅₀ (nM)
GLP-1-(7-37)	0.26 ± 0.01	0.8 ± 0.1
RIGLP-1-(7-37)	> 10 ⁻⁵	n.d.
[P ¹⁷ ,R ²² ,P ³⁰ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	> 10 ⁻⁵	n.d.
HBGLP-1-(7-37)	> 10 ⁻⁵	n.d.
[h ⁷ -I ²⁰]GLP-1-(7-37)	1793 ± 192	n.d.
[I ²⁰]GLP-1-(7-37)	1.87 ± 0.25	3.3 ± 0.1
[I ³²]GLP-1-(7-37)	48.6 ± 5.1	58.1 ± 7.6
[W ⁷ ,I ³²]GLP-1-(7-37)	2.6 ± 0.6	11.1 ± 4.4
[I ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	24.53 ± 1.2	65.9 ± 10.4
[W ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	1.47 ± 0.09	3.8 ± 0.8
[V ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	269 ± 26	517 ± 42
[H ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	238 ± 12	715 ± 125
[D ²⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	> 10 ⁻⁵	n.d.
[L ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	2.05 ± 0.43	9.9 ± 5.7
[Y ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	21.27 ± 5.4	43.6 ± 9.9
[R ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	> 10 ⁻⁵	n.d.
[V ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0.38 ± 0.14	1.5 ± 0.5
[E ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	652 ± 29	n.d.
[F ⁷ ,a ⁸ ,K ¹⁸ ,V ²⁵ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	4.44 ± 0.56	4.6 ± 1.1

Tableau 8. Etude de l'incidence de la conformation sur l'activité biologique. Affinité de liaison, et activité de l'adénylate cyclase pour des analogues du GLP-1-(7-37) contenant des mutations dans la partie centrale de la molécule.

De la même manière, l'introduction d'une D-leucine en position 32 en déstructurant l'hélice C-terminale, diminue significativement à la fois l'IC₅₀ et l'ED₅₀ : [I³²]GLP-1-(7-37) est environ 200 fois moins actif que le GLP-1-(7-37) (Tableau 8). Cette mutation n'a pas les mêmes effets sur tous les analogues. Il est curieux de constater que [W⁷]GLP-1-(7-37) et [W⁷,I³²]GLP-1-(7-37) bien que présentant des affinités similaires pour le récepteur (Tableaux 7 et 8), induisent des taux très différents d'AMPc intracellulaire. A ce niveau, [W⁷,I³²]GLP-1-(7-37) est environ 10 fois plus actif que [W⁷]GLP-1-(7-37) (Tableaux 7 et 8).

Il est difficile de comprendre pourquoi une mutation réalisée du côté C-terminal dans [W⁷]GLP-1-(7-37), agit sur l'activation du récepteur, puisque cette partie apparaît plutôt impliquée dans les processus de reconnaissance. Toutefois, comme le laisse supposer ADELHORST *et al.* {Adelhorst, K. *et al.* 1994} les choses pourraient être beaucoup moins simples. En conclusion d'une étude portant sur des peptides chimères GLP-1/glucagon, ces auteurs notent que bien que

la reconnaissance du récepteur spécifique soit principalement gouvernée par la partie C-terminale, le N-terminal intervient également.

Afin d'essayer de clarifier le problème, nous avons synthétisé et testé le peptide $[h^7-l^{20}]GLP-1-(7-37)$ dans lequel les acides aminés 7 à 20 ont tous été remplacés par leurs énantiomères dextrogyres. Dans ces conditions, si effectivement il y a ségrégation affinité-activation, cet analogue devrait se lier au récepteur par le C-terminal non modifié mais, du fait de sa stéréochimie, le N-terminal ne devrait plus être capable d'induire la production d'AMPc. C'est ce que l'on observe effectivement. L' ED_{50} est non mesurable puisque très supérieur à 10^{-5} nM, alors que l' IC_{50} est abaissé de manière drastique par rapport au GLP-1-(7-37) (*Tableau 8*). Ces résultats sont accord avec ceux d'ADELHORST *et al.* {Adelhorst, K. *et al.* 1994} puisque la modification stéréochimique des 14 premiers acides aminés de la séquence conduit, non seulement à la suppression de l'activation de l'adénylate cyclase, mais encore à une baisse considérable de l'affinité.

La stéréochimie au niveau du dernier résidu (Leu^{20}) de l'hélice N-terminale a une certaine importance, puisque le composé $[^{20}]GLP-1-(7-37)$ est environ 10 fois moins actif que le peptide natif (*Tableau 8*).

Comme nous l'avons déjà souligné plus haut, les résidus Ile^{29} et Phe^{28} et surtout ce dernier, ont une grande importance. Selon ADELHORST *et al.* {Adelhorst, K. *et al.* 1994} cela serait dû au fait que tout changement à ce niveau modifie la structure du GLP-1. D'autre part, la séquence -E-F-I- constitue une des cibles privilégiées de la NEP 24-11. Il était donc intéressant d'étudier le comportement d'analogues modifiés dans cette région. Pour cela, nous avons considéré le $[desR^{36}]GLP-1-(7-37)$ qui a une activité semblable à celle du GLP-1-(7-37) (*Tableau 7*) et avons réalisé, dans la zone 28-29, un certain nombre de mutations en remplaçant la phénylalanine par des résidus aromatiques, des résidus hydrophobes encombrés, des résidus basiques et des résidus acides ($[W^{28},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$, $[V^{28},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$, $[I^{28},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$, $[H^{28},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$ et $[D^{28},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$). Les résultats rapportés sur le *Tableau 8* montrent pour tous ces analogues une baisse sensible d'activité.

Nous avons également substitué l'isoleucine 29 par une leucine, une valine, une tyrosine, une arginine et un glutamique ($[L^{29},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$, $[V^{29},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$, $[Y^{29},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$, $[R^{29},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$ et $[E^{29},desR^{36}]GLP-1-(7-37)$). Ici encore les dérivés sont

beaucoup moins puissants que le GLP-1-(7-37), à l'exception de $[V^{29}, \text{desR}^{36}] \text{GLP-1-(7-37)}$ qui est à peu près aussi actif que l'hormone native (*Tableau 8*). Mais, à priori cette mutation n'est pas très intéressante, car la NEP 24-11 qui agit au niveau des résidus hydrophobes doit couper aussi facilement cette valine que la phénylalanine originale.

2.4.6. Mutations susceptibles d'affecter la structure tertiaire globale du GLP-1-(7-37).

Lors de la formation du complexe ligand peptidique/récepteur, le squelette peptidique adopte une conformation stabilisée par des liaisons hydrogène et des ponts disulfures (s'ils existent) et ce sont les chaînes latérales des résidus disposés sur ce squelette qui vont assurer l'essentiel des liaisons avec la protéine cible. Beaucoup de chercheurs ont donc pensé qu'en greffant sur un squelette peptidique modifié en des positions précises, les déterminants chimiques et physico-chimiques (acide, base, polaire, apolaire, hydrophobe, hydrophile...) impliqués dans l'interaction, on devrait obtenir des espèces « pseudopeptidiques » ou des « peptidomimétiques » se comportant, vis à vis du récepteur, de la même manière que le ligand naturel. L'avantage considérable d'une telle approche est que l'on n'a plus à tenir compte de l'action des protéases.

Plusieurs techniques ont été proposées dont une des plus faciles à mettre en œuvre est celle des rétro-énantios (*Figure 26*).

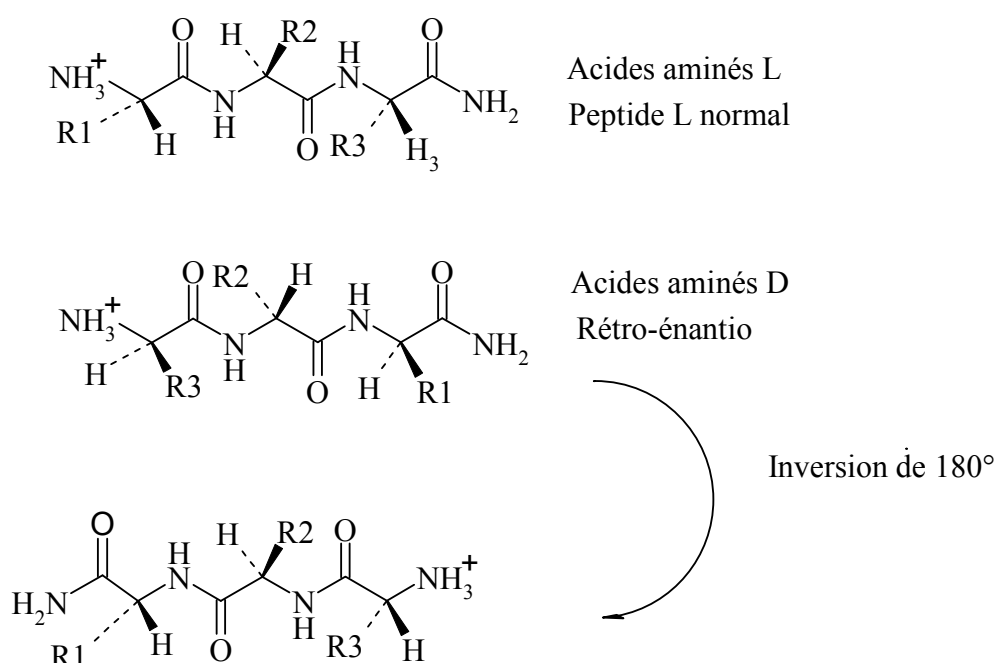


Figure 26. Structures des analogues rétro-énantios et relations stéréochimiques avec le peptide natif.

Dans un peptide naturel les acides aminés de configuration L sont reliés par des liaisons -CO-NH- dans une séquence numérotée $1,2,3,\dots,n$ à partir du N-terminal. Dans l'analogue énantiomère les acides aminés L sont remplacés par des acides aminés D. C'est donc l'image à travers un miroir du peptide natif. Le rétro peptide contient lui des résidus L mais dans une séquence inversée $n,\dots,3,2,1$. Le rétro-énantiomère combine les deux transformations : c'est un rétro peptide constitué d'acides aminés entièrement D. Si rétro et rétro-énantiomère sont deux énantiomères, il n'en est pas de même pour rétro-énantiomère et peptide natif qui n'ont aucune corrélation stéréochimique stricte.

Rétro-énantiomère et peptide natif ont la même séquence et la même disposition relative des chaînes latérales comme le montre la *Figure 26* ; seules les liaisons amides sont inversées (-NH-CO- $\rightarrow$ -CO-NH-).

Etant donné la disposition spatiale des chaînes latérales sensiblement identique dans le peptide natif et le rétro-énantiomère (*Figure 26*), les deux espèces ont bien souvent des comportements biochimiques identiques. Lorsque les activités divergent cela peut être dû à deux causes :

- soit la position des charges N et C-terminales (NH_3^+ et COO^-) est importante. En effet (*Figure 26*), le NH_3^+ par exemple est porté par le résidu n au lieu d'être porté, comme dans le peptide natif, par le résidu 1.
- soit le renversement du sens de la liaison peptidique (-NH-CO- $\rightarrow$ -CO-NH-) conduit à une modification des liaisons hydrogènes qui peut induire un changement conformationnel préjudiciable à la fois sur l'affinité et sur l'activation.

Nous avons donc cherché à savoir si l'analogue rétro-énantiomère du GLP-1-(7-37), nommé RIGLP-1-(7-37), était actif ou non. Cela était important, car en cas de réponse positive, on disposait ainsi d'une entité « pseudo-peptidique » totalement résistante à l'action de toutes les protéases spécifiques ou non. Malheureusement (*Tableau 8*), l'analogue RIGLP-1-(7-37) est totalement dénué d'activité.

2.4.7. Modifications de la partie centrale de la séquence du GLP-1.

Les données structurales et le fait que les régions C et N-terminales soient toutes deux impliquées (à des degrés divers toutefois) dans l'activité fonctionnelle du GLP-1, suggèrent fortement que les deux hélices 14-20 et 24-36 sont spatialement proches. GALLWITZ *et al.*

{Gallwitz, B. *et al.* 1994} ont même émis l'hypothèse qu'il existait au centre de la molécule un coude, hypothèse partiellement confirmée par les résultats de RMN.

Dans ces conditions, il n'était pas déraisonnable d'envisager la synthèse d'un analogue, dans lequel toute la partie centrale serait remplacée par une séquence connue comme formant un *hair pin*, soit deux feuillets bêta antiparallèles séparés par un coude bêta. Evidemment, dans une telle structure les deux extrémités qui correspondent aux deux segments terminaux du GLP-1-(7-37) sont proches. Nous avons choisi la séquence -Gly-Glu-Trp-Thr-Tyr-Asp-Asp-Ala-Thr-Lys-Thr-Phe-Thr-Val-Thr-Glu- qui a été montrée existant sous forme de *hair pin* stable en solution {Blanco, F. J. *et al.* 1994}. Ce fragment a été incorporé entre les résidus 15 et 31 : peptide nommé HBGLP-1-(7-37).

En admettant que l'hypothèse de GALLWITZ *et al.* soit exacte, on pouvait s'attendre à ce que l'analogue HBGLP-1-(7-37) présente une bonne activité. Or contrairement à ce qui était attendu, ce peptide est totalement inactif (*Tableau 8*).

Ce résultat négatif pouvait s'interpréter en supposant, qu'une fois incorporé dans la séquence du GLP-1-(7-37), le fragment *hair pin* n'adoptait pas une conformation de type *hair pin* mais une conformation « *random coil* » par exemple. Nous avons enregistré le spectre IR-TF (infrarouge à Transformé de Fourier) de HBGLP-1-(7-37) (*Figure 27*). Le peptide présente une forte prédominance des bandes amides primaires dans la gamme 1625-1640 et 1675 cm^{-1} , caractéristiques des feuillets bêta. De l'étude du spectre, on en déduit la présence d'environ 10% d'hélices alpha et 40% de feuillets bêta ce qui correspond, à peu de choses près, à la proportion attendue. Il y a donc de fortes chances pour que la partie centrale de HBGLP-1-(7-37) soit bien sous forme de *hair pin*.

Le comportement de HBGLP-1-(7-37) souligne l'implication des hélices dans l'activité biologique. Pour le GLP-1, il ne suffit pas que les parties N et C-terminales soient rapprochées, il faut encore que la partie centrale ait une structure secondaire bien définie et qu'elle présente une certaine flexibilité.

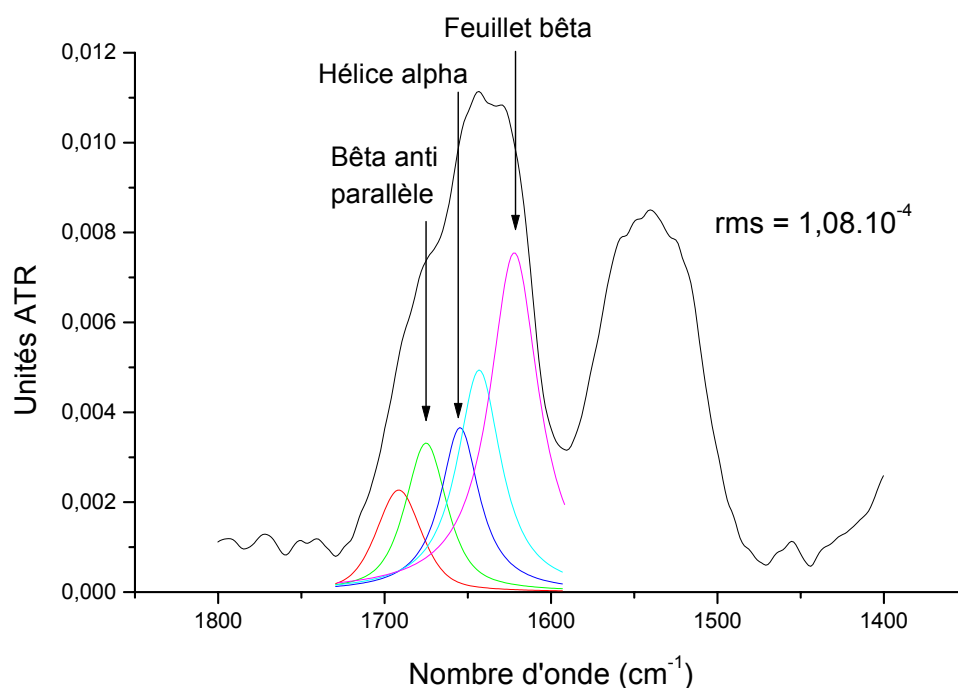


Figure 27. Spectre IR-TF du HBGLP-1-(7-37) en tampon phosphate 10 mM, pH 7.37. Confirmation de l'existence de structure en feuillet bêta, introduite par le fragment « hair pin ».

2.4.8. Mutations complémentaires basées sur des homologies de séquence avec d'autres membres de la famille du GRF.

Nous avons montré (Tableau 7) que les substitutions His⁷ → Phe⁷ et Ala⁸ → D-Ala⁸ ainsi que la délétion de l'arginine 36, ne modifiaient pas l'activité biologique du GLP-1-(7-37) natif. Dans ces conditions, nous sommes partis de la séquence [F⁷,a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37) dans laquelle nous avons remplacé la sérine 18 par une lysine et l'alanine 25 par une valine. On trouve ces deux résidus (lysine et valine) à ces mêmes positions dans plusieurs membres de la famille du GRF (Tableau 3). Dans ces conditions on obtient un analogue [F⁷,a⁸,K¹⁸,V²⁵,desR³⁶]GLP-1-(7-37) qui possède une activité, quoique plus faible que celle de l'hormone native (Tableau 8).

2.5. Stabilité métabolique et activité in vivo.

Le but principal de ce travail est d'obtenir des agonistes du GLP-1 plus résistants à l'action des protéases. il fallait donc, pour valider le choix de nos mutations, examiner le comportement des composés synthétisés ici, en présence de DPP IV (principale enzyme

impliquée dans le processus de dégradation) et de sérum. L'activité *in vivo* a été également abordée. En effet, ce n'est pas parce qu'un peptide active des récepteurs situés à la surface de cellules en culture qu'il agira dans un organisme vivant. Il est bien connu que des problèmes de biodisponibilité liés, le plus souvent, à des agrégations et/ou à des séquestrations par les protéines sériques, peuvent apparaître, supprimant ainsi tout intérêt à la molécule. Dans le cadre de notre partenariat industriel, les études de stabilité et de détermination de l'activité *in vivo* ont été effectuées sous la direction des Dr. B. PFEIFFER, Ph. DELAGRANGE et D. MANECHEZ par les laboratoires SERVIER (Courbevoie, France).

Les expériences étant extrêmement lourdes, nous avons dû choisir seulement quelques analogues. Parmi les composés les plus actifs, également décrits dans le brevet {Calas, B. *et al.* 1998}, et en prévision d'un futur développement, ont été sélectionnés : [a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [desR³⁶]GLP-1-(7-37), [D⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [F⁷,a⁸,K¹⁸,V²⁵,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [M⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [V²⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [F⁷,desR³⁶]GLP-1-(7-37) et [L⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37). Les résultats de stabilité aux protéases, et d'activité métabolique sur la glycémie et sur l'insulinémie sont rapportés dans les *Tableaux 9*.

Comme l'on pouvait s'y attendre, deux peptides le [a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37) et le [F⁷,a⁸,K¹⁸,V²⁵,desR³⁶]GLP-1-(7-37) sont extrêmement stables, puisqu'ils ne sont pratiquement pas dégradés au bout d'une heure en présence de sérum humain et de rat (*Tableau 9A*). La substitution de Ala⁸ par un acide aminé non reconnu par la DPP IV bloque l'attaque enzymatique.

Plus curieux est le comportement de [D⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37) et de [L⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), bien que ces deux analogues possèdent une alanine en position 2, ils sont beaucoup plus stables que le peptide natif (*Tableau 9A*). Il apparaît donc clairement qu'au niveau du site actif de la DPP IV : P₂-P₁-P'₁- (P₁ = Ala ou Pro), le résidu en position P'₁ a une grande importance. La préférence à ce niveau doit être relativement stricte puisque [M⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), ayant une méthionine en P'₁, se comporte au bout d'une heure, pratiquement comme GLP-1-(7-37). Il faut également noter que [F⁷,desR³⁶]GLP-1-(7-37) est un peu plus résistant à la dégradation que ce à quoi on pouvait s'attendre. Ceci pourrait laisser supposer que la position P₂ exerce aussi une certaine influence sur la cinétique d'hydrolyse.

Tableau 9 A	Stabilité (plasma)				DPPIV
Peptides	Rat		Homme		Porc
	30 min.	60 min.	30 min.	60 min.	10 min. ou 15 min.
GLP-1-(7-37)	0	0	29	10	8
[a ⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	94	91	100	100	100
[desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	22	9	41	28	40
[D ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	49	42	67	59	29
[F ⁷ ,a ⁸ ,K ¹⁸ ,V ²⁵ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	95	87	95	92	Non déterminée
[M ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	51	15	41	18	28
[V ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	51	24	43	18	12
[F ⁷ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	68	56	49	25	19
[L ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	62	30	64	40	41

Tableau 9 B	Activité <i>in vivo</i>							
Peptides	5 min.		10 min.		15 min.		20 min.	
	ΔG	$\Delta I/\Delta G$	ΔG	$\Delta I/\Delta G$	ΔG	$\Delta I/\Delta G$	ΔG	$\Delta I/\Delta G$
GLP-1-(7-37)	\$	\$	0	0				
[a ⁸ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	\$	\$	\$	\$	0	0		
[desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	\$	\$	\$	\$	\$	\$	0	0
[D ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	\$	\$	0	0	\$	0	0	0
[F ⁷ ,a ⁸ ,K ¹⁸ ,V ²⁵ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)								
[M ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	\$	\$	0	0	\$	0		
[V ²⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	\$	0	0	0	0	0		
[F ⁷ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0	0	0	0	0	0		
[L ⁹ ,desR ³⁶]GLP-1-(7-37)	0	0	0	0	0	0		

Tableaux 9. Etudes de stabilité et de détermination de l'activité *in vivo* des peptides sélectionnés parmi les plus actifs et décrits dans le brevet {Calas, B. et al. 1998}.

A) Stabilité *in vitro* ; % de produit inchangé. Etude de la stabilité du GLP-1-(7-37) et des différents analogues, en présence de plasma humain et de rat, et vis à vis de la protéase DDP IV en tampon aqueux. Les mesures de produit inchangé se font par HPLC après des temps variables d'incubation.

B) Activité *in vivo* ; rat normal 400 ng/kg ; administration i.v. ; ΔG : variation de la glycémie : Glycémie au temps $\times$ par rapport à la glycémie basale ; $\Delta I/\Delta G$: rapport de l'insulinémie sur la glycémie. Plus ce rapport est significatif dans le temps, plus le peptide sera actif ; \$: Statistiquement significatif soit $P < 0.05$. (Données provenant des Laboratoires Servier)

Pour des raisons liées à notre volonté de breveter les différentes molécules issues de cette étude {Calas, B. *et al.* 1998}, tous les peptides testés (*Tableaux 9*) n'ont pas d'arginine en position 36. En comparant les stabilités de [desR³⁶]GLP-1-(7-37) et de GLP-1-(7-37), on s'aperçoit que si le premier de ces deux peptides est significativement moins dégradé au bout de 30 minutes, il n'est que légèrement plus stable au bout d'une heure. Ce phénomène est général (*Tableau 9A*), même avec les deux analogues ([M⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37) et [V²⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37)) ayant des stabilités sensiblement identiques à celle du peptide natif après 60 minutes d'incubation en présence de sérum.

Il apparaît donc que la délétion de l'arginine 36 stabilise, par un processus que nous ne connaissons pas, la structure du GLP-1.

Si maintenant nous examinons les activités *in vivo* des composés [a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [D⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [M⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [V²⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [F⁷,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [L⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), [desR³⁶]GLP-1-(7-37) et [F⁷,a⁸,K¹⁸,V²⁵,desR³⁶]GLP-1-(7-37), (*Tableau 9B*), il y a là quelques surprises. En effet, l'analogue qui présente l'activité la plus soutenue sur l'insulinémie et la glycémie est [desR³⁶]GLP-1-(7-37) qui ne possède qu'une stabilité métabolique limitée, comparée à celle de [a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37). Des résultats rapportés sur les *Tableaux 9*, il ressort qu'il y a une absence totale de corrélation entre stabilité, activité *in vivo* et activité *in vitro*.

De plus, comment interpréter qu'un agoniste puissant et relativement stable tel que [L⁹,desR³⁶]GLP-1-(7-37), n'est aucune activité ?

On rentre là dans des problèmes de biodisponibilité. Il se peut que la substitution Glu⁹ → Leu⁹, en augmentant l'hydrophobicité de la molécule, favorise l'agrégation et/ou les interactions non-spécifiques avec des protéines pièges.

On retiendra des études *in vitro* d'affinité de liaison et d'activité de l'adénylate cyclase, reliées à la stabilité métabolique et à l'activité *in vivo*, qu'un composé se distingue des autres : le [a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37). En effet, ce peptide qui se comporte *in vitro* de façon quasiment identique au GLP-1-(7-37) (IC₅₀ = 0.33±0.1 et ED₅₀ = 1.4±0.6 nM contre 0.26±0.01 et 0.8±0.1 nM respectivement), est métaboliquement extrêmement plus stable que la molécule native et présente une meilleure activité tant sur la glycémie que sur l'insulinémie. Cet analogue, le

[a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37) a donc été sélectionné et, est actuellement en phase de développement pré-clinique dans les laboratoires Servier ; il semble promu à un bel avenir.

Chapitre III.

DISCUSSION DES RESULTATS SUR LA BASE DE CARACTERISTIQUES STRUCTURALES. CONFORMATION BIOACTIVE.

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié un certain nombre de dérivés du GLP-1-(7-37) modifiés en position 7, 8 et 9. Dans ce chapitre, nous avons cherché à interpréter, sur la base de caractéristiques structurales, les différences d'activité *in vitro* observée entre ces différents analogues. A partir des données RMN de THORNTON et GORENSTEIN {Thornton, K. *et al.* 1994} d'une part, et des résultats de dichroïsme circulaire (CD) d'autre part, nous proposons un modèle qui pourrait être proche de la conformation adoptée par le GLP-1-(7-37) au contact de son récepteur.

3.1. Préambule aux études de dichroïsme circulaire.

Au niveau des peptides et des protéines, le dichroïsme circulaire a été largement utilisé pour :

- suivre des changements conformationnels (passage monomère → oligomère, fixation sur un substrat, dénaturation ...),
- estimer le contenu en structure secondaire (hélice alpha, feuillet bêta, et coude).

Toutefois, cette deuxième application se heurte à quelques difficultés et les résultats dépendent, comme nous allons le voir par la suite, de la manière dont on traite les spectres.

La méthode la plus simple pour extraire l'information à partir des données de dichroïsme circulaire, consiste à supposer que le spectre d'un peptide ou d'une protéine est une combinaison linéaire des spectres de chacune des structures « pures » (hélice alpha « pure », feuillet bêta « pur »), pondérée par l'abondance de chaque structure. Les spectres CD (*Figure 28*) de ces structures « pures » (standards) ont été obtenus à partir de composés modèles. La principale difficulté de la technique réside dans le fait qu'il n'existe pas de vrais spectres de référence. Les

peptides synthétiques utilisés sont de mauvais modèles pour les structures secondaires rencontrées dans les protéines. Par exemple, le CD d'une hélice alpha dépend de sa longueur {Hirst, J. D. *et al.* 1994} et nous ne connaissons pas de feuillet bêta synthétique, capable de rendre compte exactement du spectre d'un feuillet bêta « naturel », tel qu'on le rencontre dans les protéines.

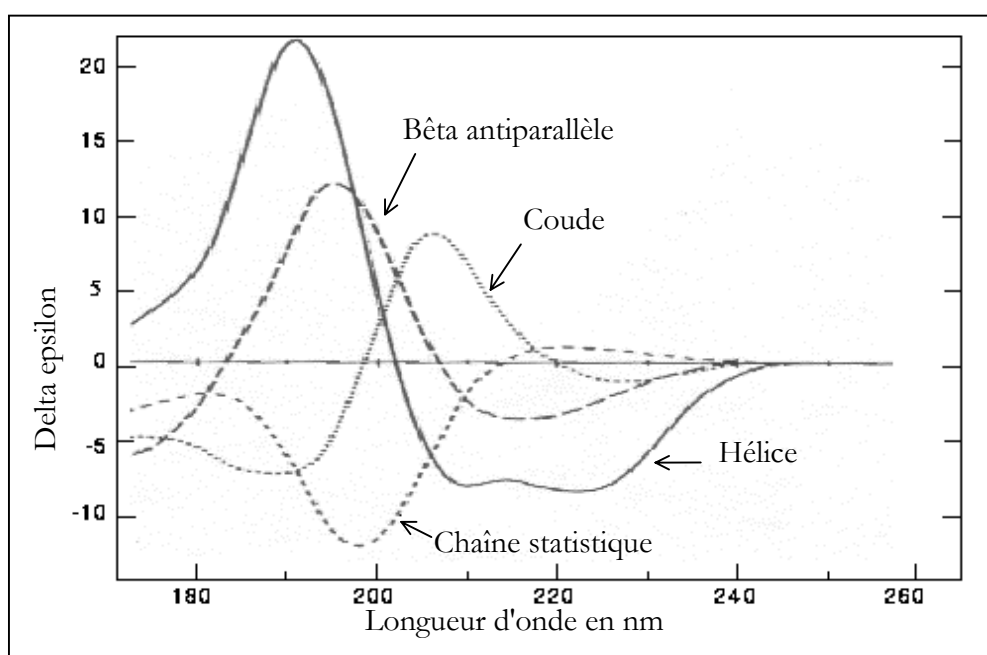


Figure 28. Spectre de dichroïsme circulaire de composés modèles synthétiques supposés exister sous forme de conformations « pures ». Redessiné à partir de Brahms et Brahms {Brahms, S. *et al.* 1980}.

En conséquence, il a été développé d'autres méthodes (« *self-consistent* ») {Sreerama, N. *et al.* 1994 ; Sreerama, N. *et al.* 1993} afin d'améliorer la fiabilité et la précision de l'analyse. Très schématiquement, ces méthodes consistent à comparer, à l'aide de procédés mathématiques complexes, le spectre expérimental à ceux d'une banque de protéines de structures connues, déterminées soit par RX soit par RMN. Le grand avantage de ces méthodes est qu'on n'a aucun besoin de spectres standards. Toutefois, les résultats varient en fonction de la base de protéines de référence choisie.

Un des intérêts du dichroïsme circulaire est qu'il permet de travailler dans une large gamme de pH et de solvants (aqueux et non aqueux). Le trifluoroéthanol (TFE) et l'hexafluoroisopropanol (HFIP) sont très utilisés, car il est généralement admis que ces deux milieux miment les caractéristiques particulières des systèmes *in vivo*. Cependant, les travaux récents de

WATERHOUS et JOHNSON {Waterhous, D. V. *et al.* 1994} tempèrent cette belle unanimité. En effet, ces auteurs ont montré que des fragments de protéines synthétiques adoptent, dans le TFE, des conformations qui n'ont rien avoir avec celles des mêmes espèces dans leur environnement naturel.

Ici, le but principal n'était pas d'atteindre par CD la structure du GLP-1 qui était connue, mais de détecter d'éventuels changements conformationnels liés aux mutations réalisées, et capables d'expliquer les gains ou les pertes d'activité biologique observés.

Nous avons tout d'abord enregistré les spectres CD du GLP-1-(7-37) et de l'exendine-4 dans un tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7.35) (Figure. 29). Bien que présentant des affinités similaires pour le récepteur du GLP-1 (Tableau 7), ces deux peptides ont des spectres significativement différents (Figure 29). Celui de l'exendine-4 est le spectre classique d'un composé majoritairement en hélice alpha, avec deux minima à 207 et 222 nm et une bande positive intense à 193 nm. Pour le GLP-1-(7-37), le minimum à 222 nm est beaucoup moins apparent et celui à 207 nm est déplacé aux environs de 204 nm (Figure 29). Cette allure est caractéristique d'un mélange de plusieurs structures : hélices alpha, feuillets bêta et « *random coil* », qui a pu également être observé sur le spectre IR-TF du GLP-1-(7-37) (résultat non montré ici).

