

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation des domaines de liaison de l'Endothéline-1 sur le récepteur ET<sub>A</sub>  
au moyen de sondes mono- et bisubstituées avec un dérivé photoréactif.**

Par  
Eugène Francoeur

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

Jury d'évaluation

Directeur de recherche	Dr Alain Fournier INRS-Institut Armand-Frappier Université du Québec
Président du jury et examinateur interne	Dr Patrick Devine INRS-Institut Armand-Frappier Université du Québec
Examineur externe	Dr Eric Biron Faculté de pharmacie Université Laval

## Résumé

L'endothéline (ET), un des plus puissants agents vasoconstricteurs connus à ce jour est un peptide de 21 acides aminés porteur de deux ponts disulfures caractéristiques. Ce peptide agit via les récepteurs ET<sub>A</sub> (ET<sub>A</sub>R) et ET<sub>B</sub> (ET<sub>B</sub>R) au niveau de plusieurs organes afin d'induire des réponses telles que la constriction de vaisseaux sanguins et de muscles lisses ou la sécrétion hormonale. Ce peptide-hormone est vraisemblablement impliqué dans diverses pathologies comme l'hypertension, l'infarctus du myocarde et l'asthme. Beaucoup de recherches sont donc menées afin de comprendre les mécanismes d'actions, à l'échelle moléculaire, du système de l'endothéline et des événements qui sont à l'origine de dysfonctionnement relié à ce peptide.

Afin d'en apprendre davantage sur la nature de la liaison de l'ET-1 avec le ET<sub>A</sub>R, nous avons procédé à des essais de marquage par photoaffinité de ce récepteur et pour y parvenir nous avons appliqué une stratégie de synthèse de l'ET-1 établie à partir des données de structure-activité recueillies dans la littérature. Nous avons ainsi produit des analogues présentant un ou deux résidus photoactivables *p*-benzoyl-phenylalanine (*p*-Bpa) d'orientation L ou D en position 4 et/ou 12. C'est à la suite de caractérisations physiques (CLHP et MS) et biologiques (essais de liaison et bioessais pharmacologiques) de ces sondes que nous en sommes venus à sélectionner les peptides [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>]hET-1, [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 pour nos travaux. La stéréochimie s'est révélée déterminante puisque l'incorporation de D-Bpa en position 4 et/ou 12 a eu un impact néfaste au niveau de la liaison au récepteur, ou de l'activation de celui-ci.

L'incorporation d'un isotope radioactif (<sup>125</sup>I) sur la tyrosine-13 de la sonde a permis d'assurer le suivi de celle-ci lors des différentes étapes menant à la production et la caractérisation du complexe de photomarquage constitué d'une des 3 sondes et du ET<sub>A</sub>R. A l'aide d'expériences de clivage du complexe par digestions chimiques ou enzymatiques, il a été possible d'identifier le domaine de liaison de l'ET-1 dans le récepteur. Ainsi, la sonde [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>]hET-1 semble établir un point de contact au niveau du segment His<sup>66</sup>-Trp<sup>146</sup>. Ensuite, la réaction de marquage par photoaffinité de ce récepteur s'est effectuée aux abords de la région délimitée par les acides aminés

Phe<sup>147</sup> et Lys<sup>166</sup> du ET<sub>A</sub>R lorsque qu'était utilisé l'analogue [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1. Enfin, ces expériences impliquant la sonde bivalente [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 ont permis d'établir que le site de liaison était situé à l'intérieur de la séquence Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>183</sup> du récepteur. Ces résultats laissent supposer que le phénomène de liaison de l'ET-1 au niveau du ET<sub>A</sub>R implique les domaines transmembranaires (TM) I, II, III ainsi que la première boucle extracellulaire (EC). Ces résultats se veulent complémentaires aux données mises de l'avant par des expérimentations impliquant l'utilisation d'ET<sub>A</sub>R mutés ou chimères ou d'analyses par modélisation moléculaire qui offrent une appréciation indirecte ou virtuelle du phénomène.

## Remerciements

Je remercie tout d'abord, mon directeur de recherche, le Dr Alain Fournier pour son soutien et la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de mon périple et pour m'avoir permis d'oeuvrer dans son laboratoire avec une équipe enthousiaste et passionnée.

Je remercie les membres du laboratoire, plus particulièrement Myriam Létourneau pour son apport scientifique inestimable, ses encouragements et sa bonne humeur contagieuse mais aussi Duc Ngoc Doan, Steve Bourgault, Martin Viau, Kathy Turcotte, Josée Frappier et Jacinthe Aubin pour leur agréable présence dans les bons et moins bons moments de la recherche.

Je ne pourrais passer sous silence le support et la présence de ma copine Mélissa, de mon garçon Gabriel ainsi que de ma mère.

Enfin, je remercie l'INRS ainsi que la Fondation Armand-Frappier pour les supports financiers accordés pendant mes études graduées.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Introduction.....	1
Matériel et Méthodes.....	12
1. Synthèse des sondes peptidiques.....	14
1.1 Fixation du premier acide aminé sur la résine.....	15
1.2 Évaluation du taux de substitution de la résine.....	16
1.3 Couplage des autres acides aminés sur la résine.....	17
1.4 Clivage du lien peptide-résine avec l'acide fluorhydrique.....	19
2. Purification et caractérisation des sondes.....	19
2.1 Purification des sondes.....	19
2.2 Caractérisation des sondes.....	21
2.2.1 CLHP analytique.....	21
2.2.2 Spectrométrie de masse.....	21
2.2.3 Marquage radioactif de peptides.....	21
2.2.4 Essai de liaison compétitif des sondes.....	22
2.2.5 Évaluation pharmacologique des sondes.....	23
3. Production et purification d'un complexe de photomarquage.....	24
3.1 Photomarquage du ET <sub>A</sub> R.....	24
3.2 Déglycosylation du complexe de photomarquage.....	26
4. Caractérisation du complexe de photomarquage.....	27
4.1 Immunobuvardage de type Western du complexe de photomarquage.....	27
4.2 Digestions chimiques et enzymatiques du complexe de photomarquage.....	27
Résultats.....	32
5. Synthèse des sondes.....	32
5.1 Préparation et purification des sondes.....	33
5.2 Caractérisation des sondes.....	35
5.2.1 Caractérisation par CLHP et spectroscopie de masse.....	35
5.2.2 Caractérisation par essai de liaison compétitif.....	39

5.2.3 Caractérisation par essai pharmacologique.....	43
5.3 Photomarquage du ET <sub>A</sub> R.....	46
5.4 Caractérisation du complexe de photomarquage.....	47
Discussion.....	54
1. Mise en situation.....	54
2. Stratégie de synthèse pour l'assemblage des sondes.....	55
2.1 Synthèse des sondes.....	56
2.2 Évaluation de la synthèse des sondes.....	56
3. Caractérisation des sondes.....	58
3.1 Caractérisation par CLHP et spectrométrie de masse.....	58
3.2 Caractérisation par essai pharmacologique et essai de liaison.....	59
4. Production, purification et caractérisation du complexe de photomarquage.....	60
4.1 Production et purification du complexe de photomarquage.....	60
4.2 Caractérisation du complexe de photomarquage.....	61
Conclusion.....	70
Appendices.....	72
Appendice 1.....	72
Appendice 2.....	73
Liste des références.....	74

## Liste des figures

- Figure 1: Représentation schématique des trois isoformes de l'ET humaine. Les résidus en gras représentent les acides aminés conservés dans les différents isoformes.....2
- Figure 2: Cascade d'événements intracellulaires résultant de la liaison de l'ET-1 sur le récepteur ET<sub>A</sub> dans des cellules musculaires lisses.....7
- Figure 3: Structure primaire du sous-type A du récepteur humain à 7 domaines transmembranaires de l'ET.....9
- Figure 4: Structure tertiaire du sous-type A du récepteur humain de l'ET avec l'ET-1 cristallisée liée au site de liaison (données proposées par modélisation assistée par ordinateur selon le logiciel MOLMOL).....9
- Figure 5: Procédure de photomarquage du ET<sub>A</sub>R à l'aide des sondes photoactivables. La réaction s'est déroulée sur des cellules CHO-K1 exprimant le ET<sub>A</sub>R pendant 1 h à 4°C sous une lumière UV de longueur d'onde de 365 nm.....25
- Figure 6: Schématisation de la procédure de digestion du complexe de photomarquage à l'aide d'agents de clivage chimique ou enzymatique. Les produits de la réaction sont analysés à partir de l'autoradiographie d'un gel SDS-PAGE 16%. L'identité des bandes obtenues est révélée par comparaison des masses obtenues avec les fragments théoriques possibles générés par la digestion du ET<sub>A</sub>R.....28
- Figure 7: Logarithme du poids moléculaire des 5 constituants du standard (45, 29, 20, 14,5 et 6,5 kDa) en fonction de la migration mesurée sur gel SDS-PAGE.....31
- Figure 8: Exemple d'une digestion du complexe de photomarquage (ET<sub>A</sub>R-sonde radiomarquée) séparé par gel SDS-PAGE 16%. .....31
- Figure 9: Profil CLHP analytique du peptide brut [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 après le clivage à l'acide fluorhydrique.....32
- Figure 10: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 après la première réaction de cyclisation par formation du pont disulfure Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>11</sup>) avec le (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>).....33

Figure 11: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1 après la deuxième réaction de cyclisation par formation du pont disulfure (Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>15</sup> ) au moyen d'iode.....	34
Figure 12: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1 après la troisième réaction soit la déformylation du Trp <sup>21</sup> au moyen de pipéridine.....	35
Figure 13: Profil de CLHP analytique d'une coinjection des peptides [D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1, [D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1, [L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1, [L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1 et hET-1.....	36
Figure 14: Profil de CLHP analytique de hET-1.....	37
Figure 15: Profil de CLHP analytique du peptide [D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1.....	37
Figure 16: Profil de CLHP analytique du peptide [D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1.....	37
Figure 17: Profil de CLHP analytique du peptide [L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1.....	38
Figure 18: Profil de CLHP analytique du peptide [L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1.....	38
Figure 19: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1 purifié.....	38
Figure 20: Courbe concentration-réponse lors de l'essai de liaison compétitif opposant les 4 sondes bisubstituées à l'ET-1 radiomarquée pour le site de liaison au ET <sub>A</sub> R dans des cellules CHO exprimant ce récepteur.....	40
Figure 21: Courbe concentration-réponse lors de l'essai de liaison compétitif opposant les 3 sondes les plus performantes à l'ET-1 radiomarquée pour le site de liaison du ET <sub>A</sub> R dans des cellules CHO exprimant ce récepteur.....	42
Figure 22: Courbe concentration-réponse obtenues lors du bioessai (aorte de rats exprimant le ET <sub>A</sub> R) impliquant les 4 sondes bisubstituées comparées à l'ET1.....	44
Figure 23: Courbe concentration-réponse obtenues lors du bioessai (aorte de rats exprimant le ET <sub>A</sub> R) impliquant les 3 sondes ayant démontré le plus haut potentiel d'activation du récepteur et l'ET-1.....	45
Figure 24: Caractérisation par autoradiographie d'un gel SDS-PAGE 10% du complexe de photomarquage composé du ETAR et de la sonde radiomarquée [L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> , ( <sup>125</sup> I)Tyr <sup>13</sup> ]hET-1 glycosylé (A), déglycosylé (B).	

- Immunobuvardage de type western de ce complexe de photomarquage déglycosylé (C).....47
- Figure 25: Digestion au CNBr du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....48
- Figure 26: Digestion à la protéase Endo Arg C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....49
- Figure 27: Digestion au NCS du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....49
- Figure 28: Digestion à la protéase Endo Lys C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....51
- Figure 29: Digestion à la protéase Endo Arg C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....51
- Figure 30: Digestion au NCS du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A).

- Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....52
- Figure 31: Digestion au CNBr du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....53
- Figure 32: Digestion à la protéase Endo Arg C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).....53
- Figure 33: Représentation du complexe formé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. La région en noir correspond au segment commun issue des digestions par le CNBr, le NCS et l'Endo Arg C.....63
- Figure 34: Représentation du complexe formé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. La région en noir correspond au segment commun issue des digestions par le NCS, l'Endo Arg C et l'endo Lys C.....65
- Figure 35: Représentation du complexe formé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde [[L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. La région en noir correspond au segment commun issue des digestions par l'Endo Arg C et le CNBr.....66

**Liste des tableaux**

Tableau 1: Actions biologiques de l'ET selon le tissu ou l'organe.....	4
Tableau 2: Groupe protecteur masquant la chaîne latérale réactive de certains acides aminés lors de la synthèse des analogues de l'ET-1.....	15
Tableau 3: Protocole employé pour le couplage d'un acide aminé en chimie Boc.....	18
Tableau 4: Pureté des sondes déterminée par CLHP analytique.....	39
Tableau 5: Masse des sondes déterminée par spectrométrie de masse.....	39
Tableau 6: Valeur d'IC <sub>50</sub> des sondes bisubstituées lors de l'essai de liaison compétitif dans des cellules CHO exprimant le récepteur ET <sub>A</sub> .....	41
Tableau 7: Valeur d'IC <sub>50</sub> des 4 sondes les plus performantes lors de l'essai de liaison compétitif dans des cellules CHO exprimant le récepteur ET <sub>A</sub> .....	42
Tableau 8: Valeur d'EC <sub>50</sub> des sondes bisubstituées lors de l'essai pharmacologique sur l'aorte de rat exprimant le récepteur ET <sub>A</sub> .....	44
Tableau 9: Valeur d'EC <sub>50</sub> des 3 meilleures sondes lors de l'essai pharmacologique sur l'aorte de rat exprimant le récepteur ET <sub>A</sub> .....	46

Liste des abréviations

Acm	Acétamidométhyle
ACN	Acétonitrile
A.C.S	<i>American Chemical Standard</i>
ANP	Atrial natriuretic peptide
ATP	Adénosine triphosphate
<i>p</i> -Bpa	<i>p</i> -benzoyl-phénylalanine
BSA	albumine de sérum bovin
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyle
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Butyle
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)- phosphonium
Bzl	Benzyle
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CNBr	Bromure de cyanogène
CHO	Ovaire de hamster chinois
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMS	Diméthylsulfure
EDCF	<i>Endothelium derived constricting factors</i>
EDRF	<i>Endothelium derived relaxing factors</i>
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
ET	Endothéline
EC	boucle extracellulaire
Fmoc	9-Fluorènylméthoxyloxycarbonyle
For	Formyle
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
GTP	Guanosine triphosphate
HF	Acide fluorhydrique
IP <sub>3</sub>	Inositol-triphosphate

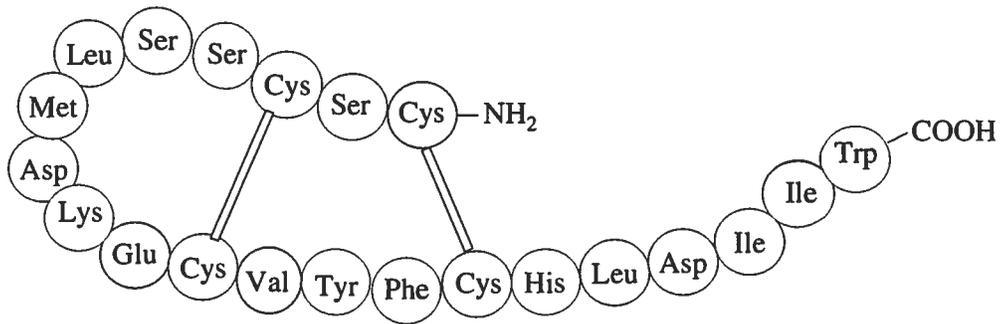
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i>
SM	Spectrométrie de masse
pMeBzl	<i>p</i> -Méthylbenzyle
NCS	N-chlorosuccinimide
NO	Oxyde nitrique
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PLC	Phospholipase C
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TFA	Acide trifluoroacétique
TM	Domaine transmembranaire

## Introduction

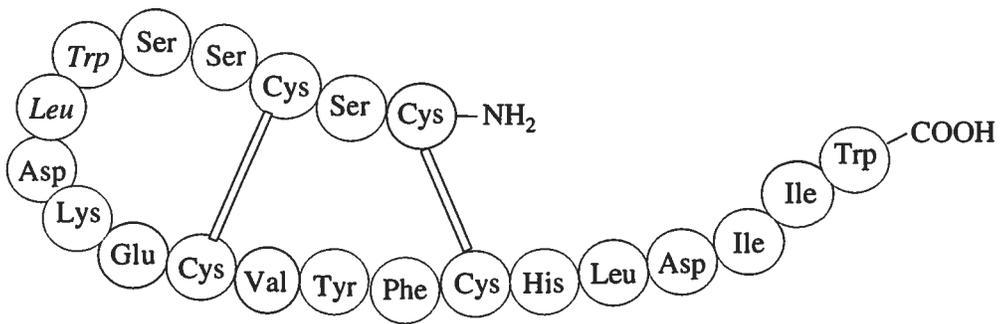
L'endothélium vasculaire a longtemps été considéré, à tort, comme n'étant qu'une simple barrière qui prévenait tout contact direct entre les cellules sanguines et les tissus vasculaires. Cette interprétation simpliste a été révisée suite aux nombreuses découvertes des scientifiques du domaine. Désormais on attribue un rôle beaucoup plus important et complexe à ce tissu multifonctionnel. Il est impliqué dans la régulation des fonctions cardiovasculaires telles que la modulation du tonus vasculaire, l'adhésion des cellules sanguines et l'anti-coagulation (Masaki *et al.*, 1992). Ce tissu orchestre un contrôle précis du tonus vasculaire par la production et la sécrétion de substances vasodilatatrices (*Endothelium Derived Relaxing Factors*) ou vasoconstrictrices (*Endothelium Derived Constricting Factors*). L'oxyde nitrique (NO) a été identifié comme étant la principale molécule sécrétée par l'endothélium, responsable de la relaxation du tonus vasculaire, opérant en collaboration avec d'autres substances lipidiques ou peptidiques comme la prostacycline, la bradykinine, la substance P et les neurokinines par exemple (Furchgott et Zawadzki, 1980). A l'opposé, les principaux acteurs responsables de l'augmentation du tonus vasculaire sont l'angiotensine II, la vasopressine, le neuropeptide Y et surtout l'endothéline (ET) dont le pouvoir constricteur figure parmi les plus puissants connus à ce jour.