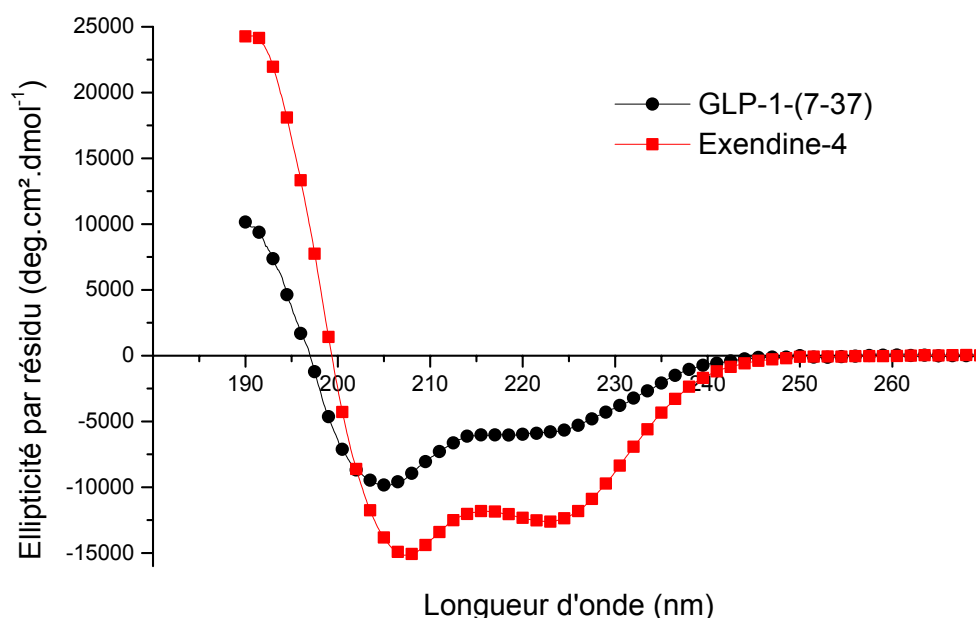


Figure 29. Spectres CD enregistrés en tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7.35) de l'exendine-4 et du GLP-1-(7-36). Ces peptides d'activité biologique identique, présentent une structure différente.

Ces résultats soulèvent un problème. En effet, il paraît évident que GLP-1-(7-37) et exendine-4, de séquence relativement homologue (*Tableau 3*) et se liant de la même manière au récepteur (*Tableau 7*), devraient avoir des conformations bioactives voisines, or ce n'est pas ce qui est observé, tout au moins dans un tampon phosphate. Ceci signifie qu'en milieu aqueux, les conformations du GLP-1-(7-37) et/ou de l'exendine-4 ne correspondent pas à la structure réelle de la molécule en interaction avec le récepteur.

Nous avons cherché à extraire les pourcentages d'hélice alpha et de feuillet bêta présents dans le GLP-1-(7-37) et l'exendine-4, à partir des spectres CD rapportés sur la *Figure 29*. Pour cela nous avons utilisé la technique de «fit» par les moindres carrés, basée sur l'algorithme d'élimination de Gauss-Jordan, incluse dans le programme Dicroprot 2.5 (<http://www.ibcp.fr>) {Deleage, G. *et al.* 1993}, et qui utilise différents modèles de références.

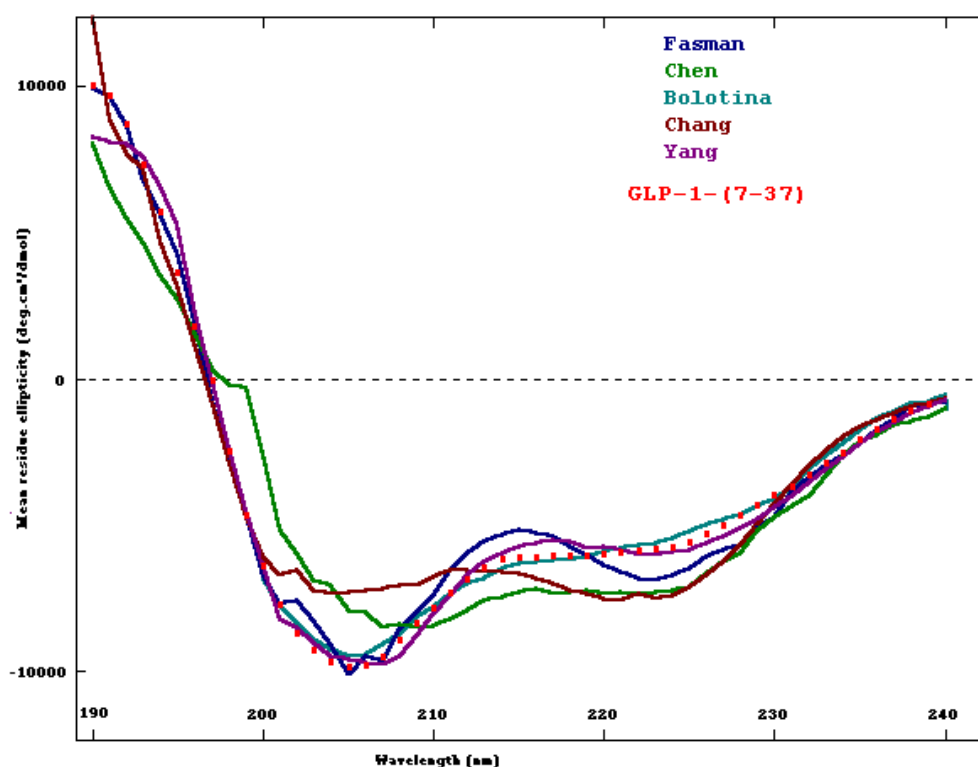


Figure 30. Déconvolution du spectre CD de GLP-1-(7-37) à l'aide des différents modèles de «fit» par les moindres carrés contenus dans le logiciel Dicroprot. C'est la méthode de Yang, qui reflète le mieux l'expérience.

De la *Figure 30*, il ressort que c'est le modèle développé par YANG {Yang, J. T. *et al.* 1986} qui seul permet de rendre compte de l'allure des courbes expérimentales ; il a donc été choisi

pour déterminer les pourcentages des éléments de structure secondaire impliqués dans les conformations en milieu aqueux du GLP-1-(7-37) et de l'exendine-4. Les résultats sont rapportés sur le *Tableau 10*.

Peptide	Milieu	Hélice alpha (%)	Feuillet bêta (%)
GLP-1-(7-37)	Tampon phosphate	30	14
GLP-1-(7-37)	TFE	72	2
Exendine-4	Tampon phosphate	54	8
Exendine-4	TFE	70	n.d.

Tableau 10. Eléments de structure secondaire contenus dans le GLP-1-(7-37) déduit du CD à l'aide du modèle de Yang. (nd : non déterminé)

Du *Tableau 10*, il ressort que le GLP-1-(7-37) présente en tampon phosphate un pourcentage non négligeable de structure secondaire. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par ADELHORST *et al.* {Adelhorst, K. *et al.* 1994} qui ont mis en évidence par CD la présence de 35% d'hélice alpha dans un milieu de composition identique à celui utilisé dans ce travail. Par contre, pour MONTROSE-RAFIZADEH et ENG {Montrose-Rafizadeh, C. *et al.* 1997a}, le GLP-1-(7-36) amide existerait principalement sous forme de feuillet bêta (50%). Cette contradiction peut s'expliquer par le fait qu'ADELHORST et nous, avons certainement employé la même méthodologie expérimentale et la même technique pour traiter les données brutes de CD, alors que MONTROSE-RAFIZADEH et ENG utilisaient une technique différente : peptide dans eau pure, Spectrographe AVIV Brand et traitement des spectres par la méthode ProSec (communication personnelle). Rappelons d'autre part, que selon THORNTON et GORENSTEIN, le $[N^{15}]$ GLP-1-(7-36) amide n'est structuré qu'en milieu membrano-mimétique {Thornton, K. *et al.* 1994}. De ces résultats il apparaît que la nature de la conformation du GLP-1 en milieu aqueux est loin d'être élucidée.

3.2. Résultats de dichroïsme circulaire des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 7, 8 et 9.

Si on examine maintenant les spectres CD des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 7, 8 et 9 avec ou sans délétion de l'arginine en position 36 (*Figures 31, 32, 33 et 34*), on note d'importantes variations structurales. Ces variations sont beaucoup plus nettes dans le cas des composés ne contenant pas d'arginine en 36 (*Figure 34*).

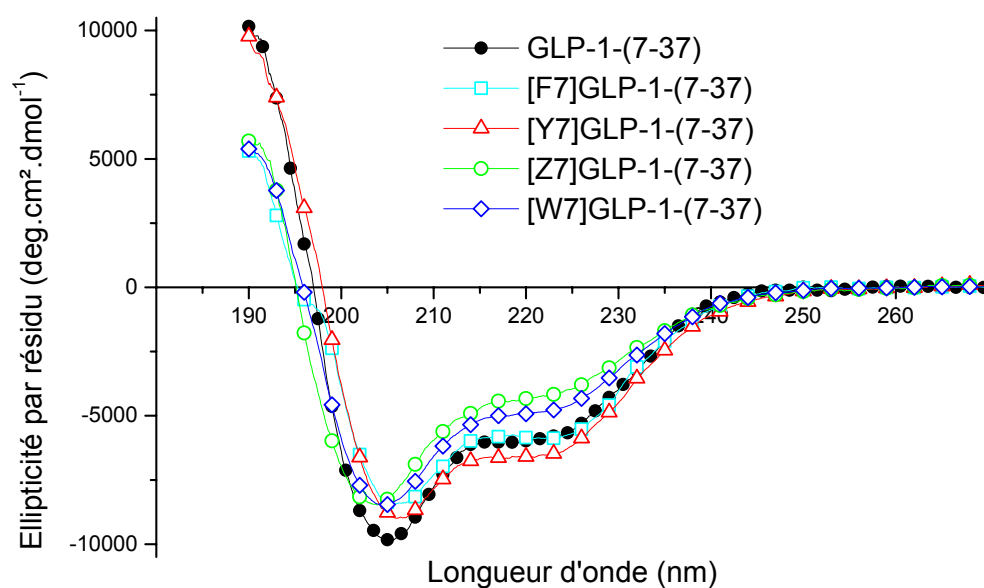


Figure 31. CD des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 7. Variation structurale en fonction des mutations.

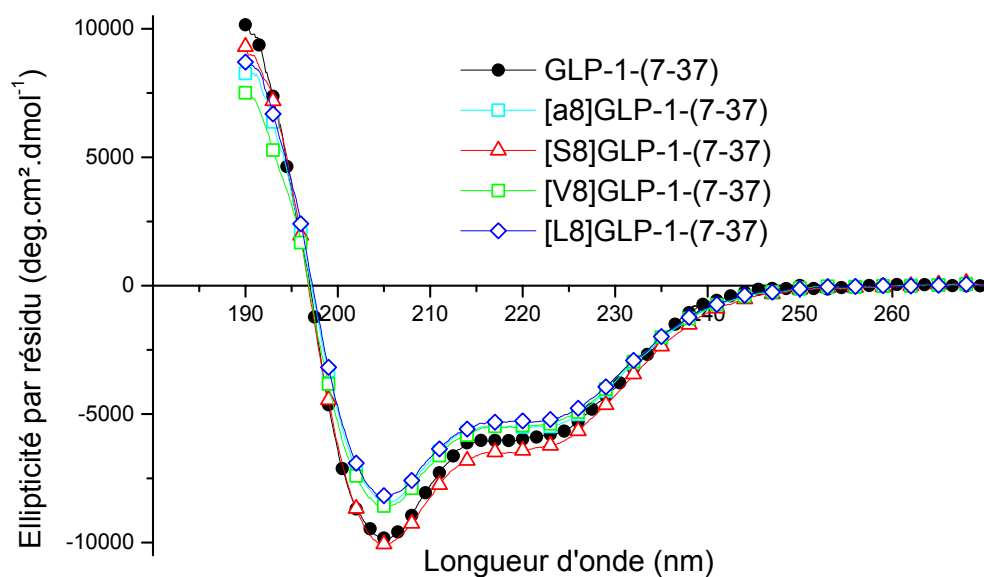


Figure 32. CD des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 8. Variation structurale en fonction des mutations.

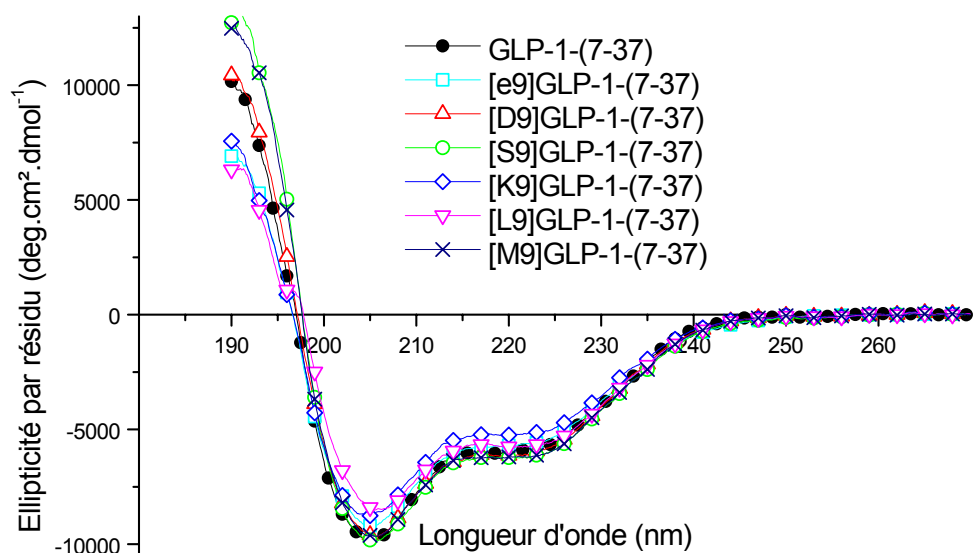


Figure 33. CD des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 9. Variation structurale en fonction des mutations.

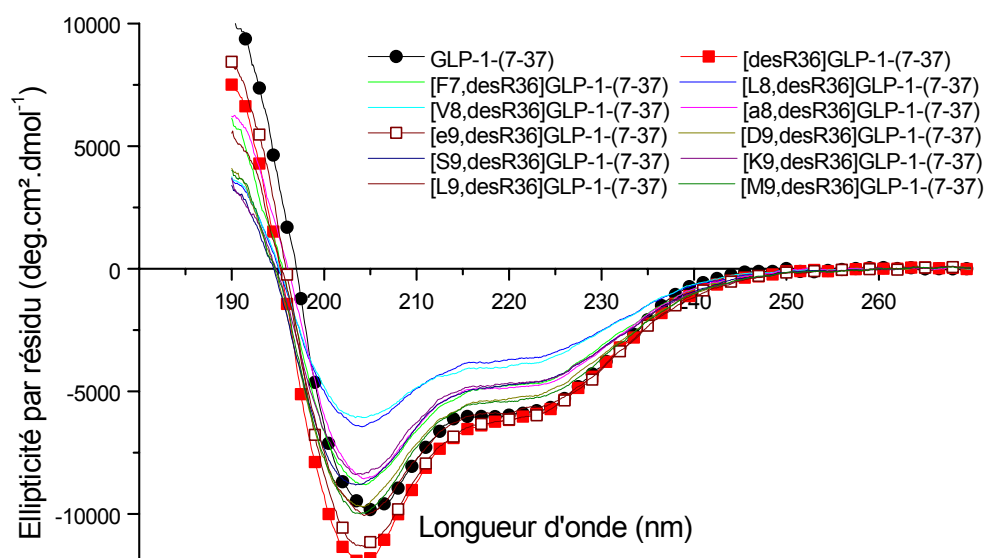


Figure 34. CD des analogues du GLP-1-(7-37) dépourvus de Arg³⁶. Variations structurales importantes induites par la suppression de l'Arg 36

En milieu aqueux le GLP-1-(7-37) semble présenter une grande flexibilité. En effet, comme l'indique les spectres CD (*Figures 31, 32, 33 et 34*), de petites variations de séquence (mutation ou délétion d'un seul résidu) sont capables d'induire des changements structuraux relativement importants. Nous n'avons pas cherché à déterminer les pourcentages d'hélice alpha et de feuillet bêta présents. Cela n'a que peu d'intérêt dans la mesure où la conformation dans l'eau est certainement très éloignée de celle adoptée au sein de la cavité réceptricielle. Afin d'essayer d'obtenir une image plus réaliste du peptide en interaction avec sa cible, nous avons enregistré les spectres CD dans le TFE/eau (30/70, V/V) un solvant supposé être membranomimétique.

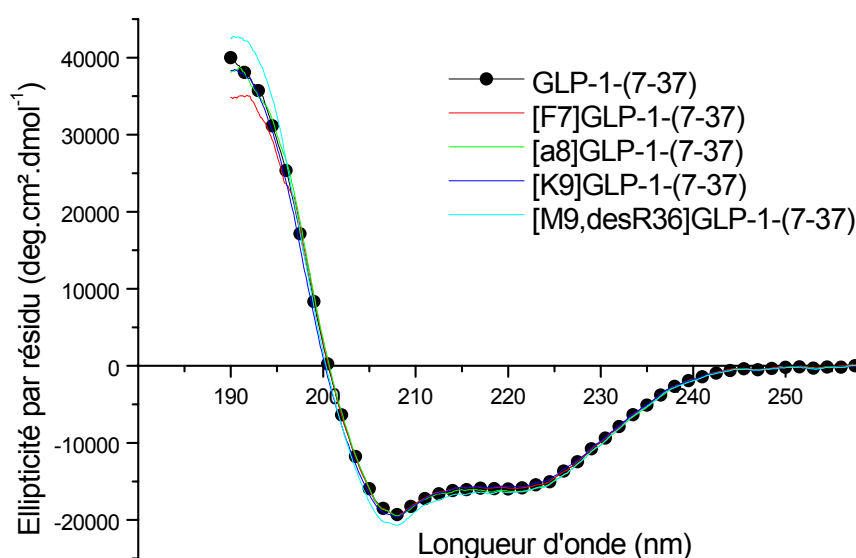


Figure 35. Spectres CD du GLP-1-(7-37) et de quelques analogues dans le mélange TFE-eau (30-70, V-V). Dans un environnement supposé membranomimétique, tous les peptides adoptent pratiquement la même structure.

Il est intéressant de remarquer (*Figure 35*) que tous les analogues du GLP-1-(7-37) présentent dans ce milieu des structures pratiquement toutes identiques, contenant entre 65 et 75% d'hélice alpha selon les peptides. Ce pourcentage est identique à celui calculé à partir du modèle, déduit des données RMN, de $[N^{15}]$ GLP-1-(7-36) amide et rapporté sur la *Figure 15*. En effet, dans ce modèle on trouve 20 des 30 résidus, soit 66% dans les deux hélices 14-20 et 24-36. On peut donc conclure :

- que le GLP-1-(7-37) et ses analogues ont dans le TFE, une conformation identique à celle de [N¹⁵]GLP-1-(7-36) amide dans les micelles de DPC, conformation qui pourrait être proche de celle adoptée au contact du récepteur,
- et que, d'autre part, les mutations réalisées sur les trois positions N-terminales du GLP-1-(7-37) n'affectent pas la structure dans le TFE, contrairement à ce qui avait été observé dans le tampon phosphate.

3.3. Interprétation de l'activité des analogues du GLP-1-(7-37) substitués en position 7, 8 et 9 avec et sans délétion de l'arginine 36.

Les analogues mutés en position 7, 8 et 9 présentent des activités différentes (*Tableau 7*) : ainsi [K⁹]GLP-1-(7-37) est environ 1000 fois moins puissant que le GLP-1-(7-37). Ceci pourrait laisser supposer que ces deux peptides ont des conformations vraiment dissemblables, ou encore que le groupement COOH de Glu⁹ établisse une liaison ionique avec le récepteur nécessaire à l'activité biologique. Cette deuxième hypothèse peut être éliminée, puisque la substitution Glu⁹ → Met⁹ ou Leu⁹ (*Tableau 7*) conserve aussi bien l'affinité pour le récepteur que la capacité d'activer l'adénylate cyclase. Reste alors la possibilité qu'il existe entre [K⁹]GLP-1-(7-37) et GLP-1-(7-37) une caractéristique structurale non détectable par CD, permettant d'expliquer le comportement de ces deux peptides vis à vis du récepteur.

Nous proposons ici un modèle basé sur l'existence d'une interaction ionique entre les chaînes latérales de His⁷ et Asp¹⁵, comme dans le cas du glucagon {Unson, C. G. *et al.* 1994a ; Unson, C. G. *et al.* 1994b}. Dans ces conditions, la partie de la molécule de GLP-1-(7-37) comprise entre les résidus 7 à 12, forme une large boucle (*Figure 36*). Un acide aminé clé dans le processus de formation de cette boucle est Gly¹⁰ qui agit à la manière d'un pivot permettant le repliement de la partie N-terminale. Ceci peut expliquer le fait que la substitution de Gly¹⁰ par n'importe quel autre acide amine, même petit comme l'alanine {Goke, R. *et al.* 1997 ; Adelhorst, K. *et al.* 1994 ; Gallwitz, B. *et al.* 1994}, réduit considérablement l'activité. A cette position, la présence d'une glycine est absolument nécessaire du fait de sa grande labilité conformationnelle.

Sur la structure rapportée *Figure 36*, il est à noter que His⁷ est spatialement proche non seulement de Asp¹⁵, mais encore de Phe¹². Dans ces conditions, le groupement phényle de ce résidu peut interagir avec le groupement imidazole de l'histidine N-terminale, qui constitue un dipôle permanent du fait de la présence de deux nuages parallèles d'électrons π , situés de part et

On a vu que His⁷ peut être remplacé, sans perte sensible d'activité biologique, par une phénylalanine (*Tableau 7*) ; ceci suggère que la chaîne latérale Phe⁷, incapable d'établir une liaison ionique avec Asp¹⁵, utilise Phe¹² comme site compensatoire pour amener le N-terminal de la molécule de GLP-1-(7-37) à se courber.

Il n'est pas surprenant d'observer que le [Y⁷]GLP-1-(7-36) soit moins actif que le GLP-1-(7-36) amide (*Tableau 7*) {Parker, J. C. *et al.* 1998 ; Hareter, A. *et al.* 1997 ; Gallwitz, B. *et al.* 1994}. En effet, si la conformation bioactive nécessite une interaction entre la chaîne latérale du résidu 7 et celle de Asp¹⁵ et/ou celle de Phe¹², la présence d'un hydroxyle sur le groupement aromatique de Tyr⁷ induit une répulsion électrostatique avec le carboxyle de Asp¹⁵ spatialement proche (*Figure 36*). Dans le cas de [W⁷]GLP-1-(7-37), l'importante diminution des IC₅₀ et ED₅₀ observée (*Tableau*

7) est certainement due à l'encombrement stérique généré par le noyau indole qui gêne la formation de l'interaction Trp⁷-Phe¹².

Dans la boucle N-terminale du GLP-1-(7-37) (*Figure 36*), les chaînes latérales de His⁷, Ala⁸ et Glu⁹ sont proches l'une de l'autre et dirigées du même côté par rapport au plan moyen du cycle. Aussi, si la taille de l'acide aminé en position 8, placé entre une histidine et un acide glutamique, devient suffisamment importante, des contraintes stériques peuvent se développer, gênant la formation de la liaison ionique His⁷-Asp¹⁵. Ainsi, [V⁸]GLP-1-(7-37) et [S⁸]GLP-1-(7-37) ayant en position 8 deux acides aminés de taille un peu plus importante que l'alanine, présentent tous deux une baisse relativement modérée de l'activité biologique (*Tableau 7*). Par contre, [L⁸]GLP-1-(7-37) avec un groupement volumineux en position 8, s'il conserve une affinité faible mais significative, est presque totalement dénué d'activité sur de l'adénylate cyclase (*Tableau 7*). Ceci souligne à nouveau, s'il en est encore besoin, le rôle prépondérant de la partie N-terminale de la molécule de GLP-1-(7-37) dans le mécanisme d'activation du récepteur.

L'analogue [a⁸]GLP-1-(7-37) est aussi puissant que le GLP-1-(7-37), son IC₅₀ semble même être légèrement plus élevé (*Tableau 7*). Ceci peut facilement s'expliquer sur la base du modèle proposé sur la *Figure 36*. La chaîne latérale de D-Ala est dirigée par rapport au plan moyen du cycle N-terminal, du côté opposé à celles de His⁷ et Glu⁹ réduisant ainsi l'incidence des contraintes stériques.

En première analyse, la position 9 apparaît être plus permissive que la 8. En effet, [S⁹]GLP-1-(7-37), [L⁹]GLP-1-(7-37) et [M⁹]GLP-1-(7-37) et surtout ces deux derniers sont de puissants agonistes (*Tableau 7*). Encore dans ce cas, le modèle que nous proposons permet de rendre compte du comportement de ces peptides. Glu⁹ étant placé entre une alanine et une glycine, résidus peu encombrants, la position 9 peut accepter facilement des acides aminés volumineux comme la leucine ou la méthionine. Notons également que le changement mineur Glu⁹ → Asp⁹, en réduisant quelque peu les contraintes stériques, augmente l'activité (*Tableau 7*). Avec les tests utilisés ici, nous trouvons que [D⁹,desR36]GLP-1-(7-37) est aussi puissant que l'exendine-4.

Des activités importantes présentées par [D⁹]GLP-1-(7-37), [L⁹]GLP-1-(7-37), [S⁹]GLP-1-(7-37) et [M⁹]GLP-1-(7-37), il ressort que la présence d'un résidu acide n'est pas strictement requise en position 9. Cependant, le changement de polarité Glu⁹ → Lys⁹, induit une baisse très importante de l'activité biologique. [K⁹]GLP-1-(7-37) est presque totalement inactif (*Tableau 7*). Il

est possible que la charge positive portée par Lys⁹ interagisse à la place de His⁷ avec Asp¹⁵ déstabilisant ainsi la boucle N-terminale.

La stéréochimie apparaît aussi être importante puisque [e⁹]GLP-1-(7-37) est beaucoup moins actif que le peptide natif. Encore ici, le modèle proposé sur la *Figure 36* pourrait permettre d'interpréter ce résultat. Dans le GLP-1-(7-37), sur la face A de la boucle N-terminale (*Figure 37*), sont regroupées toutes les chaînes latérales des acides aminés 8 à 12 ; en conséquence la face B est peu encombrée, donc facilement accessible. Ce n'est plus le cas pour [e⁹]GLP-1-(7-37) où le changement de chiralité amène la chaîne latérale du glutamique à se positionner sur la face B. La présence dans cette partie de l'espace d'un groupement $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{H}$ peut gêner l'approche du récepteur par des répulsions, soit électrostatiques, soit encore stériques. Pour vérifier la nature des forces impliquées, il faudrait synthétiser un analogue du GLP-1-(7-37) substitué en 9 par un acide aminé encombré de configuration D. Si cette analyse est exacte, la position 9 serait en contact étroit avec une partie fonctionnellement importante du récepteur. Ces résultats font l'objet d'une publication qui est sur le point d'être soumise : « *Structural requirements of the N-terminal region of glucagon-like peptide-1-(7-37) for receptor interaction and cAMP production.* » {Sarrauste de Menthère, C. *et al.* en préparation}.

THORNTON et GORENSTEIN {Thornton, K. *et al.* 1994} n'ont pas clairement mis en évidence de structurations dans la partie N-terminale. Ce n'est pas très étonnant puisque la molécule étudiée est le [N¹⁵]GLP-1-(7-37) dans laquelle l'acide aspartique en 15, important pour la formation de la boucle N-terminale est remplacé, par une asparagine. Ce résidu est bien évidemment incapable de former une liaison ionique avec le cycle imidazol de His⁷. Toutefois, si l'on examine soigneusement la structure de [N¹⁵]GLP-1-(7-37) déduite de la dynamique moléculaire réalisée sous contrainte (NOESY) (*Figure 37*), on note que la partie N-terminale est peu mobile et qu'elle a tendance à adopter une configuration en boucle. Ceci constitue un argument (et non pas une preuve) pour l'existence d'une structuration au niveau du fragment 7-13.

Pour vérifier la présence d'une boucle et valider ainsi totalement notre modèle, il faudrait reprendre les études RMN de THORNTON et GORENSTEIN sur le GLP-1-(7-37).

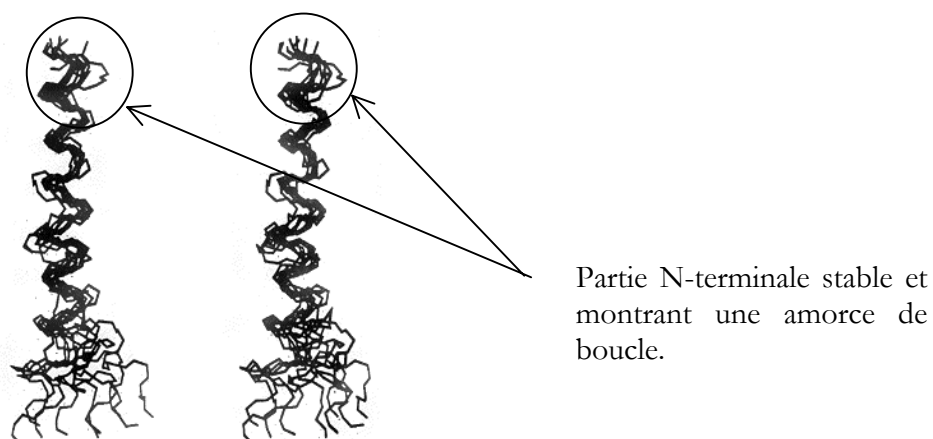


Figure 37. Vue stéréo de la structure du GLP-1-(7-37) déduite de la dynamique moléculaire sous contraintes de distance (en micelle DPC). Reproduction de {Thornton, K. et al. 1994}. La partie N-terminale présente une bonne stabilité (peu de mobilité), en comparaison à la partie C-terminale, et a tendance à adopter une configuration en boucle.

Chapitre IV.

RECEPTEUR DU GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1. RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (RCPG).

ETAT DE LA QUESTION.

Le GLP-1 produit son effet via un récepteur de nature protéique. Il peut être important pour le « *design* » d'agonistes ou d'antagonistes superactifs, de connaître la structure tridimensionnelle de ce récepteur et surtout les acides aminés impliqués dans l'interaction avec le ligand. C'est pourquoi, après avoir conçu des analogues à partir de l'hormone elle-même, nous avons essayé de déterminer la structure du récepteur spécifique du GLP-1 (GLPr), qui est un récepteur couplé aux protéine G (RCPG). Dans ce chapitre, nous énoncerons tout d'abord, quelques propriétés biologiques du récepteur du GLP-1 et ferons ensuite quelques rappels sur les RCPG, en insistant plus particulièrement sur leur modélisation.

4.1. Récepteur du GLP-1.

4.1.1. Mise en évidence du récepteur du GLP-1.

En 1988, ORSKOV *et al.* {Orskov, C. *et al.* 1988} ont mis en évidence la présence de récepteurs spécifiques du GLP-1-(7-36) amide dans les cellules d'insulinomes pancréatiques de rat.

Ces premiers résultats furent confirmés et approfondis par FEHMANN *et al.* {Fehmann, H. C. *et al.* 1991} qui démontrèrent que le GLP-1-(7-37) se lie spécifiquement à des récepteurs situés sur les cellules bêta et delta-pancréatiques, où le peptide induit la sécrétion glucose-dépendante d'insuline (cellules bêta) et de somatostatine (cellules D).

On notera qu'une fois l'existence de ce récepteur clairement établie au niveau pancréatique, d'autres études ont montré l'expression du récepteur du GLP-1 dans le tissu adipeux {Valverde, I. *et al.* 1993}, les glandes gastriques {Uttenthal, L. O. *et al.* 1990}, le poumon, le cerveau, les reins, l'estomac et le cœur {Wei, Y. *et al.* 1995}.

4.1.2. Clonage et expression du récepteur du GLP-1.

En 1992 THORENS {Thorens, B. 1992} a cloné, puis séquencé, un récepteur du GLP-1-(7-36) isolé de cellules pancréatiques de rat : c'est une protéine de 63 kDA, constituée de 463 acides aminés. Une analyse d'hydropathie révèle l'existence de sept domaines hydrophobes.

Ce récepteur présente quelques analogies avec les récepteurs aux sécrétines, au glucagon, au VIP, au GRF, au PTH (*parathyroïd hormone*), au PACAP, à la calcitonine et à la corticotropine, qui forment un sous-groupe de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le degré d'homologie varie de 27 à 49%. Une caractéristique commune à ces récepteurs est l'existence d'un domaine N-terminal extracellulaire relativement long, d'environ 120 acides aminés, dont la séquence primaire est variable, à l'exception de six cystéines conservées.

THORENS *et al.* {Thorens, B. *et al.* 1993a}, ont également cloné puis séquencé le récepteur du GLP-1-(7-36) pancréatique humain. Il est de même longueur que celui du rat, avec lequel il présente 95% d'homologie.

On retiendra enfin que le gène codant pour le récepteur du GLP-1 a été localisé chez l'homme par STOFFEL *et al.* {Stoffel, M. *et al.* 1993}. Le clonage et le séquençage de l'ADNc du récepteur localisé dans le cœur et le cerveau humain présente la même séquence que celle du récepteur des tissus pancréatiques. Par contre, dans les lieux de « *turnover* » important du glucose, comme le foie, le muscle squelettique et les tissus adipeux, la séquence est quelque peu différente {Wei, Y. *et al.* 1995}.

4.1.3. Effecteurs du récepteur du GLP-1.

La liaison des GLP-1-(7-37) et (7-36) amide sur leur récepteur produit une augmentation de concentration intracellulaire en AMPc {Thorens, B. *et al.* 1993b ; Thorens, B. 1992 ; Fehmann, H. C. *et al.* 1991 ; Goke, R. *et al.* 1989}.

En 1989, GOKE *et al.* {Goke, R. *et al.* 1989 ; Goke, R. *et al.* 1989} montrent l'implication directe de l'adénylate cyclase sur l'insulino-sécrétion, faisant suite à la liaison du GLP-1-(7-36) à son récepteur. Ce couplage se fait certainement par l'intermédiaire d'une protéine G stimulante (Gs) {Hibert, M. 1993}. Ce résultat était d'ailleurs décrit par THORENS {Thorens, B. 1992}, qui ajoutait de plus que c'est au niveau de la séquence -R-L-A-K-, de la troisième boucle intracellulaire du récepteur du GLP-1-(7-36) pancréatique du rat, que se fait le couplage récepteur-protéine G.

4.2. Les récepteurs couplés aux protéines G .

Comme nous l'avons laissé entendre, le récepteur du GLP-1 (GLPr) appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Nous ne donnerons ici qu'un aperçu succinct de la structure générale des RCPG, tant leur multiplicité est grande et leur mode d'action trop complexe pour être détaillé ici.

4.2.1. Structure des RCPG.

Très schématiquement, un RCPG est une glycoprotéine monomérique de 350 à 800 acides aminés. Une analyse d'hydropathie des différents résidus le long de la séquence primaire, pour une protéine donnée, permet de prévoir les domaines compatibles avec un milieu hydrophile (polaire) ou hydrophobe (apolaire). La méthode la plus couramment utilisée, celle de KYTE et DOOLITTLE {Kyte, J. *et al.* 1982}, suggère que tous les RCPG possèdent sept domaines hydrophobes, donc potentiellement transmembranaires.

Des études enzymatiques et immunologiques ont permis de localiser la partie amino-terminale de ce récepteur, toujours extracellulaire, alors que la partie carboxy-terminale est intracellulaire. Les sept domaines hydrophobes correspondraient à sept domaines transmembranaires, de 20 à 30 résidus chacun. Une analyse de la structure secondaire de ces sept fragments hydrophobes montre qu'ils sont organisés en hélice alpha {Hibert, M. 1993}. Ces sept hélices transmembranaires (HTM) seraient proches, formant ainsi une poche hydrophile au sein de la membrane plasmique. Les boucles (séquences d'acides aminés) reliant ces 7 HTM sont alternativement intra (notées **i**) et extracellulaires (notées **e**) (*Figure 38*).

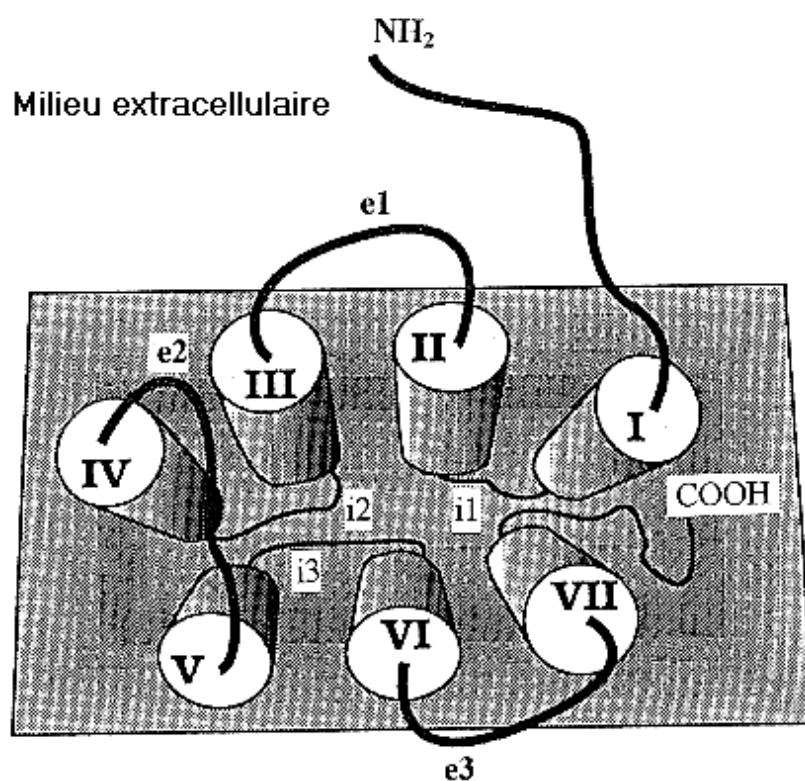


Figure 38. Structure générale et nomenclature des RCPG : 7 hélices transmembranaires antiparallèles (notées de I à VII), reliées par 3 boucles extracellulaires (e1, e2, e3) et par 3 boucles intracellulaires (i1, i2, i3).

4.2.2. Transmission de l'information.

Au niveau des RCPG, la première étape de propagation du signal est l'interaction avec un médiateur extracellulaire. Cette association va induire une modification conformationnelle du récepteur. Ainsi « activé », ce dernier pourra se coupler à un transducteur : la protéine G. Cette association ternaire provoque la déstabilisation de la structure hétérotrimérique $\alpha\beta\gamma$ de la protéine G, qui se dissocie en deux composants : la sous-unité α d'une part, et l'ensemble des deux sous-unités β et γ de l'autre. L'entité α va former un complexe moléculaire avec un effecteur qui donnera naissance à un « pool » de messagers secondaires (AMPc, GMPc, IP₃, Ca²⁺, K⁺, DAG, acide arachidonique) {Hibert, M. 1993 ; Linder, M. E. *et al.* 1992}. Comme il a déjà été mentionné, rappelons que pour le GLPr l'effecteur est l'adénylate cyclase et le second messenger l'AMPc.

4.2.3 Classification des RCPG.

Les RCPG représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires. En 1995, plus de 140 récepteurs ont été identifiés (sans compter les centaines de récepteurs olfactifs) et de nouvelles découvertes augmentent tous les jours leur nombre.

Ces récepteurs se lient à des ligands aussi variés que des amines (noradrénaline, histamine, sérotonine, ...), des peptides (angiotensines, mélanocortines, endothélines, glucagon, ...), de volumineuses hormones glycosilées (thyrotropine, hormone folliculo-stimulante, ...), des dérivés lipidiques, des nucléosides ou nucléotides, des ions, une variété presque infinie de substances odorantes, ainsi que des agents physiques comme les photons {Parmentier, M. *et al.* 1995}.

Cette importante famille de récepteurs peut être divisée en trois sous-groupes selon deux critères principaux {Bockaert, J. 1995} : (a) leur séquence primaire et (b) la localisation du site de liaison des ligands agonistes.

4.2.3.1. Classement selon la séquence primaire.

La différence essentielle entre ces trois groupes est l'absence d'homologie de séquence. Et, s'il y a homologie de séquence au sein d'un seul et même groupe, cela concerne essentiellement les zones transmembranaires {Parmentier, M. *et al.* 1995}.

Le premier groupe **G1**, contenant la majorité des RCPG, dont les récepteurs olfactifs, les récepteurs aux opsines, aux canabinoïdes, à l'adénosine, ... se caractérise par la présence d'une séquence de type -D-R-Y- ou -E-R-W- très bien conservée, du côté N-terminal de la boucle i2. D'autres résidus des domaines transmembranaires sont aussi conservés : Asp de HTM2, Pro et Phe de HTM6 ainsi que Asn et Pro de HTM7. On notera aussi la présence d'un pont disulfure entre deux cystéines, qui relie les boucles e1 et e2.

Le second groupe **G2**, celui du GLP-1, du glucagon, du VIP... (récepteurs peptidergiques), présente moins de 10% d'identité de séquence avec G1, et ne possède notamment pas la séquence de type -D-R-Y-.

Le troisième groupe **G3**, contient les récepteurs métabotropiques du glutamate et les récepteurs au Ca^{2+} . Il ne présente pas d'homologie avec G1 (et notamment pour la séquence -D-

R-Y-), ni avec G2. Par contre, il y a 20 cystéines (17 dans le domaine N-terminal, 1 dans les boucles e1 et e2 et 1 dans HTM5) conservées dans tout ce groupe. De même, on constate la conservation d'une zone hydrophobe dans le domaine amino-terminal, et 50 à 60% de résidus identiques dans les boucles i1 et i3.

4.2.3.2. Classement selon le site de liaison.

On retiendra pour ce qui est du classement en fonction du site de liaison des agonistes, {Bockaert, J. 1995}, que :

Le groupe G1 est lui-même divisé en trois sous-groupes : le **G1a** quand la liaison se fait dans un domaine transmembranaire profond. Le **G1b** quand le site de liaison met en jeu le domaine transmembranaire superficiel et le domaine N-terminal. Et enfin le **G1c**, quand l'agoniste se lie avec le domaine amino-terminal, induisant peut-être une interaction de ce complexe avec les HTM. On notera aussi l'existence dans G1a d'une cystéine, palmitoylée dans les récepteurs adrénergiques, bien conservée dans la partie carboxy-terminale.

Pour le groupe G2, à l'heure actuelle, on ne sait pas où se trouve le site de liaison des agonistes.

Le groupe G3 implique la zone N-terminale dans la reconnaissance de l'agoniste, mais on ignore s'il y a interaction avec les domaines transmembranaires.

4.3.3. Modèles 3D des RCPG : « Les grands courants de pensée ».

La facile dénaturation des RCPG, une fois isolés de leur environnement lipidique, entrave sérieusement la détermination de leur structure 3D par utilisation de techniques expérimentales comme la cristallisation, la diffraction (rayons X, électrons et neutrons). C'est pour cela que la modélisation moléculaire est de première importance pour obtenir des indices sur la structure de ces protéines {Tuffery, P. *et al.* 1994 ; Du, P. *et al.* 1994}. La modélisation s'appuie sur une protéine de base : la bactériorhodopsine (bR).

4.3.3.1. Le modèle de base : la bactériorhodopsine.

La bactériorhodopsine est une protéine membranaire de 26 kDA de *Halobacterium halobium*. Elle forme un complexe 1:1 avec un chromophore : le rétinale ; cela lui confère sa couleur pourpre caractéristique. Cette protéine présente, comme les RCPG, sept domaines transmembranaires en hélice alpha (HTM), et des parties amino et carboxy-terminales respectivement extra et intracellulaires. Ce polypeptide agit comme une pompe à protons, via la photoisomérisation (cis-trans) de la double liaison $^{11}\text{C}=\text{C}^{12}$ du rétinale, permettant l'activation du récepteur. Le complexe est le résultat de la formation d'une base de Schiff au niveau de la Lys²¹⁶ de l'hélice 7, avec le chromophore {Hoflack, J. *et al.* 1994 ; Hibert, M. F. *et al.* 1993b ; Savarese, T. M. *et al.* 1992 ; Trumpp-Kallmeyer, S. *et al.* 1992 ; Henderson, R. *et al.* 1990}.

En 1990, HENDERSON *et al.* {Henderson, R. *et al.* 1990} publient la structure 3D de la bR par cryomicroscopie électronique à une résolution de 3,5Å horizontalement, et 10Å perpendiculairement par rapport au plan de la membrane.



Figure 39. Carte d'électrodensité de la bactériorhodopsine (3,5Å).

Les hélices 2, 3 et 4 sont approximativement perpendiculaires à la membrane du procaryote, alors que les HTM 1, 5, 6, et 7 sont légèrement inclinées. Arrangées dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (face extracellulaire), elles sont antiparallèles et relativement proches les unes par rapport aux autres ; les chaînes latérales de ces hélices adjacentes interagissent. Cet agrégat de 25x35x40 Å délimite une poche hydrophile, où se trouve le site de liaison.

Cependant, il est à noter que cette structure ne concerne que les hélices transmembranaires, (aucune donnée n'est disponible pour les boucles inter-hélices ni pour les fragments N et C-terminaux), et que la position de HTM4 reste ambiguë. Afin de pallier ces problèmes, des travaux

{Schertler, G. F. *et al.* 1993a} se focalisent sur l'obtention de cristaux 3D qui permettraient une détermination de structure de plus haute résolution.

Toutefois, il faut souligner que la bR n'est pas un récepteur couplé aux protéines G, et qu'elle ne présente que peu d'homologie (environ 10%) avec les différents RCPG.

4.3.3.2. Modélisation des RCPG.

L'opsine, protéine membranaire de 348 résidus, est un des constituants de la rhodopsine, pigment visuel des cellules photoréceptrices en bâtonnet, composé d'un chromophore, le 11-cis-rétinal, lié de façon covalente à l'opsine {Alkorta, I. *et al.* 1994 ; Schertler, G. F. *et al.* 1993b}. Les opsines sont des RCPG du groupe G1.

De manière similaire à la bR, le 11-cis-rétinal s'accroche à la Lys²⁹⁶ (HTM7) de la rhodopsine de bovins {Schertler, G. F. *et al.* 1993b ; Savarese, T. M. *et al.* 1992}. Il y a également deux résidus, Trp et Tyr à des positions géométriquement identiques sur l'hélice 6 des deux protéines, qui donnent des interactions π - σ avec le rétinol. Les résidus Asp ou Glu des hélices 3 agissent comme contre-ions de la base Schiff protonée {Schertler, G. F. *et al.* 1993b ; Trumpp-Kallmeyer, S. *et al.* 1992}.

Ainsi, la bR et les opsines, ayant des ligands, des mécanismes d'action et des profils d'hydropathie sensiblement identiques, il était possible de considérer la bactériorhodopsine, de structure connue, comme modèle pour les RCPG voisins des opsines (groupe G1).

En 1986 FINDLAY et PAPPIN {Findlay, J. B. *et al.* 1986} proposent le premier modèle rudimentaire 3D de RCPG, basé sur la carte de densité électronique faible résolution de la bR.

A partir de là, il y eut une vingtaine de RCPG modélisés selon le modèle de la bR. Les séquences primaires des récepteurs sont repliées dans l'espace selon leur profil d'hydropathie, et les hélices accolées de manière analogue à la bR. L'orientation de celles-ci tient compte de tous les résultats expérimentaux disponibles (essentiellement de biologie moléculaire). Enfin la géométrie finale est optimisée par minimisation de l'énergie interne de la molécule.

Les caractéristiques générales des domaines transmembranaires des RCPG sont donc définies comme suit : sept hélices alpha très étroitement accolées et délimitant une fente centrale diédrique, étroite et profonde de 20 Å. Les résidus chargés et conservés sont localisés au cœur du récepteur, les autres (apolaires et/ou non conservés) faisant face aux phospholipides de la bicouche membranaire {Hibert, M. F. *et al.* 1993a}.

Mais cette topologie, espérée comme générique pour l'ensemble des RCPG, est basée uniquement sur la modélisation de récepteurs faisant partie du groupe G1 présentant un certain degré d'homologie avec la bR. Le problème est beaucoup plus compliqué pour les récepteurs qui ne présentent pas de similitudes évidentes, comme avec le groupe G2 du récepteur du GLP-1.

4.3.3.3. Validation des différents modèles.

En 1992 MALONEY-HUSS *et al.* {MaloneyHuss, K. *et al.* 1992} proposent une structure 3D du récepteur β_2 -adrénergique basée uniquement sur des données expérimentales et des homologies de séquence primaire de domaines intramembranaires. Ils n'utilisent pas la bR, car la faible homologie de séquence avec les RCPG les font douter de la validité du modèle. En conclusion, les auteurs soulignent que l'arrangement des 7 HTM de leur modèle diffère fortement de celui trouvé précédemment en utilisant la bR comme ligne directrice. Leur HTM2 correspondrait à la position occupée par la HTM7 de la bR.

Dès lors, commence un grand débat sur la validation des modèles construits à partir de la bR, et sur son utilisation comme modèle de base ; aucun des différents arguments avancés ne fait, encore aujourd'hui, l'unanimité au sein de la communauté scientifique.

Ainsi, PARDO *et al.* {Pardo, L. *et al.* 1992} à partir d'alignements de séquence et en considérant les positions des prolines dans les hélices des RCPG du groupe G1 et de la bR, ont été amenés à mettre en cause l'ordre séquentiel des hélices.

Il semblait que les problèmes liés à l'utilisation de la bR, allaient pouvoir être résolus grâce aux travaux de SCHERTLER *et al.* {Schertler, G. F. *et al.* 1993b}. A partir d'un cristal de rhodopsine bovine, qui elle est un RCPG du groupe G1 présentant un mécanisme d'action identique à celui de la bR, ces auteurs ont pu obtenir une carte de densité électronique (résolution 9Å) (*Figure 40*).

Ils montrent qu'il y a une différence très nette entre la structure de la rhodopsine et celle de la bR à la même résolution

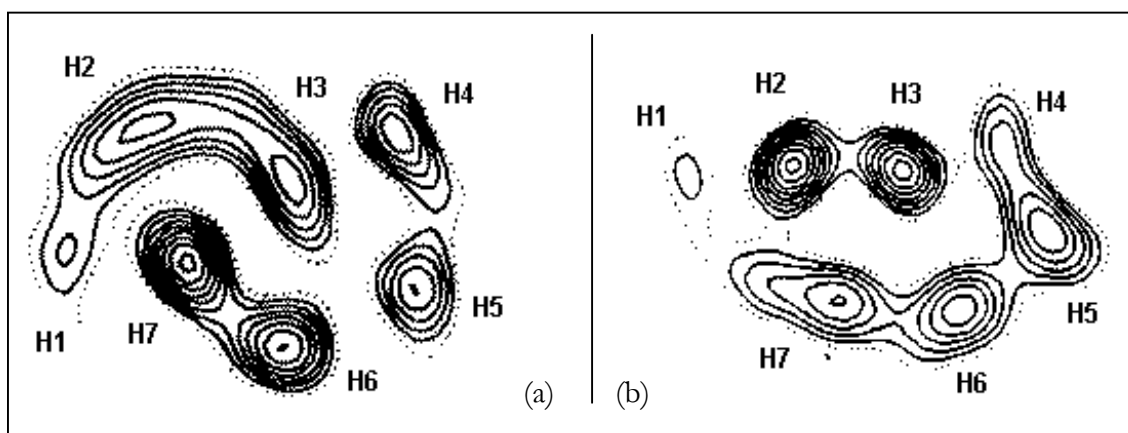


Figure 40. Comparaison des cartes d'électrodensité à une résolution de 9 Å : (a) rhodopsine, (b) bactériorhodopsine. Vue intracellulaire. Dans le cas de la rhodopsine, il y a 4 hélices perpendiculaires au plan de la membrane. De plus, la projection de la structure est moins étendue, et l'hélice H3 est moins exposée à l'environnement phospholipidique.

La rhodopsine présente quatre HTM quasiment perpendiculaires au plan de la membrane, et le motif en arc de cercle correspondrait aux trois autres HTM, un peu inclinées par rapport à ce plan. La projection de cette structure est moins allongée et un peu plus large que celle de la bR. On remarquera aussi, que l'inclinaison des hélices diffère d'une protéine à l'autre. Ces résultats ont été confirmés par ALKORTA *et al.* {Alkorta, I. *et al.* 1994} à partir de la rhodopsine humaine. Ce récepteur est homologue à 93% avec la rhodopsine bovine.

Partant de ces nouveaux résultats, BALDWIN {Baldwin, J. M. 1993} disserte sur l'arrangement probable des hélices dans la rhodopsine et dans les récepteurs de type G1. Entre autres conclusions, exception faite du site présumé de liaison d'agonistes ou d'antagonistes, nous retiendrons que cet auteur suggère que les hélices sont proches les unes des autres (à cause de la faible longueur des boucles inter-hélices) et que les HTM 1, 4, 5 et 6, présentant une large surface de résidus polaires principalement sur une face de l'hélice, sont orientées spécifiquement (côté polaire vers le cœur du récepteur). Il conclut aussi que HTM3, ayant une très petite surface hydrophobe, serait la moins exposée à l'environnement lipidique de la membrane. Enfin adoptant un arrangement dans le sens des aiguille d'une montre (vu du milieu intracellulaire), les hélices 1,

2 et 3 correspondent à l'arc de cercle de la carte de projection, alors que les autres hélices, plus perpendiculaires au plan de la membrane, correspondent aux autres traces (*Figure 40*).

Il apparaît donc que la structure 3D des RCPG (G1) ne correspondrait pas exactement à celle de la bR, en dépit d'un arrangement général similaire, mais plutôt à celle de la rhodopsine.

Malgré le discrédit porté sur la bR, l'utilisation de cette protéine comme base de la modélisation des RCPG, n'est pas abandonnée. En effet, en 1994, HOFLACK *et al.* {Hoflack, J. *et al.* 1994} réévaluent la bR comme modèle de ces RCPG, en tenant compte des résultats précédemment obtenus avec la rhodopsine. En fait, il semble que la différence essentielle entre bR et rhodopsine tiendrait plutôt à l'implantation dans la membrane, qu'à l'arrangement des hélices. Cette implantation dépendrait de plusieurs facteurs comme la structure protéique elle-même, la concentration en récepteurs dans la membrane, la composition de la bicouche et les conditions expérimentales. En effet, la bR existe naturellement sous forme de cristal 2D, ce qui permet une étude en cristallographie électronique directement à partir de la membrane pourpre de la bactérie. Par contre, la rhodopsine doit d'abord être isolée puis purifiée, avant d'être reconstituée dans une bicouche lipidique, ce qui peut modifier la structure native.

Avec HIBERT *et al.* {Hibert, M. F. *et al.* 1993b}, on peut conclure en ce qui concerne la modélisation des RCPG du groupe G1 que :

- ❑ la prédiction de la structure secondaire est ambiguë,
- ❑ la bR n'est pas un modèle de base idéal : faible homologie de séquence (en particulier pour les résidus « charnières » Pro et Gly), et connaissance de la structure 3D uniquement pour la partie transmembranaire,
- ❑ la position relative des HTM n'est qu'approximative,
- ❑ l'orientation des hélices, selon le critère résidus lipophiles à l'extérieur et résidus hydrophiles vers le cœur du récepteur, n'est compatible qu'avec un profil amphipatique clairement établi {Tuffery, P. *et al.* 1994},
- ❑ la conformation des boucles inter-hélices flexibles n'est pas objectivement définie,
- ❑ ces modèles ne donnent qu'une image statique de ces récepteurs dynamiques.
- ❑ l'environnement du récepteur n'est pas explicitement pris en compte, ni d'ailleurs les autres composants du système moléculaire, comme les protéines G.

En outre, on retiendra que l'utilisation de la rhodopsine eucaryote plutôt que de la bR n'est pas réellement démontrée comme nécessaire, malgré l'avantage qu'a la première d'être réellement

un RCPG et de présenter une plus forte homologie de séquence (en particulier pour les Pro et Gly).

En plus, la localisation des HTM par analyse d'hydropathie ne permet pas de déterminer de façon précise le début et la fin de chaque hélice {Hibert, M. F. *et al.* 1993b}, et il apparaît donc être encore plus déraisonnable de le faire en s'appuyant sur l'ordre séquentiel de celles-ci dans le modèle de la bR {Pardo, L. *et al.* 1992}.

Enfin, le plus important est de constater que les travaux de modélisation des RCPG ne concernent que les récepteurs du groupe G1 (à une ou deux exceptions près). Les auteurs présentent à chaque fois un modèle générique pour toute la famille des RCPG, sans tenir compte de la classification en trois sous-groupes de cette immense famille de récepteurs couplés aux protéines G.

En particulier, le groupe G2, dont fait parti le GLPr, diffère profondément des autres et, est relativement pauvre en données expérimentales. Seuls deux auteurs, BALDWIN {Baldwin, J. M. 1994 ; Baldwin, J. M. 1993} et SAVERSE {Savarese, T. M. *et al.* 1992}, font une distinction et ne considèrent pas cette famille, car elle ne présente pas assez de similarité de séquence avec les autres RCPG.

Chapitre V.

MODELISATION DU RECEPTEUR SPECIFIQUE DU GLP-1.

STRATEGIE – RESULTATS ET DISCUSSION.

Lorsque nous avons débuté ce travail, seule la séquence primaire du récepteur du GLP-1 était disponible dans la littérature. Dans le but de localiser le site actif du récepteur, nous avons dû construire *de novo* un modèle 3D. Les contraintes de modélisation ont été engendrées à partir de données théoriques et d'hypothèses fondées sur le modèle existant de la bactériorhodopsine (numéro d'accès 1BHA dans la Protein Data Bank, <http://pdb.igh.cnrs.fr>). L'état actuel des connaissances du récepteur du GLP-1, implique une modélisation ne concernant uniquement les hélices transmembranaires. Dans ce chapitre nous donnerons les résultats de cette construction et discuterons de sa validité.

5.1. Modélisation du récepteur du GLP-1 (GLPr).

Notre approche de modélisation moléculaire du GLPr comporte quatre grandes étapes distinctes :

- (1) Localiser la position des sept segments transmembranaires (HTM) et les construire.
- (2) Analyser séparément chacune des 7 hélices présumées, aussi bien au niveau de leur profil d'hydropathie qu'au niveau de leur degré d'homologie avec les hélices des récepteurs du groupe 2 des RCPG. Ceci permet d'obtenir le caractère amphiphile global, et une séquence consensus pour chacune des hélices.
- (3) Partant de l'hypothèse que l'agrégat des HTM est fortement similaire à celui du modèle expérimental de la bactériorhodopsine, les hélices du GLPr sont superposées à celles de la bR et orientées en fonction de leur caractère amphipatique et de la séquence consensus de chacune.

- (4) Après optimisation des chaînes carbonées de chaque hélice, on construit les chaînes latérales, respectant l'encombrement stérique des résidus les uns par rapport aux autres.

5.1.1. Localisation et construction des segments transmembranaires.

La séquence primaire du GLPr issue des tissus des îlots pancréatiques humains est disponible dans la littérature (*Figure 41*) {Thorens, B. *et al.* 1993a}. Partant du principe que les segments transmembranaires de ce récepteur sont les zones les mieux conservées au sein de la famille (groupe 2 des RCPG), une recherche de séquences primaires du groupe G2 est accomplie dans la banque de données SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot/>) {Bairoch, A. *et al.* 1991}.

1	11	21	31	41	51	60
1	MAGAPGPLRL	ALLLLGMVGR	AGPRPQGATV	SLWETVQKWR	EYRROQRSL	TEDPPPATDL
61	FQNRTFDEYA	QWPDGEPGSF	VNVSQWYLP	WASSVPQGHV	YRFQTAEGW	LQKDNSSLPW
121	RDLSEQEEK	RGERSSPEEQ	LLFLYIIYTV	GYALSFSALV	IASAILLGFR	HLHCTRNYIH
181	LNLFAFILR	ALSVFIKDA	LKWMYSTAAQ	QHWDGLLSY	QDSLSCRLVF	LLMQYCVAAN
241	YYWLLVEGVY	LYTLAFAVSF	SEQWIFRLYV	SIGWGVPLLF	VVPWGIVKYL	YEDEGCWTRN
301	SNMNYWLIIR	LPILFAIGVN	FLIFVRVICI	VVSKLKANLM	CKTDIKCRLA	KSTLTLIPLL
361	GTHEVIFAFV	MDEHARGTLR	FIKLFTLSF	TSFQGLMVAI	LYCFVNNEVQ	LEFRKSWERW
421	RLEHLHIQRD	SSMKPLKCPT	SSLSSGATAG	SSMYTATCQA	SCS	

Figure 41. Séquence primaire du GLPr humain. Les 6 Cys conservées au sein du groupe 2 des RCPG, ainsi que la séquence -R-L-A-K- susceptible de se coupler à la protéine G sont surlignées.

Cette recherche par homologie de séquence est faite avec l'utilitaire « FastA » du logiciel GCG Wisconsin Package™ (Oxford Molecular) {Genetic Computer Group 1994}. Un tri est fait sur la liste obtenue, afin de ne conserver que les séquences présentant une homologie supérieure à 25%, et surtout afin de ne considérer que les séquences appartenant à la sous-famille qui nous intéresse.

Un alignement multiple de séquences, utilisant la méthode de NEEDLEMAN et WUNSCH {Needleman, S. B. *et al.* 1970} et la table de similarité de DAYHOFF *et al.* {Schwarz, R. M. *et al.* 1979}, est effectué avec l'utilitaire « Pileup » du logiciel GCG, sur les séquences sélectionnées et la bactériorhodopsine. Le résultat, schématisé par le dendrogramme (*Figure 42*), confirme qu'il y a très peu d'homologie entre les séquences du GLPr et de la bR (moins de 10%) {Cronet, P. *et al.* 1993 ; Kontoyianni, M. *et al.* 1993 ; Hibert, M. F. *et al.* 1993b ; MaloneyHuss, K. *et al.* 1992 ; Pardo, L. *et al.* 1992}. De plus, les récepteurs à la corticotropine et à la calcitonine ne présentent eux aussi que peu d'homologie (environ 30%) avec le GLPr.

Ainsi, seuls sont conservés pour l'étude du GLPr, les récepteurs au glucagon, au GLP, au VIP, à la sécrétine, à l'hormone parathyroïdienne, au PACAP, et au GRF (soit 14 séquences plus le GLPr humain).

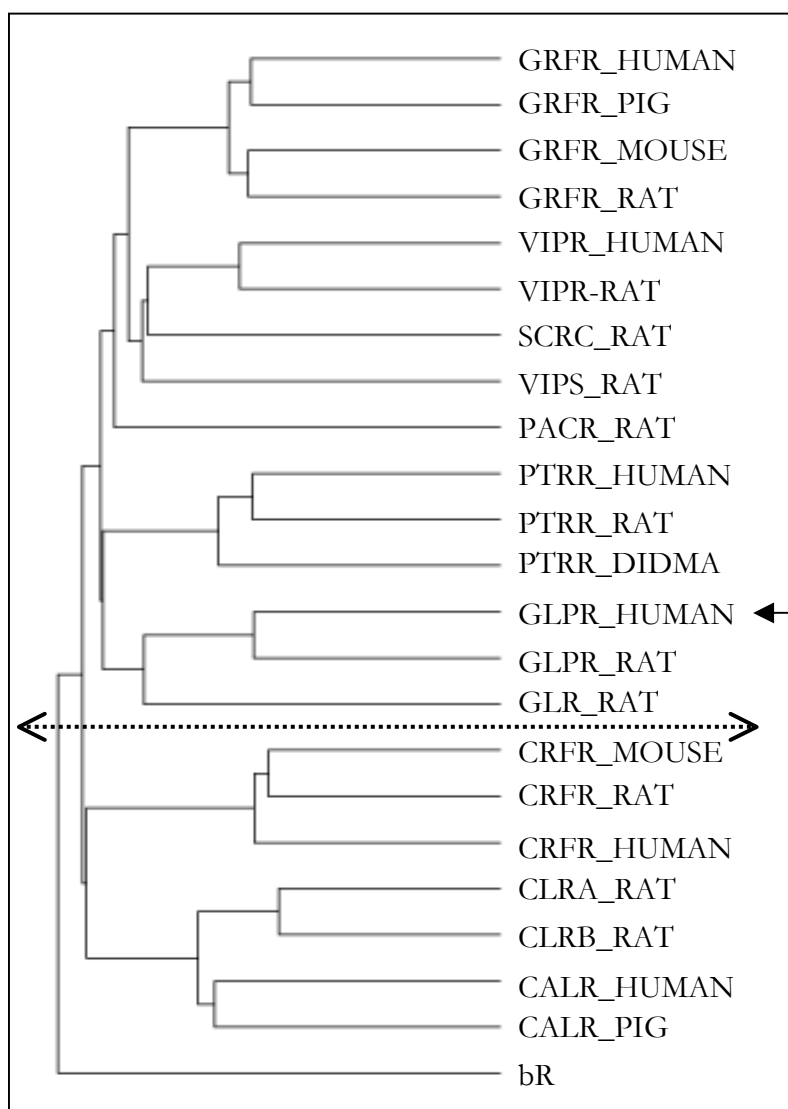


Figure 42. Dendrogramme des séquences des récepteurs du groupe 2 des RCPG et de la bR. (GRFR : Growth Hormone Releasing Factor, VIP : Vasoactive Intestinal Polypeptide, SCRC : Secretin, PACR : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide, PTRR : Parathyroïd Hormone, GLR : Glucagon, CRFR : Corticotropin Releasing Factor, CLR : Calcitonin). Des 2 sous-groupes (séparés par la flèche), seul celui du GLPr sera pris en compte dans la suite des études. La bR est rejetée à part, puisque appartient au groupe 1 des RCPG.

On peut prédire la localisation des 7 HTM à partir des zones les plus conservées de l'alignement multiple des séquences étudiées (Figure 43). Mais cette méthode est peu précise.

Figure 43. Prédiction de la localisation des hélices présumées par alignement des RCPG étudiés : zones surlignées.

Pour parfaire cette prédiction, deux méthodes complémentaires sont utilisées :

(1) La première consiste à établir un profil d'hydropathie de la protéine, avec les indices de KYTE-DOOLITTLE {Kyte, J. *et al.* 1982}. Il est réalisé avec l'utilitaire « Pepplot » du logiciel GCG (Figure 44). Mais cette méthode est, elle aussi peu précise pour les RCPG, comme l'ont fait remarquer plusieurs auteurs {Cronet, P. *et al.* 1993 ; Kontoyianni, M. *et al.* 1993 ; Hibert, M. F. *et al.* 1993b ; Pardo, L. *et al.* 1992}, car elle ne définit pas clairement un profil hydrophile/hydrophobe. De plus la frontière entre HTM3 et HTM4 est assez floue.