A l'origine, l'ET-1 a été isolée et caractérisée à partir de milieu de culture de cellules endothéliales d'aorte porcine (Yanagisawa *et al.*, 1988). Ce peptide de 21 acides aminés, d'un poids moléculaire de 2492 Da possède des extrémités libres et est porteur de deux noyaux cycliques formés par la présence de 2 ponts disulfures aux niveaux des Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>15</sup> et Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>11</sup>. L'analyse du génome humain a montré l'existence de 3 gènes codant pour trois isoformes de l'endothéline (Figure 1). Si les structures sont fortement appariées il en va autrement pour leur activité biologique. Les isoformes 1 et 2 ont un pouvoir vasoconstricteur bien supérieur à celui de l'ET-3, reconnu plutôt pour son pouvoir vasodilatateur (Ohlstein *et al.*, 1996).

ET-1



ET-2



ET-3

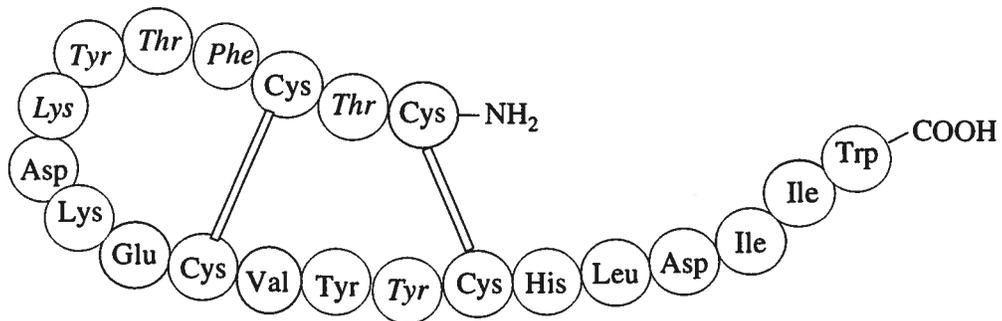


Figure 1: Représentation schématique des trois isoformes de l'ET humaine. Les résidus en gras représentent les acides aminés concernés dans les différents isoformes.

Des analyses de séquences ont révélé que les trois ETs sont générées à partir de gènes distincts codant pour des précurseurs de 160 à 238 acides aminés appelés prépro-ETs (Ortega et de Artinano, 1997). Chez l'humain, le gène ET-1 est localisé sur le chromosome 6, celui de l'ET-2 sur le chromosome 1 alors qu'il est situé sur le chromosome 20 pour l'ET-3. Ces trois prépro-ETs subissent deux processus protéolytiques similaires. Dans un premier temps, les prépro-ETs sont clivés par une endopeptidase afin d'en soustraire la séquence signal. Les pro-ETs ainsi formées sont à leurs tours clivées par une convertase (furine) spécifique aux paires d'acides aminés basiques (Ohlstein *et al.*, 1996). Cette nouvelle coupure engendre des formes peptidiques intermédiaires nommée big-ETs. Tout comme le clivage moléculaire des prépro-ETs en big-ETs, celui des big-ETs en ETs représente une étape prépondérante dans le processus de genèse des ETs matures. Cette hydrolyse, entre Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> pour big-ET-1 et big-ET-2 et entre Trp<sup>21</sup>-Ile<sup>22</sup> pour big-ET-3, est catalysée par une famille de métallo-endopeptidases appelées enzymes de conversion des ETs (ECEs). Ces ECEs ne peuvent toutefois agir sans la coupure préalable de l'Arg<sup>92</sup>. Le clivage des big-ETs en ETs est essentiel pour la pleine expression de leur activité biologique. À cet effet, l'activité spasmodique de la big-ET-1 dans des vaisseaux sanguins isolés est environ 140 fois moins puissante que celle engendrée par ET-1.

Les ETs sont présentes dans la majorité des tissus et des cellules de mammifères. Ces peptides endogènes sont, par ailleurs, exprimés différemment en fonction du type cellulaire ou du tissu où on les retrouve. Au niveau basal, l'ET-1 et l'ET-3 sont les composantes du système de l'ET les plus exprimées. De plus, l'ET-1 est présente, par exemple, dans les cellules endothéliales, les myocytes cardiaques et dans les cellules vasculaires des muscles lisses. L'ET-2, quant à elle, est exprimée au niveau du tissu intestinal, alors que l'ET-3 possède une expression particulièrement élevée dans le cerveau. Cette diversité de distribution suggère une multitude de fonctions pour le système de l'ET dans les divers tissus et organes (Kedzierski and Yanagisawa, 2001) (Tableau 1).

Tableau 1 : Actions biologiques de l'ET selon le tissu ou l'organe (Doherty, 1992).

Tissus ou organes cibles	Effets biologiques
Muscles vasculaires lisses	Constriction de longue durée des muscles vasculaires isolés. Action mitogène sur les cellules musculaires lisses en culture. Vasoconstriction des artères coronaires. Augmentation de la pression sanguine.
Endothélium vasculaire	Libération d'oxyde nitrique.
Muscles lisses non-vasculaires	Constriction des muscles lisses de l'intestin, de la trachée et de l'utérus
Coeur	Augmentation de la contractilité. Augmentation du débit cardiaque. Stimulation de la libération d'ANP.
Tissu nerveux	Augmentation de la libération de neurotransmetteurs.
Reins	Inhibition de la libération de la rénine. Diminution du flux sanguin rénal. Diminution de la vitesse de filtration glomérulaire. Diminution de l'excrétion urinaire de Na <sup>+</sup> et de K <sup>+</sup> .
Glandes surrénales	Stimulation de la biosynthèse de l'aldostérone. Libération de catécholamines

Des trois ETs identifiées, seule l'ET-1 est présente dans l'endothélium vasculaire. La concentration locale d'ET-1 dans la paroi vasculaire correspond à près de 100 fois celle du plasma. Cette concentration vient du fait qu'environ 80% à 90% de l'ET-1 sécrétée l'est au niveau basal des cellules endothéliales (Kedzierski et Yanagisawa, 2001).

Étant donné les propriétés vasomodulatrices uniques de l'ET, nombreux sont ceux qui croient en une implication directe de celle-ci comme agent étiologique de certaines pathologies. Par exemple, plusieurs données provenant de divers laboratoires ont suggéré l'implication du système de l'ET et de ses récepteurs (ET-R) dans diverses physiopathologies comme l'hypertension pulmonaire, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'insuffisance rénale chronique. Ainsi, les niveaux circulants d'ET-1 sont, dans plusieurs de ces cas, trop élevés (Masaki, 2004).

Une fois produites et sécrétées, les ETs agissent directement sur des récepteurs qui leur sont spécifiques. Cette interaction est essentielle à la production d'une variété d'actions physiologiques dans divers types de cellules, tissus et organes. De façon générale, les réponses induites par les ETs peuvent être divisées en deux groupes. Dans un premier temps, la vasoconstriction, la bronchoconstriction et la prolifération des cellules du muscle lisse sont des réponses pour lesquelles l'ET-1 et l'ET-2 sont de puissants agonistes par rapport à l'ET-3. À l'inverse, un deuxième groupe de réponses inclut la vasodilatation et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Dans ce deuxième groupe, les trois isopeptides possèdent une puissance égale afin d'induire ces effets. Ces observations ont suggéré l'existence d'au moins deux récepteurs distincts impliqués dans ces réponses pharmacologiques opposées (Masaki *et al.*, 1992).

Deux sous types de récepteurs de l'ET, nommés ET<sub>A</sub>R et ET<sub>B</sub>R, ont effectivement été séquencés et clonés chez certains mammifères, incluant l'humain (hET<sub>A</sub>R et hET<sub>B</sub>R) (Arai *et al.*, 1990). Ils diffèrent l'un de l'autre par leur affinité à leurs substrats naturels. Le récepteur ET<sub>A</sub> a une affinité beaucoup plus importante pour l'ET-1 et l'ET-2 que l'ET-3 alors que le récepteur ET<sub>B</sub> n'est pas sélectif, liant les 3 endothélines avec une affinité similaire. Tout comme pour le ET<sub>A</sub>R, un seul gène a été identifié jusqu'à maintenant pour le ET<sub>B</sub>R. Les récepteurs de l'ET sont présents dans la majorité des tissus de mammifères. Cependant, leur distribution et leur densité varient selon l'espèce et le tissu étudié. Au niveau vasculaire, les cellules musculaires lisses

sont généralement une source importante de récepteurs ET<sub>A</sub>, lesquels déclenchent des réponses spécifiques (activités vasoconstrictrices, prolifération cellulaire) lorsque qu'activés par son ligand. Les ET<sub>B</sub>R, quant à eux, se retrouvent principalement au niveau des cellules endothéliales (Masaki et Yanagisawa, 1992).

Les ET-Rs font partie d'une famille de récepteurs heptahéliques couplés aux protéines G. Ces deux récepteurs partagent 68% d'identité au niveau de leur séquence d'acides aminés (Sakurai *et al.*, 1990). Par ailleurs, la liaison de l'ET-1 aux ET-Rs induit une série de réponses fonctionnelles via l'activation de la cyclo-oxygénase, de la synthèse de NO, des canaux potassiques adénosine triphosphate (ATP)-dépendants et des canaux calciques non sélectifs (Masaki *et al.*, 1999a). Les ET<sub>A</sub>R et ET<sub>B</sub>R interagissent tous deux avec la phospholipase C (PLC) via une protéine de liaison à la guanosine triphosphate (GTP). L'activation de la PLC cause l'hydrolyse du phosphatidylinositol, la formation rapide de 1,4,5-inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et l'accumulation de 1,2-diacylglycérol (DAG). La présence d'IP<sub>3</sub> stimule le relargage de calcium (Ca<sup>2+</sup>) par les organelles intracellulaires, incluant celles du réticulum endoplasmique (Mateo et de Artinano, 2001). En plus de leurs actions sur les concentrations calciques intracellulaires, l'activation des ET-Rs provoque également l'activation des phospholipases A2 et D. L'activation de la phospholipase D semble être responsable de l'accumulation de DAG, laquelle conduirait à l'activation prolongée de la protéine kinase C (PKC) (Mateo et de Artinano, 2001). L'effet vasoconstricteur de phase aigüe est dû au relargage intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> via le réticulum sarcoplasmique alors que la réponse soutenue serait facilitée par l'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire au niveau des canaux Ca<sup>2+</sup> non spécifiques. Cette ouverture serait médiée par le couplage à la protéine G et inhibée par la diffusion de NO extracellulaire vers l'intérieur de la cellule (Masaki *et al.*, 1999a). Comme il a été démontré avec d'autres substances vasoconstrictrices, l'internalisation des complexes ETs /ET-Rs pourrait être un mécanisme de régulation négative (Chun *et al.*, 1995). À la suite de son internalisation, le complexe ligand-récepteur est séquestré dans les lysosomes où l'acidité de cet environnement promouvoit la dissociation du complexe (Bremnes *et al.*, 2000) (Figure 2).

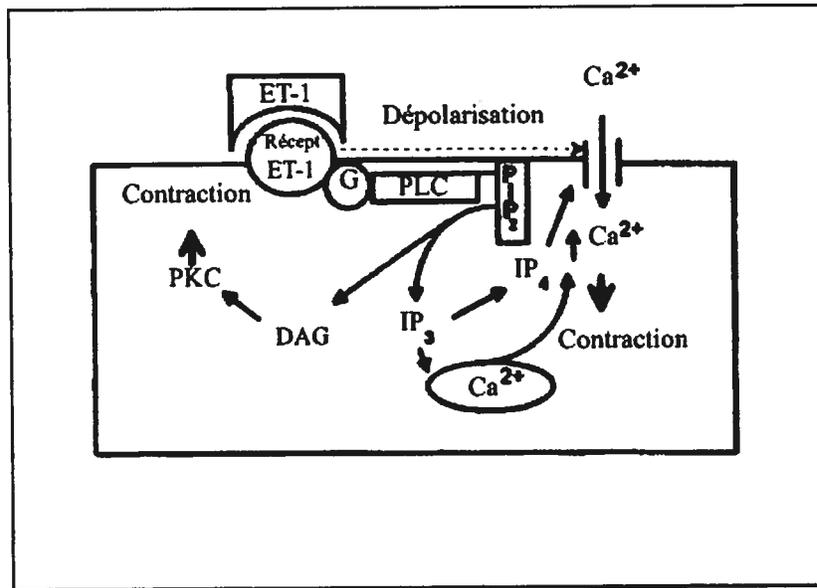


Figure 2: Cascade d'évènements intracellulaires résultant de la liaison de l'ET-1 sur le récepteur ET<sub>A</sub> dans des cellules musculaires lisses (Mateo et De Artinano, 1997)

La transduction de signal orchestré par la liaison de l'ET à ses récepteurs entraîne une variété d'effets biologiques. La balance entre l'action des facteurs relaxants et contractants libérés par l'endothélium vasculaire se doit d'être parfaitement régulée en tout temps. Les dysfonctionnements endothéliaux sont suspectés d'être à l'origine de nombreuses pathologies et il n'est donc pas surprenant de voir autant de recherches orientées vers l'étude des sites critiques d'interaction de l'ET avec ses récepteurs au niveau de la liaison, la sélectivité ou de l'activation.

Les expériences, effectuées sur le récepteur ET<sub>A</sub> (Figure 3) ont visé à identifier les sites de liaison de l'ET-1 et l'établissement des régions ou domaines où l'hormone interagit avec le récepteur. Il a été observé que la boucle N-terminale de l'ET-1 de même que les domaines transmembranaires (TM) IV-VI et leur boucles extracellulaires (EC) adjacentes étaient impliquées dans la sélectivité alors que la partie C-terminale linéaire ainsi que les TM I, II, III et VII ainsi que leur boucles extracellulaires voisines étaient impliquées dans le phénomène de liaison. Ces découvertes ont été avantageusement imagées par le concept de domaines distincts

d'adresse et de messagerie (Sakamoto *et al.*, 1993). À ce jour, l'étude des sites fonctionnels du récepteur ET<sub>A</sub> s'est déroulée via une approche basée sur la mutagenèse dirigée de récepteurs (Adachi *et al.*, 1992), la production de récepteurs chimériques (Adachi *et al.*, 1993) ou par expérimentation d'arrimage de ligand dans le récepteur (modélisation moléculaire assisté par ordinateur) (Orry et Wallace, 2000). Ces expériences ont démontré que les TM II, III et de EC I étaient responsables de la liaison du ligand au niveau du ET<sub>A</sub>R. Plus précisément, elles ont mis en évidence l'implication d'un regroupement de 5 acides aminés successifs localisés à proximité du TM II et de EC I directement impliqué dans la liaison de l'ET-1. À ce titre, les acides Lys<sup>140</sup>-Leu<sup>141</sup>-Leu<sup>142</sup>-Ala<sup>143</sup>-Gly<sup>144</sup> sont considérés comme étant les plus importants acteurs dans l'activité de liaison (Adachi *et al.*, 1993). Les études d'arrimage du ligand à l'intérieur du récepteur ont quant à elles démontré que les résidus 132 à 156 du ET<sub>A</sub>R sont d'une grande importance pour la liaison de l'ET-1 et qu'il y avait une interaction critique entre les acides aminés du récepteur ET<sub>A</sub> et ceux de l'ET-1 au niveau des paires Phe<sup>153</sup>-Trp<sup>21</sup>, Lys<sup>142</sup>-Leu<sup>17</sup> et Phe<sup>156</sup>-Asp<sup>18</sup> (Orry et Wallace, 2000). Toutefois, les expériences de mutagenèse dirigée et la construction de récepteurs chimériques par le laboratoire du Dr. Adachi se sont déroulées dans le cadre d'essais de liaison qui opposaient de l'ET-1 radiomarquée à un antagoniste compétitif du ET<sub>A</sub>R (BQ123). Les résultats obtenus ne démontrent donc pas directement la région du récepteur impliquée dans la liaison avec le ligand. De plus, les résultats de Wallace sont de nature virtuelle puisque qu'ils consistent en la simulation de liaison de l'ET-1 dans le ET<sub>A</sub>R à partir de la structure cristalline de l'ET-1 (déterminée comme étant la structure ayant la plus forte pertinence biologique comparativement aux autres structures tridimensionnelles déterminées à partir de la spectroscopie RMN ou de modélisation moléculaire par exemple) (Wallace et Janes, 1995). Cette structure cristalline a été utilisée comme ligand alors que la rhodopsine (GPCR), dont on a aussi déterminé la structure cristalline, a servi de modèle en tant que récepteur de l'endothéline (Ballesteros et Palczewski, 2001). Pour valider l'approche, le groupe de recherche a personnalisé le modèle de récepteur en lui greffant virtuellement les EC cristallisées provenant de la *protein data bank* (PDB) sélectionnées selon des critères de similarité de séquence, de longueur et de structure tridimensionnelle avec celles du récepteur ET<sub>A</sub>. Ils ont ensuite procédé à des essais d'arrimage de la structure cristalline de l'ET-1 dans ce modèle de récepteur (Figure 4).