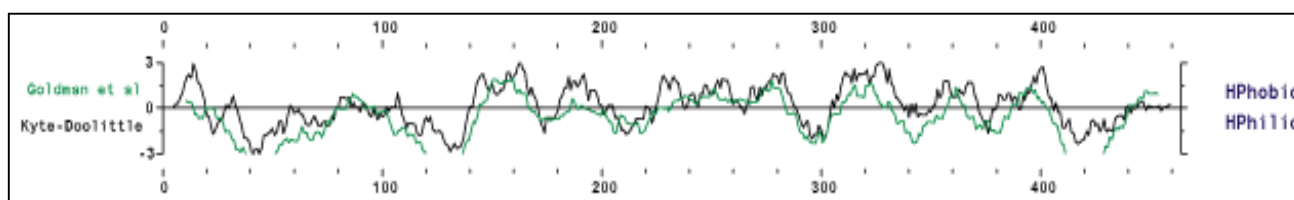


Figure 44. Profil d'hydropathie du GLPr humain selon Kyte-Doolittle et Goldman *et al.* Les hélices sont des segments hydrophobes, mais avec cette méthode, il est difficile d'en prédire exactement la position.

(2) Dans la seconde méthode, les séquences primaires des récepteurs étudiés sont soumises au serveur PredictProtein {Rost, B. *et al.* 1994b} de l'EMBL (Heidelberg, Allemagne), utilisant le logiciel « PHDhtm » développé par ROST et son équipe {Rost, B. *et al.* 1995 ; Rost, B. *et al.* 1994a}. Cette méthode dite d'apprentissage, utilise les algorithmes neuronaux. On reconnaît comme étant une HTM, un segment, qui par cette méthode, a un indice « probabilité d'être une hélice » supérieur ou égal à 70%[♦]. Les HTM des différentes séquences (zones surlignées de la Figure 43) sont alors séparées, et mises dans des fichiers distincts (un par HTM).

La prédiction que l'on fait ici correspond pratiquement à celle faite par THORENS *et al.* {Thorens, B. *et al.* 1993a ; Thorens, B. 1992}.

5.1.2. Analyse des segments transmembranaires.

5.1.2.1. Séquences consensus des HTM.

Chaque groupe d'hélices est soumis à un alignement (Pileup de GCG), à partir duquel on calcule la séquence consensus de chacune des HTM : séquence représentative de la

[♦] Le serveur, lui, accorde une structure hélicoïdale dès que ce pourcentage est supérieur ou égal à 50% (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/ppHelp.html#P2HTM>).

conservation parmi le groupe des 15 séquences étudiées à différents pourcentages (*plurality*) de conservation : 70, 80, 90 et 95%. On utilise pour cela la fonction « Pretty » intégrée au logiciel GCG.

Dans cette recherche d'homologie, la valeur seuil de la matrice de score « pileuppep.cmp » (qui définit la similarité entre les différents acides aminés) est fixée à 0.6 pour autoriser les mutations Ile $\leftrightarrow$ Met. Cette matrice reflète surtout des points de mutations génétiques {Cserzo, M. *et al.* 1994} mais, avec un tel seuil, elle n'attribue que peu de poids à une mutation entre des résidus hydrophobes, qui sont les moins conservés au sein des hélices. Les résultats de ces alignements par hélice, ainsi que les séquences consensus résultantes sont exposés dans la Figure 46 et analysés dans la Figure 45, ci-dessous.

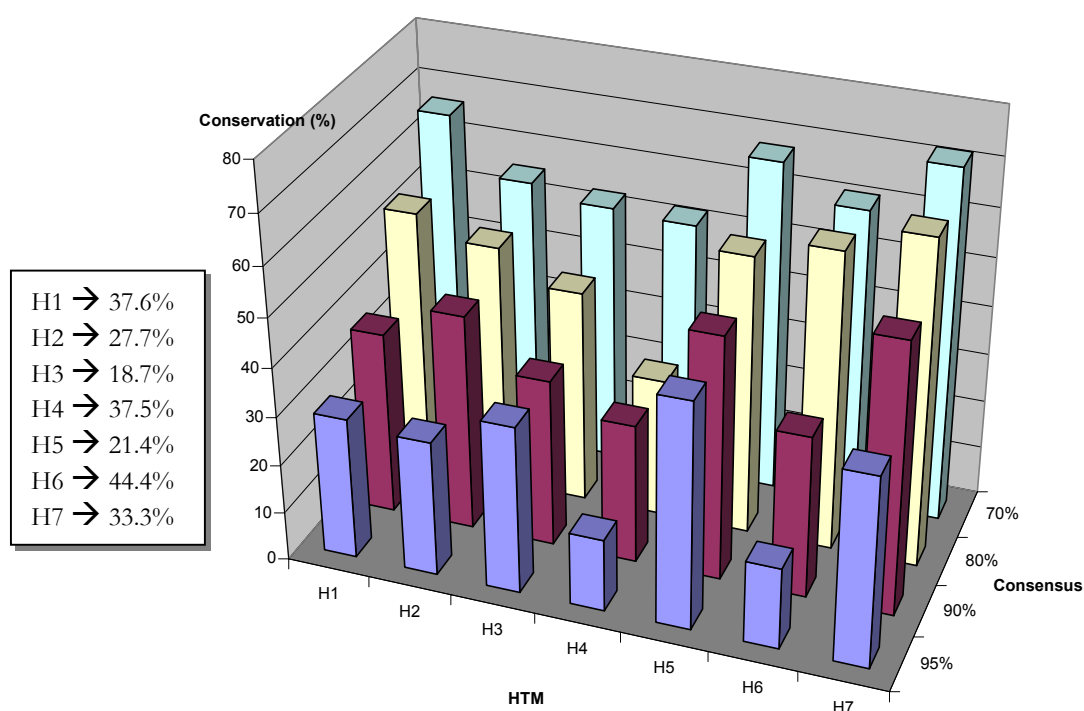


Figure 45. Evolution des séquences consensus hélice par hélice, parmi un échantillon variable (70 à 95%) des 15 récepteurs étudiés. L'encadré donne pour chaque hélice la valeur (%) de perte de la conservation quand on passe d'un consensus représentatif de 70% à 95% de l'échantillon.

On constate que pour un taux de conservation de 70%, la prédiction faite sur la localisation de HTM7, est la plus vraisemblable (72.2% des acides aminés présumés appartenir à HTM7 sont conservés, parmi les 15 RCPG étudiés). Pour les hélices 1, 5 et 6, la prédiction est aussi fortement vérifiée : 60%. L'hélice présumée HTM4 est la moins bien conservée.

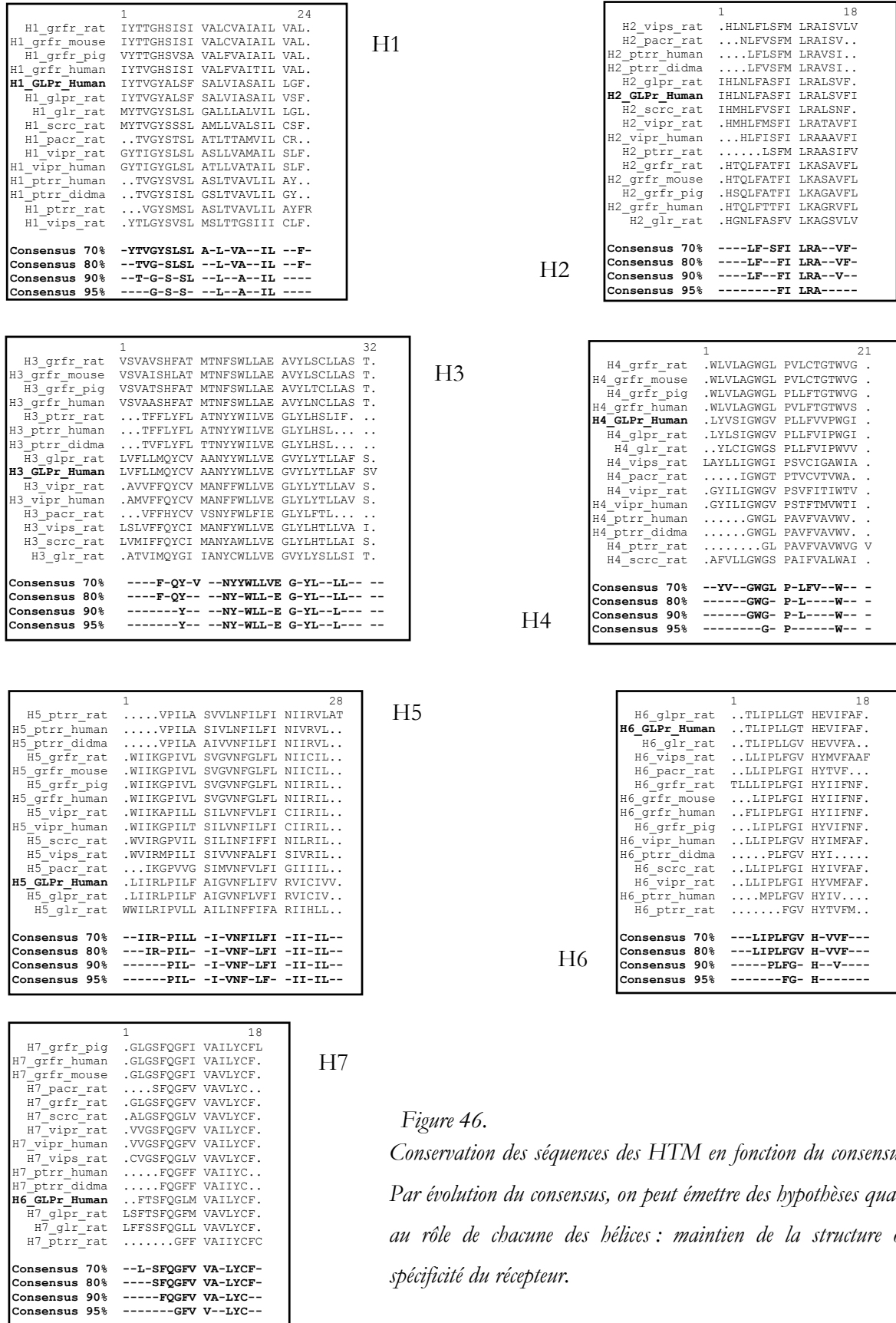


Figure 46.

Conservation des séquences des HTM en fonction du consensus.

Par évolution du consensus, on peut émettre des hypothèses quant au rôle de chacune des hélices : maintien de la structure ou spécificité du récepteur.

A ce niveau, selon un consensus, évoluant de 70 à 95% des séquences étudiées, il est possible d'avancer quelques hypothèses sur le rôle que joue chaque hélice dans le groupe G2 des RCPG. On pourrait ainsi envisager que les HTM 4 et 6, les moins conservées, aient une action dans la spécificité du récepteur, alors que les HTM 3 et 5, les mieux conservées, pourraient être responsables du maintien relatif de la structure.

5.1.2.2. Profil hydropatique des HTM.

Le dernier point concernant l'analyse des hélices transmembranaires, est de déterminer si elles présentent un caractère amphiphile.

En effet, comme nous l'avons signalé dans le chapitre précédent, ces hélices doivent présenter sur une portion de leur surface des résidus hydrophobes, capables d'interagir avec les lipides, et sur la face opposée des résidus hydrophiles formant le « canal » dans lequel vont s'insérer le ligand ou des molécules d'eau.

Pour cela, les différents résidus des hélices sont projetés dans un plan perpendiculaire aux axes principaux des HTM, et se voient attribuer un indice d'hydrophilie. On utilise pour cela l'utilitaire « HelicalWheel » du logiciel GCG {Janin, J. 1979}. Cette fonction associe une valeur d'hydrophobie aux différents résidus. On peut ainsi définir, plus ou moins facilement, sur chaque hélice (présumée régulière) une face hydrophile et une autre hydrophobe (*Figure 47*). Seuls les résidus les plus conservés (consensus 95%) sont explicitement représentés ; il est pertinent de remarquer que parmi ces résidus la plupart sont hydrophobes.

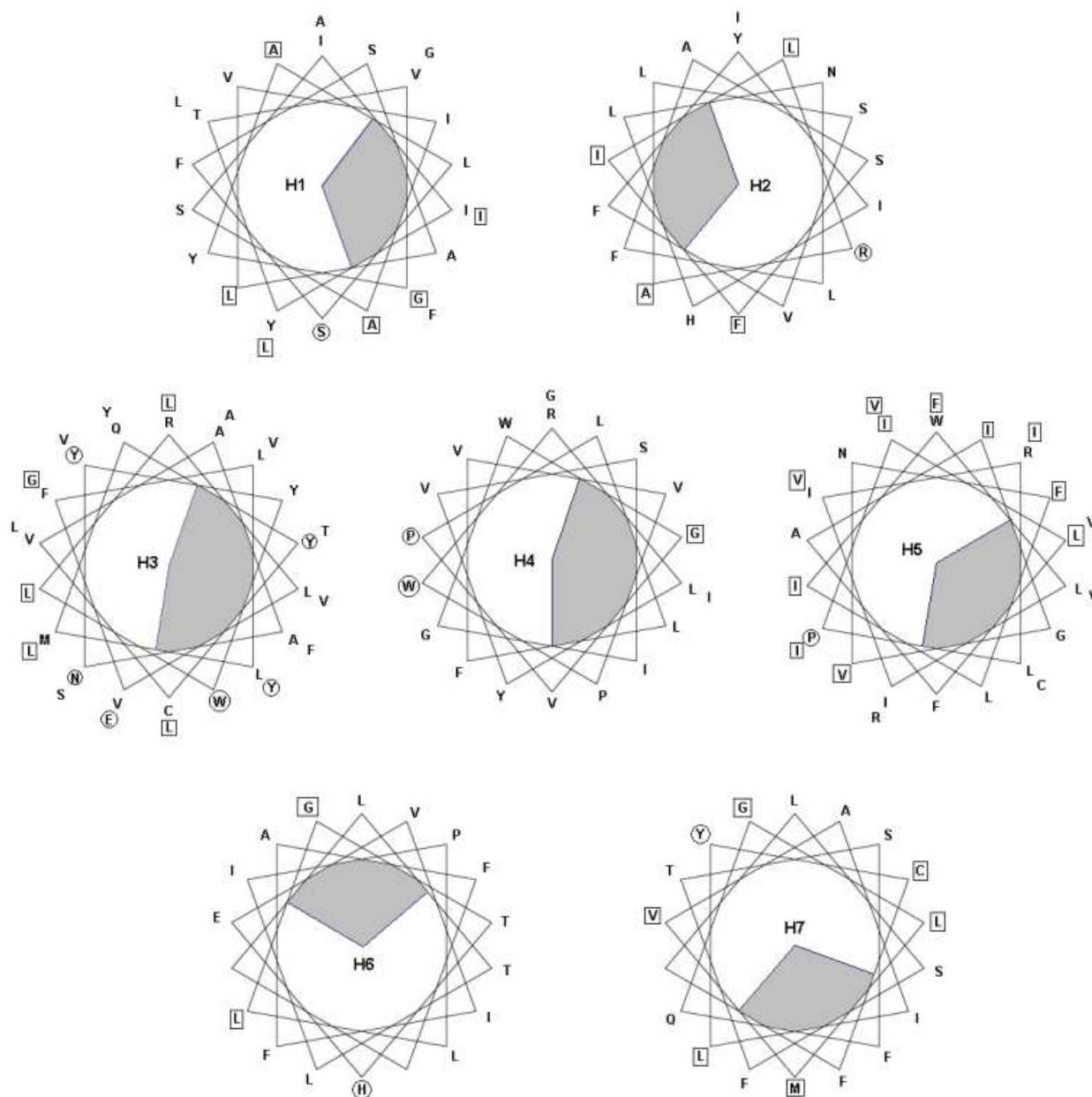


Figure 47. Représentation de la tendance amphipatique des hélices du GLPr-humain. Les zones hydrophobes sont grisées. $\square$: acides aminés hydrophobes conservés dans le consensus 95%. $\circ$: acides aminés hydrophyles du même consensus. Les hélices impaires sont observées depuis la face extracellulaire, alors que les paires sont observées depuis la face intracellulaire. Cette représentation permettra de positionner les hélices les unes par rapport aux autres au sein du récepteur, en respect de la stratégie adoptée pour la construction du modèle 3D du GLPr.

5.1.3. Construction du modèle.

Dans notre procédure de modélisation, nous estimons, comme CRONET *et al.* le faisaient pour la modélisation du β_2 adrénorécepteur {Cronet, P. *et al.* 1993}, que le GLPr a la même topographie que la bR. Ainsi les hélices du GLPr sont construites selon la même position spatiale relative que celles de la bR, et respectant le même ordre de connexion inter-hélice.

A partir de la séquence du GLPr humain et de la localisation des HTM définie ultérieurement, les sept hélices alpha sont construites dans le logiciel QUANTA (Molecular Simulations) {Brooks, B. R. *et al.* 1983}.

5.1.3.1. Positionnement des hélices.

La bR disponible dans la PDB (1BRD.pdb), peut être visualisée et manipulée grâce au logiciel QUANTA. Chaque hélice du GLPr, considérée comme une unité rigide, est superposée à l'hélice de la bR lui correspondant.

Les contraintes de positions X et Y sont issues de la carte de projection de densité électronique de la bR. Malgré une résolution de 3.5 Å, une part d'incertitude sur l'inclinaison des hélices persiste {Henderson, R. *et al.* 1990}.

Les contraintes de position Z sont contrôlées par l'épaisseur de la membrane plasmique (45 Å), puisque la faible résolution du modèle de la bR dans le sens vertical crée quelques incertitudes {Cronet, P. *et al.* 1993 ; Henderson, R. *et al.* 1990}.

5.1.3.2. Orientation relative des hélices.

Les hélices sont orientées manuellement en tenant compte des résidus conservés dans la séquence consensus à 95%, et du caractère amphiphile des hélices (*Figure 47*). Le choix de l'orientation de chacune d'entre elles, est en accord avec la littérature : les résidus hydrophiles et les résidus conservés sont préférentiellement dirigés vers le cœur du récepteur {Alkorta, I. *et al.* 1994 ; Baldwin, J. M. 1993 ; Cronet, P. *et al.* 1993}.

Mais cette orientation perturbe de façon non négligeable la superposition sur la bR. En effet, les hélices de la bR, et du GLPr ne sont pas régulières (coudes au niveau des Pro et Gly), si bien que toute rotation induit un déphasage, qui n'est pas récupéré par simple translation.

5.1.3.3. Positionnement des chaînes latérales.

Comme on a pu le voir ultérieurement, ce sont essentiellement les interactions entre les chaînes latérales des hélices qui sont responsables de leur disposition au sein de la membrane. Cette orientation des chaînes latérales se fait par le logiciel Sparse Matrix Driven (SMD) {Tuffery, P. *et al.* 1991}.

Chaque résidu est orienté selon une bibliothèque de rotamères et selon des calculs d'énergies qui donnent l'orientation préférentielle des chaînes latérales.

5.1.3.4. Minimisation d'énergie du modèle.

On choisit la méthode de minimisation ABNR (Adopted-Basis Newton Raphson) pour le bon compromis qu'elle offre, entre les résultats et les temps de calcul. Une minimisation, dans le vide, de 500 pas est appliquée aux chaînes latérales du modèle GLPr issu de SMD en maintenant la position de la chaîne principale fixe (*backbone* : N, C α , C, O). Ceci est réalisé grâce au logiciel CHARMM {Brooks, B. R. *et al.* 1983}. Au final, une structure de gradient 0.41 kCal/mol/ $\text{\AA}^2$ et d'énergie totale de -209.21 kCal/mol est obtenue (Figure 48).

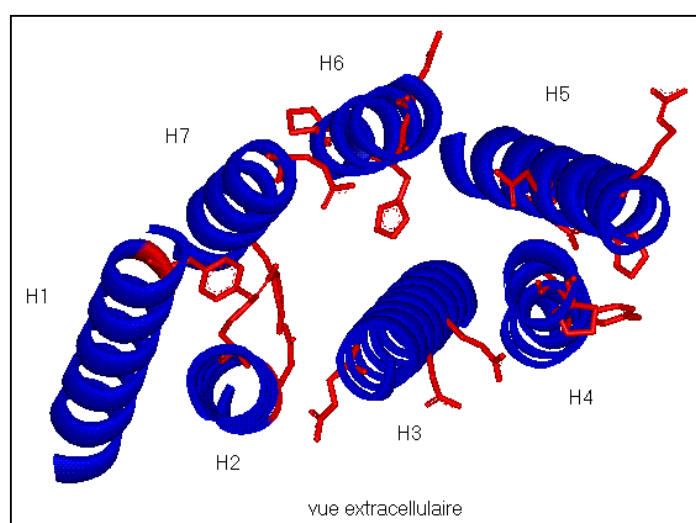


Figure 48. Modèle du GLPr humain construit selon le modèle de la bR. L'orientation des hélices est donnée par la caractéristique amphipatique de chacune, respectant le fait que les faces hydrophiles sont préférentiellement disposées dans la lumière du récepteur. Seules sont représentées les chaînes latérales de forte hydrophilie, conservées ou non dans le consensus à 95%.

5.2. Modélisation du GLPr - Discussion.

En observant le modèle proposé (*Figure 48*), de nombreuses interrogations apparaissent quant à la réalité de la structure proposée.

En premier lieu, il est pertinent de remarquer que parmi les résidus conservés au sein du groupe G2 des RCPG (consensus 95%), la plupart sont hydrophobes (*Figure 47*). Ainsi, si l'on suit la méthodologie générale de modélisation des RCPG, ils devraient être orientés vers le cœur hydrophile du récepteur : c'est peu probable.

De plus, cette orientation basée sur le caractère amphipatique ne semble pas être déterminante à elle seule, puisque dans le modèle de la bR lui même {Cronet, P. *et al.* 1993}, le moment hydrophobe de l'hélice 4 est orienté vers le centre de la protéine. D'ailleurs DONNELLY {Donnelly, D. 1997} dans son modèle du GLPr de rat, ne considère pleinement l'orientation des chaînes polaires vers le centre du récepteur que si elles se trouvent au centre d'une hélice, et il admet possible une orientation vers ce même centre du récepteur pour des chaînes lipophiles et conservées dans le groupe G2.

Enfin, comment peut-on disposer les acides aminés hydrophiles non conservés dans le consensus 95% ? Car à l'observation du modèle proposé, il est net que certaines chaînes polaires sont orientées vers la membrane plasmique (extérieur du récepteur). Ceci est clairement irréaliste dans des zones ne se trouvant pas aux extrémités des hélices.

Malgré sa faible résolution horizontale (9Å), il semblerait d'après les données bibliographiques déjà exposées, que la rhodopsine bovine soit un meilleur modèle initial pour la construction de structure 3D des RCPG. De plus, en se référant à la projection 2D de la carte de densité électronique, on voit distinctement que l'hélice 3 de la rhodopsine est plus imbriquée dans le corps du récepteur que dans le cas de la bR (*Figure 40*).

Donc, ajouté au fait que la rhodopsine est un vrai RCPG (contrairement à la bR), ce qui ne peut être que plus favorable au niveau fonctionnalité et homologie, un modèle construit sur une telle topologie permettrait de positionner les chaînes latérales, hydrophiles de l'HTM3 de notre modèle, dans un environnement plus favorable.

Mais rappelons que pour les deux modèles de bases utilisables pour nos constructions, le ligand est une petite molécule chimique : le rétinol, 284,4 g/mol contrairement au cas du GLPr où le ligand GLP-1 est de taille conséquente (3354 g/mol).

Ainsi, les contraintes de liaison ligand/récepteur utilisées pour la construction du modèle 3D de la bR ou de la rhodopsine ne sont plus valables, et laisse donc supposer des modifications de topologie inter-hélices qui pourraient être importantes.

En effet, il est peu probable que le site actif du GLPr soit au sein du récepteur : de part la taille du ligand, mais aussi de part l'encombrement stérique important des boucles extracellulaires inter-hélices. De plus, rappelons qu'une des caractéristiques du groupe 2 des RCPG est d'avoir un fragment N-terminal extracellulaire particulièrement long (environ de 150 acides aminés), ce qui réduit encore plus les chances d'une interaction au sein même du récepteur.

D'ailleurs, au sein des RCPG de la famille du GRF, cette partie N-terminale présente 6 Cys totalement conservées. La formation de ponts disulfures conférerait à ce fragment N-terminal une importance majeure dans la liaison du peptide au récepteur {Donnelly, D. 1997 ; Wilmen, A. *et al.* 1996}.

Finalement, nous avons dû revoir notre modèle et surtout la position des hélices suite à la publication, dans la banque de données SWISS-PROT, de la séquence lissée du GLPr humain (code P43220). Ainsi, mis à part de faibles conflits de séquences primaires, la localisation potentielle des différentes hélices est maintenant bien définie. (*Figure 49*).

Fort de ses nouvelles données concernant la localisation des hélices et respectant la même stratégie de modélisation que celle décrite précédemment, on se propose de donner deux nouveaux modèles du GLPr : l'un basé sur le modèle de la bR (comme précédemment) et l'autre sur celui de la rhodopsine bovine (*Figure 50*).

H1 {	1) I IYTVGYALSFSALVIASAILLG	H2 {	1) NYIHLNLFASFILRALSVFI
	2) IYTVGYALSFSALVIASAILLGF		2) IHLNLFASFILRALSVFI
	H3 {		
	1) LVFLLMQYCVAANYWLLVEGVLY		
	2) LVFLLMQYCVAANYWLLVEGVLYTLLAFSV		
H4 {	1) I FRLYV SIGWGV PLLFVVPWGIVK	H7 {	1) LSFTSFQGLMVAILYCFVNNE
	2) LYV SIGWGV PLLFVVPWGI		2) FTSFQGLMVAILYCF
H5 {	1) NYWLIIRLPILFAIGVNFLIFVRVIC	H6 {	1) STLTLLIPLLGTHEVIFAFVMD
	2) LIIRLPILFAIGVNFLIFVRVICIV		2) TLLIPLLGTHEVIFAF

Figure 49. Comparaison de la localisation des hélice du GLPr humain (1) publiée dans la banque de données SWISS-PROT (primary accession number P43220) et (2) exposée précédemment dans ce manuscrit. Globalement, les localisations publiées proposent des hélices plus longues (sauf H3). La suite des études tient compte de ces nouvelles données.

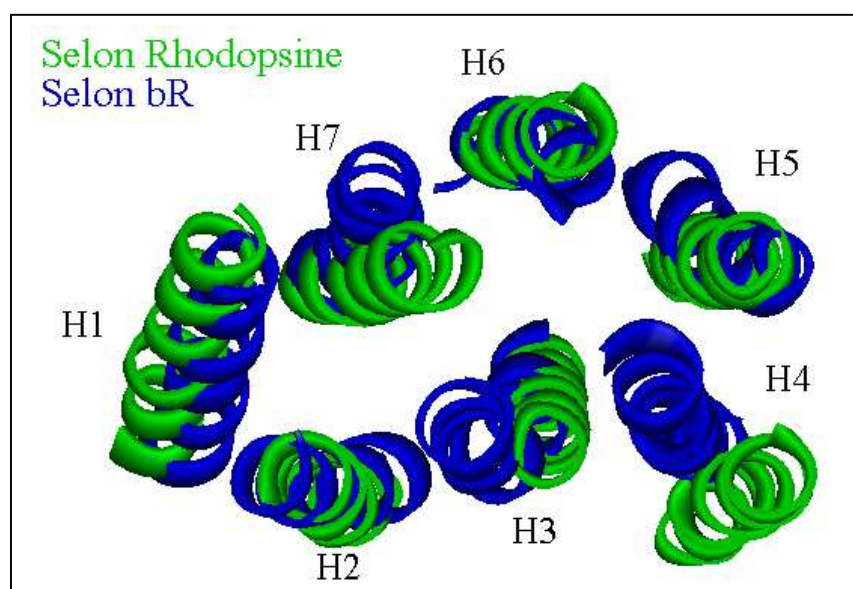


Figure 50. Superposition des deux nouveaux modèles (utilisant la localisation des hélices publiée dans SWISS-PROT) construits selon la bR ou la rhodopsine bovine (vue extracellulaire). Dans le modèle construit selon la rhodopsine, l'hélice 3 est moins exposée à l'environnement phospholipidique. Ce modèle est donc plus favorable au regard des études d'amphiphilie des hélices, et de la localisation des résidus hydrophobes de ce segments.

Selon le choix du modèle utilisé (bR ou rhodopsine), il est pertinent de remarquer la différence d'inclinaison de certaines hélices dans la membrane plasmique, ainsi que la différence d'orientation des hélices les unes par rapport aux autres. Ainsi, on s'accordera (comme prédit) à favoriser le modèle construit selon la rhodopsine qui paraît plus probable, malgré les limitations dont nous avons précédemment discutées (en particulier l'orientation des chaînes latérales).

5.3. Modélisation du GLPr - Conclusion.

Depuis 1996, il est maintenant admis que la rhodopsine est le modèle de base le plus approprié pour la modélisation des RCPG {Herzyk, P. *et al.* 1998} {et P. HERZYK communication personnelle}. Mais, comme VRIEND le signale pour ses modèles de RCPG du groupe 2, disponibles sur le serveur du GPCRDB (*G Protein Coupled Receptor Data Base - 1998*, <http://www.gpcr.org/7tm/>) , il faut rester très dubitatif quant à cette procédure de modélisation.

Toutefois, VRIEND reconnaît, et c'est aussi la conclusion de notre modélisation du GLPr, que se baser sur le modèle de la rhodopsine plutôt que sur celui de la bR est actuellement la meilleure approche à adopter : "[...] there are many whens and ifs in GPCR modelling. *With the release of this set of models, I believe we got closer to the truth, but we still have a long way to go.*"(G. Vriend).

En effet, les structures 3D construites selon le modèle des carbones-alpha {Baldwin, J. M. *et al.* 1997} de la rhodopsine, dont l'interprétation de la carte de densité électronique est de faible résolution, ne permet pas de positionner clairement les chaînes carbonées et encore moins les chaînes latérales. Le manque de données expérimentales est lui aussi un frein à la modélisation.

La modélisation *de novo* de ce type de récepteurs doit donc attendre l'émergence de données expérimentales telles que des mutagenèses dirigées sur les hélices du récepteur, et des contraintes de modélisation données par les paramètres de liaison ligand-récepteur.

Enfin, il est intéressant de noter que DONNELLY {Donnelly, D. 1997} a tenté, dans son modèle du GLPr de rat, de positionner les boucles inter-hélices. Une recherche de domaines consensus (des boucles extracellulaires) sur différentes banques de données (SWISS-PROT, PDB ...), ne renvoie que les segments de récepteurs appartenant au groupe 2 des RCPG. Cela ne permet donc pas d'avoir d'informations supplémentaires quant à la structure de ces boucles.

De plus, une étude par dichroïsme circulaire de chacune des boucles e1, e2 et e3, que nous avons synthétisées, montre des structures de type chaîne statistique (*Figure 51*). On observe, malgré tout, pour e2 et e3 un faible pourcentage d'hélicité, représenté par l'épaulement des spectres {Greenfield, N. *et al.* 1969}.

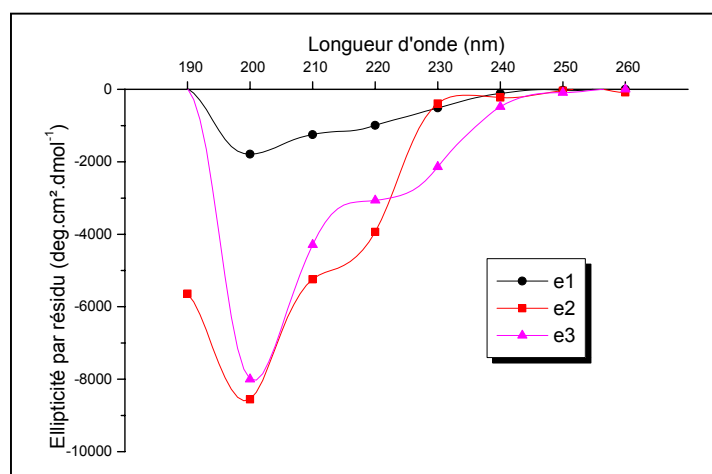


Figure 51. Spectres de dichroïsme circulaire pour les différentes boucles extracellulaires du GLPr. Les structures sont essentiellement de type chaîne statistique, ne permettant donc pas de les incorporer dans une modélisation 3D.

Ainsi ni l'homologie de séquence, ni les rares données expérimentales disponibles aujourd'hui ne permettent de construire ces trois boucles extracellulaires de façon réaliste. Ces lacunes structurales corroborent les difficultés déjà évoquées pour une éventuelle incorporation de ces boucles dans un modèle 3D du récepteur.

Malgré tout, si ces modélisations ne sont pas des structures réelles de RCPG, et ne le seront jamais, les images issues de ces modèles font apparaître quelques hypothèses quant au probable site d'interaction ligand/récepteur. Ces hypothèses, et les études mis en œuvre pour les étayer, sont développées dans le chapitre suivant.

Chapitre VI.

ETUDES DES INTERACTION GLP-1/GLPr ET ACTIVITE DE LIAISON DU RECEPTEUR.

De nombreux arguments biologiques sont en faveur d'une interaction ligand-récepteur sur la face extracellulaire du récepteur. L'implication de la boucle N-terminale est d'ailleurs de plus en plus souvent évoquée, que ce soit pour le récepteur du GLP-1 {Wilmen, A. *et al.* 1996 ; Hjorth, S. A. *et al.* 1996} ou pour celui du glucagon {Buggy, J. J. *et al.* 1995}.