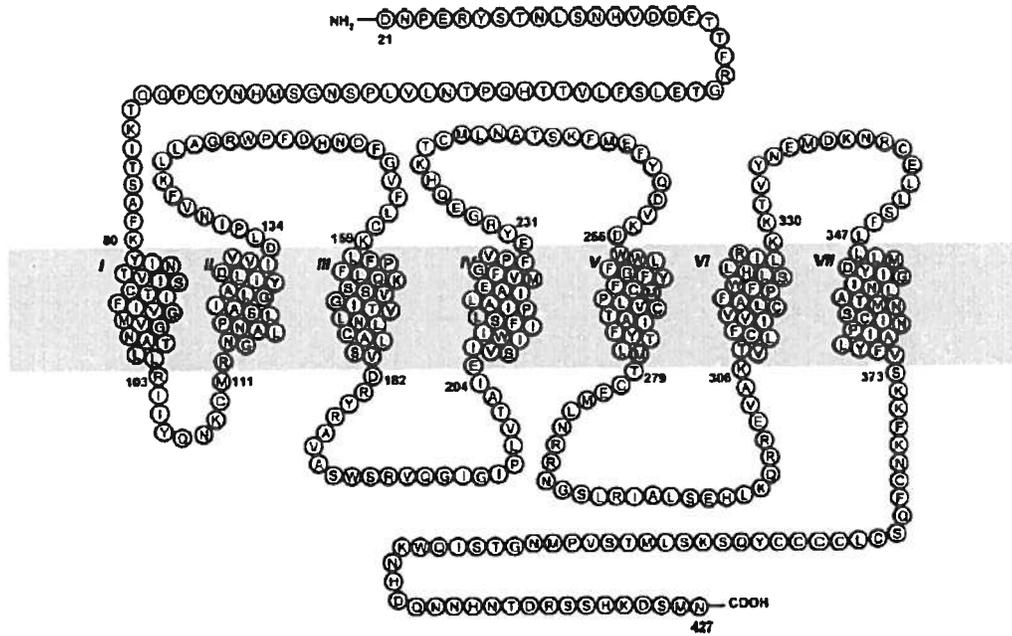


Figure 3: Structure primaire du sous-type A du récepteur humain à 7 domaines transmembranaires de l'ET (Tessier *et al.*, 2005)

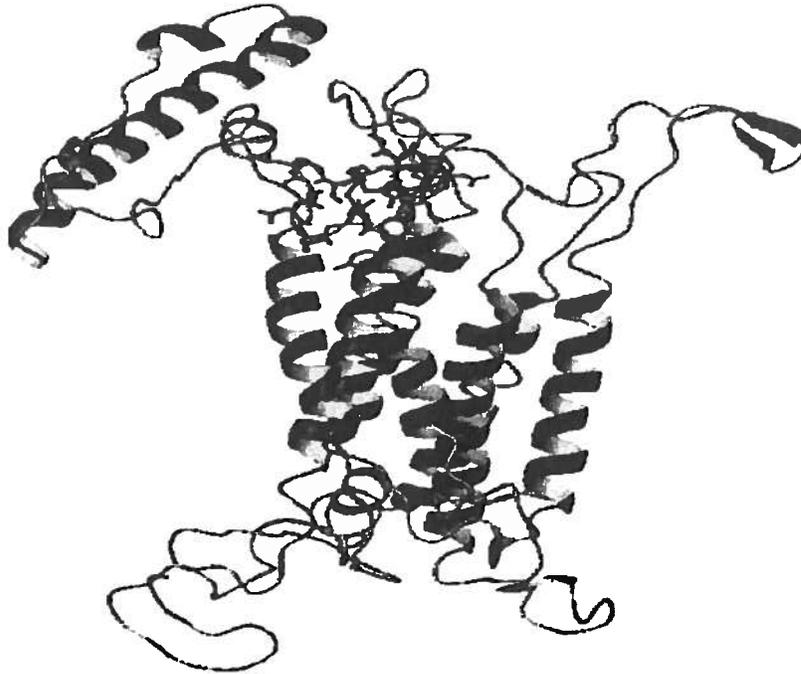


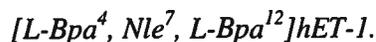
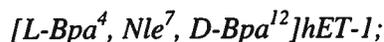
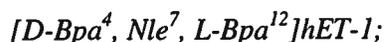
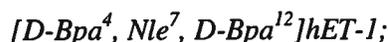
Figure 4: Structure tertiaire du sous-type A du récepteur humain de l'ET avec l'ET-1 cristallisée liée au site de liaison (données proposées par modélisation assistée par ordinateur selon le logiciel MOLMOL) (Orry et Wallace, 2000).

Dès lors, une stratégie expérimentale visant à démontrer cette interaction de manière directe et en temps réel a été avancée par notre laboratoire. Elle implique la technologie du photomarquage. Introduite par Westheimer (Singh *et al.*, 1962), elle consiste en la formation d'un lien covalent irréversible, sous l'effet d'une lumière U.V. activatrice, entre un ligand marqué contenant un résidu photoactivable (sonde) et le récepteur spécifique (Dorman et Prestwich, 2000). Cette méthode s'avère fort utile pour déterminer le récepteur de médicaments, de toxines, pour identifier les sites de reconnaissance catalytiques d'enzymes ou pour identifier le rôle que jouent certains acides aminés dans les phénomènes de stabilisation, de liaison, de sélectivité de ligand et d'activation de récepteurs. Les groupements connus pour leur aptitude à la photoactivation sont, entre autres, les arylazides, les aryldiazirines, et les benzophénones. Le choix du résidu photoactivable s'est ici porté sur le *p*-benzoyl-phénylalanine (*p*-Bpa) (Appendice 2). Ce membre de la famille des benzophénones a été utilisé, à ses débuts, comme un acide aminé non naturel incorporé dans le *Calmodulin binding peptide* de synthèse utilisé pour un marquage par photoaffinité (Kauer *et al.*, 1986). Le *p*-Bpa a été choisi pour sa grande stabilité à la lumière ambiante et le risque réduit de modifications de protéines lors de son activation à 365 nm. De plus, sa structure se compare avantageusement à celle de l'acide aminé Phe et il est totalement compatible avec la synthèse en phase solide de peptide, et ce tant en chimie Boc que Fmoc (Kauer *et al.*, 1986).

De manière à s'assurer de l'affinité et de la sélectivité des analogues photoactivables, une analyse de structure activité était impérative afin d'identifier les positions pouvant être substituées sans conduire à des analogues inertes. Ainsi, un balayage avec l'alanine (alanine scan) a démontré l'importance des résidus aromatiques Tyr<sup>13</sup>, Phe<sup>14</sup> et Trp<sup>21</sup>, ainsi que de la région chargée constituée des résidus Asp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> et Glu<sup>10</sup> (Tam *et al.*, 1994). Similairement, la substitution successive des résidus de la séquence avec les dérivés de configuration D des acides aminés (D scan) a entraîné une perte importante d'affinité lorsque les résidus 2, 8, 14 et 16 à 21 avaient une orientation modifiée de leur chaîne latérale. Les paires d'acides aminés Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>13</sup>, Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>15</sup>, Lys<sup>9</sup>-Tyr<sup>13</sup> et Glu<sup>10</sup>-Phe<sup>14</sup> stabilisent la structure tridimensionnelle de l'ET-1 et ne peuvent être altérées sans une perte importante de son activité biologique et/ou de son affinité (Andersen *et al.*, 1992; Galantino *et al.*, 1995). Des recherches de type structure-activité ont d'ailleurs été réalisées dans notre laboratoire dans le but de

produire des antagonistes photoactivables dérivés du TTA-386, un antagoniste spécifique au ET<sub>A</sub>R (Tessier *et al.*, 2000).

En présence de ces données, la stratégie de synthèse visant l'incorporation du *p*-Bpa s'est orientée vers les positions 4 et 12 de l'ET-1. Une Tyr est essentielle pour l'incorporation d'un traceur radioactif (présente en position 13 de l'ET-1) et une norleucine (Nle) (Appendice 2) doit aussi être incorporée à la place de la méthionine pour éviter que la sonde ne soit clivée lors du traitement au CNBr qui coupe en C-terminal de cet acide aminé lors des expériences de caractérisation du complexe de photomarquage. Également, l'absence de Met dans le peptide évite de créer une espèce oxydé (Met(O)) lors d'étapes d'oxydation. Dès lors, la synthèse des analogues a été initiée pour produire les sondes bisubstituées suivantes :



La masse théorique attendue est de 2792 Da pour les 4 sondes puisque seule la stéréochimie du résidu *p*-Bpa (L ou D) varie d'une sonde à l'autre. L'utilisation de ces analogues de l'ET-1 est combinée à celle de sondes monosubstituées synthétisées précédemment pour les expériences de photomarquage:



La caractérisation pharmacologique de ces sondes a été effectuée après leur synthèse et purification pour permettre d'apprécier l'impact de l'ajout de résidus non naturels (*p*-Bpa, Nle) et de la stéréochimie (L-Bpa ou D-Bpa) sur les propriétés biologiques des analogues. En ce sens, un bioessai évaluant le potentiel d'activation du récepteur par les sondes a été réalisé avec des tissus exprimant le ET<sub>A</sub>R (aorte de rats). La puissance d'action a été comparée à l'activité de l'endothéline-1 native. Aussi, des essais de liaison compétitifs des sondes ont été effectués pour mesurer l'affinité envers le ET<sub>A</sub>R. Ces tests ont été accomplis au moyen d'expérimentations évaluant l'inhibition de la liaison d'ET-1 radiomarquée en fonction de la concentration de sonde (IC<sub>50</sub>). L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration d'un inhibiteur (les sondes) nécessaire pour inhiber 50% de la liaison d'une molécule donnée (l'ET-1) envers une cible (le ET<sub>A</sub>R). Cette évaluation permet de déterminer si les analogues photolabiles sont de bons candidats pour les expériences de marquage du récepteur. Une fois le complexe établi par photomarquage, celui-ci est isolé et une caractérisation par immunoaffinité est réalisée pour mettre en évidence la nature du complexe. Un anticorps anti-ET<sub>A</sub>R a servi à démontrer l'atteinte de la cible visée par nos sondes. Des études par fragmentations du complexe de photomarquage à l'aide de divers agents de digestion chimiques et enzymatiques permettent, ensuite l'identification de domaines de liaison au sein du récepteur.

## Matériel et Méthodes

### Matériel utilisé

Les rats mâles Spague-Dawley ont été obtenus de Charles River Canada (St-Constant, QC). Ils ont été maintenus sous un cycle jour/nuit de 12 heures et nourris en accord avec les standards établis par le Conseil canadien des bons soins aux animaux. Les cellules recombinantes CHO-K1 exprimant le récepteur A de l'endothéline humaine (hET<sub>A</sub>R) ont été fournies par Euroscreen (Bruxelles, Belgique). Les acides aminés protégés ont été obtenus de Matrix Innovation (Montréal, QC), de ChemImpex International (Wood Dale, IL), et de Bachem (Torrance, CA). La résine chlorométhylée, le réactif de couplage, hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium (BOP) et la diisopropyléthylamine (DIEA) ont été commandés chez Matrix Innovation (Montréal, QC) alors que le dichlorométhane (DCM), le diméthylformamide (DMF), l'acétonitrile (ACN), l'éthanol, le méthanol, le toluène provenaient de chez EMD Biosciences (Gibbstown, NJ). L'acide trifluoroacétique (TFA) a été obtenu de PSIG (Montréal, QC) tandis que l'acide fluorhydrique (HF) a été acheté chez Matheson Gas Products (Ottawa, ON). Le diméthylsulfure (DMS), le m-crésol, la pipéridine, le milieu de culture Ham-F12, le sérum de veau foetal, la glutamine, le G418, la streptomycine, la pénicilline, l'amphotéricine B, la trypsine, la chloramine-T, l'iodure de potassium (KI), l'albumine de sérum bovin (BSA), le cocktail d'inhibiteurs de protéases, le bromure de cyanogène (CNBr), la protéase Endo Lys-C, l'acrylamide, le bis-acrylamide, le N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED), les standards de poids moléculaire de 6,5 à 45 kDA et de 20 à 250 kDA, le N-chloro succinimide (NCS), le Tris-HCl et le Tris-Base, le chlorure de magnésium, le chlorure de sodium, le métabisulfite de sodium, l'acide ascorbique, le NaOH, la glycine, le Tween 20, le 2-mercaptoéthanol, le dodécylsulfate de sodium (SDS), le carbamate de césium, le ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), le glycérol, l'Igepal, les anticorps primaires de lapin anti-ET<sub>A</sub>R, l'anticorps secondaire de lapin conjugué à la peroxidase, le persulfate d'ammonium (APS) et finalement l'hydroxide d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Mississauga, ON). L'acide acétique, le butanol, l'éther éthylique, le toluène, l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA) ont été obtenus de Fischer Scientific (Nepean, ON). L'électroéluteur Modèle 422 et

les membranes de cellulose provenaient de Biorad (Hercules, CA). L'endoprotéinase PNGase F P0705S a été achetée de NewEngland Biolabs (Pickering, ON) tandis que l'endoprotéinase Arg-C a été achetée chez Roche Diagnostics (Laval, QC). L'iodure de sodium radioactif ( $\text{Na}^{125}\text{I}$ ) était produit par Amersham Biosciences (Montréal, QC). Enfin, les films pour rayons X proviennent d'UXR (Dorval, QC).

## Méthodes

### **1. Synthèse des sondes peptidiques**

Les analogues photoactivables de l'ET-1 ont été assemblés par synthèse peptidique sur support solide. Cette méthode, simple et efficace, développée par Bruce Merrifield (Merrifield, 1969) constitue un changement de paradigme dans le domaine de la chimie organique. Ainsi, la méthode sur support solide se démarque de la synthèse en solution dans la mesure où elle permet l'usage, en excès, de réactifs qui seront par la suite, éliminés aisément par filtration. Également, elle offre la possibilité de synthétiser de longs peptides en minimisant les réactions secondaires qui diminuent le rendement de synthèse tout en compliquant les étapes de purification subséquentes.

L'assemblage successif des acides aminés a été effectué en accord avec les protocoles de synthèse propre à la chimie Boc et qui permettent de produire des peptides acides. Brièvement, le dernier acide aminé (C-terminal) du peptide est fixé de manière covalente à une résine insoluble et l'ajout successif d'acides aminés se fait dans le sens C-terminal vers N-terminal par voie de condensation. La fonction amine alpha (réactive) de chacun des acides aminés requis est temporairement masquée par un groupement acide-labile Boc (*t*-butyloxycarbonyl). Ce groupement, au terme d'une étape de déprotection, est libéré, exposant la fonction amine alpha pour le couplage subséquent. En plus de cette protection, certains résidus nécessitent l'ajout d'un groupement protecteur supplémentaire pour masquer leur chaîne latérale réactive. Les acides aminés Cys, Ser, Asp, Lys, Glu, Tyr, His et finalement Trp ont nécessité cette protection additionnelle (Tableau 2)

Tableau 2: Groupe protecteur masquant la chaîne latérale réactive de certains acides aminés lors de la synthèse des analogues de l'ET-1.

Acide Aminé	Groupe protecteur
Asp <sup>8</sup> , Asp <sup>18</sup>	Cyclohexyle (cHxO)
Cys <sup>1</sup> , Cys <sup>15</sup>	Acétamidométhyle (Acm)
Cys <sup>3</sup> , Cys <sup>11</sup>	4-Méthylbenzyle (MeBzl)
His <sup>16</sup>	Tosyle (Tos)
Lys <sup>9</sup>	2-Chlorobenzoyloxycarbonyle (2-Cl-Z)
Ser <sup>2</sup> et Ser <sup>5</sup>	Benzyle (Bzl)
Glu <sup>10</sup>	Benzyle (OBzl)
Trp <sup>21</sup>	Formyle (For)
Tyr <sup>13</sup>	2-Bromobenzoyloxycarbonyle (2-Br-Z)

### 1.1 Fixation du premier acide aminé sur la résine

Le tout premier acide aminé incorporé à la résine, dernier dans la séquence de l'ET-1, est le Trp. Son ancrage s'effectue via la production d'un sel de césium ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) avec ce résidu C-terminal (Wang *et al.*, 1977). La production du sel de césium est effectuée en dissolvant, dans un mélange éthanol:eau (4:1), 3 équivalents de Boc-Trp pour 1 équivalent de site chlorométhylé sur la résine. La solution est ensuite titrée jusqu'à pH neutre avec le carbonate de césium 2M. La solution est asséchée par évaporation sous vide dans un dessiccateur puis solubilisée dans le DMF en présence d'iodure de potassium à raison de 100 mg de KI/g de résine. La solution est laissée sous agitation à 50°C pour une durée de 24 h. Le mélange est ensuite versé et la résine est ensuite lavée successivement avec du DMF, du MeOH puis du DCM. Enfin, cette étape se termine par un séchage sous vide du support polymérique.

## 1.2 Évaluation du taux de substitution de la résine

Une manière d'évaluer le rendement d'incorporation du premier acide aminé sur la résine ou, en d'autres termes, d'en évaluer le taux de substitution est de procéder à un test à l'acide picrique (Gisin 1972). À cet effet, 20 mg de résine séchée sont placés dans une mini colonne de verre. La résine à laquelle on a précédemment incorporé une Boc-Trp doit subir une étape de déprotection en milieu acide afin de libérer la fonction amine alpha. Pour ce faire, 3 lavages au DCM suivi d'un lavage 40% TFA/DCM ont été faits à raison de 4 mL respectivement. Le tout a été suivi d'une étape supplémentaire de déprotection en présence de 4 mL de 40% TFA/DCM pour un temps de réaction de 20 min. L'étape suivante consiste à laver le complexe résine-Trp pour le préparer à la réaction entre l'acide picrique et l'amine alpha du Trp. Ainsi, des lavages de 4 mL avec les solvants suivants sont effectués : 1 lavage 40% TFA/DCM, 5 lavages au DCM, 2 lavages DCM/Dioxane (1 :1), 4 lavages DCM, 2 lavages 5% DIEA/DCM suivis de 5 minutes en présence de cette dernière solution assure la déprotonation de l'amine alpha chargée. L'amine alpha déprotégée du Trp dont la charge positive a été neutralisée est à même de réagir de manière stœchiométrique avec l'acide picrique. À cet effet, 5 lavages au DCM suivis d'un lavage à l'acide picrique 0,05M dans le DCM se succèdent avant de réaliser une dernière incubation de 10 min en présence de la solution d'acide picrique. L'excès d'acide est retiré grâce à 4 lavages avec du DCM, de l'EtOH et encore du DCM. L'étape finale consiste à décrocher l'acide picrique avec 10 mL d'une solution 5% DIEA/DCM. Le nouveau complexe stable (DIEA-acide picrique) est recueilli par 6 lavages à l'éthanol et ce volume est complété à 100 mL. La substitution est dosée par mesure d'absorbance à 358 nm. Le taux, en mmol/g, est calculé comme suit :

$$\frac{\text{Absorbance} \times 10^5}{16250 \times 20 \text{ (poids de la résine)}}$$

### 1.3 Couplage des autres acides aminés sur la résine

L'ajout des acides aminés subséquents a été effectué à l'aide d'un synthétiseur semi automatique. Le système permet la synthèse simultanée de 6 peptides et les chambres de réaction sont pourvues d'un flux d'azote pour l'agitation des milieux réactionnels et le drainage des solutions. L'allongement des peptides a été réalisé par activation des fonctions carboxyliques des dérivés protégés des acides aminés au moyen du réactif BOP (Forest et Fournier, 1990). Sommairement, la procédure d'élongation (Tableau 3), se compose d'étapes de déprotection, neutralisation, couplage, lavages et d'un suivi de réaction (monitoring). Comme présenté précédemment, l'étape initiale consiste à décrocher le groupement protecteur Boc sur l'amine alpha du dernier acide aminé fixé. Pour ce faire, un mélange constitué de 40% TFA/DCM est ajouté aux chambres de réactions. Un cycle d'agitation de 5 min est effectué. Un drainage suit cette étape avant d'entreprendre un cycle de 20 min sous les mêmes conditions. Suite à la déprotection en milieu acide, l'amine alpha est protonée. La résine est ensuite lavée via des cycles d'agitation et de drainages en présence de DCM, d'EtOH et de DCM ce qui, respectivement, dilate et comprime la résine pour la libérer des réactifs en excès. La neutralisation de la charge sur la fonction amine alpha est subséquentement obtenue par neutralisation au moyen de lavages au 1% DIEA/DMF. Après un lavage au DMF, on ajoute le prochain Boc-acide aminé (3 éq) à la résine dont la fonction carboxylique a été activée avec le BOP (3 éq) et contenant du DIEA (5 éq) dans un volume minimal de DMF. Un temps d'agitation de 45 minutes est accordé avant de vérifier avec un test à la ninhydrine (test de Kaiser) si la réaction est complète. Cet examen (Kaiser *et al.*, 1970) est systématiquement effectué après chaque couplage à des fins d'évaluation qualitative. Il permet de détecter la présence d'amines libres ce qui indique, par une coloration bleu, que la réaction est incomplète. Le couplage est repris si ce test est positif. Dans le cas contraire, le cycle d'élongation est poursuivi et ce, jusqu'au dernier acide aminé à incorporer. Enfin, lorsque ce test montre que l'insertion du dernier acide aminé est complétée, on procède à une déprotection finale. On récupère la résine-peptide au moyen d'un fritté et on lave cette dernière généreusement, sous agitation, en présence de DCM, d'EtOH et finalement d'éther anhydre. La résine est ensuite séchée dans un dessiccateur sous vide pendant quelques heures.