Ainsi, conforté par ces données bibliographiques et au regard des résultats de modélisation, on se propose de vérifier, par une approche expérimentale, ces hypothèses quant à l'interaction du GLP-1 avec les parties extracellulaires du récepteur.

Nous avons synthétisé la partie N-terminale (extracellulaire) proximale, c'est à dire proche de l'hélice 1, et les trois boucles extracellulaires (e1, e2 et e3) (*Figure 52*).

En admettant les résultats de modélisation, les trois boucles e1, e2, e3 correspondent respectivement aux peptides [197-227]-GLPr, [287-305]-GLPr et [370-389]-GLPr. La partie N-terminale proximale (notée Nt-GLPr) correspond, quant à elle, au peptide [88-142]-GLPr.

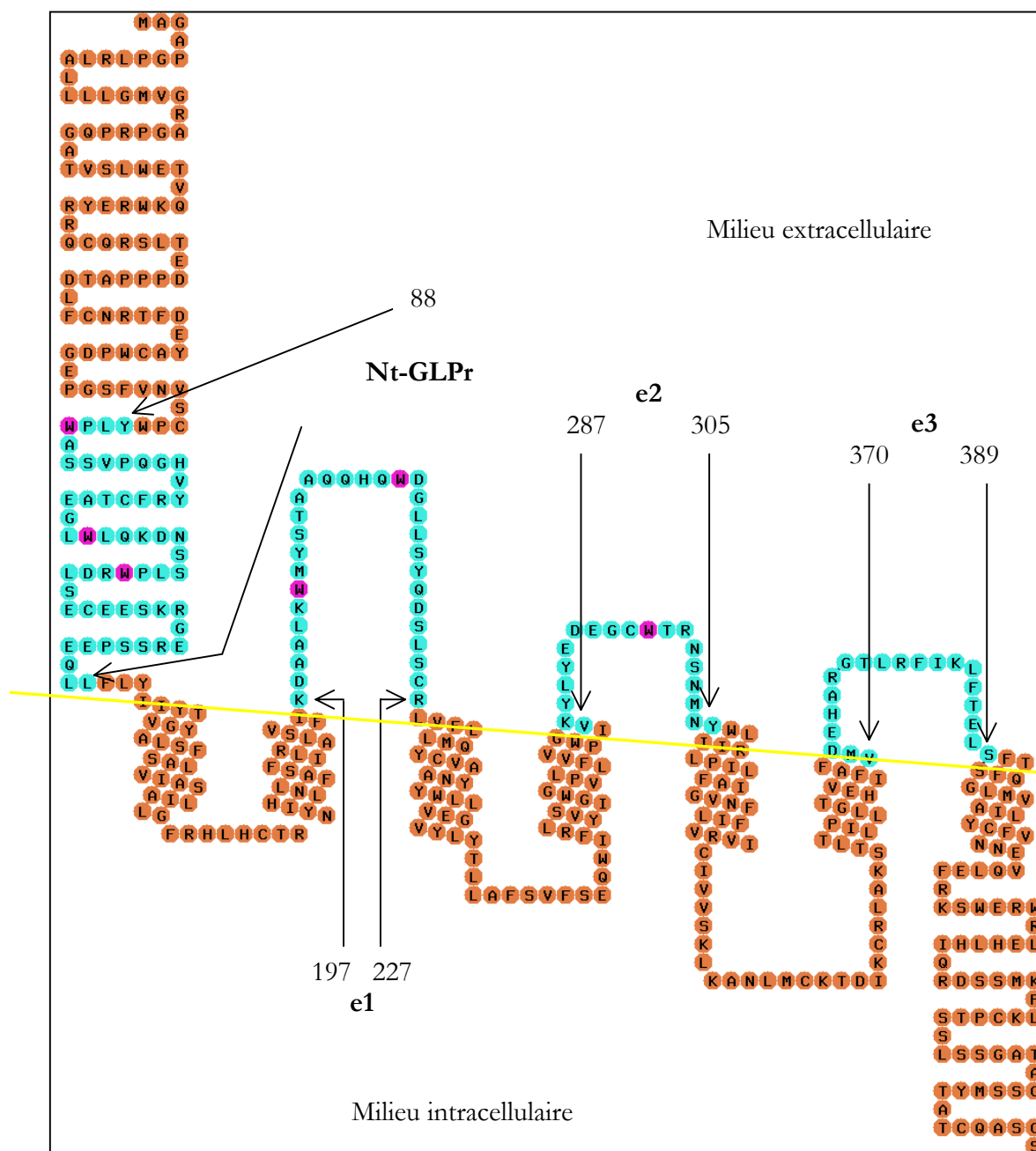


Figure 52. Schématisation du GLPr représentant les parties du récepteur synthétisées pour les études d'interactions : Partie N-terminale proximale (Nt-GLPr), et les 3 boucles extracellulaires (e1, e2, e3). Les Tryptophanes, chromophores intrinsèques utilisés pour les études par fluorescence, sont mis en évidence dans chacun des segments.

6.1. Interactions boucles extracellulaires - GLP-1.

La présence de chromophores intrinsèques (2 Trp pour e1, 1 Trp pour e2, mais aucun dans la séquence e3) permet l'étude de l'interaction, par fluorescence (excitation à 290 nm), de chacun de ces segments avec le GLP-1 natif (1 Trp).

Les expériences de fluorescence sont faites à concentration constante de GLP-1 50 μ M. En effet, à cette concentration la DO du ligand à 280 nm est linéaire (résultats non montrés ici). Différentes solutions, à concentration constante de GLP-1, en présence de chacun des segments du récepteur (soit e1, soit e2 soit e3) sont préparées pour avoir des échantillons de rapport molaire 1:1 à 50:1 (GLP-1:e_x).

6.1.1. Interactions e1, e2 et GLP-1.

Dans le cas des complexes GLP-1:e1 et GLP-1:e2, la linéarité de la fluorescence en fonction de la concentration révèle qu'il n'y a pas d'auto-association des peptides (*Figure 53*, graphique en insert). Les rendements quantiques de e1 (somme des deux Trp) et e2 sont quasiment identiques dans ce tampon. Par contre le rendement de l'unique Trp du GLP-1 est double. Ceci laisse pressentir une variation d'accessibilité et d'environnement.

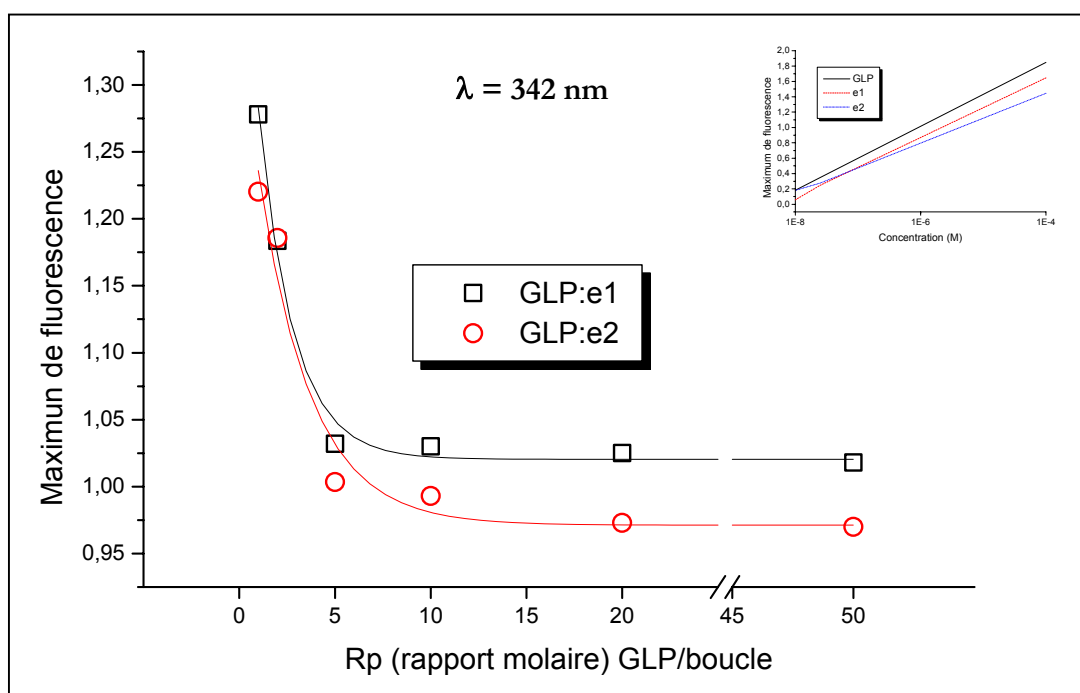


Figure 53. Étude de fluorescence pour les complexes GLP-1:e1 et GLP-1:e2. La saturation de fluorescence indique l'existence d'un complexe. La linéarité de fluorescence en fonction de la concentration (Graphique en insert) confirme qu'il n'y a pas d'auto-association des peptides.

La Figure 53 confirme l'existence d'une interaction identique pour les complexes GLP-1/e1 et GLP-1/e2. On observe, dans les deux cas, une saturation de fluorescence pour une stœchiométrie des complexes avoisinant le rapport 1:5 (GLP-1:boucle). Les constantes de dissociations (estimées par ajustement mathématique à partir de la tangente) sont de l'ordre de 60 μM .

Le fait que l'interaction entraîne une forte diminution de la fluorescence des partenaires laisse supposer des interactions de type hydrophobe. De plus, compte tenu de la longueur d'onde maximum de fluorescence deux hypothèses se présentent :

- 1) soit la perte de fluorescence est due à un contact direct des Trp donc à une extinction de fluorescence par collision,
- 2) soit à un changement de conformation lors de l'interaction qui exposerait les Trp au solvant (perte d'hydrophobicité et extinction par le solvant).

Evidemment une combinaison des deux effets n'est pas à exclure, mais le fait que l'intensité maximum de fluorescence soit constante quelque soit le complexe (343 ± 1 nm, Figure 54), implique que les Trp ne changent pas d'environnement.

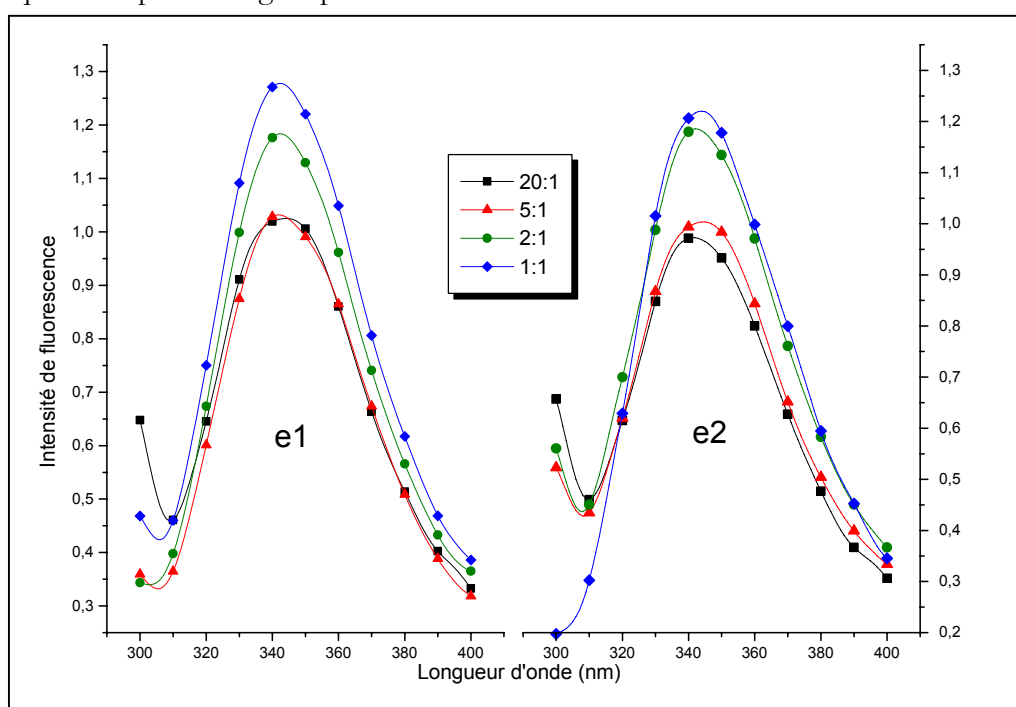


Figure 54. Spectres de fluorescence pour les différents complexes GLP-1:e1 et GLP-1:e2. Les Trp ne changent pas d'environnement : maximum d'intensité de fluorescence quasiment constant (343 ± 1 nm).

Ces arguments sont donc en faveur de la première hypothèse : l'interaction entre le GLP-1 et les boucles e1 et/ou e2 se fait par contacts directs des Trp.

6.1.2. Interaction GLP-1:e3

Le cas des mélanges GLP-1:e3 est plus classique à analyser, puisque la seule sonde intrinsèque appartient au GLP-1 (1 Trp, et aucun pour e3).

Ici, aux erreurs de mesures près, il n'y a pas de variation de l'intensité de fluorescence. On observe une extinction très faible de la fluorescence d'environ 10%. De plus, on remarque également que l'environnement du Trp ne varie pas (maximum de fluorescence à 342 ± 1 nm).

Ainsi, on peut conclure qu'il n'y a pas d'interaction entre le GLP-1 et la boucle e3 du récepteur.

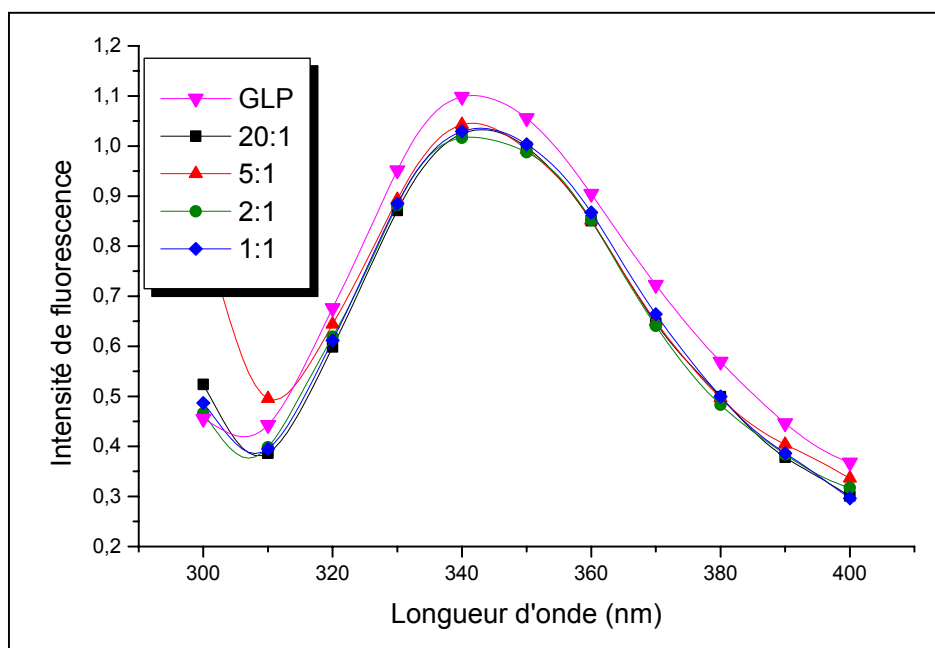


Figure 55. Spectres de fluorescence pour les différents mélanges GLP-1:e3. Seul le GLP possède un Trp. Il n'y a pratiquement pas de variation d'intensité de fluorescence, Le Trp ne subit pas de changement d'environnement (maximum d'intensité de fluorescence constant).

6.1.3. Conclusion

Ces différentes expériences étayent donc l'hypothèse d'une implication des boucles e1 et e2 dans la liaison du ligand GLP-1 à son récepteur, alors qu'il ne semble pas exister *in vitro* d'interaction du GLP-1 avec la troisième boucle extracellulaire (e3).

BUGGY *et al.* {Buggy, J. J. *et al.* 1995} ont également démontré l'importance de la boucle e1 dans l'interaction du glucagon avec son récepteur. Rappelons que les ligands GLP-1 et glucagon sont très homologues au niveau de leur séquence primaire (Tableau 3), mais que chacun d'eux n'a quasiment pas d'affinité de liaison pour le récepteur « non-parent » : IC₅₀ glucagon/GLPr = 440 mM, et IC₅₀ GLP-1/récepteur au glucagon > 1000 mM {Hjorth, S. A. *et al.* 1996}.

Les deux récepteurs présentent 47% d'identité et 66% de similitude d'acides aminés, et ce, essentiellement de part les régions transmembranaires. Mais les 2 boucles e1 restent toutefois très homologues {Buggy, J. J. *et al.* 1995} (Figure 56) :

	1			32
e1_GLPr	KDAALKWMYS	TAAQQHQWDG	L.LSYQDSL	CR
e1_GLr	IDGLLRTRY	QKIGDDLVS	TWLSDGAVAG	CR
Consensus	iDaaLktmYS	qaagddlsdg	l.LSdgasag	CR

Figure 56. Alignement des séquences des boucles e1 du récepteur du GLP-1 (e1_GLPr) et du récepteur au glucagon (e1_GLr) montrant une forte homologie. Ces boucles e1 semblent être des clés dans la reconnaissance spécifique des ligands à leur récepteur.

Ainsi, on peut penser que la boucle e1 du récepteur joue une part importante dans la reconnaissance spécifique du ligand GLP-1.

6.2. Interaction fragment N-terminal du récepteur - GLP-1.

Comme il a déjà été évoqué, la partie N-terminale du récepteur du GLP-1 et plus précisément sa partie proximale serait une région clé dans l'interaction du GLP-1 avec son récepteur {Donnelly, D. 1997 ; Wilmen, A. *et al.* 1996 ; Hjorth, S. A. *et al.* 1996 ; Buggy, J. J. *et al.* 1995}. De plus on rappelle que cette partie extracellulaire présente six cystéines très bien conservées au sein du groupe 2 des RCPG. Ainsi, la formation de ponts disulfures permettrait un repliement du domaine, lui conférant une structure compacte et ordonnée, rendant ainsi possible la « capture » du ligand {Hjorth, S. A. *et al.* 1996}.

Ne sera considérée dans cette étude, que la partie synthétique [88-142]-GLPr proximale du segment N-terminal, que l'on notera Nt-GLPr (*Figure 52*).

Une étude préliminaire consiste à vérifier l'existence d'un complexe 1:1 (Nt-GLPr:GLP-1) par spectrométrie de masse ESI-MS. Si un tel complexe existe, il n'a pas pu être décelé par cette méthode.

Par contre, comme pour les différentes boucles du GLPr, ce segment Nt-GLPr étudié possède des chromophores intrinsèques (3 Trp) ce qui rend possible l'étude d'interactions par fluorescence (excitation 290 nm). Selon la même méthodologie que précédemment, différentes solutions présentant des rapports molaires de 1:1 à 50:1 (GLP-1:Nt-GLPr) sont analysées.

On observe une diminution du rendement quantique de fluorescence en fonction du nombre de GLP-1 mis en présence du Nt-GLPr. L'affaiblissement du signal résultant de cette association GLP-1:Nt-GLPr traduit une interaction entre les deux peptides synthétiques, dont le K_d (estimé mathématiquement) est de l'ordre de 20 μ M. L'effet de saturation est observé, comme dans le cas des interactions du GLP-1 avec les boucles extracellulaires, pour un *ratio* 1:5 (*Figure 57*).

La linéarité du signal de fluorescence en fonction de la concentration de chacun des partenaires (*Figure 58*, courbe en insert) confirme qu'il n'y a pas d'auto association des peptides. Ainsi, le phénomène d'extinction par collision précédemment observé pour les complexe GLP-1:boucles reste de mise.

Le fait que le complexe présente un maximum d'intensité inférieur à la somme théorique des intensités des GLP-1 et Nt-GLPr pris séparément, conforte l'existence de cette interaction, puisqu'il n'y a pas d'auto-association (*Figure 58*).

La longueur d'onde de 341 ± 1 nm pour tous les maxima laisse penser qu'il n'y a pas de changement d'environnement global des Trp lors de ces associations GLP-1:Nt-GLPr.

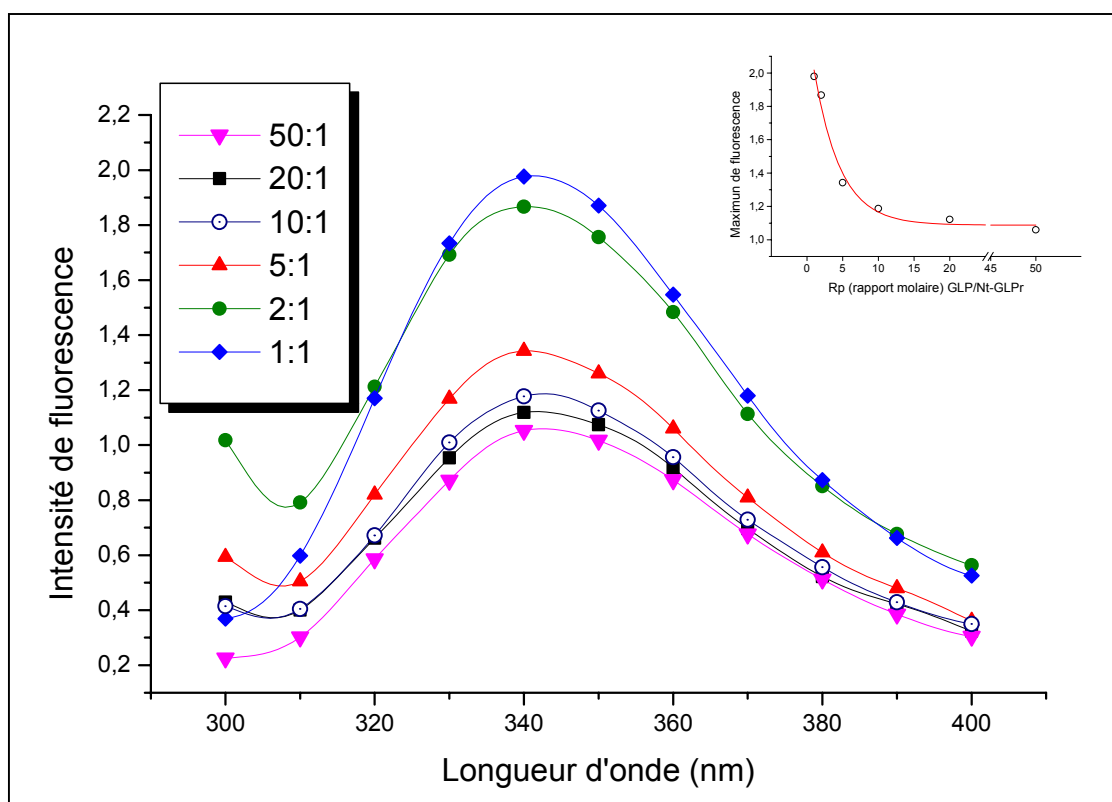


Figure 57. Etude de fluorescence pour les complexes GLP-1:Nt-GLPr.

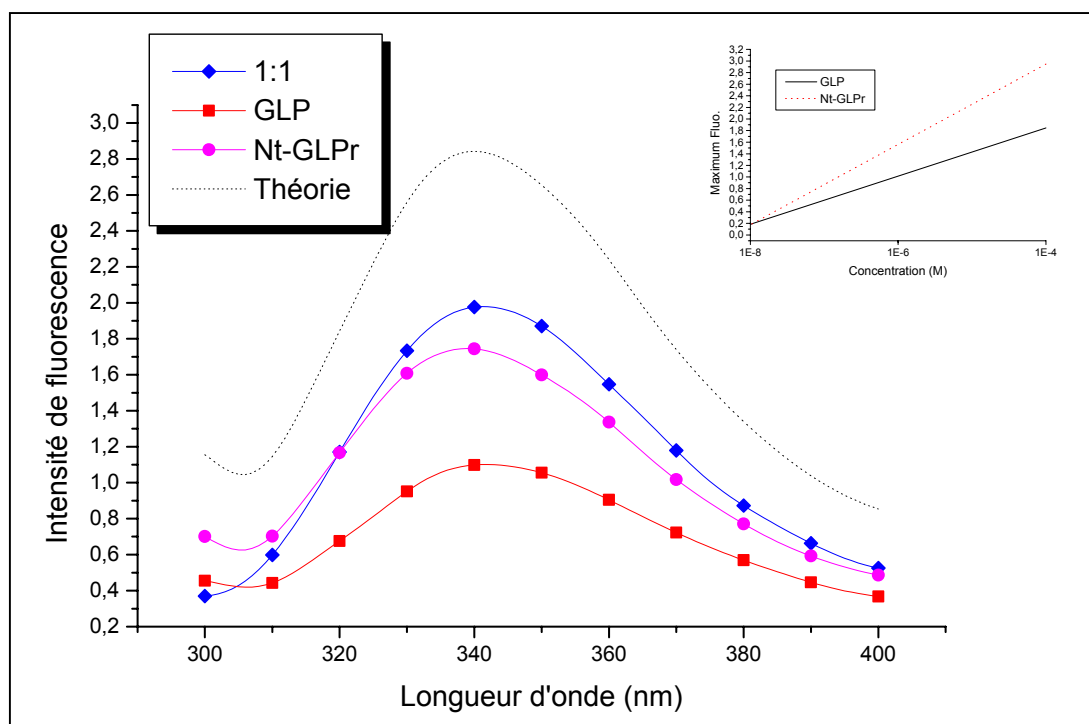


Figure 58. Comparaison des intensités de fluorescence pour les peptides (GLP-1 et Nt-GLPr) seuls, et le complexe 1:1.

Or, une étude structurale par dichroïsme circulaire pour le mélange 1:1 (GLP-1:Nt-GLPr) démontre clairement un changement structural (*Figure 59*), ce qui pouvait être pressenti par l'observation de l'extinction de fluorescence.

L'ellipticité moléculaire est une fonction additive de chacun des partenaires. Or si l'on prend séparément les deux protagonistes, on distingue nettement que partant d'une hélice alpha pour le GLP-1, et d'une chaîne statistique pour le Nt-GLPr, le complexe est totalement non-structuré (*Figure 59*).

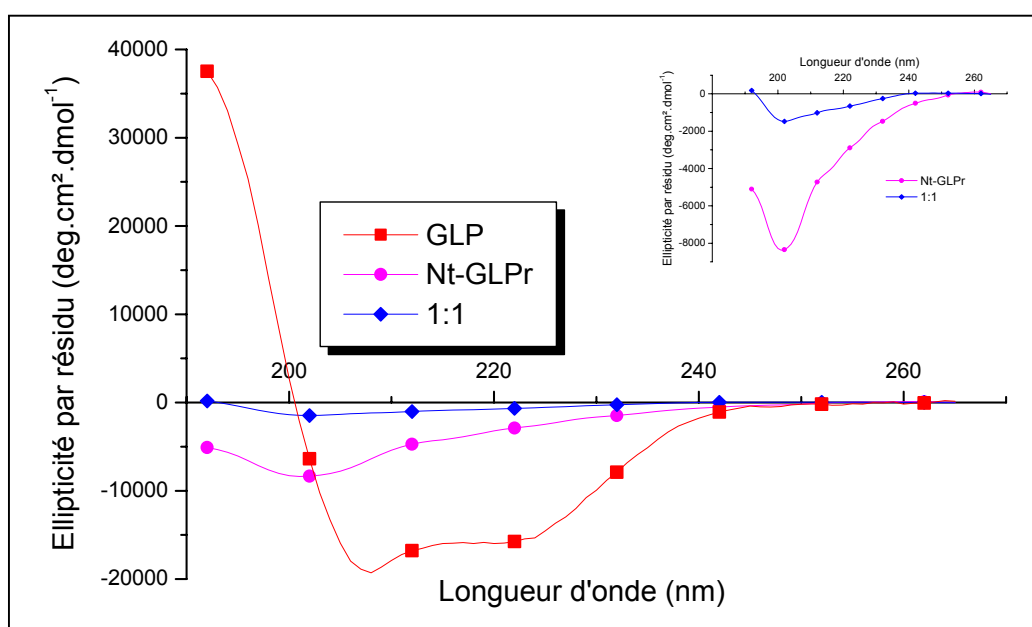


Figure 59. Spectres de CD du GLP-1, du Nt-GLPr et du complexe 1:1 de ces deux peptides. Le graphe en insert est un agrandissement des spectres CD du complexe et du Nt-GLPr. Perte de la structure hélicoïdale du GLP-1 quand il forme un complexe avec Nt-GLPr.

Donc dans le cas de l'interaction GLP-1:Nt-GLPr on déduit des études de fluorescence l'existence d'une interaction hydrophobe, faisant intervenir les Trp (extinction par collision), qui est de plus caractérisée par un changement de conformation des partenaires (données du CD).

6.3. Activité intrinsèque de liaison du GLPr.

Le fait que la partie N-terminale et au moins une des boucles extracellulaires soient impliquées dans la liaison ligand-récepteur, semble plus ou moins vérifié pour les RCPG du

groupe 2. Ceci peut être représenté par un schéma de liaison en trois étapes {Wilmen, A. *et al.* 1996} :

- 1) Approche du ligand.
- 2) Peptide pseudo lié au récepteur, par la partie N-terminale de ce dernier.
- 3) Peptide intimement lié au récepteur par la partie N-terminale, et par la (les) boucle(s) extracellulaire(s).

Cette hypothèse se rapproche du cas du récepteur à la thrombine (appartenant au groupe 1b des RCPG). En effet, la protéolyse de ce récepteur conduit à sa propre activation. Ce mécanisme de clivage engendré par la thrombine elle-même {Dennington, P. M. *et al.* 1994 ; Vu, T. K. *et al.* 1991} donne naissance à un nouveau fragment N-terminal qui interagira avec le récepteur selon le schéma ci-dessus.

Pour cette raison, des tests *in vitro* de liaison et d'activation sont mis en œuvre sur des parties de récepteurs synthétiques. Pour mémoire rappelons tout de même que l'homologie, entre les fragments du récepteur du GLP-1 (Nt-GLPr, e1, e2 et e3) et ceux de la thrombine, est inférieure à 20%.

Les peptides synthétisés pour cette étude sont de 30 acides aminés et couvrent toute la longueur (exception faite des 18 premiers acides aminés qui correspondent au peptide signal) de la partie N-terminale native du GLPr. Il s'agit des fragments [19-38], [39-68], [69-98], [99-128] et [129-158]-GLPr (*Figure 60*). Les fragments déjà décrits ultérieurement dans cette étude, Nt-GLPr ainsi que e1, e2 et e3, sont également utilisés dans ces tests *in vitro*.

1	11	21	31	41	51	60					
1	MAGAPG	PLRL	ALLLLGMVGR	AGPRPQGATV	SLWETVQKWR	EYRRQCQ	RSL	TEDPPP	PATDL		
61	FCNRTF	DEYA	CWPDGEPGSF	VNVSCP	WYLP	WASSVP	QGHV	YRFCTA	EGLW	LQKDNSS	LPW
121	RDLSECE	ESK	RGERSSPEEQ	LLFLYII	YTV	GYALSFS	ALV	IASA	ILLGFR	HLHCTR	NYIH
181	LNLFA	SFILR	ALSVFIKDAA	LKWMYSTAAQ	QHWDGLLSY	QDSL	SCLRVF	LLMQYC	VAAAN		
241	YYWLL	VEGVY	LYTLA	FSVF	SEQWIFRLYV	SIGWGV	PLLF	VVPWGI	VKYL	YEDEGC	WTRN
301	SNMNY	WLIIR	LPILFA	IGVN	FLIFVRVICI	VVSKL	KANLM	CKTDI	KCRLA	KSTLT	LIPLL
361	GTHEV	IFAFV	MDEHARGTLR	FIKLFT	ELSF	TSFQGL	MVAI	LYCFV	NNEVQ	LEFRKS	SWERW
421	RLEHL	HIQRD	SSMKPLKCPT	SSLSSG	GATAG	SSMYT	TATCQA	SCS			

Figure 60. Séquence primaire du GLPr. Les séquences synthétisées pour cette étude sont surlignées. La zone soulignée représente la séquence Nt-GLPr précédemment synthétisée. L'hélice présumée HTM 1 est représentée en rouge.

Des tests de liaison *in vitro* sur le récepteur au glucagon sont également mis en œuvre, et prouvent (résultats non montrés ici) que ces fragments synthétiques n'ont aucune affinité (tout comme le ligand GLP-1) pour ce récepteur.

Evidemment, en comparaison au GLP-1 ($IC_{50} = 0.23 \pm 0.02 \text{ nM}$) le déplacement du GLP-1 radiomarcué par les fragments du récepteur reste faible (*Figure 61*). Aussi, le résultat le plus probant est pour la partie proximale Nt-GLPr dans sa totalité : [88-142]-GLPr ($IC_{50} = 2600 \text{ nM}$). Mais si cette zone est scindée en deux peptides, bien que la liaison soit notable, l'activité de liaison au récepteur diminue : $IC_{50} = 13510$ et 11084 nM respectivement pour le [99-128]-GLPr et le [129-158]-GLPr.

On peut donc admettre que le peptide Nt-GLPr dans sa totalité se comporte comme un ligand compétitif. Par contre, les résultats de liaison pour [19-38], [39-68] et [69-98]-GLPr ainsi que pour les 3 boucles extracellulaires e1, e2 et e3 (représentées uniquement par des + sur la *Figure 61*) sont non représentatifs.