Tableau 3: Protocole employé pour le couplage d'un acide aminé en chimie Boc.

Étape	Réactifs <sup>a</sup>	Temps de réaction (min)
Déprotection	40%TFA/DCM	5
Déprotection	40%TFA/DCM	20
Lavage	DCM	2 x 2
Lavage	EtOH	2
Lavage	DCM	2
Lavage <sup>b</sup>	1% DIEA/DMF	2
Lavage	DMF	2
Couplage	3 éq de Boc-AA-COOH 3 éq de BOP 5 éq de DIEA	45 <sup>c</sup>
Lavage	DMF	2 x 2
Lavage <sup>d</sup>	DCM	2 x 2
Vérification du couplage	Ninhydrine (Test de Kaiser)	5

*a* : Le volume de solvant utilisé pour un couplage est de 10 mL/g de résine.

*b* : L'étape de lavage avec le DIEA est omise lorsque l'acide aminé est l'acide glutamique.

*c* : Le temps de couplage peut dépasser 45 min. Le couplage peut être répété si le test de Kaiser confirme la présence d'amines libres

*d* : Entre les couplages, les peptides-résines sont conservés dans le DCM.

#### **1.4 Clivage du lien peptide-résine avec l'acide fluorhydrique**

Le lien qui unit la résine au peptide requiert l'action d'un acide porteur d'un nucléophile. L'acide fluorhydrique (HF) est sélectionné pour sa capacité à rompre ce lien. De plus, cet agent permet de cliver les groupements protecteurs masquant les chaînes latérales réactives de plusieurs acides aminés dans la séquence du peptide. Tous sont déplacés à l'exception des protections acétamidométhyle (Acm) au niveau des résidus Cys<sup>1</sup> et Cys<sup>15</sup> et du formyle (For) sur le résidu Trp. Lors de cette étape, du diméthylsulfure (DMS) et du *m*-crésol sont ajoutés à raison de 1 ml/g de résine-peptide à laquelle se rajoute, par condensation, les quelques 10 mL de HF. La réaction se poursuit pendant 1 h à 4°C. L'acide est ensuite rapidement évaporé et l'on procède à une récupération du peptide par précipitation à l'éther éthylique. Des lavages avec ce même solvant éliminent du peptide les excès de DMS, de *m*-crésol et d'HF. Le peptide brut est, par la suite resolubilisé dans un volume minimal de TFA et on filtre afin d'extraire le composé de la résine insoluble. Enfin, la solution est évaporée sous vide et le peptide est ensuite précipité à l'éther et séché au dessiccateur. Les produits de synthèse sont conservés à -20°C pour les purifications subséquentes.

### **2. Purification et caractérisation des sondes**

#### **2.1 Purification des sondes**

Les analogues de synthèse doivent être cyclisés par formation des ponts disulfures unissant les Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>15</sup> et Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>11</sup>. De plus, le groupement formyle doit être enlevé de la chaîne latérale du Trp<sup>21</sup>. Une stratégie en 3 phases intercalées d'étapes de purification et d'étapes de caractérisation est utilisée. Ainsi, les peptides bruts subissent, en premier lieu, une première étape de cyclisation oxydative des Cys<sup>3</sup> et Cys<sup>13</sup>. Pour produire le premier noyau cyclique, un aliquot de 200 mg de peptide brut réagit 20 minutes à pH 9,5 en présence de 20 éq. de ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>).

L'isolation du produit de cyclisation est effectuée par purification au moyen de la chromatographie liquide à haute performance en phase inversée (CLHP). Un système Waters, Prep LC500A combiné à une pompe modèle 590 de Waters et un détecteur d'absorbance modèle 441 (229nm) de Waters a été utilisé à cette fin. Un volume du peptide cyclique brut dissout dans 500 mL de 20% ACN dans 0,05% de NH<sub>4</sub>OH est injecté sur une colonne contenant une matrice de C<sub>18</sub> Phenomenex Gemini (5µm;110 Å) de 250 x 21,2mm. Le débit est fixé à 10 mL/min et l'élution du matériel est obtenue en appliquant un gradient linéaire, sur 120 minutes, du solvant A vers le solvant B où A est 0,05% NH<sub>4</sub>OH et B est 50% ACN dans 0,05% NH<sub>4</sub>OH.

Une deuxième cyclisation vise à unir par un pont disulfure, les Cys<sup>1</sup> et Cys<sup>15</sup>. Une réaction d'oxydation à l'iode permet de retirer les groupes protecteurs AcM et de définir un environnement oxydatif favorable à la cyclisation. Donc, 100 mg de peptide sont mis dans 30 mL d'une solution d'acide acétique à 80% à laquelle sont ajoutés 50 éq. d'iode préalablement solubilisés dans un volume minimal de DMF. Parallèlement, un suivi de réaction est effectué par spectrométrie de masse pour établir la cinétique de formation du produit bicyclisé (masse du brut monocyclique -144 Daltons). Lorsque la réaction est complétée, de l'acide ascorbique est ajoutée jusqu'à la décoloration complète de la solution afin de stopper la réaction. La purification s'effectue, par la suite avec le même système que lors de la première purification mais cette fois-ci, un autre gradient de phase linéaire A vers B, sur 90 minutes, où A est 0,06% TFA et B est 60% ACN dans 0,06% TFA.

Une étape finale de déformylation du groupement indole du résidu Trp est réalisée. À cet effet, on dissout 100 mg de peptide dans 100 mL d'une solution aqueuse de pipéridine 0,1N. La réaction s'effectue sur glace, sous atmosphère d'azote, pour une durée d'environ 10 min (le suivi par spectrométrie de masse dicte la durée exacte de la réaction). L'apparition d'un pic majoritaire correspondant à la masse du peptide – 29 Daltons (For) indique que le dernier des groupes protecteurs n'est plus présent. À ce moment, la solution réactionnelle est complétée à 1 L pour arriver à un ratio de 10% ACN/H<sub>2</sub>O. Cette solution est celle qui sera injectée sur colonne pour la purification finale. D'ailleurs, cette purification s'effectue sur le même appareil et selon les mêmes conditions d'élution que lors de la deuxième purification effectuée précédemment. La masse théorique attendue des sondes est de 2792Da.

## **2.2 Caractérisation des sondes**

### **2.2.1 CLHP analytique**

L'unité d'analyse est constitué d'un échantillonneur automatisé Beckman System Gold 507E, d'un contrôleur de gradient et d'un détecteur d'absorbance, tous deux de modèle 128. La détection est effectuée à 230 nm et l'élution s'est déroulée à un débit de 1 mL/min. La colonne utilisée était une Vydac C18 de 5µm, 300 Å. L'élution des échantillons s'est déroulée sur une période de 30 min au cours de laquelle la phase mobile est passée de 30% ACN contenant 0,06% TFA vers 60% ACN contenant 0,06% TFA.

### **2.2.2 Spectrométrie de masse**

Cette caractérisation a été effectuée après les 2 réactions de cyclisation et celle de déformylation. L'appareil, un Voyager de Perceptive Biosystem (Farmingham, MA) est équipé d'un laser réglé à 337 nm et d'un potentiel de 20 KV comme voltage d'accélération. L'acquisition a été réalisée à 20 pulses/sec et la matrice ionisable  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique a servi à l'inclusion des peptides. La calibration a été faite grâce à l'utilisation d'une solution étalon contenant l'angiotensine-1, l'ADH et l'insuline bovine.

### **2.2.3 Marquage radioactif de peptides**

L'incorporation d'un isotope radioactif a été réalisée sur l'ET-1 et sur certains analogues. L'iode radioactif ( $^{125}\text{I}$ ) a été incorporé au niveau du noyau aromatique de la chaîne latérale de la Tyr<sup>13</sup> de l'ET-1 ou d'un analogue (Watakabe *et al.*, 1992). Sommairement, le peptide a été dissous dans un tampon phosphate (pH 7,5) à une concentration de 2mg/mL. Par la suite, 1 mCi de Na<sup>125</sup>I dans 10 µL a été ajouté à 50 µL de la solution peptidique. Au terme d'une agitation de 30 sec, la réaction est amorcée par l'ajout de 10 µL d'une préparation contenant l'oxydant (chloramine-T) dissous dans du tampon phosphate à 1mg/mL. La réaction est stoppée après 1 min d'agitation continue par l'ajout de 100 µL de métabisulfite de sodium (2 mg/mL) solubilisé dans du tampon phosphate. La purification du produit d'iodation est

effectuée par CLHP sur un système Waters 600E équipé d'une colonne Jupiter C<sub>18</sub> de Phenomenex (5µm, 300 Å, 250 mm x 4 mm). L'élution des produits de réaction s'effectue sur 40 min à un débit de 1 mL/min. Le gradient linéaire choisi est de 30% à 60% d'ACN contenant du TFA 0,06%. Enfin, la récolte des fractions s'effectue toutes les 30 sec et l'identification des peptides radioactifs désirés est obtenue par mesure sur un système Packard  $\gamma$ -counter (Downers Grove, IL). Les sondes iodées sont finalement diluées 1:1 dans du tampon phosphate et ces fractions sont entreposées à -20°C.

#### **2.2.4 Essai de liaison compétitif des sondes**

Des cellules provenant d'ovaires de hamsters chinois (CHO) ont été utilisées lors des essais de liaison *in vitro*. Ces cellules recombinantes expriment le sous-type A du récepteur humain de l'ET (hET<sub>A</sub>R). La culture de ces cellules est effectuée à 37°C dans un incubateur où le taux de CO<sub>2</sub> est de 5%. Le milieu de croissance est le HAM F-12 supplémenté avec 10% v/v de sérum de veau foetal, 5 mL de L-glutamine (1mg/mL), 400 µg/mL de G418, 100 U/mL de streptomycine, 100 U/mL de pénicilline et 2,5 U/mL d'amphotéricine B.

L'essai de liaison compétitif est utilisé pour apprécier l'impact d'incorporation d'acides aminés non naturels (*p*-Bpa, Nle) sur l'aptitude des sondes à lier le ET<sub>A</sub>R. L'affinité des sondes envers ce récepteur a été déterminée grâce à un essai de liaison par compétition des sondes avec l'ET-1 radiomarquée dans des cellules exprimant le récepteur. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits, à raison de 5 x 10<sup>5</sup> cellules/puits. La croissance des cellules s'est poursuivie sur 24 h à 37°C. La suite des procédures expérimentales s'est déroulée sur glace. Ainsi, le milieu a été retiré et le tapis cellulaire a été lavé et refroidi par 2 lavages avec un tampon glacé (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub> et 100 mM NaCl). Les cellules ont été laissées en incubation pendant 16 h avec une quantité fixe d'ET-1 radiomarquée (3 x 10<sup>-10</sup> M) compétitionnant avec des concentrations croissantes de sondes (10<sup>-10</sup> M jusqu'à 10<sup>-5</sup> M) dans un volume total de 650 µL de tampon de liaison (tampon de lavage supplémenté de 0,01% p/v de BSA et de 0,01% de cocktail d'inhibiteurs de protéases composé d'aprotinine, leupeptine, bestatine, pepstatine A et

d'E-64). L'essai de liaison a été interrompu par le retrait du milieu de liaison. Les cellules ont été rincées deux fois avec du tampon de lavage pour éliminer le contenu peptidique lié non spécifiquement. Enfin, les membranes plasmiques des cellules ont été lysées avec 300 µL de NaOH 1M et la solution a été récoltée dans des tubes compatibles avec la mesure de radioactivité. Les valeurs d'émission  $\gamma$  ont été mesurées et les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été déterminées par régression non linéaire avec le logiciel Prism 4.0 Les sondes ayant conservé le plus d'affinité pour le récepteur ont été retenues pour la suite expérimentale.

### **2.2.5 Évaluation pharmacologique des sondes**

Un examen pharmacologique des analogues a été effectué pour déterminer l'impact de l'incorporation de résidus non naturels (*p*-Bpa, Nle) au niveau de la modulation de l'activité biologique. Sommairement, l'aorte thoracique de rats mâles de 250-300g (Sprague-Dawley) préalablement anesthésiés a été prélevée et nettoyée de ses tissus conjonctifs et graisseux. Ce tissu riche en récepteurs ET<sub>A</sub> a été coupé en cylindres de 4 mm. Ils ont, par la suite été installés sous tension initiale de 1g et maintenue en conditions physiologiques (95% O<sub>2</sub>, 37°C) dans un bain d'organes alimenté par un tampon Krebs physiologique (120 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucose, 4,7 mM KCl, 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) à raison de 5 ml par chambre d'organe. Les tissus prélevés ont été laissés 1 heure dans ces conditions puis une évaluation de contractilité a été déterminée au moyen d'un polygraphe Grass 7E couplé à un système de transduction de signal transformant les tensions mécaniques en signaux électriques. Les mesures de contractilité des tissus ont été déterminées en relation avec différentes concentrations de peptides s'échelonnant de (10<sup>-10</sup> M jusqu'à 10<sup>-6</sup> M) et transformées en valeur relative au données récoltées préalablement lorsqu'exposé à 80 mM KCl. L'analyse des résultats expérimentaux (grâce au logiciel Prism 4.0.) a permis d'obtenir les valeurs relatives de contractilité (en % de contraction induite par 80 mM KCl) en fonction de la concentration de peptide.

### 3. Production et purification d'un complexe de photomarquage

#### 3.1 Photomarquage du ET<sub>A</sub>R

Lorsque nécessaire, la concentration de l'échantillon a été déterminé *via* un dosage inspiré de la méthode développée par Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Une courbe standard à partir d'albumine sérique bovine (BSA) couvrant des concentrations allant de 0 à 400 mg/mL a été produite en plaque 96 puits. Les échantillons ont ensuite été dosés et leur concentration a été déterminée par comparaison avec la courbe étalon de BSA obtenue précédemment.

La méthode expérimentale qui a mené à la production d'un complexe sonde-récepteur est dérivée de procédures de photomarquage préalablement optimisées dans notre laboratoire (Boivin *et al.*, 2004 ; Tessier *et al.*, 2005;) (Figure 5). Les procédures visant l'isolation du complexe sont menées sur 4 jours. En premier lieu, les cellules sontensemencées dans des plaques à 6 puits à raison de  $5 \times 10^5$  cellules/puits. La croissance des cellules s'est poursuivie sur 24 h en incubateur à 37°C. La suite des procédures expérimentales s'est effectuée sur glace. Lors du 2<sup>e</sup> jour, le milieu a été retiré et le tapis cellulaire a été refroidi au moyen de deux lavages avec un tampon glacé (dont la composition a été décrite précédemment). Les cellules ont été laissées en incubation pendant 24 h additionnelles avec  $5 \times 10^{-9}$  M de sonde photoactivable et radiomarquée dans un volume total de 650 µL de tampon de liaison. L'essai de liaison a été interrompu, au jour 3 par retrait du milieu de liaison suivi de 3 rinçages avec le tampon de lavage. Les cellules en plaque baignant dans 1,5 mL de tampon de lavage ont été ensuite irradiées à 365 nm pendant 1 h avec une lampe UV de 100 W maintenue à 6 cm des puits. Les cellules ont ensuite été lysées et récupérées dans un tube après l'ajout de 300 µL de tampon détergent (50mM de Tris à pH 8, 150 mM de NaCl, 0,5% d'Igepal (v/v), 0,1% de SDS (m/v), 0,1% de Triton (v/v) auquel est ajouté, juste avant l'étape de lyse cellulaire, 1,5% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (v/v). Une étape d'agitation lente de 45 min a laissé au tampon lytique le temps de solubiliser la membrane cellulaire et de libérer les protéines y étant ancrées (dont le complexe de photomarquage). Les débris cellulaires insolubles ont sédimentés par centrifugation à 13 000 g durant 1 h à 4°C. Le surnageant récupéré a été combiné 1:1 avec du tampon de chargement pour électrophorèse SDS-PAGE (62,5

mM de Tris-HCl pH 6,8, 20% de glycérol (v/v), 2% de SDS (m/v), 5% de 2-mercaptoéthanol (v/v), 0,025 % de bleu de bromophénol (m/v) et incubé 1 h à 37°C. Ces échantillons ont été conservés à -20°C pendant la nuit. Le lendemain, les échantillons congelés ont été ramenés à la température de la pièce pour être chargés, à raison de 600 µL, sur un gel préparatif SDS-PAGE 10% de 1,5 mm d'épaisseur. Les protéines ont été placées dans un champs de 100 volts pour environ 2 h. Un puit du gel est réservé pour les standards de poids moléculaire s'échelonnant de 20 à 250 kDa. Après l'électrophorèse, le gel est découpé en bandes horizontales de 2 mm d'épaisseur et chacune de ces bandes est individuellement comptée pour sa radioactivité. Les mesures de radiation  $\gamma$  sont effectuées sur le système Packard  $\gamma$ -counter. Le complexe constitué de la sonde (environ 3 kDa) et du ET<sub>A</sub>R (environ 48,6 kDa) est récolté dans la région de 45 à 55 kDa identifiée par les standards de poids moléculaire. La réaction de photomarquage du ET<sub>A</sub>R est, par ailleurs, majoritaire et donc, la radioactivité est maximale dans cette région. La région sur gel correspondant au complexe désiré est finement hachée et est électroéluée pendant 4 heures à la température de la pièce dans un tampon à cet effet (25 mM de Tris-base, 192 mM de glycine, 0,1% (w/v) de SDS. L'éluat est, par la suite traité sur Microcon YM-10 (limite de 10 000 Da) pour être dessalé et concentré jusqu'à un volume de 30 µL. Le produit de photomarquage purifié, dessalé et concentré est entreposé à -20°C pour un usage ultérieur.

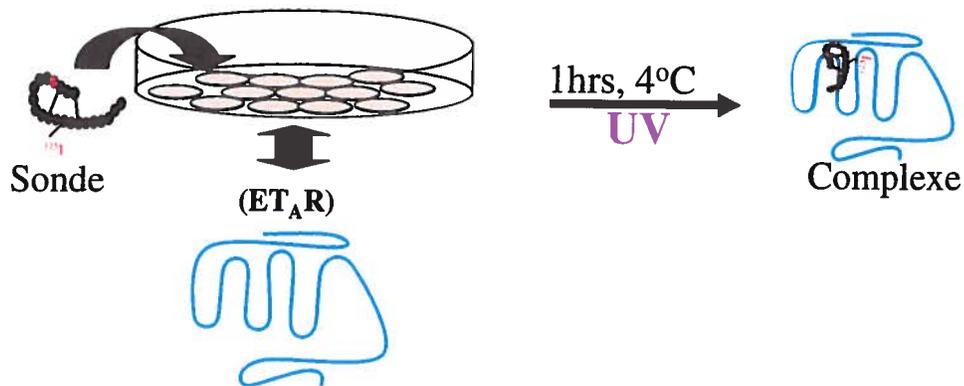


Figure 5: Procédure de photomarquage du ET<sub>A</sub>R à l'aide des sondes photoactivables. La réaction s'est déroulée sur des cellules CHO-K1 exprimant le ET<sub>A</sub>R pendant 1 h à 4°C sous une lumière UV de longueur d'onde de 365 nm.

### 3.2 Déglycosylation du complexe de photomarquage

Le hET<sub>A</sub>R est naturellement glycosylé. Puisque des étapes de digestion chimique et de protéolyse (digestion enzymatique) sont à prévoir, il est préférable de déglycosyler le récepteur pour éviter de compliquer le patron fragmentaire issu de ces digestions. L'ensemble PNGase F P0705S (New England Biolabs) est sélectionné pour exciser cette portion extracellulaire au niveau du récepteur. À l'exception de l'enzyme, les différentes solutions sont à 10X. Ainsi, 45 µL est ajouté pour en arriver à un volume réactionnel final de 450 µL. Donc, l'équivalent de 20 µg de protéine (300 µL) est solubilisé dans le tampon de dénaturation et l'ensemble est chauffé à 100°C pendant 10 min. Au terme de l'étape de dénaturation, le tampon réactif G7 ainsi que le détergent NP-40 sont ajoutés. Ensuite, 5 µL de l'enzyme PNGase F sont additionnés et le tout est laissé sous incubation à 37°C pour 1 h. Une filtration des quelque 450 µL de produit de clivage sur Microcon YM-10 ramène le volume aux alentours de 50 µL tout en le dessalant partiellement. L'échantillon est conservé à -20°C. Un gel de SDS-PAGE 10% de 1mm d'épaisseur est préparé pour effectuer un examen analytique de la réaction. Donc, l'équivalent de 2 µg de complexe déglycosylé (5 µL), de complexe non déglycosylé (issu de la section 3.1) tous deux préalablement combinés 1:1 au tampon de chargement et chauffés 1 h à 37°C sont chargés sur le gel en compagnie des standards de poids moléculaire de 20 à 250 kDa. Au terme d'une migration de 2 h à 100 V, le gel est séché et exposé 2 jours en cassette avec film permettant la détection des particules  $\gamma$ . La déglycosylation se veut une réussite dans la mesure où la bande du complexe issue de la réaction à la PNGase F est d'un poids inférieur à celle correspondant au complexe glycosylé.

#### **4. Caractérisation du complexe de photomarquage**

##### **4.1 Immunobuvardage de type Western du complexe de photomarquage**

La méthode de marquage par anticorps a été employée pour, dans un premier temps, déterminer la masse du produit de photomarquage et ensuite, confirmer que le complexe purifié suite aux étapes de photomarquage est bien composé de la sonde liée spécifiquement au récepteur ET<sub>A</sub>. À cet effet, un anticorps produit contre le ET<sub>A</sub>R humain a été utilisé. Donc, l'équivalent de 2 µg d'échantillon purifié issu du photomarquage a été séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % (selon les procédures présentées dans la section 3.1). Au terme de la migration, le gel a été isolé et les protéines ont été déplacées vers une membrane de PVDF (fluorure de polyvinylidène) par transfert électrophorétique pendant 1 h à 100 V. Le complexe a été marqué au moyen d'un anticorps primaire anti-hET<sub>A</sub>R capable d'interagir ensuite avec un anticorps secondaire de lapin conjugué à la peroxydase de raifort. Le complexe, préalablement activé par procédure de révélation par chimioluminescence (ECL), a été révélé sur film.

##### **4.2 Digestions chimiques et enzymatiques du complexe de photomarquage**

Une fraction purifiée correspondant à la sonde liée au ET<sub>A</sub>R a été obtenue et l'identité de ce complexe a été confirmée par immunoaffinité. Cet essai a aussi permis d'en déterminer la masse approximative laquelle était similaire à celle constatée par examen analytique sur gel de polyacrylamide. Une procédure expérimentale de clivage du produit de photomarquage faisant appel à différents agents de digestion chimique et enzymatiques a ensuite été réalisée (Figure 6). Les 4 agents de clivage utilisés (Endo Arg C, Endo Lys C, NCS et CNBr) clivent des résidus absents de nos sondes. La radioactivité est notre moyen d'en observer le comportement. Une digestion de celle-ci en aval du traceur radioactif (<sup>125</sup>I fixé sur la Tyr<sup>13</sup>) les rendraient silencieuses. Nous ne serions plus en mesure d'apprécier les conséquences des agents de clivage sur le complexe de photomarquage produit lors des étapes précédentes.

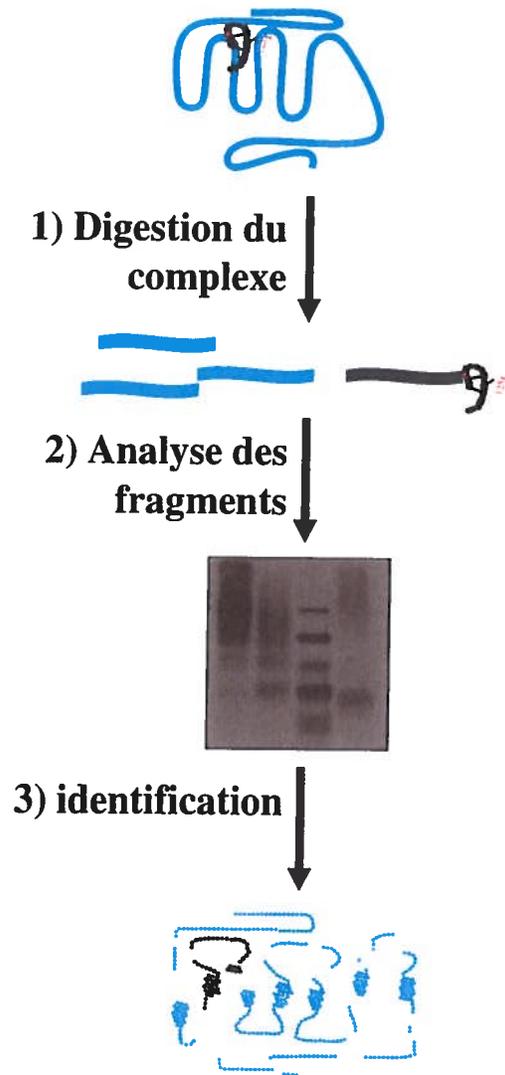


Figure 6 : Schématisation de la procédure de digestion du complexe de photomarquage à l'aide d'agents de clivage chimique ou enzymatique. Les produits de la réaction sont analysés à partir de l'autoradiographie d'un gel SDS-PAGE 16%. L'identité des bandes obtenues est révélée par comparaison des masses obtenues avec les fragments théoriques possibles générés par la digestion du ET<sub>A</sub>R.

Le bromure de cyanogène (CNBr) est un agent chimique capable de couper la chaîne peptidique en C-terminal des résidus Met. Les récepteurs photomarqués ont donc été solubilisés dans 200  $\mu\text{L}$  de 40 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ . Cette solution a été combinée à un volume équivalent d'une solution d'ACN contenant 100 mg de CNBr. La réaction de clivage s'est déroulée à la température de la pièce, dans l'obscurité, pendant 18 h. La réaction a été interrompue par l'ajout de 3 mL d'eau et une étape de lyophilisation a suivi pour éliminer une partie de l'acidité et des sels. Les cristaux résultant de cette étape ont été ressuspendus dans 500  $\mu\text{L}$  d'eau pour une étape de filtration par Microcon YM-3. Le produit de filtration a été suspendu de nouveau dans 1 mL d'eau dans un tube avant d'être encore lyophilisé. Enfin, les récepteurs photomarqués ont été resuspendus directement dans 600  $\mu\text{L}$  de tampon de chargement pour gel de polyacrylamide et conservés à  $-20^\circ\text{C}$ . Un deuxième agent chimique de digestion, le N-chlorosuccinimide (NCS) a été choisi pour sa capacité à briser le lien amide en C-terminal des Trp. À cet effet, un tampon constitué de 83,3 mM d'urée, de 50% d'acide acétique/ $\text{H}_2\text{O}$  (v/v) et de 50 nM de NCS a été préparé pour servir de milieu réactionnel. Le complexe de photomarquage purifié a été solubilisé dans ce milieu à raison de 15  $\mu\text{L}$  dans 150  $\mu\text{L}$  de tampon. Un temps de réaction de 30 min à température de la pièce a permis à l'agent de produire son action et celle-ci a été stoppée par l'ajout de quelques milligrammes de méthionine. Les étapes utilisées pour se débarrasser de l'acide et des sels lors de la réaction au CNBr sont aussi appliquées sur ces échantillons avant d'arriver à l'étape d'analyse sur un gel de SDS-PAGE. Entre temps, ils sont conservés à  $-20^\circ\text{C}$  dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon de chargement.

Deux agents protéolytiques ont aussi été sélectionnés pour ajouter des données permettant de déterminer la région d'interaction entre nos sondes et le  $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ . En premier lieu, l'Endo Lys-C est une protéase capable de catalyser une réaction de digestion menant à la rupture du lien en C-terminal des Lys. Ainsi, 1  $\mu\text{g}$  d'enzyme a été solubilisé dans un tampon de réaction contenant 25 mM de Tris-HCl, pH 8, 1 mM d'EDTA et 0,1 % de SDS (m/v) et la digestion des récepteurs photomarqués ajoutés s'est déroulée sur 18 h à  $37^\circ\text{C}$ . Ensuite, la protéase Endo Arg-C a été utilisée pour son aptitude à rompre le lien en C-terminal des résidus Arg. Cette réaction de clivage du complexe a été réalisée sur 18 h à  $37^\circ\text{C}$  dans 75  $\mu\text{L}$  de tampon de digestion (90 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 8,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM de dithiothréitol, 0,5 mM d'EDTA et 0,01% de SDS) contenant à 1  $\mu\text{g}$  d'enzyme. Les conditions réactionnelles propres aux

digestions enzymatiques contiennent moins de sels et/ou d'acides et ne nécessitent donc pas autant d'étapes de lyophilisation et de filtration/dessalage pour les rendre compatibles à une injection sur SDS PAGE. Ainsi une simple lyophilisation dans 1 ml d'eau suivi d'une solubilisation dans 50  $\mu$ L de tampon de chargement a suffi à préparer l'échantillon.

L'analyse des fragments a été accomplie par injection des échantillons de digestion sur gel SDS-PAGE 16 %. La migration électrophorétique s'est déroulée en présence des marqueurs de poids moléculaire de 6,5 à 45 kDa sur 2 h à 100 V. Le gel a été démoulé et séché, puis exposé sur film rayon X pendant 2-6 jours selon l'intensité de la radiation émise par les fragments de digestion. Les fragments visibles sur film ont été comparés, selon leur masse, avec les fragmentations théoriques du ET<sub>A</sub>R attendues après clivage sous l'effet d'un agent donné. Ainsi, nous avons utilisé 2 logiciels (PeptideCutter et PeptideMass) pour générer et calculer la masse théorique des fragments de récepteur produits sous l'action d'un agent de clivage donné. La masse réelle de ces fragments, séparés sur gel SDS-PAGE, a ensuite été déterminée par calcul analytique. Pour ce faire, nous avons établi une régression linéaire de la migration des constituants de notre échantillon standard en fonction du logarithme du poids moléculaire (Figure 7). La masse de nos fragments de digestion de l'échantillon a par la suite été extrapolée en fonction de la migration mesurée (en mm) en utilisant l'équation de la courbe obtenue. Les fragments de récepteur correspondant à la bande de plus faible poids moléculaire sont identifiés en noir tandis que le gris associe les bandes de poids moléculaire plus élevé aux fragments de récepteur plus lourds (Figure 8).

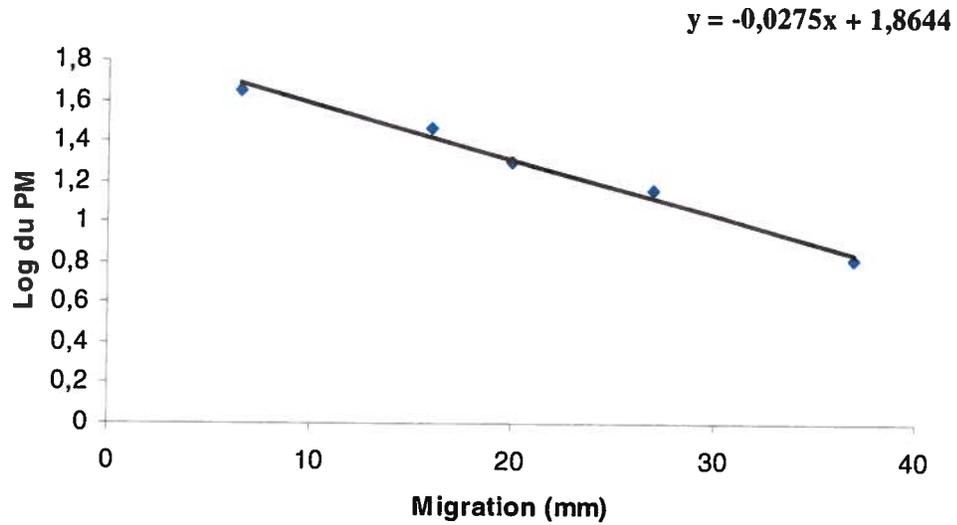


Figure 7: Logarithme du poids moléculaire des 5 constituants du standard (45, 29, 20, 14,5 et 6,5 kDa) en fonction de la migration mesurée sur gel SDS-PAGE.

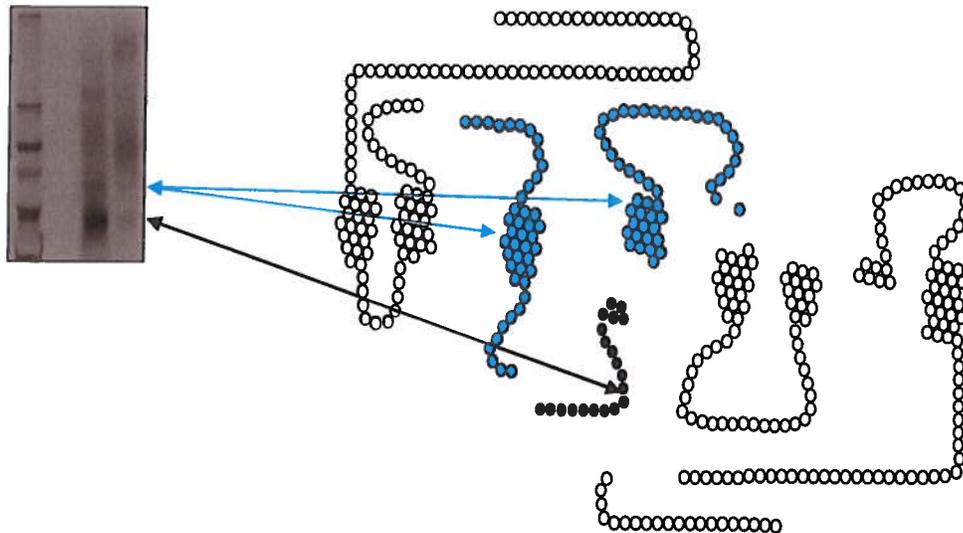


Figure 8: Exemple d'une digestion du complexe de photomarquage ( $ET_A$ R-sonde radiomarquée) séparé par gel SDS-PAGE 16%.

## Résultats

### 5. Synthèse des sondes

Le test à l'acide picrique a montré que le taux de substitution de Boc Trp(For) sur la résine de Merrifield utilisée correspondait à 0,56 mmol/g. Une quantité de 1g de Boc-Trp (For)-résine a été déposée dans chacun des réacteurs de sorte que l'échelle de synthèse s'établissait à 0,56 mmol.

Le couplage de certains acides aminés a été problématique et il a donc fallu, pour ces derniers allonger le temps de réaction ou recommencer le couplage pour que finalement le test de Kaiser confirme l'incorporation complète de celui-ci. En fin de synthèse, une réaction avec l'anhydride acétique a été utilisée afin de masquer les sites aminés résiduels avec un groupement acétyle.

Le clivage à l'acide fluorhydrique s'est effectué sans difficulté et a permis de récolter, après précipitation, une poudre amorphe de peptide de couleur mauve. Au terme de brèves étapes de lavages, les poudres correspondant aux 4 peptides bruts ont été analysées par CLHP analytique. On a observé pour les 4 sondes la présence de 2 ou 3 pics majoritaires. La présence de produits indésirables (réactions secondaires et/ou déprotections incomplètes) a aussi été observée (Figure 9).

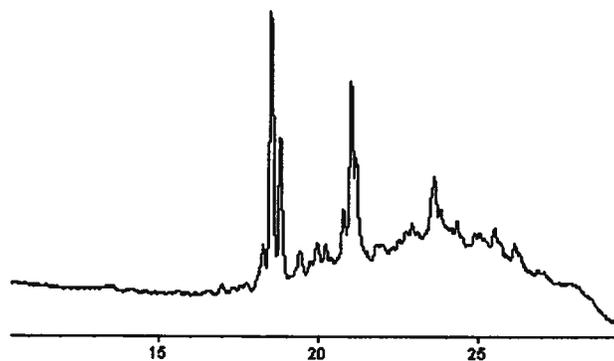


Figure 9: Profil CLHP analytique du peptide brut [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 après le clivage à l'acide fluorhydrique.