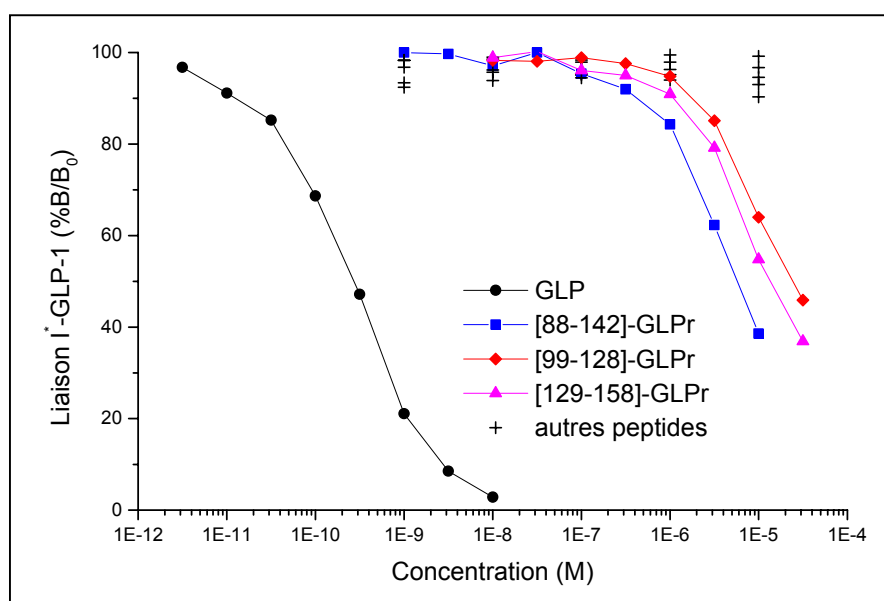


Figure 61. Etude de l'affinité de liaison du GLP-1 et des différents fragments du récepteur GLPr sur le GLPr. Ne sont représentés de façon explicite que les peptides donnant une réponse. Bien que faible, il y a une certaine compétition de liaison entre le GLP-1 et certains fragment de la parties N-terminale du récepteur.

Ces dernières expériences, liées aux travaux de WILMEN *et al.* {Wilmen, A. *et al.* 1996}, confortent l'idée déjà évoquée que le domaine extracellulaire et particulièrement le segment N-terminal (au moins en partie) est un élément crucial de la reconnaissance et de la liaison du GLP-1.

De plus, comme l'affinité de liaison GLP-1/Nt-GLPr est beaucoup plus faible que dans le cas du récepteur natif, cela indique que d'autres éléments du récepteur sont impliqués dans la liaison native, de haute affinité.

Une étude plus systématique utilisant d'autres peptides synthétiques issus du segment N-terminal natif permettrait de mieux localiser les résidus essentiels. Entre autre, il serait intéressant de faire une étude similaire sur le segment [114-143]-GLPr intermédiaire du [99-128] et du [129-158]-GLPr par rapport au segment synthétique Nt-GLPr.

Des études d'activation *in vitro* du récepteur, par mesure de la production d'AMPc, sont faites pour les fragments [88-142], [99-128] et [129-158]-GLPr (Figure 62).

On remarquera une très faible production d'AMPc pour le segment entier Nt-GLPr, confirmant l'effet compétiteur de cette zone extracellulaire du récepteur.

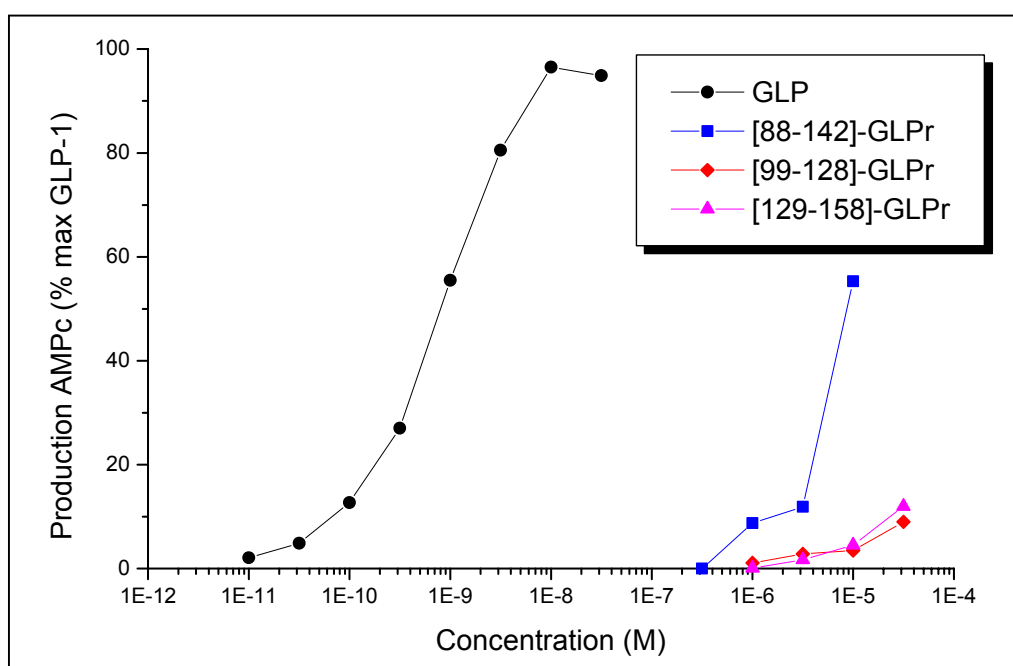


Figure 62. Production d'AMPc induite par les parties synthétiques du GLPr en comparaison avec le GLP-1.

Conclusions et perspectives.

Des molécules actuellement en développement, pour les thérapies futures du diabète de type II, le GLP-1 est en très bonne voie. Outre le fait qu'il s'agisse d'une hormone endogène (diminuant ainsi les risques de toxicité), son action insulino-sécrétrice glucose-dépendante, qui est un pré-requis évitant les risques d'hypoglycémie, est sans effets secondaires connus. Ce peptide a pour autre avantage d'être actif via un récepteur couplé aux protéines G, qui lui est spécifique.

Le facteur limitant, à l'utilisation de l'hormone dans sa forme native, est une inactivation rapide par les protéases, dont essentiellement la DPP IV.

La première approche de ce travail est purement peptidique pour essayer d'augmenter la stabilité du peptide, avec respect des positions clés dans l'activité de cette hormone. Aux différentes mutations effectuées dans ce but, des analyses biophysiques sont mises en œuvre, permettant d'étayer des hypothèses quant à la conformation que doit avoir l'hormone ou les mutants pour être actifs.

La partie N-terminale est reconnue comme particulièrement importante dans les processus d'activation ; d'ailleurs, elle contient la majorité des résidus clés, dont His⁷, élément essentiel de l'activation et Ala⁸, cible de la DPP IV. Ce segment n'étant pas structuré, les mutations dans cette région, ne devraient pas avoir de conséquence sur la structure bioactive initiale. Ainsi, afin d'augmenter la stabilité du peptide nous avons décidé de muter les trois premiers acides aminés de la séquence.

Des différentes mutations réalisées, on peut conclure que les critères requis à la position 7 (où l'histidine semblait obligatoire) se résument à un noyau aromatique, peu encombrant et surtout pas de résidus polaires.

La position 8, où initialement Ala⁸ est la cible de la DPP IV, accepte les petits acides aminés, de polarité faible.

Enfin, la troisième position, qui joue un rôle dans la cinétique de dégradation par la DPP IV, semble être très permissive : cette position accepte les résidus peu volumineux, et le caractère acide n'est pas strictement obligatoire. En revanche le caractère basique n'est pas toléré à cette position, ni même l'inversion de stéréochimie.

Des mutations réalisées dans la partie centrale du peptide, permettent de vérifier certaines hypothèses concernant la conformation de l'hormone. Il en ressort qu'il n'y a pas de stricte ségrégation entre activité (attribuée à la partie N-terminale) et reconnaissance du récepteur (attribuée à la partie C-terminale).

Ces segments N- et C-terminaux doivent être stériquement proches et séparés dans la partie centrale du peptide par une chaîne de conformation précise et donnée.

Des activités des peptides analogues, il est intéressant de remarquer que si l'arginine 36 stabilise la structure, la raison en reste encore assez floue. De même, il est curieux de noter que la corrélation entre activité *in vitro*, *in vivo* et stabilité métabolique ne semble pas être évidente. Ainsi, il faudrait pour mieux appréhender ce problème, se pencher sur les notions de biodisponibilité.

A partir d'études structurales de CD et IR-TF, réalisées sur les différents mutants et, combinées avec les résultats de RMN précédemment publiés, on propose ici une conformation bioactive. La partie N-terminale forme une large boucle, permettant des interactions entre la position 7 et la position 15, voir la position 12 comme site compensatoire. Ainsi, ce segment amino-terminal est relativement peu mobile, par rapport à la grande flexibilité du reste de la molécule en solution.

Pour affiner ces conclusions, des études RMN sur les différents mutants, ainsi que quelques mutations supplémentaires (comme par exemple un résidu dextrogyre volumineux en position 9) s'avèrent nécessaires pour connaître la nature des forces impliquées.

Enfin, pour voir dans le GLP-1 et ses analogues un médicament potentiellement commercialisable, il faudrait développer, entre autre, toute une série d'études de bio-disponibilité. En effet, si l'on a pu concevoir et breveter {Calas, B. *et al.* 1998} des molécules de stabilité supérieure à celle du GLP-1, présentant une activité équivalente, voir meilleure, ce n'est pas pour autant que nous avons un médicament. De plus, il faudrait tenter, pour une formulation plus aisée et un coût moindre, de réduire sa longueur en veillant à ne pas toucher aux résidus clés et à

la conformation bioactive. Cette approche ne semble pas à priori aisée, et serait peut-être compensée par la synthèse de pseudopeptides.

La seconde série d'études, exposée dans ce manuscrit et concernant le récepteur au glucagon-like peptide, représente une étape préliminaire à de futurs développements, qui devraient très rapidement voir le jour, dans les différentes équipes de recherches travaillant sur le GLP-1 et sur les potentialités que celui-ci représente dans une thérapie du diabète de type II.

En effet, la modélisation moléculaire représente un outil moderne permettant de mieux appréhender les phénomènes de liaison d'un peptide avec son récepteur. Par la détermination de la structure 3D, bon nombre d'hypothèses émergent quant à la localisation du site d'interaction. Ceci permet de focaliser plus précisément le type d'expériences biologiques à mettre en œuvre pour déterminer l'existence ou non d'un tel site.

Ainsi, la volonté de construire un modèle du GLPr reste d'actualité. Mais si les méthodes de bio-informatique sont de plus en plus puissantes, elles ne peuvent en aucun cas pallier des données issues de l'expérience *in vitro*. Pour cela notre modèle de GLPr ne peut se prétendre réaliste, tant par le positionnement des chaînes latérales des hélices, que par la topologie générale du récepteur.

S'il est maintenant admis que les structures 3D doivent se construire sur le modèle de la rhodopsine, plutôt que sur celui de la bR, il faudrait d'abord dans un premier temps affiner ce modèle pour en faire un « patron » convenablement utilisable. De plus, la rhodopsine est un RCPG du 1^{er} groupe, alors que le GLPr lui appartient au second groupe. Ce fait, impliquant un faible degré d'homologie, est en lui seul un facteur limitant quant à la construction de modèles par homologie.

Ainsi, les différentes modélisations du récepteur présentées dans ce travail et dans la littérature en général (au moins en ce qui concerne le groupe 2 des RCPG) ne doivent donc être purement considérées que comme spéculatives. La topologie relative des hélices les unes par rapport aux autres ne sera pleinement élucidée qu'après isolement et cristallisation du récepteur.

C'est seulement ensuite, par une parfaite connaissance du positionnement de ces hélices au sein de la membrane plasmique que l'on pourra s'attarder sur le problème des boucles inter-hélices, voir sur le fragment amino-terminal du récepteur.

Par contre, la détermination de la localisation des hélices fait apparaître une donnée de la plus haute importance : la taille des zones extracellulaires du récepteur (boucles e1, e2, e3 et partie N-terminale). Cette caractéristique du groupe des récepteurs peptidergiques laisse fortement pressentir une interaction ligand-récepteur dans cette zone extracellulaire. L'encombrement stérique de ces segments extracellulaires conjugué à la taille importante du ligand permet d'exclure un site de liaison simplement localisé dans la lumière du récepteur, comme c'est le cas pour une majorité des RCPG du groupe 1.

En effet, les expériences de fluorescence du Trp et de dichroïsme circulaire exposées dans ce manuscrit confirment l'existence d'un site d'interaction dans cette zone. S'il n'est pas encore très clair que la boucle e1 ou e2 participe à la liaison du GLP-1 au récepteur, les données concernant la boucle e1 du récepteur au glucagon confortent le fait qu'il faut persévérer dans cette voie. Par contre, il semble établi que la boucle e3 ne participe pas (du moins *in vitro*) à cette interaction.

De plus, confirmant de nombreuses hypothèses, il est clairement établi que la partie N-terminale du récepteur est une zone clé dans l'affinité ligand-récepteur. Il semble aux vues des résultats exposés précédemment que ce soit plus particulièrement la partie proximale de ce segment qui soit impliquée dans la liaison.

Il reste maintenant à affiner la localisation de ce site de reconnaissance, probablement induit par la structure tertiaire que prend cette protéine en formant des ponts disulfures entre les 6 Cys parfaitement conservées au sein des RCPG du groupe 2.

Un aboutissement de ce travail sur le récepteur et l'interaction avec les peptides, serait de réaliser des mutagenèses dirigées sur les parties extracellulaires du récepteur. On pourrait ainsi appréhender avec plus de certitude les acides aminés impliqués dans la liaison avec le ligand, et par là même comprendre les processus d'activation du récepteur.

Bien plus en aval serait l'étude du changement « potentiel » de conformation du récepteur, permettant l'interaction du segment -R-L-A-K- de la boucle intracellulaire i3 (suggérée par différents auteurs) avec la protéine G.

Bibliographie.

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **1997** ; 20(7): 1183-1197.
2. Adelhorst, K. ; Hedegaard, B. B. ; Knudsen, L. B. ; Kirk, O. Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1. *J.Biol.Chem.* **1994** ; 269: 6275-6278.
3. Adenot, M. Développement d'un outil bio-informatique intégré pour la conception rationnelle de peptides d'intérêt thérapeutique ~ QSAR & Relation Dynamique-Activité d'analogues peptidiques du GLP-1 à potentialité antidiabétogène. - 123p. [Th. univ.] Sciences du Médicament. Montpellier : Université Montpellier I, **1998**.
4. Ahren, B. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) : a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *BioEssays* **1998** ; 20(8): 642-651
5. Alkorta, I. ; Du, P. Sequence divergence analysis for the prediction of seven-helix membrane protein structures: II. A 3-D model of human rhodopsin. *Protein Eng.* **1994** ; 7(10): 1231-1238.
6. Assan, R. ; Perronne, C. ; Assan, D. ; Chotard, L. ; Mayaud, C. ; Matheron, S. ; Zucman, D. Pentamidine-induced derangements of glucose homeostasis. Determinant roles of renal failure and drug accumulation. A study of 128 patients. *Diabetes Care* **1995** ; 18: 47-55.
7. Bairoch, A. ; Boeckmann, B. The SWISS-PROT protein sequence data bank. *Nucleic.Acids.Res.* **1991** ; 19(Suppl.): 2247-2249.
8. Baldwin, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **1993** ; 12(4): 1693-1703.
9. Baldwin, J. M. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **1994** ; 6(2): 180-190.
10. Baldwin, J. M. ; Schertler, G. F. ; Unger, V. M. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J.Mol.Biol.* **1997** ; 272: 144-164.
11. Barnett, A. H. ; Eff, C. ; Leslie, R. D. ; Pyke, D. A. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* **1981** ; 20: 87-93.
12. Bell, G. I. ; Sanchez-Pescador, R. ; Laybourn, P. J. ; Najarian, R. C. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature* **1983** ; 304: 368-371.

13. Blanco, F. J. ; Rivas, G. ; Serrano, L. A short linear peptide that folds into a native stable beta- hairpin in aqueous solution. *Nat.Struct.Biol.* **1994** ; 1: 584-590.
14. Bockaert, J. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires : physiologie et pathologie de la transduction. *Medecine/ Sciences* **1995** ; 11(3): 382-394.
15. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **1976** ; 72: 248-254.
16. Brahms, S. ; Brahms, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J.Mol.Biol.* **1980** ; 138(2): 149-178.
17. Brooks, B. R. ; Brucoleri, R. E. ; Olafson, B. D ; States, D. J. ; Swaminathan, S. ; Karplus, M. *J.Comp.Chem.* **1983** ; 4: 187-217.
18. Buggy, J. J. ; Livingston, J. N. ; Rabin, D. U. ; Yoo-Warren, H. Glucagon.glucagon-like peptide I receptor chimeras reveal domains that determine specificity of glucagon binding. *J.Biol.Chem.* **1995** ; 270: 7474-7478.
19. Burcelin, R. ; Dolci, W. ; Thorens, B. Long-lasting antidiabetic effect of a dipeptidyl peptidase IV-resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism* **1999** ; 48(2): 252-258.
20. Burley, S. K. ; Petsko, G. A. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* **1985** ; 229(4708): 23-28.
21. Burley, S. K. ; Petsko, G. A. Weakly polar interactions in proteins. *Adv.Protein Chem.* **1988** ; 39: 125-185.
22. Calas, B. ; Grassy, G. ; Chavanieu, A. ; Sarrauste de Menthère, C. ; Renard, P. ; Pfeiffer, B. ; Manechez, D., inventors. Adir et Compagnie, assignee. Nouveaux composés peptidiques analogues du glucagon-like-peptide-1 (7-37), leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent. Fr patent 98.04559. 1998 Apr. 21.
23. Campbell, R. M. ; Scanes, C. G. Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul.* **1992** ; 2: 175-191.
24. Charbonnel, B. ; Cariou, B. Diabète non insulino-dépendant : indications thérapeutiques. *Médecine Thérapeutique* **1998** ; hors série: 103-111.
25. Chen, Y. H. ; Yang, J. T. ; Chau, K. H. Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **1974** ; 13: 3350-3359.
26. Conlon, J. M. Proglucagon-derived peptides: nomenclature, biosynthetic relationships and physiological roles. *Diabetologia* **1988** ; 31: 563-566.

-
27. Crabbe, P. Aspects théoriques. In : Applications de la dispersion rotatoire optique et du dichroïsme circulaire optique en chimie organique / ed. Paris : Gauthier-Villars, **1968** - pp. 31-73.
 28. Creutzfeldt, W. The incretin concept today. *Diabetologia* **1979** ; 16: 75-85.
 29. Creutzfeldt, W. ; Ebert, R. New developments in the incretin concept. *Diabetologia* **1985** ; 28: 565-573.
 30. Cronet, P. ; Sander, C. ; Vriend, G. Modeling of transmembrane seven helix bundles. *Protein Eng.* **1993** ; 6(1): 59-64.
 31. Cserzo, M. ; Bernassau, J. M. ; Simon, I. ; Maigret, B. New alignment strategy for transmembrane proteins. *J.Mol.Biol.* **1994** ; 243(3): 388-396.
 32. Deacon, C. F. ; Hughes, T. E. ; Holst, J. J. Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes* **1998a** ; 47: 764-769.
 33. Deacon, C. F. ; Knudsen, L. B. ; Madsen, K. ; Wiberg, F. C. ; Jacobsen, O. ; Holst, J. J. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia* **1998b** ; 41(3): 271-78.
 34. Delcourt, C ; Papoz, L. Le diabète et ses complications dans la population Française. ed.INSERM 1996 Paris :**1996** - pp. 1-106.
 35. Deleage, G. ; Geourjon, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comput.Appl.Biosci.* **1993** ; 9(2): 197-199.
 36. Dennington, P. M. ; Berndt, M. C. The thrombin receptor. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **1994** ; 21: 349-358.
 37. Donckier, J. ; Williams, G. The roles of alpha-glucosidase inhibitors in diabetes. *Eur.J.Clin.Invest.* **1994** ; 24: 522-524.
 38. Donnelly, D. The arrangement of the transmembrane helices in the secretin receptor family of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **1997** ; 409: 431-436.
 39. Drent, M. L. ; van der Veen, E. A. First clinical studies with orlistat: a short review. *Obes.Res.* **1995** ; 3 Suppl 4: 623S-625S.
 40. Drucker, D. J. Glucagon-like peptides. *Diabetes* **1998** ; 47(2): 159-169.

41. Drucker, D. J. ; Philippe, J. ; Mojsov, S. ; Chick, W. L. ; Habener, J. F. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1987** ; 84: 3434-3438.
42. Du, P. ; Alkorta, I. Sequence divergence analysis for the prediction of seven-helix membrane protein structures: I. Comparison with bacteriorhodopsin. *Protein Eng.* **1994** ; 7(10): 1221-1229.
43. Elliot, A. Infrared spectra of polypeptides with small side chains. *Proc.R.Soc.London Ser.* **1954** ; 226: 408-421.
44. Elliot, A. ; Ambrose, E. J. Structure of synthetic polypeptides. *Nature* **1950** ; 165: 921-922.
45. Fehmann, H. C. ; Goke, R. ; Goke, B. Glucagon-like peptide-1(7-37)/(7-36)amide is a new incretin. *Mol.Cell Endocrinol.* **1992** ; 85: C39-C44.
46. Fehmann, H. C. ; Habener, J. F. Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon- like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Lett.* **1991** ; 279: 335-340.
47. Fehmann, H. C. ; Jiang, J. ; Schweinfurth, J. ; Wheeler, M. B. ; Boyd, A. E 3rd ; Goke, B. Stable expression of the rat GLP-I receptor in CHO cells: activation and binding characteristics utilizing GLP-I(7-36)- amide, oxyntomodulin, exendin-4, and exendin(9-39). *Peptides* **1994** ; 15: 453-456.
48. Findlay, J. B. ; Pappin, D. J. The opsin family of proteins. *Biochem.J.* **1986** ; 238(3): 625-642.
49. Fuhlendorff, J. ; Johansen, N. L. ; Melberg, S. G. ; Thøgersen, H. ; Schwartz, T. W. The antiparallel pancreatic polypeptide fold in the binding of neuropeptide Y to Y1 and Y2 receptors. *J.Biol.Chem.* **1990** ; 265(20): 11706-11712.
50. Gallwitz, B. ; Witt, M. ; Morys-Wortmann, C. ; Folsch, U. R. ; Schmidt, W. E. GLP-1/GIP chimeric peptides define the structural requirements for specific ligand-receptor interaction of GLP-1. *Regul.Pept.* **1996** ; 63: 17-22.
51. Gallwitz, B. ; Witt, M. ; Paetzold, G. ; Morys-Wortmann, C. ; Zimmermann, B. ; Eckart, K. ; Folsch, U. R. ; Schmidt, W. E. Structure/activity characterization of glucagon-like peptide-1. *Eur.J.Biochem.* **1994** ; 225: 1151-1156.
52. Gazdar, A. F. ; Chick, W. L. ; Oie, H. K. ; Sims, H. L. ; King, D. L. ; Weir, G. C. ; Lauris, V. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1980** ; 77: 3519-3523.
53. Gefel, D. ; Hendrick, G. K. ; Mojsov, S. ; Habener, J. ; Weir, G. C. Glucagon-like peptide-I analogs: effects on insulin secretion and adenosine 3',5'-monophosphate formation. *Endocrinology* **1990** ; 126: 2164-2168.

54. Genetic Computer Group. GCG Wisconsin Package. V.8. 10-1994. 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711.
55. Giannaccini, G. ; Lupi, R. ; Trincavelli, M. L. ; Navalesi, R. ; Betti, L. ; Marchetti, P. ; Lucacchini, A. ; Del Guerra, S. ; Martini, C. Characterization of sulfonylurea receptors in isolated human pancreatic islets. *J.Cell Biochem.* **1998** ; 71: 182-188.
56. Goke, R. ; Cole, T. ; Conlon, J. M. Characterization of the receptor for glucagon-like peptide-1(7- 36)amide on plasma membranes from rat insulinoma-derived cells by covalent cross- linking. *J.Mol.Endocrinol.* **1989** ; 2: 93-98.
57. Goke, R. ; Fehmann, H. C. ; Linn, T. ; Schmidt, H. ; Krause, M. ; Eng, J. ; Goke, B. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)- amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J.Biol.Chem.* **1993** ; 268(26): 19650-19655.
58. Goke, R. ; Hareter, A. ; Vahl, T. ; Bode, H. P. ; Hoffmann, E. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor in Relation to its Ligand. In : The Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-Like Peptide-1. Front Diabetes. / ed.Fehmann, H. C. and Göke, B. Basel : Karger, **1997** - pp. 85-104.
59. Goke, R. ; Trautmann, M. E. ; Haus, E. ; Richter, G. ; Fehmann, H. C. ; Arnold, R. ; Goke, B. Signal transmission after GLP-1(7-36)amide binding in RINm5F cells. *Am.J.Physiol.* **1989** ; 257: G397-G401.
60. Greenfield, N. ; Fasman, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **1969** ; 8: 4108-4116.
61. Griffiths, P. R. ; Haseth, J. Fourier transform infrared spectrometry. In : Chemicals Analysis / ed.Elving, P. J, Winefordner, J. D., and John Willey & Sons New York :**1986** - pp. 1-56.
62. Gros, L. ; Thorens, B. ; Bataille, D. ; Kervran, A. Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, oxyntomodulin, and glucagon interact with a common receptor in a somatostatin- secreting cell line. *Endocrinology* **1993** ; 133: 631-638.
63. Gutniak, M. ; Orskov, C. ; Holst, J. J. ; Ahren, B. ; Efendic, S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* **1992** ; 326: 1316-1322.
64. Halimi, S. ; Benhamou, P. Y. Critères diagnostiques du diabète non insulino-dépendant et dépistage dans la population générale. *Médecine Thérapeutique* **1998** ; hors série: 80-86.
65. Hareter, A. ; Hoffmann, E. ; Bode, H. P. ; Goke, B. ; Goke, R. The positive charge of the Imidazole side chain of Histidine⁷ is crucial for GLP-1 action. *Endocr.J.* **1997** ; 44(5): 701-5.

66. Henderson, R. ; Baldwin, J. M. ; Ceska, T. A. ; Zemlin, F. ; Beckmann, E. ; Downing, K. H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J.Mol.Biol.* **1990** ; 213(4): 899-929.
67. Herzyk, P. ; Hubbard, R. E. Combined biophysical and biochemical information confirms arrangement of transmembrane helices visible from the three-dimensional map of frog rhodopsin. *J.Mol.Biol.* **1998** ; 281: 741-754.
68. Hibert, M. Les récepteurs couplés aux protéines G. In : Pharmacologie Moléculaire / ed.Landry, Y. and Gies, J. P. Paris :**1993** - pp. 119-136.
69. Hibert, M. F. ; Hoflack, J. ; Trumpp-Kallmeyer, S. ; Bruinvels, A. Modèles tridimensionnels des recepteurs couplés aux protéines G. *Medecine/Sciences* **1993a** ; 9: 31-40.
70. Hibert, M. F. ; Trumpp-Kallmeyer, S. ; Hoflack, J. ; Bruinvels, A. This is not a G protein-coupled receptor. *Trends.Pharmacol.Sci.* **1993b** ; 14(1): 7-12.
71. Hirst, J. D. ; Brooks, C. L. Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins. *J.Mol.Biol.* **1994** ; 243: 173-178.
72. Hjorth, S. A. ; Adelhorst, K. ; Pedersen, B. B. ; Kirk, O. ; Schwartz, T. W. Glucagon and glucagon-like peptide 1: selective receptor recognition via distinct peptide epitopes. *J.Biol.Chem.* **1994** ; 269: 30121-30124.
73. Hjorth, S. A. ; Schwartz, T. W. Glucagon and GLP-1 receptors: lessons from chimeric ligands and receptors. *Acta Physiol.Scand.* **1996** ; 157: 343-345.
74. Hoflack, J. ; Trumpp-Kallmeyer, S. ; Hibert, M. Re-evaluation of bacteriorhodopsin as a model for G protein-coupled receptors. *Trends.Pharmacol.Sci.* **1994** ; 15(1): 7-9.
75. Hollander, P. A. ; Elbein, S. C. ; Hirsch, I. B. ; Kelley, D. ; McGill, J. ; Taylor, T. ; Weiss, S. R. ; Crockett, S. E. ; Kaplan, R. A. ; Comstock, J. ; Lucas, C. P. ; Lodewick, P. A. ; Canovatchel, W. ; Chung, J. ; Hauptman, J. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. A 1-year randomized double-blind study. *Diabetes Care* **1998** ; 21: 1288-1294.
76. Holst, J. J. ; Deacon, C. F. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* **1998** ; 47: 1663-1670.
77. Holst, J. J. ; Orskov, C. ; Nielsen, O. V. ; Schwartz, T. W. Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett.* **1987** ; 211: 169-174.
78. Holz, G. G 4th ; Kuhlreiber, W. M. ; Habener, J. F. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* **1993** ; 361: 362-365.

79. Hupe-Sodmann, K. ; Goke, R. ; Goke, B. ; Thole, H. H. ; Zimmermann, B. ; Voigt, K. ; McGregor, G. P. Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1 (7-36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells. *Peptides* **1997** ; 18: 625-632.
80. Hupe-Sodmann, K. ; McGregor, G. P. ; Bridenbaugh, R. ; Goke, R. ; Goke, B. ; Thole, H. ; Zimmermann, B. ; Voigt, K. Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul.Pept.* **1995** ; 58: 149-156.
81. Jackson, M. ; Mantsch, H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* **1995** ; 30 : 95-120.
82. Janin, J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* **1979** ; 277(5696): 491-492.
83. Kieffer, T. J. ; McIntosh, C. H. ; Pederson, R. A. Degradation of glucose-dependent insulintropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* **1995** ; 136: 3585-3596.
84. King, D. S. ; Fields, C. G. ; Fields, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int.J.Pept.Protein Res.* **1990** ; 36: 255-266.
85. Kontoyianni, M. ; Lybrand, T. P. Three-dimensional models for integral membrane proteins : Possibilities and pitfalls. *Perspectives in Drugs Discovery and Design* **1993** ; 1: 291-300.
86. Kreymann, B. ; Williams, G. ; Ghatei, M. A. ; Bloom, S. R. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* **1987** ; 2: 1300-1304.
87. Kreymann, B. ; Yiangou, Y. ; Kanse, S. ; Williams, G. ; Ghatei, M. A. ; Bloom, S. R. Isolation and characterisation of GLP-1 7-36 amide from rat intestine. Elevated levels in diabetic rats. *FEBS Lett.* **1988** ; 242: 167-170.
88. Kyte, J. ; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.* **1982** ; 157(1): 105-132.
89. La Barre, J. ; Still, E. U. Further studies on the effect of secretin on the blood sugar. *Am.J.Physiol.* **1930** ; 91: 649-653.
90. Larger, E. Mécanismes d'action des antidiabétiques oraux. *Médecine Thérapeutique* **1998** ; hors série: 97-102.
91. Lebovitz, H. E. ; Feinglos, M. N. The oral hypoglycemic agents. In : Diabetes Mellitus, theory and practice / ed.Ellenberg, M. and Rifkin, H. New Hyde Park, New York : Medical Examination Publishing, **1983** - pp. 591-610.
92. Linder, M. E. ; Gilman, A. G. G proteins. *Sci.Am.* **1992** ; 267(1): 56-61.

93. Loubatieres, A. Analyse du mécanisme de l'action hypoglycémiante du p-aminobenzène-sulfamido-isopropyl-thiodazol (2254 RP). *Compt.rend.soc.Biol.* **1944** ; 138: 766.
94. Loubatieres, A. Etude physiologique et pharmacodynamique de certains dérivés sulfamidés hypoglycémiants. *Arch.intern.physiol.* **1946** ; 54: 174.
95. MaloneyHuss, K. ; Lybrand, T. P. Three-dimensional structure for the beta 2 adrenergic receptor protein based on computer modeling studies. *J.Mol.Biol.* **1992** ; 225(3): 859-871.
96. Maurer, T. ; Lucke, C. ; Ruterjans, H. Investigation of the membrane-active peptides melittin and glucagon by photochemically induced dynamic-nuclear-polarization (photo-CIDNP) NMR. *Eur.J.Biochem.* **1991** ; 196: 135-141.
97. Merrifield, R. B. Automated synthesis of peptides. *Science* **1965** ; 150: 178-185.
98. Mojsov, S. Structural requirements for biological activity of glucagon-like peptide-I. *Int.J.Pept.Protein Res.* **1992** ; 40: 333-343.
99. Mojsov, S. ; Heinrich, G. ; Wilson, I. B. ; Ravazzola, M. ; Orci, L. ; Habener, J. F. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J.Biol.Chem.* **1986** ; 261(25): 11880-11889.
100. Mojsov, S. ; Kopczynski, M. G. ; Habener, J. F. Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide I are synthesized in the rat intestine and the pancreas. *J.Biol.Chem.* **1990** ; 265: 8001-8008.
101. Mojsov, S. ; Weir, G. C. ; Habener, J. F. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J.Clin.Invest.* **1987** ; 79: 616-619.
102. Montrose-Rafizadeh, C. and Eng, J. Agonist Secondary Structure Correlates with Binding Affinity to GLP-1 Receptor. **1997**. Hynes Convention Center - Boston, Massachusetts, American Diabetes Association. 57th Annual Meeting & Scientific Sessions.
103. Montrose-Rafizadeh, C. ; Yang, H. ; Rodgers, B. D. ; Beday, A. ; Pritchette, L. A. ; Eng, J. High potency antagonists of the pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor. *J.Biol.Chem.* **1997b** ; 272: 21201-21206.
104. Nathan, D. M. ; Schreiber, E. ; Fogel, H. ; Mojsov, S. ; Habener, J. F. Insulinotropic action of glucagonlike peptide-I-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* **1992** ; 15: 270-276.
105. Nauck, M. ; Stockmann, F. ; Ebert, R. ; Creutzfeldt, W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **1986** ; 29: 46-52.

-
106. Nauck, M. A. ; Heimesaat, M. M. ; Orskov, C. ; Holst, J. J. ; Ebert, R. ; Creutzfeldt, W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J.Clin.Invest.* **1993a** ; 91: 301-307.
107. Nauck, M. A. ; Kleine, N. ; Orskov, C. ; Holst, J. J. ; Willms, B. ; Creutzfeldt, W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon- like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* **1993b** ; 36(8): 741-744.
108. Navarro, M. ; Rodriquez de Fonseca, F. ; Alvarez, E. ; Chowen, J. A. ; Zueco, J. A. ; Gomez, R. ; Eng, J. ; Blazquez, E. Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J.Neurochem.* **1996** ; 67: 1982-1991.
109. Needleman, S. B. ; Wunsch, C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J.Mol.Biol.* **1970** ; 48(3): 443-453.
110. O'Halloran, D. J. ; Nikou, G. C. ; Kreymann, B. ; Ghattei, M. A. ; Bloom, S. R. Glucagon-like peptide-1 (7-36)-NH₂: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man. *J.Endocrinol.* **1990** ; 126: 169-173.
111. O'Harte, F. P. ; Abdel-Wahab, Y. H. ; Conlon, J. M. ; Flatt, P. R. Glycation of glucagon-like peptide-1(7-36)amide: characterization and impaired action on rat insulin secreting cells. *Diabetologia* **1998** ; 41: 1187-1193.
112. O'Shea, D. ; Gunn, I. ; Chen, X. ; Bloom, S. ; Herbert, J. A role for central glucagon-like peptide-1 in temperature regulation. *Neuroreport.* **1996** ; 7: 830-832.
113. Orskov, C. ; Bersani, M. ; Johnsen, A. H. ; Hojrup, P. ; Holst, J. J. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *J.Biol.Chem.* **1989** ; 264: 12826-12829.
114. Orskov, C. ; Jeppesen, J. ; Madsbad, S. ; Holst, J. J. Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *J.Clin.Invest.* **1991** ; 87: 415-423.
115. Orskov, C. ; Nielsen, J. H. Truncated glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107 amide), an intestinal insulin-releasing peptide, has specific receptors on rat insulinoma cells (RIN 5AH). *FEBS Lett.* **1988** ; 229: 175-178.
116. Pardo, L. ; Ballesteros, J. A. ; Osman, R. ; Weinstein, H. On the use of the transmembrane domain of bacteriorhodopsin as a template for modeling the three-dimensional structure of guanine nucleotide-binding regulatory protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1992** ; 89(9): 4009-4012.

117. Parker, J. C. ; Andrews, K. M. ; Rescek, D. M. ; Masefski, W. Jr ; Andrews, G. C. ; Contillo, L. G. ; Stevenson, R. W. ; Singleton, D. H. ; Suleske, R. T. Structure-function analysis of a series of glucagon-like peptide-1 analogs. *J.Pept.Res.* **1998** ; 52: 398-409.
118. Parmentier, M. ; Libert, F. ; Vassart, G. La famille des récepteurs couplés aux protéines G et ses orphelins. *Medecine/ Sciences* **1995** ; 11 (2): 222-231.
119. Polonsky, K. S. Lilly Lecture 1994. The beta-cell in diabetes: from molecular genetics to clinical research. *Diabetes* **1995** ; 44: 705-717.
120. Pridal, L. ; Deacon, C. F. ; Kirk, O. ; Christensen, J. V. ; Carr, R. D. ; Holst, J. J. Glucagon-like peptide-1(7-37) has a larger volume of distribution than glucagon-like peptide-1(7-36)amide in dogs and is degraded more quickly in vitro by dog plasma. *Eur.J Drug Metab.Pharmacokinet.* **1996** ; 21: 51-59.
121. Rachman, J. ; Gribble, F. M. ; Barrow, B. A. ; Levy, J. C. ; Buchanan, K. D. ; Turner, R. C. Normalization of insulin responses to glucose by overnight infusion of glucagon-like peptide 1 (7-36) amide in patients with NIDDM. *Diabetes* **1996** ; 45: 1524-1530.
122. Raufman, J. P. ; Singh, L. ; Singh, G. ; Eng, J. Truncated glucagon-like peptide-1 interacts with exendin receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. Identification of a mammalian analogue of the reptilian peptide exendin-4. *J.Biol.Chem.* **1992** ; 267: 21432-21437.
123. Richter, G. ; Feddersen, O. ; Wagner, U. ; Barth, P. ; Goke, R. ; Goke, B. GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am.J.Physiol.* **1993** ; 265: L374-L381.
124. Rossetti, L. ; Giaccari, A. ; DeFronzo, R. A. Glucose toxicity. *Diabetes Care* **1990** ; 13: 610-630.
125. Rost, B. ; Casadio, R. ; Fariselli, P. ; Sander, C. Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci.* **1995** ; 4(3): 521-533.
126. Rost, B. ; Sander, C. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* **1994a** ; 19(1): 55-72.
127. Rost, B. ; Sander, C. ; Schneider, R. PHD--an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Comput.Appl.Biosci.* **1994b** ; 10(1): 53-60.
128. Ruiz-Grande, C. ; Alarcon, C. ; Merida, E. ; Valverde, I. Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* **1992** ; 13 : 13-16.
129. Sai, P. ; Boillot, D. ; Boitard, C. ; Debray-Sachs, M. ; Reach, G. ; Assan, R. Pentamidine, a new diabetogenic drug in laboratory rodents. *Diabetologia* **1983** ; 25: 418-423.

130. Saltiel, A. R. ; Olefsky, J. M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* **1996** ; 45: 1661-1669.
131. Sarrauste de Menthère, C. ; Dalle, S. ; Chavanieu, A. ; Manechez, D. ; Pfeiffer, B. ; Renard, P. ; Salazar, G. ; Kervran, A. ; Grassy, G. and Calas, B. Structural requirements of the N-terminal region of glucagon-like peptide-1-(7-37) for receptor interaction and cAMP production. [en préparation].
132. Sauvaire, Y. ; Petit, P. ; Broca, C. ; Manteghetti, M. ; Baissac, Y. ; Fernandez-Alvarez, J. ; Gross, R. ; Roye, M. ; Leconte, A. ; Gomis, R. ; Ribes, G. 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes* **1998** ; 47: 206-210.
133. Savarese, T. M. ; Fraser, C. M. In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem.J.* **1992** ; 283: 1-19.
134. Schepp, W. ; Schmidler, J. ; Riedel, T. ; Dehne, K. ; Schusdzarra, V. ; Holst, J. J. ; Eng, J. ; Raufman, J. P. ; Classen, M. Exendin-4 and exendin-(9-39)NH₂: agonist and antagonist, respectively, at the rat parietal cell receptor for glucagon-like peptide-1-(7-36)NH₂. *Eur.J.Pharmacol.* **1994** ; 269: 183-191.
135. Schertler, G. F. ; Bartunik, H. D. ; Michel, H. ; Oesterheld, D. Orthorhombic crystal form of bacteriorhodopsin nucleated on benzamidine diffracting to 3.6   resolution. *J.Mol.Biol.* **1993a** ; 234(1): 156-164.
136. Schertler, G. F. ; Villa, C. ; Henderson, R. Projection structure of rhodopsin. *Nature* **1993b** ; 362(6422): 770-772.
137. Schiffer, M. ; Edmundson, A. B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys.J.* **1967** ; 7(2): 121-135.
138. Schmidt, W. E. ; Siegel, E. G. ; Creutzfeldt, W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* **1985** ; 28: 704-707.
139. Schwarz, R. M. ; Dayhoff, M. O. Matrices for Detecting Distant Relationships. In : Atlas of protein sequences and structure / ed.Dayhoff, M. O. Washington, DC, USA :**1979** - pp. 353-358.
140. Scrocchi, L. A. ; Brown, T. J. ; McClusky, N. ; Brubaker, P. L. ; Auerbach, A. B. ; Joyner, A. L. ; Drucker, D. J. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat.Med.* **1996** ; 2: 1254-1258.
141. Shughrue, P. J. ; Lane, M. V. ; Merchenthaler, I. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* **1996** ; 137: 5159-5162.

-
142. Sreerama, N. ; Woody, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal.Biochem.* **1993** ; 209: 32-44.
143. Sreerama, N. ; Woody, R. W. Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. *J.Mol.Biol.* **1994** ; 242: 497-507.
144. Steiner, A. L. ; Parker, C. W. ; Kipnis, D. M. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J.Biol.Chem.* **1972** ; 247(4): 1106-1113.
145. Stoffel, M. ; Espinosa, R. 3d ; Le Beau, M. M. ; Bell, G. I. Human glucagon-like peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6. *Diabetes* **1993** ; 42 : 1215-1218.
146. Surewicz, W. K. ; Mantsch, H. H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim.Biophys.Acta* **1988** ; 952: 115-130.
147. Suzuki, S. ; Kawai, K. ; Ohashi, S. ; Mukai, H. ; Yamashita, K. Comparison of the effects of various C-terminal and N-terminal fragment peptides of glucagon-like peptide-1 on insulin and glucagon release from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* **1989** ; 125: 3109-3114.
148. Tamm, L. K. ; Tatulian, S. A. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q.Rev.Biophys.* **1997** ; 30(4): 365-429.
149. Tang-Christensen, M. ; Larsen, P. J. ; Goke, R. ; Fink-Jensen, A. ; Jessop, D. S. ; Moller, M. ; Sheikh, S. P. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am.J.Physiol.* **1996** ; 271: R848-R856.
150. Taniguchi, H. ; Yamashiro, Y. ; Chung, M. Y. ; Hara, Y. ; Ishihara, K. ; Ejiri, K. ; Baba, S. Vacor inhibits insulin release from islets in vitro. *J.Endocrinol.Invest.* **1989** ; 12: 273-275.
151. Thorens, B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco- incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1992** ; 89: 8641-8645.
152. Thorens, B. ; Porret, A. ; Buhler, L. ; Deng, S. P. ; Morel, P. ; Widmann, C. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin- (9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* **1993a** ; 42: 1678-1682.
153. Thorens, B. ; Waeber, G. Glucagon-like peptide-I and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM. *Diabetes* **1993b** ; 42: 1219-1225.

-
154. Thornton, K. ; Gorenstein, D. G. Structure of glucagon-like peptide (7-36) amide in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR. *Biochemistry* **1994** ; 33: 3532-3539.
155. Trumpp-Kallmeyer, S. ; Hoflack, J. ; Bruinvels, A. ; Hibert, M. Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. *J.Med.Chem.* **1992** ; 35(19): 3448-3462.
156. Tuffery, P. ; Etchebest, C. ; Hazout, S. ; Lavery, R. A new approach to the rapid determination of protein side chain conformations. *J.Biomol.Struct.Dyn.* **1991** ; 8(6): 1267-1289.
157. Tuffery, P. ; Etchebest, C. ; Popot, J. L. ; Lavery, R. Prediction of the positioning of the seven transmembrane alpha-helices of bacteriorhodopsin. A molecular simulation study. *J.Mol.Biol.* **1994** ; 236(4): 1105-1122.
158. Turton, M. D. ; O'Shea, D. ; Gunn, I. ; Beak, S. A. ; Edwards, C. M. ; Meeran, K. ; Choi, S. J. ; Taylor, G. M. ; Heath, M. M. ; Lambert, P. D. ; Wilding, J. P. ; Smith, D. M. ; Ghatei, M. A. ; Herbert, J. ; Bloom, S. R. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* **1996** ; 379: 69-72.
159. UKPDS Group. U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* **1995** ; 44: 1249-1258.
160. Unson, C. G. ; Macdonald, D. ; Merrifield, R. B. The role of histidine-1 in glucagon action. *Arch.Biochem.Biophys.* **1993** ; 300: 747-750.
161. Unson, C. G. ; Macdonald, D. ; Ray, K. ; Durrah, T. L. ; Merrifield, R. B. Position 9 replacement analogs of glucagon uncouple biological activity and receptor binding. *J.Biol.Chem.* **1991** ; 266: 2763-2766.
162. Unson, C. G. ; Wu, C. R. ; Fitzpatrick, K. J. ; Merrifield, R. B. Multiple-site replacement analogs of glucagon. A molecular basis for antagonist design. *J.Biol.Chem.* **1994a** ; 269: 12548-12551.
163. Unson, C. G. ; Wu, C. R. ; Merrifield, R. B. Roles of aspartic acid 15 and 21 in glucagon action: receptor anchor and surrogates for aspartic acid 9. *Biochemistry* **1994b** ; 33: 6884-6887.
164. Uttenthal, L. O. ; Blazquez, E. Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands. *FEBS Lett.* **1990** ; 262: 139-141.
165. Valverde, I. ; Merida, E. ; Delgado, E. ; Trapote, M. A. ; Villanueva-Penacarrillo, M. L. Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36) amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* **1993** ; 132: 75-79.

166. Vu, T. K. ; Wheaton, V. I. ; Hung, D. T. ; Charo, I. ; Coughlin, S. R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* **1991** ; 353: 674-677.
167. Waterhous, D. V. ; Johnson, W. C. Jr. Importance of environment in determining secondary structure in proteins. *Biochemistry* **1994** ; 33(8): 2121-2128.
168. Wei, Y. ; Mojsov, S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon- like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* **1995** ; 358: 219-224.
169. West, K. H. Epidemiology of diabetes and its vascular lesions. ed.Elsevier New York : Elsevier, **1978** -
170. Wettergren, A. ; Pridal, L. ; Wojdemann, M. ; Holst, J. J. Amidated and non-amidated glucagon-like peptide-1 (GLP-1): non- pancreatic effects (cephalic phase acid secretion) and stability in plasma in humans. *Regul.Pept.* **1998** ; 77: 83-87.
171. Wilmen, A. ; Goke, B. ; Goke, R. The isolated N-terminal extracellular domain of the glucagon- like peptide-1 (GLP)-1 receptor has intrinsic binding activity. *FEBS Lett.* **1996** ; 398: 43-47.
172. Wilson, G. L. ; Gaines, K. L. Effects of the rodenticide Vacor on cultured rat pancreatic beta cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **1983** ; 68: 375-379.
173. Woody, R. W. Circular dichroism of peptides. In : The Peptides / ed.Hruby, V. J. New York :**1985** - pp. 15-114.
174. Yang, J. T. ; Wu, C. S. ; Martinez, H. M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* **1986** ; 130: 208-269.
175. Zunz, E. ; La Barre, J. Contribution à l'étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancréas : relations entre les sécrétions internes et externes du pancréas. *Arch.Int.Physiol.Biochim.* **1929** ; 31: 20-44.

ANNEXES.

Liste des abréviations.

Aib :	Acide 2-aminoisobutyrique
AMPc :	Adénosine Monophosphate cyclique
ATP :	Adénosine Triphosphate
Boc :	Butoxycarbonyl
bR :	Bactériorhodopsine
CD :	Dichroïsme Circulaire
DAG :	Di-acyl-glycerol
DIPCDI :	Di-isopropylcarbodiimide
DMF :	N,N-diméthylformamide
DID :	Diabète insulino-dépendant
DNID :	Diabète non-insulino-dépendant
DO :	Densité Optique
DPC:	Dodécylphosphocholine
DPP :	Dipeptidyl-Peptidase
e1 ,e2, e3 :	Boucles extracellulaires 1, 2 et 3
ED ₅₀ :	Dose donnant 50% de l'effet
ESI-MS :	Spectrométrie de Masse à Ionisation Electro-Spray
FDA :	Food and Drug Administration
Fmoc :	9-fluorenylméthoxycarbonyl
GDM :	Diabète gestationnel (Gestational Diabetes Mellitus)
GIP :	Gastric Inhibitory Polypeptide
GLP :	Glucagon-Like Peptide
GLPr :	Récepteur au glucagon-like peptide
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GRF :	Growth hormone Releasing Factor
GRPP :	Glicentin-Related Pancreatic Peptide
HFIP :	Hexafluoroisopropanol

HOBt :	1-hydroxy-1H-benzotriazole, hydraté
HPLC :	Chromatographie Liquide à Haute Performance
HTM :	Hélice transmembranaire
i1 ,i2, i3 :	Boucles intracellulaires 1, 2 et 3
IC ₅₀ :	concentration donnant 50% de l'interaction
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IP ₃ :	Inositol triphosphate
IR-TF :	Infrarouge à Transformé de Fourier
NEP :	Neutral Endopeptidase
NOESY :	Spectroscopie nucléaire à effet Overhauser
NPY :	NeuroPeptide Y
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé (WHOs : World Health Organization study)
PACAP :	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PDB :	Protein Data Bank
PHI :	Peptide Histidine-Isoleucine
PKA :	Protéine Kinase A
Pmc :	2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
PP :	Pancreatic Polypeptide
PTH :	Parathyroïd Hormone
PYY :	Peptide Tyrosine-Tyrosine
RCPG :	Récepteur Couplé aux Protéines G
RIN T3 :	Lignée cellulaire issue d'insulinome de rat {Gazdar, A. F. <i>et al.</i> 1980}
RMN :	Résonance Nucléaire Magnétique
tBu :	Tertiobutyl
TFA :	Acide trifluoroacétique
TFE :	Trifluoroéthanol
Trt :	Trityl
VIP :	Vaso active Intestinal Peptide

Matériels et Méthodes.

Dans ces annexes, nous faisons un rappel théorique succinct, relatif aux différentes méthodes utilisées, et donnons les conditions expérimentales mises en œuvre pour chacune d'entre elle.

Tous les travaux de bio-informatique (études de séquences primaires, modélisation et dynamique moléculaire ...) ont été réalisés sur une station de travail IBM RS6000 32H™.

L'eau utilisée pour les différentes manipulations et/ou réactif est de l'eau Milli-Q (Millipore Corp., MA, USA).

I. Synthèse peptidique en phase solide.

Tous les peptides de cette étude ont été synthétisés en phase solide, et sont amidifiés sur leur partie N-terminale. Ce type de synthèse {Merrifield, R. B. 1965} consiste à greffer sur un support solide polymérique insoluble et inerte (résine), le premier acide aminé de la séquence par sa fonction carboxylique, et ce par l'intermédiaire d'un maillon (agent bi-fonctionnel).

Le couplage des autres acides aminés pour construire la chaîne peptidique se fait par réactions successives de l'acide aminé X_i sur la fonction alpha-aminée de l'acide aminé X_{i-1} (Cf. schéma général de synthèse). Ainsi, contrairement au sens classique de lecture d'une séquence primaire de peptide, la synthèse se fait dans le sens C-terminal $\rightarrow$ N-terminal.

Synthèse.

Ces réactions de polymérisations linéaires sont faites de façon automatique sur un synthétiseur peptidique, modèle PepSynthesizer 9050 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA).

L'échelle de synthèse est de 0,150 mmol. La résine utilisée est un co-polymère polyéthylène glycol-polystyrène fonctionalisé par un groupement Fmoc-PAL de substitution 0,15 meq/g. Les acides aminés (4 fois en excès) protégés sur leur fonction amine avec le groupement Fmoc sont activés sur leur fonction carboxylique par addition équimolaire de Hobb et DIPCDI (en solution 10% DMF).

Les couplages se font par passages successifs de ces solutions dans la colonne de synthèse sur des cycles étendus de 60 minutes chacun (*Figure 63*). Quelques doubles couplages peuvent être introduits au niveau des zones de synthèse délicate (essentiellement pour la synthèse des parties extracellulaires du récepteur du GLP-1, et pour les positions Arg³⁰ et Gly³¹ du GLP-1 et de ses analogues) sur des durées de 30 minutes chacun.

La déprotection des acides aminés (élimination du groupement N-Fmoc) se fait par une solution de pipéridine à 20% dans le DMF.

Pour finir la synthèse, on déprotège le groupement amine terminal du dernier acide aminé. A ce stade, le peptide qui est toujours lié à la résine, et protégé sur les chaînes latérales des différents acides aminés, est séché sous vide environ 8 heures.

Déprotection.

Le résidu sec est mis en solution dans du réactif B : TFA 88%, phénol 5%, triisopropylsilane 2% , qsp eau) pour séparer le peptide de la résine et déprotéger les chaînes latérales.

Les groupements protecteurs des chaînes latérales réactives utilisés pour les synthèses, en stratégie Fmoc, sont tBu (pour Ser, Thr, Asp, Glu, Tyr), Boc (pour Lys), Trt (pour His, Cys, Asn, Gln) et Pmc (pour Arg).

S'il y a plus d'une Arg dans le peptide on utilisera le réactif K {King, D. S. *et al.* 1990} : TFA 82.5%, phénol 5%, thioanisole 5%, éthanedithiol 2.5%, qsp eau.

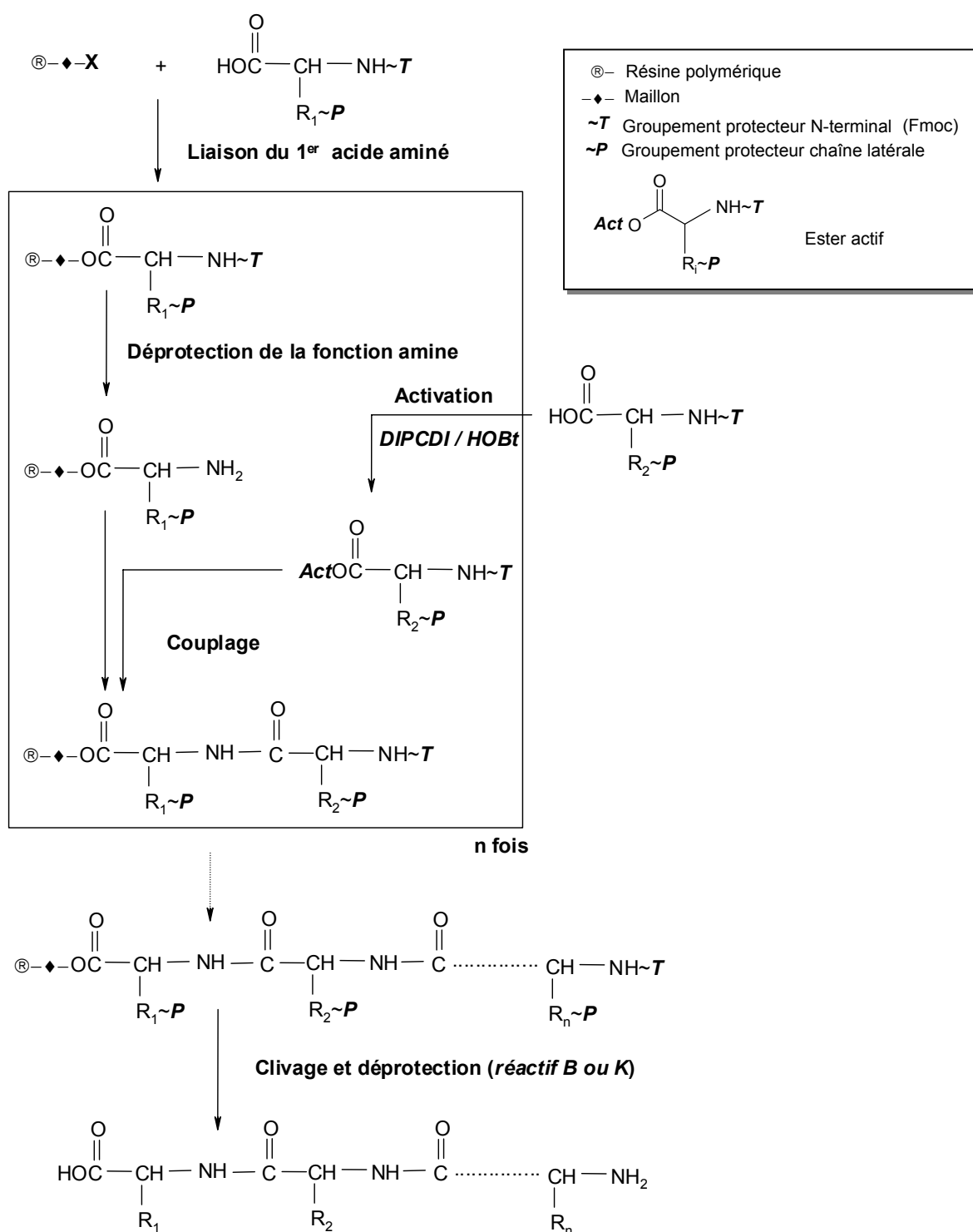


Figure 63. Schéma général de la synthèse peptidique en phase solide, en chimie Fmoc..

Cette solution mise sous agitation douce environ 10 heures est ensuite filtrée sur laine de verre dans 100ml de diéthyléther et refroidie à 0°C pendant une demi-heure. Le précipité sera centrifugé 25min. à 3000trs/min., à 4°C, puis lavé au diéthyléther, et à nouveau centrifugé (20 min. à 3000 trs/min., 4°C). La dernière étape consiste en un séchage sous vide du précipité.

On obtient ainsi un peptide, que l'on doit purifier pour éliminer les résidus de synthèse et les peptides de délétion.

Purification.

Chaque peptide est purifié par HPLC préparative sur colonne ΔPack C18 (300Å, 1.9 x 300 cm, Waters, Milford, MA, USA), en utilisant différents gradients linéaires : eau à 0.1% TFA / acétonitrile à 0.08% TFA. La détection se fait à 220nm. Le gradient par défaut évolue de 0 à 80% acétonitrile (0.08% TFA) en 40 minutes.

On pourra aussi utiliser une colonne Poros R3 (30 μm) « *Customized Packing* » (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) pour de petites quantités de peptide, avec un gradient de 10min. Les différentes fractions collectées sont lyophilisées.

Identification et contrôle.

La pureté des fractions collectées est établie par HPLC analytique sur colonne Lichrosphere-100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Allemagne), et par spectrométrie de masse par ionisation positive electrospray (Cf. paragraphe suivant).

Pour tous les peptides synthétisés, l'analyse des acides aminés et les spectres de masse sont en accord avec les structures proposées.

Réactifs utilisés

Tous les réactifs utilisés pour la synthèse peptidique, ainsi que les différents acides aminés proviennent de la Société PerSeptive Biosystems (Framingham, MA, USA), exception faite du HoBt qui provient de Calbiochem-Novabiochem Ltd. (La Jolla, CA, USA).

Les réactifs de déprotection B ou K sont préparés extemporanément, avec les composés suivants : TFA (*peptide grade*) acheté chez SDS (Peypin, France), phénol solide, triisopropylsilane, ou thioanisol et éthane dithiol de marque Fulka provenant de la Société Sigma-Aldrich (S^t Quentin Fallavier, France).

Le diéthylether provient de SDS (Peypin, France).

L'acétonitrile et le TFA (qualité HPLC) utilisés pour les chromatographies proviennent de la Société SDS (Peypin, France).

II. Spectrométrie de masse en électrospray.

Principe.

La spectrométrie de masse en ionisation par électrospray est basée sur la production d'ions multichargés en phase gazeuse à partir d'échantillons en solution. Ces ions sont ensuite séparés et analysés.

Une solution injectée dans le spectromètre transite à flux constant par un capillaire en acier, jusqu'à la source où va se produire l'ionisation. On produit une différence de potentiel entre le capillaire métallique et une contre électrode. Cette DDP est d'environ 3kV en électrospray positif (ESI-MS). A la sortie du capillaire, il y a nébulisation donnant naissance à un nuage de fines gouttelettes chargées.

Sous un flux d'azote chauffé, le solvant s'évapore et entraîne donc une diminution du diamètre des gouttelettes, qui voient ainsi leur densité de charge de surface s'accroître. Lorsque la limite de Rayleigh (répulsion électrostatique > tension superficielle) est atteinte, la répulsion des charges provoque « l'explosion coulombienne », donnant naissance à des gouttelettes filles ... Ce cycle est répété plusieurs fois. Au final on obtient des gouttes si petites que le rapport de leur densité de charge et de leur fort rayon de courbure induit un champ électrique intense, provoquant la désorption des ions dans la phase gazeuse.

Les ions ainsi obtenus sont analysés par un quadrupôle. On applique une tension $U + V \cos \omega t$ (U tension alternative, et V amplitude d'une tension de fréquence $2\pi f$) sur les deux premières électrodes, alors que la polarité est inversée sur les deux suivantes qui sont en opposition de phase par rapport aux premières électrodes (*Figure 64*).

L'amplitude V demeure constante. Pour chaque couple U et V, seul un ion possédant un certain rapport masse sur charge (m/z) et traversant ces tensions perpendiculaires, présente une trajectoire stable et définie.

Les différents ions émergeant ainsi du quadrupôle atteignent le détecteur et produisent une cascade d'électrons qui amplifie le signal, ensuite analysé par un ordinateur.

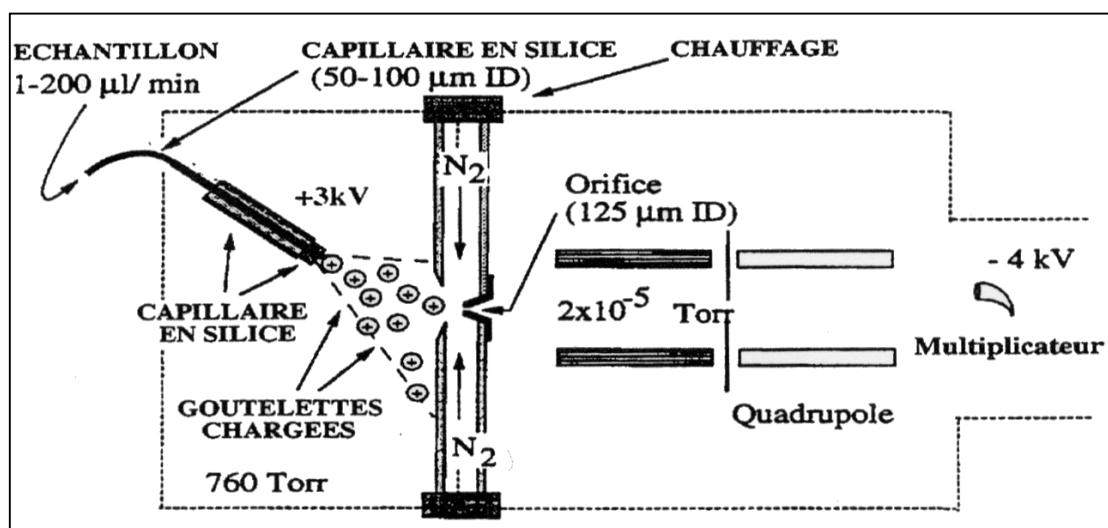


Figure 64. Fonctionnement du spectromètre de masse.

Nature des ions multichargés et spectres de masse.

De façon générale, on retiendra que tout peptide (M) possède deux catégories d'acides aminés ionisables :

- * les résidus basiques possédant un groupement NH₂ tertiaire (Lys, Arg, His) et à un degré moindre (Gln, Asn), la Pro et le α-NH₂.
- * les résidus acides : Asp, Glu, et le α-COOH.

L'ESI-MS produit des espèces multichargées ayant capté n protons : $M + nH^+$.

Le spectre représentatif sera une série de pics consécutifs $(M+n)/n$ séparés par une unité. La répartition gaussienne des pics est en théorie centrée sur l'espèce multichargée la plus abondante. A l'aide de deux pics adjacents de masse m_1 et m_2 ($m_2 > m_1$) correspondant à deux ionisations consécutives n_1 et n_2 ($n_2 < n_1$) du peptide, il est possible de calculer la masse de la molécule (Cf. Figures 65 et 66 données pour la myoglobine de cœur de cheval, utilisée pour l'étalonnage du spectromètre).

La déconvolution du spectre brut conduit à un spectre transformé dont le pic unique donne la masse du peptide.

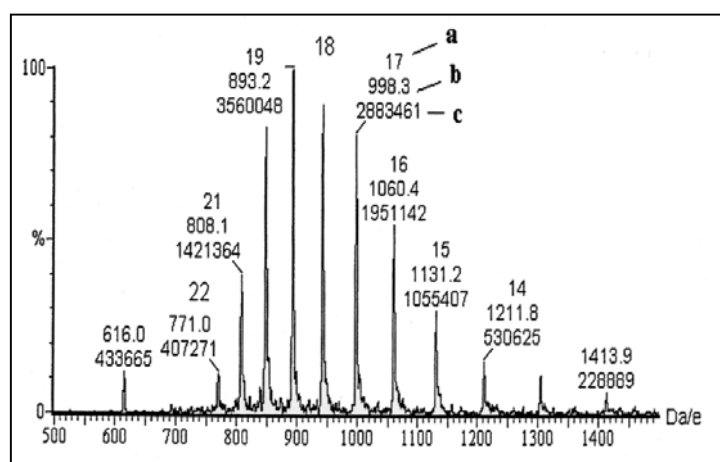


Figure 65. Spectre brut de la myoglobine de cheval. Représentation gaussienne des pics consécutifs $(M+n)/n$, centrée sur l'espèce la plus abondante. (a) nombre d'ionisation, (b) masse/charge, (c) abondance relative de l'espèce.