### 5.1 Préparation et purification des sondes

La réaction de cyclisation oxydative par formation d'un pont disulfure entre les Cys<sup>3</sup> et Cys<sup>11</sup> a été faite avec le ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) sur les quatre sondes, sans purification préliminaire. Le produit de réaction a par la suite été purifié par CLHP préparative. Les fractions récoltées ont été analysées par spectrométrie de masse et les spectres ont confirmés que les peptides avaient la masse correspondant à celle attendue. En effet, nous avons noté la présence d'un pic majoritaire de 2965,5 Da correspondant à la masse de la sonde avec les groupes protecteurs AcM fixés sur les Cys<sup>1</sup> et Cys<sup>15</sup> et le groupement For présent sur l'indole du Trp<sup>21</sup> (Figure 10). Une purification par CLHP a suivi la réaction de cyclisation au ( $K_3Fe(CN)_6$ ).

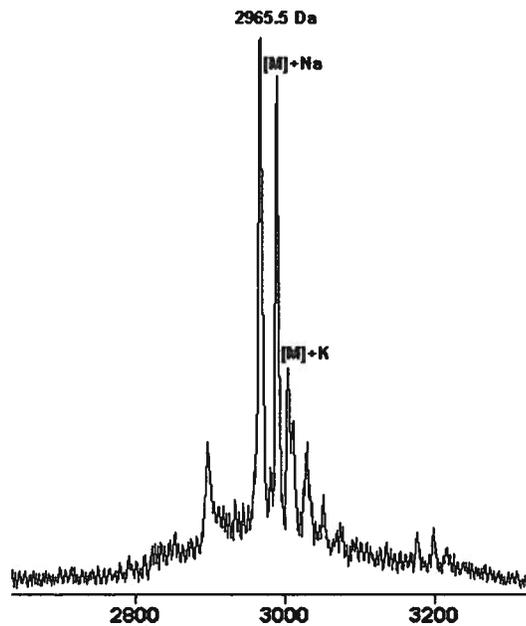


Figure 10: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 après la première réaction de cyclisation par formation du pont disulfure (Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>11</sup>) avec le  $K_3Fe(CN)_6$ .

La fraction semi-purifiée des sondes monocycliques a été remise en solution pour compléter la cyclisation via l'établissement du 2<sup>e</sup> pont disulfure unissant les Cys<sup>1</sup> et Cys<sup>15</sup>. Le produit de réaction d'oxydation à l'iode a été confirmé suite à l'analyse des fractions en spectrométrie de masse (Figure 11). La présence d'un pic large correspondant à une masse approximative de 2820 Da est en accord avec la masse théorique attendue correspondant aux sondes ne portant plus que le groupe protecteur For (2821 Da). Une purification par CLHP a suivi la réaction de cyclisation à l'iode.

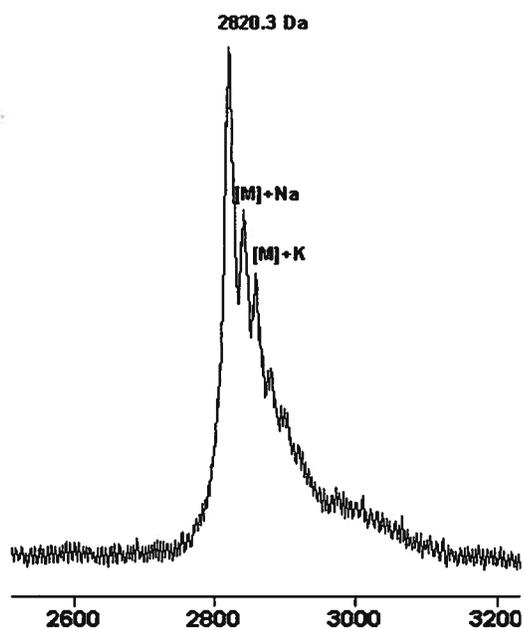


Figure 11: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 après la deuxième réaction de cyclisation par formation du pont disulfure (Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>15</sup>) au moyen d'iode.

La déformylation du groupement indole est accomplie en milieu aqueux au moyen de pipéridine qui agit comme nucléophile. La réaction a été suivie à 5 min d'intervalle et nous avons observé qu'elle était complétée après 30 min, comme indiqué par la disparition du réactif de départ correspondant à la sonde formylée (2821Da) qui a laissé la place au produit désiré (2792Da) (Figure 12). Une dernière purification préparative par CLHP a permis d'obtenir une poudre blanche homogène et floconneuse.

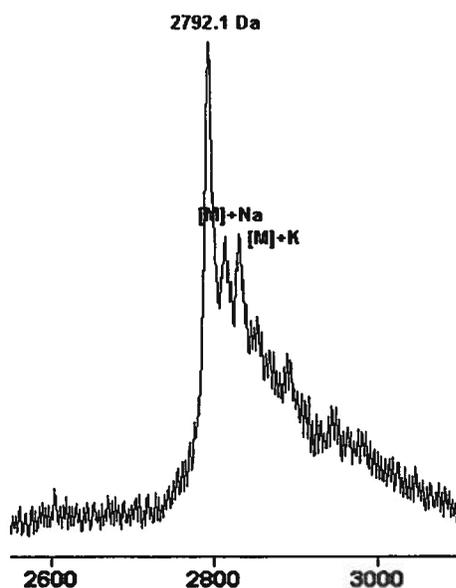


Figure 12: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 après la troisième réaction soit la déformylation du Trp<sup>21</sup> au moyen de pipéridine.

## 5.2 Caractérisation des sondes purifiées

### 5.2.1 Caractérisation par CLHP et spectrométrie de masse

L'examen final des échantillons par CLHP analytique démontre un très haut niveau de pureté puisque le pic d'absorbance correspondant à la sonde représente entre 95% et 99 % de la surface de tous les pics d'absorbance observés (Tableau 4). La présence du résidu *p*-Bpa caractérisé par son volume et son aromaticité confère aux analogues une importante hausse de leur hydrophobicité puisque que l'on observe un écart moyen de près de 7 min entre leur temps de rétention et celui de l'ET-1. La stéréochimie semble aussi avoir un léger effet sur le profil de rétention des sondes puisque les temps d'éluion différent de près 90 sec d'un analogue à l'autre (Tableau 4). Une coinjection des 4 analogues a été réalisée pour permettre d'apprécier lors d'une seule et même analyse, les caractéristiques propres à chacun des analogues en relation avec l'ET-1 et l'impact de la stéréochimie en rapport avec le temps de rétention observé. Seulement 4 pics ont été observés car les sondes [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>,

D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 ont des temps de rétention pratiquement identiques et coéluent lors de la coinjection (Figure 13). L'identification de tous les pics a été accomplie par l'entremise des résultats d'analyses en mode individuel de l'ET-1 (Figure 14) et des 4 sondes bisubstituées (Figure 15 à 18). Enfin, les poids des sondes (2791 à 2793 Da) ont été affichées (Tableau 5) où la masse théorique attendue est de 2792 Da. À titre d'exemple, l'échantillon [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 purifié a probablement la bonne identité puisque l'analyse en spectrométrie de masse nous permet d'observer un pic à 2791 Da (Figure 16).

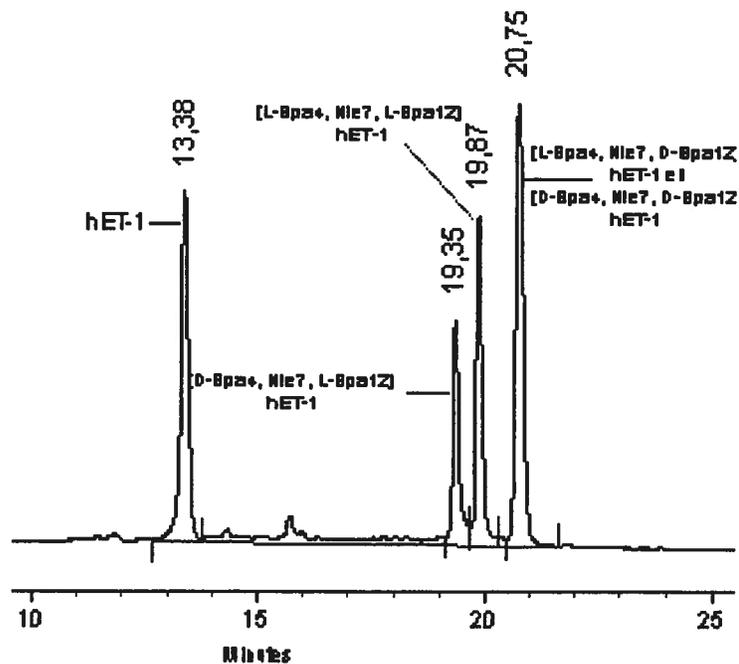


Figure 13: Profil de CLHP analytique d'une coinjection des peptides [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1, [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1, [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1, [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et hET-1.

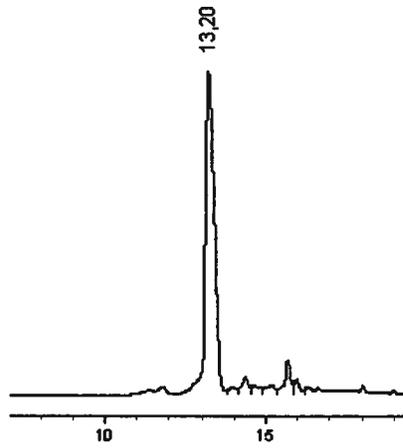


Figure 14: Profil de CLHP analytique de hET-1.

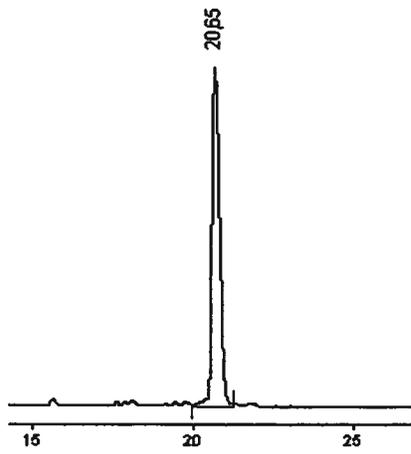


Figure 15: Profil de CLHP analytique du peptide [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1.

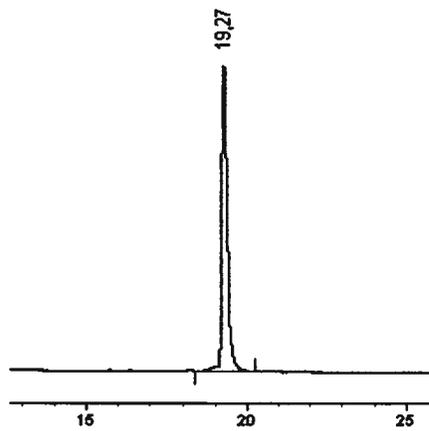


Figure 16: Profil de CLHP analytique du peptide [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1.

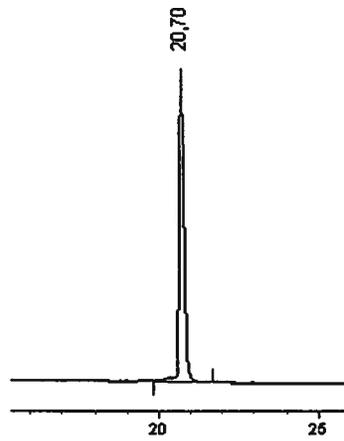


Figure 17: Profil de CLHP analytique du peptide [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1.

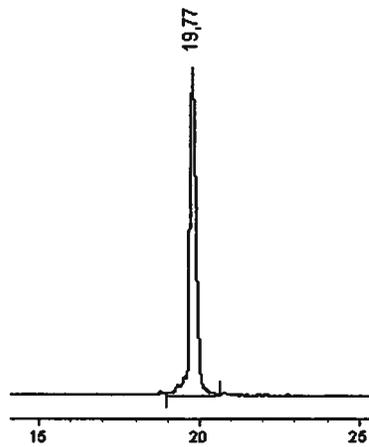


Figure 18: Profil de CLHP analytique du peptide [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1.

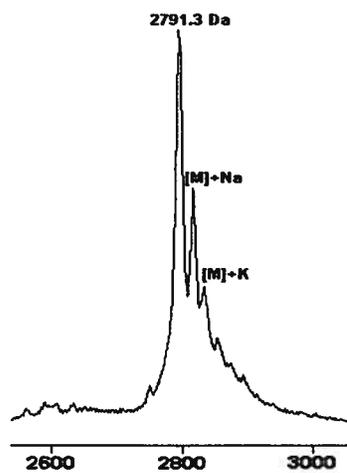


Figure 19: Analyse par spectrométrie de masse du peptide [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 purifié.

Tableau 4: Pureté des sondes déterminée par CLHP analytique.

Sonde	Pureté en %	Temps de rétention en min
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ] hET-1	95,0	20,65
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ] hET-1	97,9	20,70
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ] hET-1	97,9	19,27
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ] hET-1	97,6	19,77
hET-1	92,0	13,20

Tableau 5: Masse des sondes déterminée par spectrométrie de masse.

Sonde	Poids moléculaire théorique (Da)	Poids moléculaire obtenu (Da)
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	2792	2791
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1		2791
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1		2792
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1		2793

### 5.2.2 Caractérisation par essai de liaison compétitif

Un aliquot d'ET-1 native en solution a été traité pour y incorporer un traceur radioactif au moyen d'une réaction d'iodation à l'Iode-125 en présence de chloramine-T. L'analyse des fractions d'élution issues de la purification par chromatographie en phase inversée C<sub>18</sub> a permis d'observer 3 pics de radioactivité. L'iode libre est rapidement élué de la colonne pour constituer le premier pic. Les deuxième et troisième pics sont ceux qui proviennent de la réaction d'iodation et correspondent respectivement à une monoiodation et à une diiodation de la fonction phénolique au niveau de la Tyr<sup>13</sup> de la sonde. Le produit de monoiodation de l'ET-1 est celui qui est conservé pour les essais de liaison.

L'essai de liaison *in vitro* des sondes en compétition avec l'ET-1 radiomarquée ([Tyr(<sup>125</sup>I)<sup>13</sup>]hET-1) a mis en évidence le caractère affin de celles-ci envers le ET<sub>A</sub>R. L'examen a tout d'abord porté sur les 4 analogues porteurs de 2 résidus *p*-Bpa lors d'un essai permettant d'apprécier l'impact stéréochimique. Les 4 analogues ont donc été successivement testés, tout comme l'ET-1. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> calculées pour chacune des sondes testées indiquent que l'orientation du Bpa a une incidence directe sur l'affinité de la sonde envers le ET<sub>A</sub>R (Figure 20). En effet, les valeurs constatées pour [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et pour [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 sont, respectivement, 8,7 x 10<sup>-9</sup> M et de 3,3 x 10<sup>-6</sup> M tandis que les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour les sondes [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 sont intermédiaires aux valeurs observées pour les 2 sondes précédentes (Tableau 6).

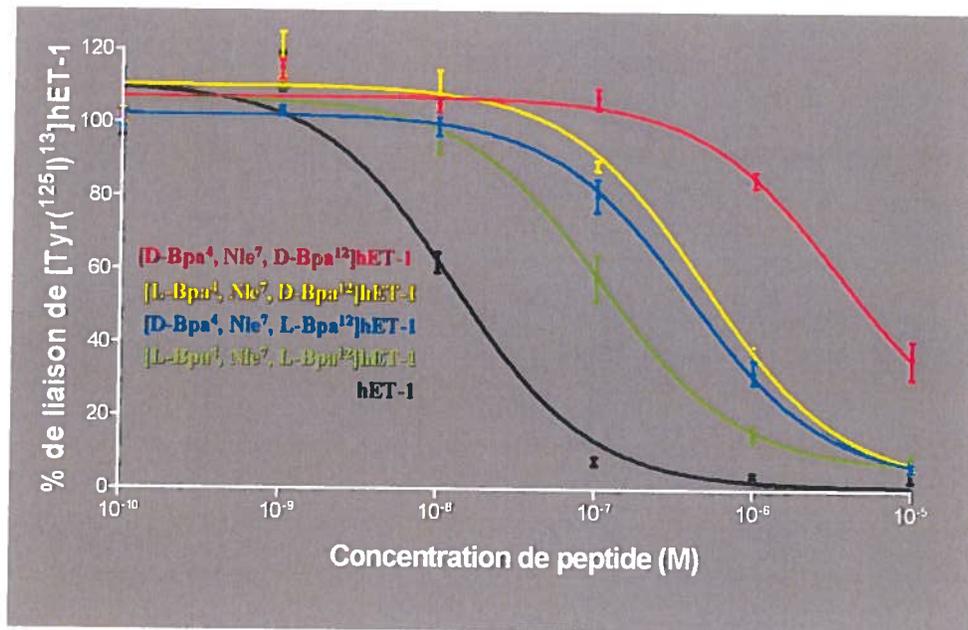


Figure 20: Courbe concentration-réponse lors de l'essai de liaison compétitif opposant les 4 sondes bisubstituées à l'ET-1 radiomarquée pour le site de liaison au ET<sub>A</sub>R dans des cellules CHO exprimant ce récepteur. Les données sont exprimées en pourcentage de liaison spécifique de l'ET-1 en absence de ligand compétitif.

Tableau 6: Valeurs d'IC<sub>50</sub> des sondes bisubstituées lors de l'essai de liaison compétitif dans des cellules CHO exprimant le récepteur ET<sub>A</sub>.

Peptide	IC <sub>50</sub> en concentration molaire (M)
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	3,3 x 10 <sup>-6</sup>
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	4,8 x 10 <sup>-7</sup>
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	3,9 x 10 <sup>-7</sup>
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	8,5 x 10 <sup>-8</sup>
hET-1	8,7 x 10 <sup>-9</sup>

L'étude a aussi porté sur les 4 sondes monosubstituées porteuses d'un L-Bpa ou D-Bpa en position 4 ou 12. Encore un fois, les données suggèrent que l'ajout d'un L-Bpa serait préférable afin de maximiser l'affinité des sondes. Le classement (Tableau 7) des 4 meilleures sondes (monosubstituées et bisubstituées) est constitué exclusivement d'analogues contenant des L-Bpa à l'exception d'une, soit l'analogue [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 qui présente un résidu D-Bpa en position 12 (Figure 21).

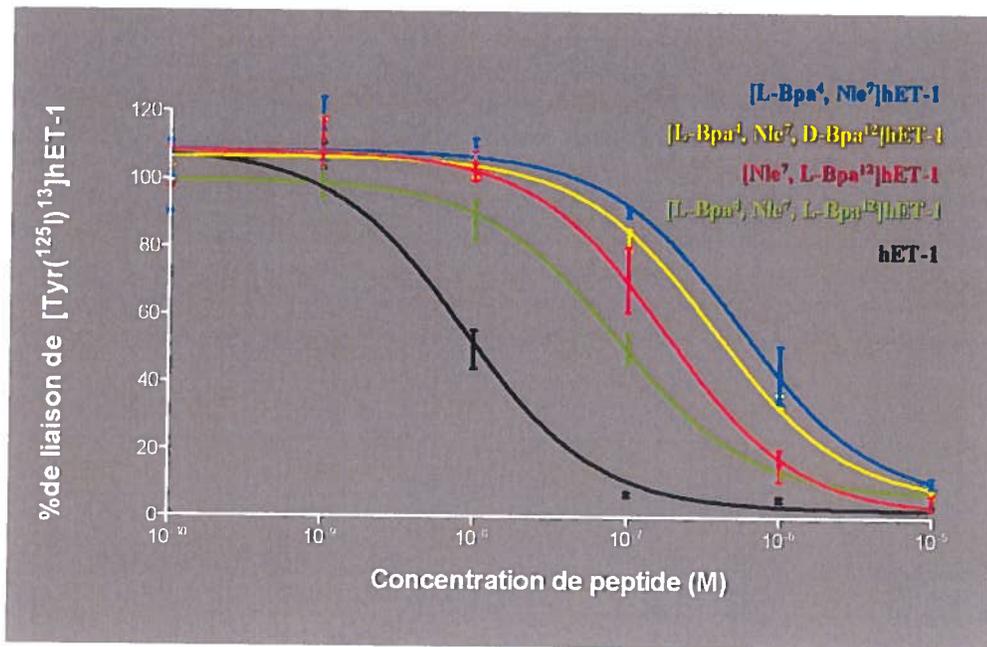


Figure 21: Courbe concentration-réponse lors de l'essai de liaison compétitif opposant les 3 sondes les plus performantes à l'ET-1 radiomarquée pour le site de liaison du ET<sub>A</sub>R dans des cellules CHO exprimant ce récepteur. Les données sont exprimées en pourcentage de liaison spécifique de l'ET-1 en absence de ligand compétitif.

Tableau 7: Valeur d'IC<sub>50</sub> des 4 sondes les plus performantes lors de l'essai de liaison compétitif dans des cellules CHO exprimant le récepteur ET<sub>A</sub>.

Peptide	IC <sub>50</sub> en concentration molaire (M)
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> ]hET-1	5,4 x 10 <sup>-7</sup>
[Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	1,7 x 10 <sup>-7</sup>
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	3,9 x 10 <sup>-7</sup>
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	8,5 x 10 <sup>-8</sup>
hET-1	8,7 x 10 <sup>-9</sup>

### **5.2.3 Caractérisation par essai pharmacologique**

La capacité des dérivés de l'ET-1 à induire une activation du récepteur ET<sub>A</sub> a été évaluée en procédant à un bioessai pharmacologique à partir de préparations d'aorte de rat, un tissu riche en ET<sub>A</sub>R. La dimension stéréochimique a été explorée, encore une fois, afin d'évaluer l'impact de l'orientation du ou des acide(s) aminé(s) photoactivable(s) incorporé(s) dans nos analogues, en relation avec l'aptitude à déclencher une contraction des muscles lisses vasculaires (Figure 22). Ils ont donc été testés alternativement pour leur propriété agoniste, en comparaison avec le pouvoir reconnu de l'ET-1 native. Le pourcentage de contraction relatif au KCl induit par les 4 analogues bisubstitués, en rapport avec la concentration de peptide en solution est nul lorsque les résidus activables sont de configuration absolue D. Par contre, on se retrouve en présence d'un agoniste partiel de l'ET-1 avec le [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 (EC<sub>50</sub> = 7,2 x 10<sup>-8</sup> M). Enfin, les résultats d'une stimulation des aortes par l'action des sondes [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1, [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 sont trop faibles pour en établir les valeurs d'EC<sub>50</sub> (Tableau 8).

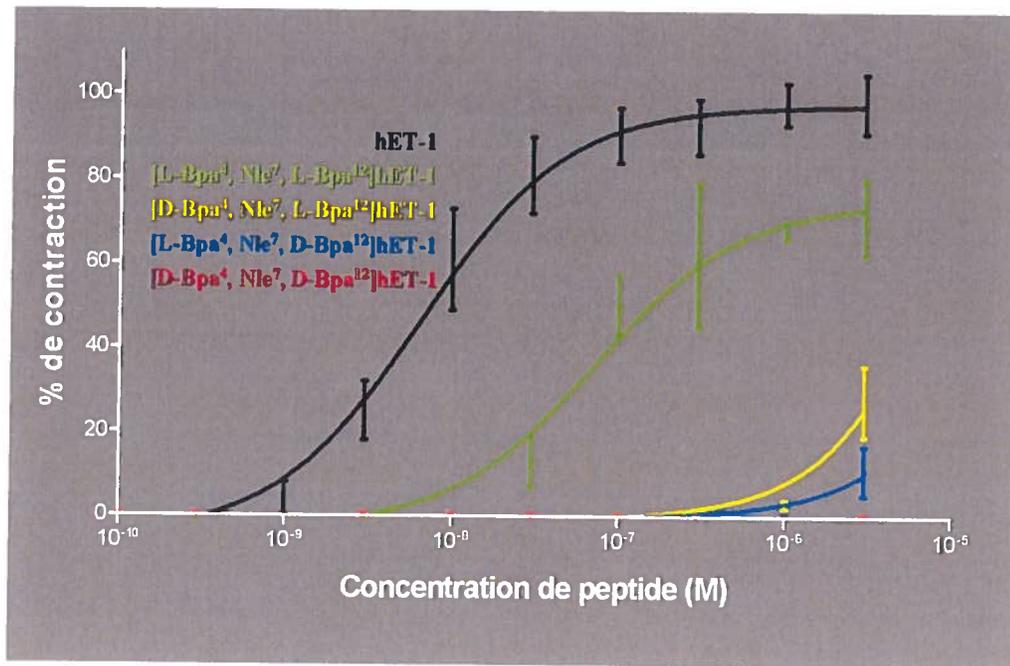


Figure 22: Courbe concentration-réponse obtenues lors du bioessai (aorte de rats exprimant le ET<sub>A</sub>R) impliquant les 4 sondes bisubstituées comparées à l'ET-1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la contraction de l'aorte de rat induit par 80mM de KCl.

Tableau 8: Valeurs d'EC<sub>50</sub> des sondes bisubstituées produisant une réponse agoniste lors de l'essai pharmacologique sur l'aorte de rat exprimant le récepteur ET<sub>A</sub>.

Peptide	EC <sub>50</sub> en concentration molaire (M)
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	n/a
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , D-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	n/a
[D-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	n/a
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	7,2 x 10 <sup>-8</sup>
hET-1	6,5 x 10 <sup>-9</sup>

Nous avons effectué un classement des sondes les plus aptes à déclencher une cascade de réactions intracellulaires menant ultimement à l'observation d'une réponse mécanique du tissu. Il est encore une fois, intéressant de constater que les 3 sondes les plus puissantes sont dotées des résidus photoactivables *L*-Bpa et ce, qu'il s'agisse d'analogues monosubstitués ou bisubstitués (Figure 23). La valeur de concentration de peptide déclenchant 50 % de la réponse physiologique maximale est de l'ordre du nanomolaire pour la sonde [Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 ( $EC_{50} = 8,7 \times 10^{-9}$  M). Une réponse significative a aussi été obtenue avec le [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 qui, en dépit d'une double présence du Bpa arrive quand même à déclencher un effet au niveau du tissu (Tableau 9).

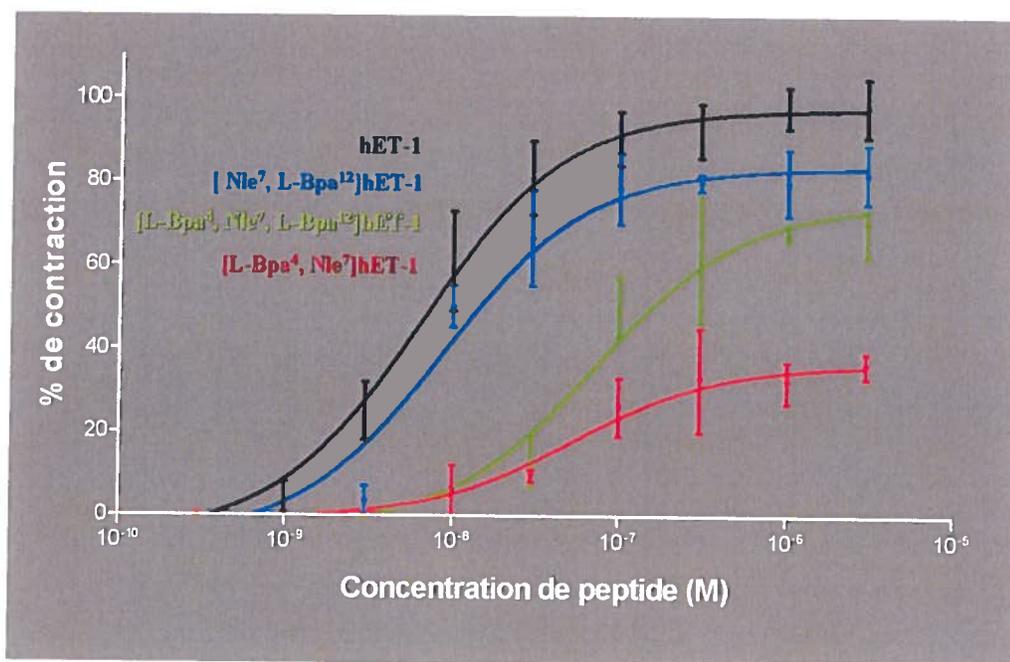
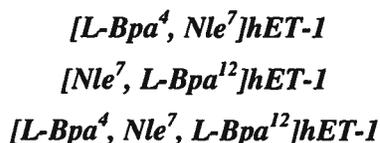


Figure 23: Courbe concentration-réponse obtenues lors du bioessai (aorte de rats exprimant le ET<sub>A</sub>R) impliquant les 3 sondes ayant démontré le plus haut potentiel d'activation du récepteur et l'ET-1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la contraction de l'aorte de rat induit par 80mM de KCl.

Tableau 9: Valeur d'EC<sub>50</sub> des trois meilleures sondes produisant une réponse agoniste lors de l'essai pharmacologique sur l'aorte de rat exprimant le récepteur ET<sub>A</sub>.

Peptide	EC <sub>50</sub> en concentration molaire (M)
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> ]hET-1	5,3 x 10 <sup>-8</sup>
[Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	8,7 x 10 <sup>-9</sup>
[L-Bpa <sup>4</sup> , Nle <sup>7</sup> , L-Bpa <sup>12</sup> ]hET-1	7,2 x 10 <sup>-8</sup>
hET-1	6,5 x 10 <sup>-9</sup>

Suite aux résultats obtenus lors des 2 expériences de caractérisation biologique des analogues, 3 sondes ont été sélectionnées pour les expériences de photomarquage:



### 5.3 Photomarquage du ET<sub>A</sub>R

L'essai de liaison compétitif des sondes synthétiques a démontré que certaines d'entre elles conservaient d'excellentes capacités de liaison au récepteur. Il était donc adéquat de considérer ces molécules pour des expériences de photomarquage du récepteur. À cet effet, l'autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 10 % de la fraction purifiée suspectée d'être le complexe désiré a montré la présence d'une bande protéique de 60-70 kDa qui correspond à la sonde lié au ET<sub>A</sub>R glycosylé (Figure 24 (A)). Une déglycosylation enzymatique (catalysée par la PNGase F) de ce complexe diminue significativement le poids de ce complexe (Figure 24 (B)). L'identité du complexe a été révélée par un immunobuvardage de type western effectué sur cette même fraction (Figure 24 (C)). En effet, la sonde s'est liée au récepteur puisqu'il y a eu apparition d'une bande correspondant à une masse d'environ 45 à 50 kDa lorsque la membrane empreinte de protéines a été exposée à un anticorps dirigé contre le ET<sub>A</sub>R. Le récepteur a une masse de 48-49 kDa et les sondes ont des poids moléculaires aux alentours de 2,8 kDa pour les bisubstituées et à peu près 2,65 kDa pour les monosubstituées.

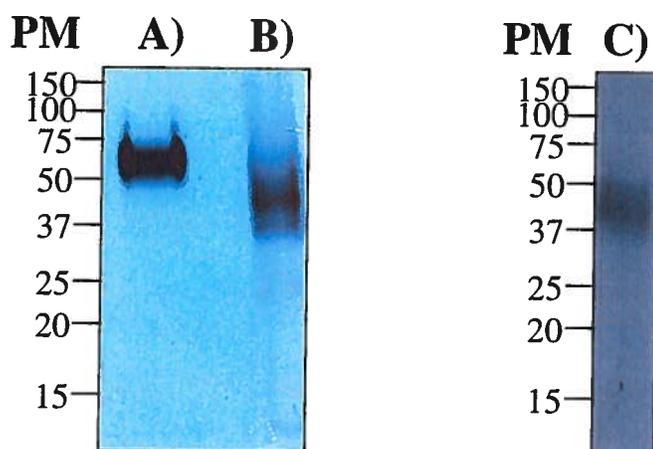


Figure 24: Caractérisation par autoradiographie d'un gel SDS-PAGE 10% du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 glycosylé (A), déglycosylé (B). Immunobuvardage de type western de ce complexe de photomarquage déglycosylé (C).

#### 5.4 Caractérisation du complexe de photomarquage

Pour déterminer la région où s'établit la liaison de la sonde avec son complément, nous avons utilisé différents types de digestion sur le complexe purifié. Plusieurs expériences de digestion par enzymes ou par agents chimiques ont produit une fragmentation du complexe. La signature d'une digestion sur la fraction purifiée du récepteur photomarké à l'aide d'un agent donné a été révélée par autoradiographie de gel SDS-PAGE 16%.

Le clivage chimique à l'aide du bromure de cyanogène sur le complexe formé du récepteur lié à l'analogue [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 (Figure 25) a généré deux gros fragments de 24,2 et 32,6 kDa. Le poids de la sonde (2,65 kDa) a été soustrait de ces valeurs pour mettre en relation ces masses observées avec les patrons théoriques de fragmentation du récepteur créés par des ruptures au niveau des méthionines. Les masses ajustées de 21,5 et 30,0 kDa démontrent, par leur taille, que la digestion s'est avérée incomplète. Le site théorique possible de fixation de la sonde dans le récepteur est inclus dans la région His<sup>66</sup>-Met<sup>266</sup>. L'analyse des fragments de digestion produit par le clivage à l'endo Arg-C (Figure 26) a permis d'établir que les masses de

fragments correspondant à 24,2, 16,2, 9,7 et 7,0 kDa sont localisables dans la région s'étendant du début du segment extracellulaire jusqu'au TM IV, à l'intérieur duquel on retrouve la séquence Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>183</sup> correspondant au plus petit fragment observé sur l'autoradiographie du gel. Enfin, la troisième et dernière digestion, impliquant le NCS (Figure 27) n'a produit qu'un seul fragment de 14,0 kDa. Le segment s'étendant de l'Asp<sup>21</sup> jusqu'à la Trp<sup>146</sup> est celui qui s'identifie le mieux à ce fragment. A partir de cette triple série de résultats, la superposition des régions théoriques établies pour les différentes digestions permet d'extrapoler une région commune, correspondant au site de liaison de la sonde monovalente. Elle est délimitée par le segment His<sup>66</sup>-Trp<sup>146</sup>.

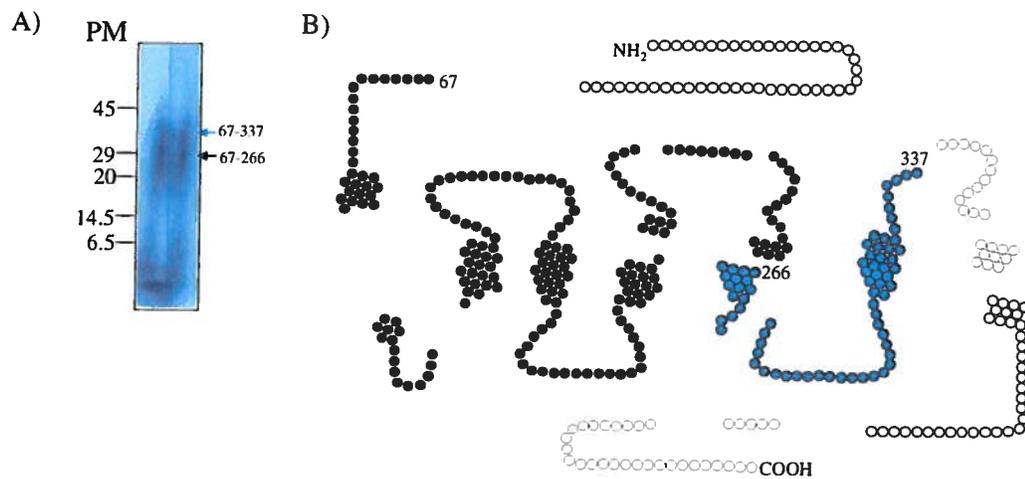


Figure 25: Digestion au CNBr du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

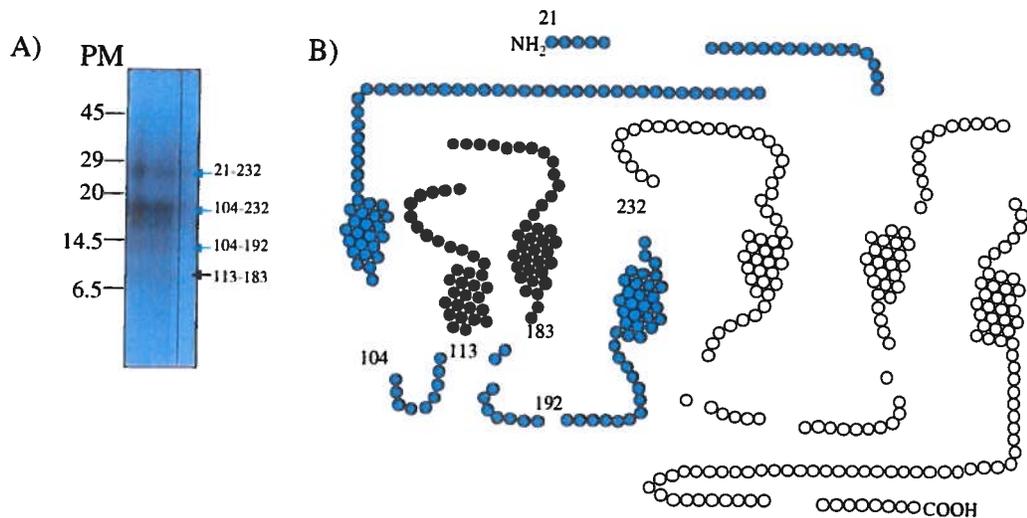


Figure 26: Digestion à la protéase Endo Arg C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

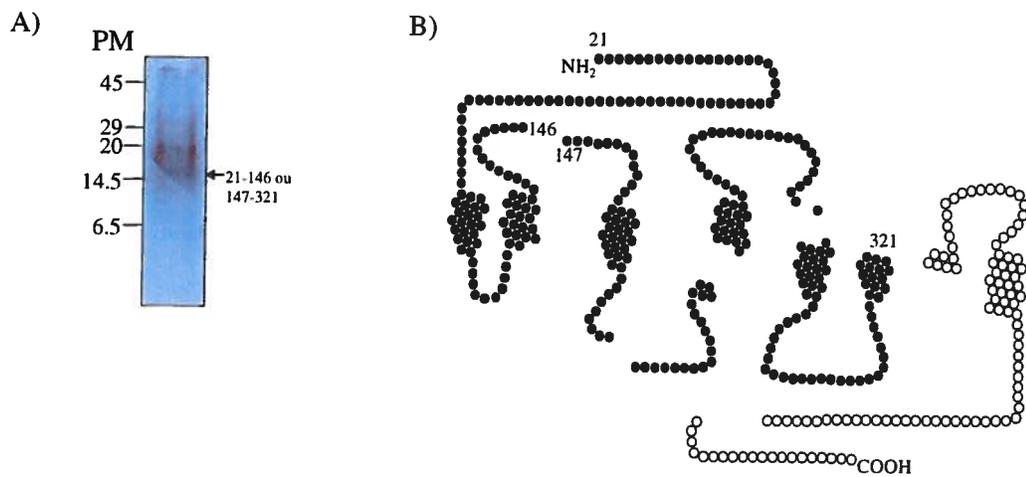


Figure 27: Digestion au NCS du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

Trois séries de clivage ont été accomplies sur le complexe formé de la sonde [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 et du récepteur. Tout d'abord, des fragments de 6,4, 11,2 et 17,4 kDa ont été identifiés conséquemment à la protéolyse par l'endo Lys-C (Figure 28). L'analyse des possibilités nous permet d'identifier la région de 18 kDa s'étendant de Asp<sup>21</sup> à Lys<sup>166</sup> inclusivement, et d'en isoler la séquence Cys<sup>110</sup>-Lys<sup>166</sup> attribuable à la bande affichant le plus petit poids moléculaire. Nous avons ensuite appliqué la digestion catalysée par l'Endo Arg-C sur notre produit de photomarquage (Figure 29) ce qui a entraîné la production de fragments de masse correspondant à 7,1 kDa, 14,5 kDa et 25,5 kDa. La région (Ile<sup>104</sup>-Lys<sup>327</sup>) possède un poids théorique de 25,1 kDa s'approchant de la masse de la bande avec le plus haut poids moléculaire, tout en comprenant les segments Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>183</sup> et Ile<sup>104</sup>-Lys<sup>232</sup> dont les poids théoriques respectifs de 7,8 kDa et 14,1 kDa sont tout près des masses des 2 autres bandes. Le NCS est le dernier des agents de digestion employé sur ce complexe (Figure 30). Il en a résulté en la production de fragments de 2,9 et 7,2 kDa et ceux-ci peuvent être associés à une région incluant le segment Phe<sup>147</sup>-Trp<sup>257</sup>. Elle contient plus précisément le fragment Ser<sup>191</sup>-Trp<sup>210</sup> dont le poids moléculaire de 2,2 kDa se rapproche de la bande de plus faible poids moléculaire. C'est en superposant ces 3 segments qu'il nous a été possible d'établir une région commune qui va des acides aminés Phe<sup>147</sup> jusqu'à la Lys<sup>166</sup>.

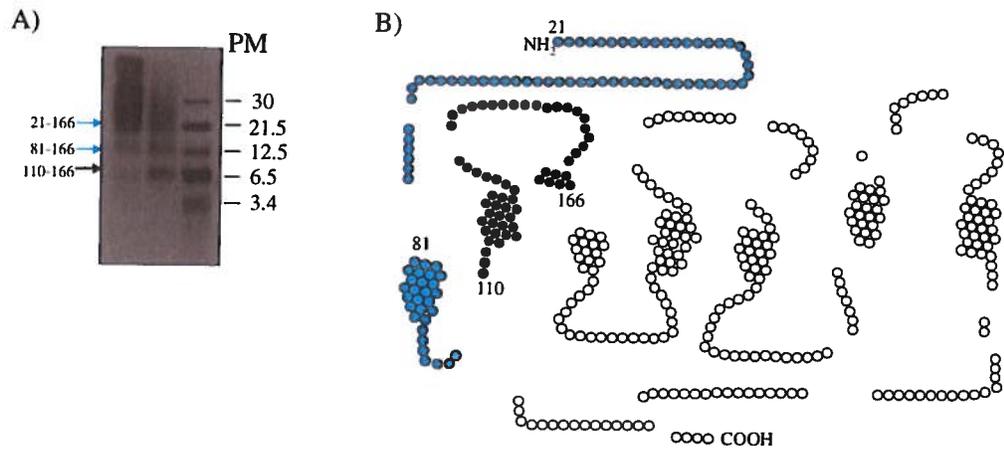


Figure 28: Digestion à la protéase Endo Lys C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

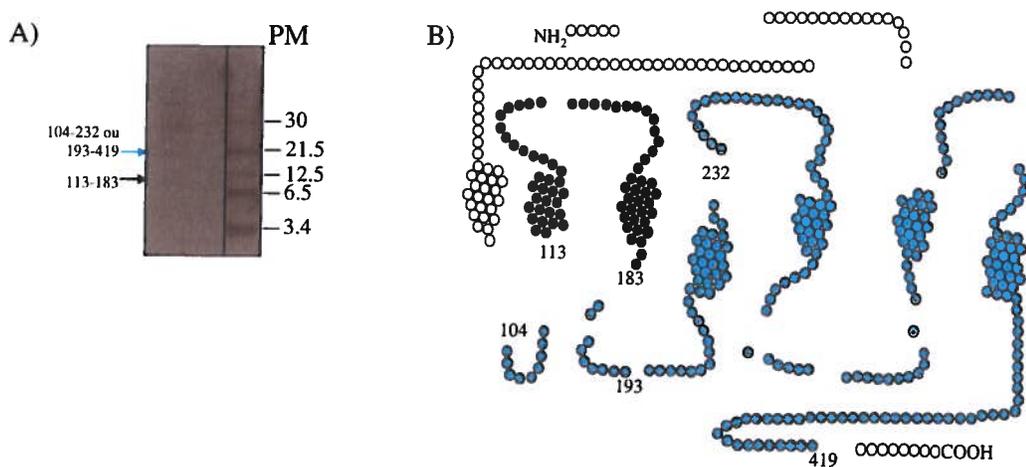


Figure 29: Digestion à la protéase Endo Arg C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

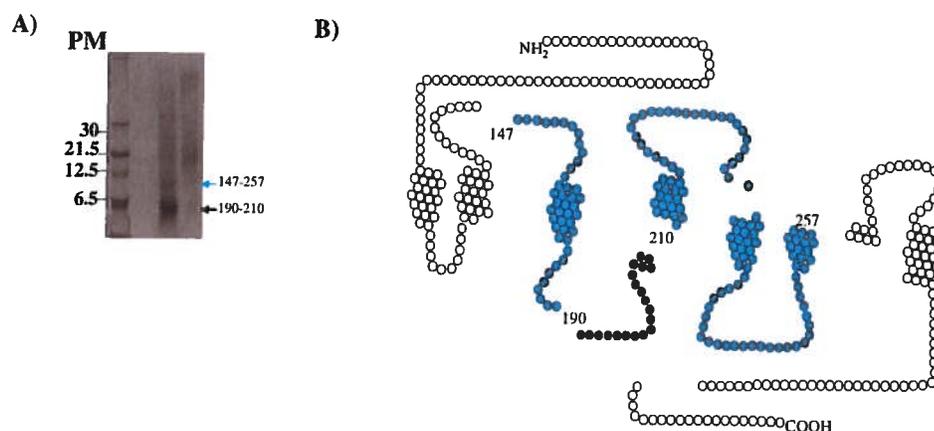


Figure 30: Digestion au NCS du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

La sonde bisubstituée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 a aussi servi pour le marquage du récepteur et la fraction purifiée du produit de cette interaction a aussi subi l'action digestive d'agents de clivage. Sous l'effet de clivages produits par le CNBr (Figure 31), le complexe s'est fragmenté et a laissé une signature observée au poids moléculaire de 12,7 kDa. Les séquences Arg<sup>112</sup>-Met<sup>223</sup> (12,6 kDa) ou Asp<sup>21</sup>-Met<sup>111</sup> (12,2 kDa) Gly<sup>224</sup>-Met<sup>336</sup> (12,6 kDa) et Lys<sup>241</sup>-Met<sup>350</sup> (12,5 kDa) ont des poids voisins de la masse calculée pour la bande. Une dernière expérience de clivage a été réalisée sur ce complexe et a fait intervenir l'Endo Arg-C (Figure 32). Quatre fragments ont pu être observés et ceux-ci avaient des masses établies à 16,1 kDa, 12,5 kDa, 8,0 kDa et 3,6 kDa. La région correspondante, d'une masse théorique de 15,7 kDa, s'allonge sur le segment Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>183</sup>. Ainsi, le fragment Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>145</sup> (11,4 kDa) correspondrait à la bande de 12,5 kDa. Lorsque l'on s'attarde à l'association des deux plus petites bandes (8,0 kDa et 3,6 kDa), on observe qu'elles sont respectivement associées aux fragments délimités par les acides aminés Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>183</sup> ou Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>102</sup> et Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>145</sup> ou Trp<sup>146</sup>-Arg<sup>183</sup>. Par conséquent, la région commune découlant de la superposition des deux séquences de résidus permet de localiser un segment qui va des acides aminés Gly<sup>42</sup> jusqu'à Arg<sup>183</sup>.

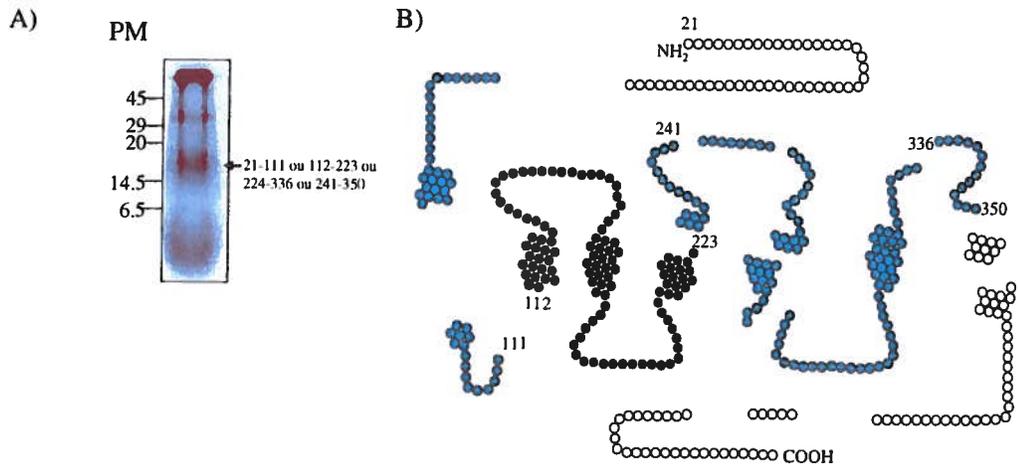


Figure 31: Digestion au CNBr du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

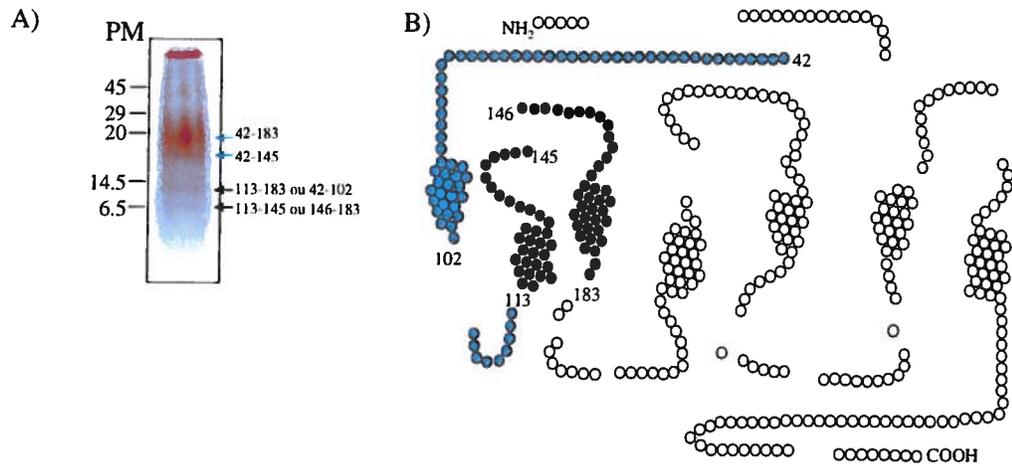


Figure 32: Digestion à la protéase Endo Arg C du complexe de photomarquage composé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde radiomarquée [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 séparé par SDS-PAGE 16%. Autoradiographie du complexe purifié soumis au clivage (A). Représentation du ET<sub>A</sub>R montrant les fragments probables de digestion associés aux bandes observées après autoradiographie du gel (B).

## Discussion

### 1. Mise en situation

Le système de l'endothéline, constitué de 3 isoformes du peptide, de 2 sous-types de récepteur et de quelques peptidases actives sur des précurseurs des isoformes requiert un parfait équilibre afin d'assurer l'homéostasie vasculaire. D'une part, l'expression paracrine et autocrine de l'hormone ET au niveau de plusieurs organes (cerveau, cœur, poumon, rein, etc) est modulée finement en réponse au stress (Kedzierski et Yanagisawa, 2001). D'autre part, son impressionnant pouvoir vasoactif représente un risque pathologique reconnu lorsque la modulation de l'expression des intervenants (ETs, ET-Rs et peptidases) s'écarte des niveaux physiologiques pour devenir source de diverses maladies telles que l'hypertension systémique et/ou pulmonaire, l'insuffisance cardiaque ou l'athérosclérose, pour n'en nommer que quelques-unes (Schiffrin et Touyz, 1998). À titre d'exemple, les victimes d'hypertension pulmonaire ont des niveaux d'ET-1 circulante trop élevés en combinaison avec une surexpression du ET<sub>A</sub>R (Masaki, 2004). Arriver à comprendre un tel système, ne serait-ce que partiellement, représente un défi de taille vu la complexité de la cascade biorégulatrice impliquée. Beaucoup d'études sont néanmoins menées depuis plusieurs années car tous reconnaissent le rôle prépondérant de cette hormone peptidique dans un nombre élevé et sans cesse croissant de pathologies. De nombreuses recherches portent sur le développement d'antagonistes qui sont sélectifs ou non pour les sous-types de récepteur de l'ET. Par exemple, la FDA a approuvé en 2001 l'utilisation d'un antagoniste non sélectif qui compétitionne avec l'ET-1 au niveau de la liaison avec les ET<sub>A</sub>R et ET<sub>B</sub>R. Ce médicament régule la pression intra-pulmonaire en contrôlant le tonus vasculaire dans cet organe (Masaki, 2004). Comme bien d'autres médicaments, les effets secondaires sont nombreux et sont souvent attribuables au manque de spécificité de ceux-ci. Une partie de la réponse à ce problème se situe à l'échelle moléculaire au niveau des processus de biosynthèse/bioactivation de l'ET ou de l'interaction ligand-récepteur.

Notre démarche expérimentale visait à dissiper un peu d'ombre au niveau de l'interaction récepteur-ligand. Plus spécifiquement, nous avons cherché à mettre en évidence les principaux déterminants moléculaires impliqués dans la liaison de l'ET-1

au sous-type de récepteur ET<sub>A</sub>, un processus qui précède l'action biologique médié par le récepteur. Nous avons focalisé sur cet objectif en privilégiant une approche moléculaire misant sur la méthode de marquage de récepteur via l'utilisation de sondes photoactivables.

## 2. Stratégie de synthèse pour l'assemblage des sondes

Dans le but précis de synthétiser des analogues avec une affinité significative, il s'avérait stratégiquement avantageux de baser leur structure sur celle de l'ET-1, un peptide-hormone dont la valeur de K<sub>d</sub> est de l'ordre du nanomolaire. Toujours dans cette optique, un examen préliminaire de la littérature a mis en évidence les données de structure-activité concernant ce peptide. Ainsi, cela a permis de relever les positions de substitution par le *p*-Bpa qu'il valait mieux éviter. Les positions 1 à 3, 8 à 11, 13 à 15, 17 et 19 à 21 ne sont interchangeable qu'au détriment d'une perte significative d'affinité et/ou d'activité (Andersen *et al.*, 1992; Galantino *et al.*, 1995; Tam *et al.*, 1994; Tessier *et al.*, 2000). Ces positions comprennent notamment la région chargée (Asp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> et Glu<sup>10</sup>) et le segment terminal hydrophobe (Ile<sup>19</sup>, Ile<sup>20</sup> et Trp<sup>21</sup>) qui sont conservés au sein des 3 isoformes de l'ET chez les mammifères (humain, souris, rat, vache, cochon, chien et lapin).

Le choix des sites d'incorporation du résidu photoactivable s'est donc porté sur les positions 4 et 12. D'ailleurs, ce résidu photoactivable a été sélectionné selon des critères de stabilité à l'environnement ambiant, de similarité avec certains acides aminés naturels (surtout la Phe), d'absence de risque pour les protéines à la longueur d'onde d'activation et sa compatibilité avec la synthèse peptidique en phase solide. La synthèse des sondes a donc été effectuée sur support solide, en accord avec les protocoles propres à la chimie Boc et en utilisant une résine de type chlorométhylée (résine de Merrifield) (Marshall, 2003).

## 2.1 Synthèse des sondes

L'assemblage des peptides selon le protocole de synthèse Boc s'est déroulé sans difficultés majeures. L'addition des résidus *p*-Bpa a toutefois ralenti la synthèse. En effet, il a fallu procéder à des acétylations au moyen de l'anhydride acétique, suite à l'incorporation de ces résidus, puisque le monitoring démontrait la présence d'amine libre même après des couplages doubles de longue durée. Il est vrai que le *p*-Bpa est un résidu volumineux