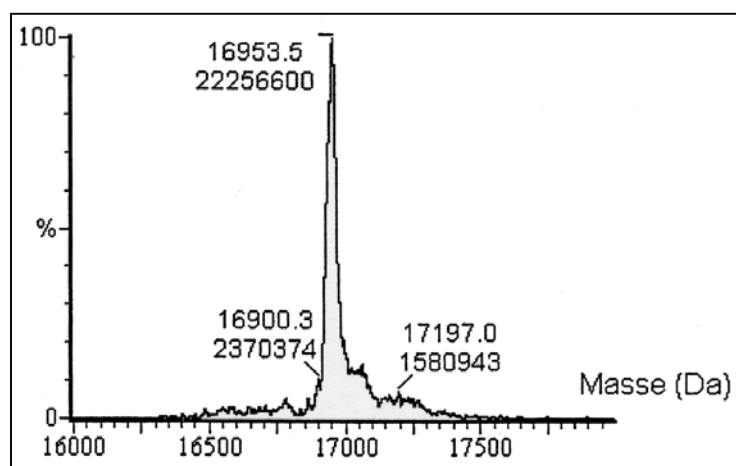


Figure 66. Spectre transformé de la myoglobine de cheval, donnant la masse du peptide.

Procédure expérimentale.

Les spectres sont obtenus par l'utilisation d'un VG Trio 2000 (Fison VG, Manchester, Royaume Uni) doté d'une source électrospray à pression atmosphérique et d'une interface utilisant un capillaire de 75 μm de diamètre interne.

Les masses ont été analysées à travers un quadrupôle possédant une capacité maximale d'analyse de 3000 Th (le thompson est l'unité du rapport m/z).

Les spectres de masse ont été scannés de 600 à 1900 Th en 10 secondes. Le spectre final est la superposition de 15 acquisitions.

Les échantillons issus d'une HPLC sont injectés tel quels, alors que les échantillons solides seront solubilisés dans différents solvants vecteurs suivant les cas : acétonitrile-eau (50/50, v/v), méthanol-eau (20/80, v/v), ou acétate d'ammonium 5 mM, pH 6.

Les instruments de contrôle, d'acquisition des données, utilisent le programme VG LabBase fourni avec le spectromètre de masse. La transformation du spectre brut (m/z) en poids moléculaire réel est réalisée à l'aide du programme MassLynx (Fisons Instruments, Manchester, Royaume Uni).

Après soustraction du bruit de fond, les spectres bruts sont analysés avec une résolution de 0,5 Da par canal et une largeur des pics à mi-hauteur égale à 5 Da.

III. Tests in vitro.

Ces différents tests ont été réalisés par le Dr. A. KERVRAN et son équipe (INSERM U376, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France)

Cultures Cellulaires et préparation de membranes.

Les cellules RIN T3 {Gazdar, A. F. *et al.* 1980} (provenant du Dr. PRADAYROL, INSERM U151, Toulouse, France) sont mises en culture dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) à 5.5 mM de glucose (Life Technologies, Eragny, France) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 100 IU/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine {Gros, L. *et al.* 1993}.

Les membranes plasmiques de RIN T3 ont été préparées selon la méthode précédemment décrite {Gros, L. *et al.* 1993}, et stockées à -80°C jusqu'à utilisation. Les protéines membranaires ont été mesurées par la méthode de Bradford, utilisant la BSA (*Bovin Serum Albumin*) comme standard {Bradford, M. M. 1976}.

Etudes de liaison au récepteur.

Les études de liaison avec les membranes de RIN T3 ont été réalisées dans un tampon Tris-HCl 60 mM, pH 7.5, contenant 4% de BSA et 750 µg/ml de bacitracine. Les membranes (20 – 30 µg) sont incubées dans un volume final de 500 µl avec le ligand marqué [¹²⁵I-GLP-1-(7-37), 50 000 cpm] et le ligand compétiteur froid ou les analogues, pendant 45 minutes à 37°C, comme décrit précédemment {Gros, L. *et al.* 1993}. La réaction est stoppée par addition de 750 µl de tampon KRP (Krebs-Ringer Phosphate) à 4°C, pH 7.5 contenant 3% de BSA, puis centrifugée à 12000 g, 5 minutes à 4°C. Le culot est rincé avec 1 ml de tampon KRP à 4°C et sédimenté par une autre étape de centrifugation. La radioactivité est mesurée par un compteur gamma. La liaison non-spécifique est déterminée en présence de 1 µM de GLP-1-(7-37) et soustraite à chaque valeur. Les manipulations, pour chacun des analogues, ont été réalisées sur deux expériences indépendantes, réitérées chacune deux fois.

Les données sont analysées par le programme Ligand (version 2.0, 1990, Biosoft). Les valeurs d'IC₅₀ (concentrations causant 50% d'inhibition de la liaison maximale) sont déduites des données

expérimentales par représentation de Scatchard et par régression selon l'équation de Hill. L'affinité de liaison est exprimée comme le ratio de l'IC₅₀ du GLP-1-(7-37) sur celle de l'analogue.

Production d'AMPc.

Les cellules RIN T3 sont mises en culture pendant 6 jours dans des boîtes 24 puits et le milieu est changé 1 jour avant l'expérimentation. Les cellules ($0.30 \pm 0.03 \times 10^6$ cellules/puits ; n=10) sont lavées 2 fois avec le DMEM, avant ajout de 0.5 ml complété de 1% de BSA et 0.2 mM d'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), et contenant le peptide à tester. Après 20 minutes d'incubation à 25°C, l'AMPc cellulaire est extrait, succinylé et quantifié par dosage radio-immunologique {Steiner, A. L. *et al.* 1972}. Les manipulations, pour chacun des peptides, ont été réalisées sur trois expériences indépendantes, répétées chacune deux fois.

Les données sont présentées comme un pourcentage de la stimulation maximale. Une production de 100% d'AMPc correspond à la production maximale obtenue avec 10^{-8} M de GLP-1-(7-37), et 0% correspond à la production basale en l'absence de GLP-1-(7-37) ou d'analogues au GLP-1. Les valeurs d'ED₅₀ (concentrations nécessaires pour obtenir la moitié de la stimulation maximale) sont calculées à partir de l'équation de Hill. L'activité relative est le ratio de l'ED₅₀ pour le GLP-1-(7-37) sur celui de l'analogue.

Réactifs utilisés.

La bacitracine, la BSA (fraction V), l'AMPc-Tyr¹, et l'IBMX proviennent de Sigma Chemical Co. (St Quentin Fallavier, France). DuPont NEN (Melchelen, Belgique) nous fournit le Na[¹²⁵I] (2000 Ci/mmol).

Le GLP-1-(7-37) amide mono-[¹²⁵I] marqué et l'AMPc-Tyr¹ mono-[¹²⁵I] marqué sont obtenus par la procédure chloramine-T et purifiés par HPLC en phase inverse sur une colonne C₁₈ µBondapak (Millipore, Milford, MA, USA).

IV. Dichroïsme circulaire.

Les mesures de dichroïsme circulaire (CD) ont été faites au Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels (CNRS URA 1465, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France).

Le dichrographe utilisé est le CD6 de Jobin-Yvon.

Principes de base.

Le dichroïsme circulaire est une mesure de la différence entre les coefficients d'extinction des deux lumières polarisées circulairement droite et gauche {Crabbe, P 1968}.

Pour une molécule chirale (tous les acides aminés, exception faite de la Gly), qui possède un carbone alpha asymétrique, on parle de notion de biréfringence : indice de réfraction de la lumière, différent selon l'onde polarisée droite ou gauche. Cette absorption différente selon l'onde polarisée donne, pour un composé chiral, une polarisation elliptique caractérisée par l'ellipticité Θ :

$$\operatorname{tg} \Theta = \frac{E_D - E_G}{E_D + E_G} = \frac{\frac{E_D}{E_G} - 1}{\frac{E_D}{E_G} + 1}$$

E est la somme des polarisations rectilignes de même amplitude en quadrature de phase, soit droite E_D soit gauche E_G .

Si I_0 est l'intensité lumineuse incidente, et A l'absorbance (droite ou gauche) pour l'onde polarisée on aura les intensités transmises :

$$\begin{cases} I_D = I_0 \cdot 10^{-A_D} \\ I_G = I_0 \cdot 10^{-A_G} \end{cases} \quad \text{avec } \Delta A = A_G - A_D \quad \text{d'où } \frac{E_D}{E_G} = \sqrt{\frac{I_D}{I_G}} = 10^{\left(\frac{\Delta A}{2}\right)}$$

$$\Rightarrow \operatorname{tg} \Theta = \frac{10^{\frac{\Delta A}{2}} - 1}{10^{\frac{\Delta A}{2}} + 1} = \frac{2.3 \frac{\Delta A}{2}}{2} \quad \text{puisque } \begin{cases} \Delta A \ll 1 \Rightarrow 10^{\frac{\Delta A}{2}} \approx e^{2.3 \frac{\Delta A}{2}} \\ e^x \approx 1 + x \text{ si } x \ll 1 \end{cases}$$

De plus comme Θ est en radian et très petit, on a $\operatorname{tg} \Theta \approx \Theta$, et intégrant la loi de Beer Lambert ($\Delta A = \Delta \epsilon c l$), on en déduit la valeur de l'ellipticité :

$$\Theta \approx \frac{2,3}{4} C.l.\Delta\epsilon \quad \text{où l'on rappelle que} \quad \begin{cases} C \text{ est la concentration} \\ l \text{ est le chemin optique} \\ \Delta\epsilon \text{ est exprimé en l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1} \end{cases}$$

Ainsi on définit l'ellipticité molaire $[\Theta]$ exprimée en $\text{d}^\circ.\text{cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ par l'expression :

$$[\Theta] = \frac{100 \Theta}{C.l} = \frac{2,3 \times 100}{4} \Delta\epsilon \times \frac{180}{\pi} \quad \text{soit} \quad \boxed{[\Theta] = 3300 \Delta\epsilon}$$

L'ellipticité moyenne par résidu sera le rapport de $[\Theta]$ par le nombre d'acides aminés de la séquence (n).

Quelles que soient leurs structures, tous les peptides possèdent un spectre de CD révélant une transition électronique $n \rightarrow \pi^*$ intense autour de 220 nm et une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ intense vers 190 nm {Woody, R. W. 1985}.

Mais la structure du peptide elle-même (angles de torsions différents selon la structure secondaire) exerce une influence sur les transitions électroniques et donc sur la position des *extrema*. Le spectre de dichroïsme circulaire est ainsi caractéristique des structures secondaires globales contenues dans un peptide {Yang, J. T. *et al.* 1986 ; Chen, Y. H. *et al.* 1974 ; Greenfield, N. *et al.* 1969}.

Une hélice α pure est caractérisée par trois *extrema* à 193, 207 et 222 nm. Pour une hélice droite les *extrema* de l'ellipticité à 207 et 222 nm sont négatifs, alors que celui à 193 est positif. C'est l'inverse pour une hélice gauche. Les bandes observées aux faibles longueurs d'ondes (193 et 207 nm) proviennent de la séparation en deux composantes, une parallèle et une perpendiculaire, de la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$. La bande avoisinant les 220 nm est caractéristique de la transition $n \rightarrow \pi^*$.

Les feuillets β sont caractérisés par deux bandes, dont l'une est centrée autour de 215 – 218 nm ($n \rightarrow \pi^*$) et l'autre à 195 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), respectivement négative et positive pour les peptides ne contenant que des acides aminés lévogyres (L).

Les coudes β (β -turn) donnent lieu à une grande diversité de spectres, rendant difficile leur interprétation. Cependant, le spectre d'un peptide structuré en coude β montre généralement deux bandes d'absorption : une négative autour de 205 nm et une autre positive centrée sur 220 nm.

Les chaînes statistiques (*random coil*) sont caractérisées par une bande d'absorption négative vers 198nm, et par une seconde, d'amplitude variable, positive ou négative, aux alentours de 220nm.

La nature physico-chimique de la solution (pH, solvant, force ionique, température ...) influence fortement la conformation des peptides, et par conséquent le spectre de dichroïsme circulaire.

Procédure expérimentale.

Les expériences sont réalisées à une vitesse de 0.1 nm/0.2 sec., dans la gamme 190 à 270 nm, dans une cuve en quartz de chemin optique 0.1 cm, et à une température de 20°C. Sauf spécifications particulières, les peptides sont étudiés à une concentration de 5.10^{-5} M dans un tampon phosphate 10 mM, pH 7.35. Certains spectres sont mesurés en présence de TFE provenant de Sigma (S^t Quentin Fallavier, France).

Tous les spectres correspondent à la moyenne de quatre mesures séparées, et sont corrigés de la ligne de base (spectre du tampon sans peptide). Les quantités des différentes structures secondaires ont été estimées selon la méthode déjà décrite {Greenfield, N. *et al.* 1969}. Pour le calcul des pourcentages de chacune des structures secondaires présentes dans un peptide, les données brutes des spectres de CD sont transformées par un programme (« macro Microsoft-Excel 97 ») et intégrées dans le logiciel Dicroprot (version 2.4, par G. DELEAGE, IBCP, Lyon, France). La régression obtenue est basée sur la méthode des moindres carrés de Gauss-Jordan.

V. L'infrarouge à transformée de Fourier.

Principe.

Un faisceau infrarouge dirigé sur une molécule a pour effet de provoquer des vibrations au niveau des liaisons de cette molécule. Les énergies de liaison qui sont modifiées, donnent lieu à un changement dans leur fréquence de vibration. Ces fréquences de vibrations peuvent être détectées sur un spectromètre infrarouge. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier {Griffiths, P. R. *et al.* 1986} utilise un dispositif appelé interféromètre, dérivé d'un système inventé par A. Michelson. L'interféromètre de Michelson est constitué d'une séparatrice et de deux miroirs dont l'un est mobile. Le spectromètre est muni également d'une source polychromatique et d'un détecteur.

Les spectres d'absorption infrarouge des peptides et protéines comprennent non seulement les bandes d'absorption correspondant aux modes de vibrations des acides aminés, mais aussi les bandes caractéristiques de la liaison peptidique appelées bandes amides {Jackson, M. *et al.* 1995 ; Surewicz, W. K. *et al.* 1988}. Il existe sept bandes amides mais la plus utilisée pour étudier la structure des protéines est la bande amide I. Il existe deux principaux types de vibrations, celles résultant d'une elongation et celles résultant d'une déformation angulaire de la liaison C=O de la liaison peptidique. La fréquence exacte de ces vibrations dépend de la liaison hydrogène présente entre le C=O et le NH qui dépend, à son tour, de la structure secondaire de la protéine étudiée. Cette relation fréquence-structure, mise en évidence pour la première fois en 1950 {Elliot, A. 1954 ; Elliot, A. *et al.* 1950}, permet d'attribuer à chaque conformation des bandes caractéristiques.

Structure	Fréquence Amide I	Fréquence Amide II
Hélice α	1648-1660	1540-1550
Feuillet β + antiparallèle	1625-1640 +1675-1695	1520-1530
Chaîne statistique	1665 ou <i>1652-1640</i>	1550
Hélice 3_{10}	1660-1670	1545
Coude β	1663,1688,1694 ou <i>1660-1685</i>	1530

Tableau 11. Relation entre les fréquences amide I et II et la structure secondaire des peptides et des protéines {Jackson, M. *et al.* 1995}. Les valeurs en italiques, plus générales proviennent d'autres études {Tamm, L. K. *et al.* 1997}.

Le spectre IR-TF d'une hélice α est caractérisé dans la région amide I par une bande vers 1655 cm^{-1} , celui des feuillets β entre 1630 et 1640 cm^{-1} avec une bande supplémentaire vers 1680 cm^{-1} pour les feuillets antiparallèles. Dans le cas d'une structure désordonnée (chaîne statistique), cette technique se révèle moins sensible mais une bande vers 1660 cm^{-1} est généralement attribuée à cette forme.

Procédure expérimentale.

Les mesures de spectres infrarouges à transformée de Fourier (IR-TF) ont été réalisées sur spectromètre Bruker IFS 28 équipé d'un détecteur DTGS. Les spectres (1000 ou 500 scans) sont enregistrés sur prisme de Germanium à une résolution spectrale de 4 cm^{-1} . Les spectres enregistrés à partir de solutions sont effectués sur une cuve horizontale ATR (Réflexions totales atténuées) comprenant un prisme de sélénium de zinc avec un angle d'entrée du faisceau de 45° permettant 10 réflexions. Les solutions peptidiques de concentration comprise entre 5.10⁻⁵ M et 10⁻³ M sont préparées dans un tampon phosphate 10 mM , pH 7.35. Le programme OPUS/IR2 de Bruker est utilisé pour l'analyse des spectres. La bande amide I complexe observée pour chaque peptide est décomposée par un programme de régression. La position des bandes pour la dernière régression est déterminée à partir de la dérivée seconde du spectre. L'estimation des contributions de chaque pic de la région amide I est obtenue à partir du calcul des aires, selon l'algorithme de Levenberg-Marquardt.

VI. Fluorescence.

Principe.

Une molécule, sous l'effet d'une irradiation lumineuse, passe de l'état fondamental à l'état excité. Plusieurs transitions sont alors possibles pour le retour à l'état initial, avec ou sans émission de photons, parmi lesquelles se trouvent la phosphorescence si le retour à l'état initial passe par un état triplet et la fluorescence si l'état intermédiaire est un état singulet (*Figure 67*). Cette fluorescence est modifiée par l'environnement du chromophore. L'équation de Lippert, mettant en jeu notamment la constante diélectrique du milieu, établit cette relation :

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f \approx \frac{2}{hc} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu^* - \mu)^2}{a^3} + \text{constante}$$

avec : μ^* , μ = moments dipolaires de l'état fondamental et excité

ν_a , ν_f = nombre d'onde (cm^{-1}) de l'absorption et de l'émission

n = indice de réfraction

ε = constante diélectrique

a = rayon de la cavité contenant le fluorophore

h = constante de Planck

c = vitesse de la lumière

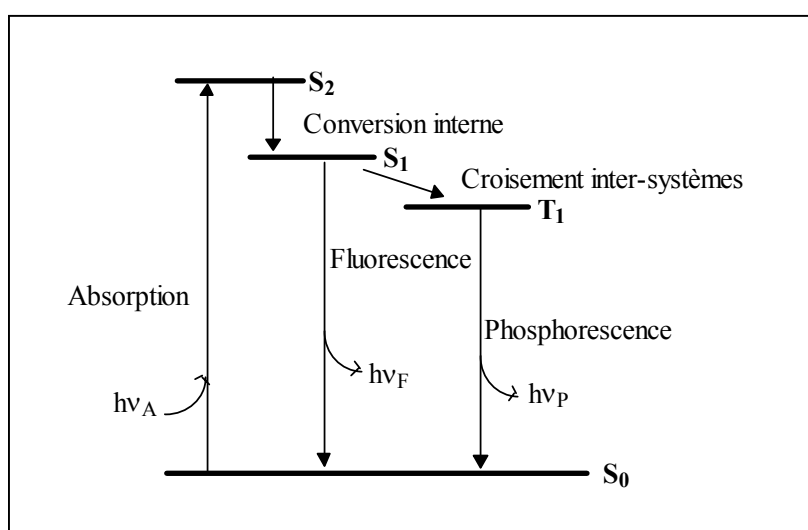


Figure 67. Diagramme de Jablonski - Transitions permettant le retour de l'état excité à l'état initial (S₀) (S : état singulet, T : état triplet).

Les peptides et protéines peuvent être étudiés grâce à la présence soit de groupements fluorescents intrinsèques (Phe, Tyr et surtout le Trp) soit de groupements fluorescents extrinsèques greffés par synthèse. L'étude de la fluorescence de ces molécules permet de déterminer les interactions peptide-peptide et la présence de poches hydrophobes.

La fluorescence de certains chromophores intrinsèques est très sensible à l'environnement dans lequel ils se trouvent et particulièrement à la polarité du milieu. Ainsi, le passage du chromophore d'un milieu polaire à un milieu apolaire se traduit par une exaltation de l'intensité de fluorescence ainsi qu'un déplacement de la longueur d'onde d'émission. Les peptides possédant un résidu Trp sont des molécules de choix pour l'étude des interactions. En effet, le transfert de ce chromophore d'un environnement polaire (le solvant) dans un cluster hydrophobe entraîne une modification de l'intensité et de la longueur d'onde du maximum sa fluorescence. Ces modifications mettent en évidence les interactions pouvant exister.

Plusieurs processus peuvent provoquer l'extinction de fluorescence ou « *quenching* » d'un chromophore : réaction à l'état excité, transfert d'énergie, formation d'un complexe ou encore extinction collisionnelle. Ils se traduisent par une diminution du rendement quantique de fluorescence de la substance observée. Les deux types d'extinction de fluorescence les plus étudiés sont d'une part, celui qui résulte de la collision entre l'extincteur de fluorescence « *quencher* » et le chromophore, appelé extinction collisionnelle ou dynamique, et d'autre part, celui résultant de la formation d'un complexe non fluorescent entre ces deux entités, appelé extinction de fluorescence statique. Les deux mécanismes impliquent le contact entre l'extincteur et le chromophore, ce qui permet de localiser les molécules étudiées par caractérisation de l'accessibilité du fluorophore à l'extincteur de fluorescence. De nombreuses molécules présentent cette propriété d'éteindre la fluorescence d'un chromophore. Ainsi, la molécule d'oxygène éteint la fluorescence de la majorité des chromophores

Procédure expérimentale.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre Spex-fluorolog modèle 1681 (Jobin-Yvon) à 25°C à une concentration en peptide de $5 \cdot 10^{-5}$ M. La longueur d'onde d'excitation est 290 nm et le spectre d'émission est enregistré entre 300 et 400 nm avec une ouverture de fentes de 4 mm.

Table des illustrations.

Les figures.

Figure 1. Structure de la metformine.	12
Figure 2. Structures du tolbutamide et de la chlorpropamide, hypoglycémiant de première génération..	13
Figure 3. Structures de quelques sulfonylurées hypoglycémiantes de deuxième génération.	13
Figure 4. Structure de l'acarbose.....	15
Figure 5. Structure du miglitol.	15
Figure 6. Structure de la troglitazone.	16
Figure 7. Structure du glimépiride.	17
Figure 8. Structure du répaglinide.....	17
Figure 9. Structure de la 4-hydroxyisoleucine.	18
Figure 10. Structure de l'orlistat.	19
Figure 11. Structure de l'aminoguanidine.....	19
Figure 12. Structures du pyriminil et de la pentamidine.	20
Figure 13. Arbre décisionnel concernant le traitement du diabète non-insulino-dépendant.	22
Figure 14. Ala-scan du GLP-1-(7-36). Perte d'efficacité par rapport au peptide natif.....	32
Figure 15. A/ Position des éléments structuraux dans la séquence du GLP-1 selon Thornton et Gorenstein. B/ Modèle minimisé du GLP-1.	33
Figure 16. Projection d'Edmundson du GLP-1-(7-37) montrant le caractère amphipatique des deux hélices 14-20 et 24-36.....	34
Figure 17. Vue latérale des potentiels de lipophilie positifs et négatifs du GLP-1-(7-37) amide ne milieu micellaire.	35
Figure 18. Conformation repliée du GLP-1-(7-36) amide après 250 ps de dynamique en conditions périodiques.	36
Figure 19. Représentation du mouvement moléculaire lors d'une simulation de 250 ps à partir de la conformation étendue du GLP-1-(7-36) amide.....	37

Figure 20. Substitutions en position 7. Déplacement de $^{125}\text{IGLP-1-(7-37)}$ fixé sur des membranes de cellules RIN T3.	44
Figure 21. Substitutions en position 7. Production d'AMPc.	44
Figure 22. Substitutions en position 8. Déplacement de $^{125}\text{IGLP-1-(7-37)}$ fixé sur les membranes de cellules RIN T3.	47
Figure 23. Substitutions en position 8. Production d'AMPc.	47
Figure 24. Substitutions en position 9. Déplacement de $^{125}\text{IGLP-1-(7-37)}$ fixé sur des membranes de cellules RIN T3.	49
Figure 25. Substitutions en position 9. Production d'AMPc.	49
Figure 26. Structures des analogues rétro-énantiomères et relations stéréochimiques avec le peptide natif.	53
Figure 27. Spectre IR-TF du HBGLP-1-(7-37) en tampon phosphate 10 mM, pH 7.37.	56
Figure 28. Spectre de dichroïsme circulaire de composés modèles synthétiques supposés exister sous forme de conformations « pures ». Redessiné à partir de Brahms et Brahms {Brahms, S. et al. 1980}.	62
Figure 29. Spectres CD enregistrés en tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 7.35) de l'exendine-4 et du GLP-1-(7-36).	63
Figure 30. Déconvolution du spectre CD de GLP-1-(7-37) à l'aide des différents modèles de « fit » par les moindres carrés contenus dans le logiciel Dicroprot.	64
Figure 31. CD des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 7.	66
Figure 32. CD des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 8.	66
Figure 33. CD des analogues du GLP-1-(7-37) modifiés en position 9.	67
Figure 34. CD des analogues du GLP-1-(7-37) dépourvus de Arg ³⁶	67
Figure 35. Spectres CD du GLP-1-(7-37) et de quelques analogues dans le mélange TFE-eau (30-70, V-V).	68
Figure 36. Structure bioactive supposée du GLP-1-(7-37).	70
Figure 37. Vue stéréographique de la structure du GLP-1-(7-37) déduite de la dynamique moléculaire sous contraintes de distance (en micelle DPC). Reproduction de {Thornton, K. et al. 1994}.	73
Figure 38. Structure et nomenclature des RCPG.	77
Figure 39. Carte d'électrodensité de la bactériorhodopsine.	80
Figure 40. Cartes d'électrodensité à une résolution de 9 Å : (a) rhodopsine, (b) bactériorhodopsine. Vue intracellulaire.	83
Figure 41. Séquence primaire du GLPr humain. Les 6 Cys conservées au sein du groupe 2 des RCPG, ainsi que la séquence -R-L-A-K- susceptible de se coupler à la protéine G sont surlignées.	87
Figure 42. Dendrogramme des séquences des récepteurs du groupe 2 des RCPG et de la bR.	88
Figure 43. Alignement des RCPG étudiés. Les hélices présumées sont surlignées.	89
Figure 44. Profil d'hydropathie du GLPr humain selon Kyte-Doolittle et Goldman et al.	90

Figure 45. Evolution des séquences consensus hélice par hélice, parmi un échantillon variable (70 à 95%) des 15 récepteurs étudiés.	91
Figure 46. Conservation des séquences des HTM en fonction du consensus.	92
Figure 47. Représentation de la tendance amphipatique des hélices du GLPr-humain.	94
Figure 48. Modèle du GLPr humain. Seules sont représentées les chaînes latérales de forte hydrophilie, conservées ou non dans le consensus à 95%.	96
Figure 49. Comparaison de la localisation des hélice du GLPr humain (1) SWISS-PROT P43220 et (2) exposées précédemment.	99
Figure 50. Superposition des deux nouveaux modèles construits selon la bR ou la rhodopsine bovine (vue extracellulaire).	99
Figure 51. Spectres de dichroïsme circulaire pour les différentes boucles extracellulaires du GLPr.	101
Figure 52. Schématisation du GLPr représentant les parties du récepteur synthétisées.	103
Figure 53. Etude de fluorescence pour les complexes GLP-1:e1 et GLP-1:e2.	104
Figure 54. Spectres de fluorescence pour les différents complexes GLP-1:e1 et GLP-1:e2.	105
Figure 55. Spectres de fluorescence pour les différents mélanges GLP-1:e3.	106
Figure 56. Alignement des séquences des boucles e1 du récepteur du GLP-1 (e1_GLPr) et du récepteur au glucagon (e1_GLR).	107
Figure 57. Etude de fluorescence pour les complexes GLP-1:Nt-GLPr.	109
Figure 58. Comparaison des intensités de fluorescence pour les peptides (GLP-1 et Nt-GLPr) seuls, et le complexe 1:1.	109
Figure 59. Spectres de CD du GLP-1, du Nt-GLPr et du complexe 1:1 de ces deux peptides.	110
Figure 60. Séquence primaire du GLPr. Les séquences synthétisées pour cette étude sont surlignées. La zone soulignée représente la séquence Nt-GLPr précédemment synthétisée. L'hélice présumée HTM 1 est représentée en rouge.	111
Figure 61. Etude de la liaison du GLP-1 et des différents fragments du récepteur GLPr sur le GLPr.	112
Figure 62. Production d'AMPc induite par les parties synthétiques du GLPr en comparaison avec le GLP-1. ...	113
Figure 63. Schéma général de la synthèse peptidique en phase solide.	vi
Figure 64. Fonctionnement du spectromètre de masse.	x
Figure 65. Spectre brut de la myoglobine de cheval. (a) nombre d'ionisation, (b) masse/charge, (c) abondance relative de l'espèce.	xi
Figure 66. Spectre transformé de la myoglobine de cheval.	xi
Figure 67. Diagramme de Jablonski - Transitions permettant le retour de l'état excité à l'état initial (S_0) (S : état singulet, T : état triplet).	xx

Les tableaux.

Tableau 1. Principaux peptides issus du proglucagon.....	24
Tableau 2. Séquences primaires des différentes formes de GLP-1.	24
Tableau 3. Séquences primaires des deux formes actives du GLP-1 comparées à celles d'autres peptides de la famille du GRF, et comparées à celles de l'exendine.	25
Tableau 4. Séquences des fragments générés par action de la NEP 24.11 sur le GLP-1-(7-36).	31
Tableau 5. Séquences des analogues du GLP-1-(7-37) mutés en position 7, 8 et 9 synthétisés dans ce travail. Les mutations sont représentées par des caractères gras. On donne également la séquence de l'exendine-4, agoniste naturel du GLP-1.	39
Tableau 6. Séquences des analogues du GLP-1-(7-37) contenant des mutations dans la partie centrale.....	40
Tableau 7. Activité biologique <i>in vitro</i> du GLP-1-(7-37), de l'exendine-4 et des analogues substitués en position 7, 8 et 9, synthétisés dans ce travail.....	42
Tableau 8. Activité biologique d'analogues du GLP-1-(7-37) contenant des mutations dans la partie centrale de la molécule.	51
Tableaux 9. Etudes de stabilité et de détermination de l'activité <i>in vivo</i> des peptides sélectionnés parmi les plus actifs et décrits dans le brevet {Calas, B. et al. 1998}. A) Stabilité <i>in vitro</i> ; % de produit inchangé en présence de plasma, et vis à vis de la protéase DDP IV mesuré par HPLC. B) Activité <i>in vivo</i> ; rat normal 400 ng/kg ; administration i.v. ; ΔG : variation de la glycémie ; $\Delta I/\Delta G$: rapport insulinémie sur glycémie.	58
Tableau 10. Eléments de structure secondaire contenus dans le GLP-1-(7-37) déduit du CD à l'aide du modèle de Yang.	65
Tableau 11. Relation entre les fréquences amide I et II et la structure secondaire des peptides et des protéines.	xviii

Abstract.

Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) represents an excellent candidate molecule for a novel therapeutical approach in the treatment of type II diabetes (NIDDM). Although its mode of action *in vivo* is well known, some fundamental problems remain to be addressed before GLP-1 might be used, and could substitute the drugs currently used in the treatment of NIDDM.

In particular our understanding of the binding of GLP-1 to its receptor are insufficient and need to be extended by structural studies of both the peptide and its receptor. Moreover, GLP-1 cannot be used in therapy in its native form since it is highly sensitive to degradation by proteases.

In order to define more stable forms of the peptide, several analogs of GLP-1-(7-37) were drawn and synthesized. According to the literature, amino acid positions previously described to play a key role for GLP-1 activity were respected. Amino acid changes were essentially introduced into the amino terminal region. Mutations were also introduced within the central region to corroborate certain hypotheses concerning conformation.

Based on their *in vitro* binding and activity properties, certain analogs were further analyzed for their biological activity and *in vivo* stability. In such assays the analog [a⁸,desR³⁶]GLP-1-(7-37) was found to display a remarkable stability and efficiency, superior to those of wild-type GLP-1-(7-37). Currently, this compound is further developed in pre-clinical trials.

Additionally, the structure of each analogue was performed by biophysical studies (CD and IR-TF), and in view of the *in vitro* assays results, a potential bio-active structure is proposed.

Finally, in order to gain a better understanding of its interaction(s) with GLP-1, molecular modeling of the receptor was performed. Based on these studies putative interaction sites are proposed. These theoretical considerations were sustained by biophysical analyses and synthesis of fragments of the receptor.

Keywords : Glucagon-like peptide-1, GLP-1, diabetes, NIDDM, drug design, structure/function relationships, molecular modeling, bio-computing, CD, G-protein coupled receptor, Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis.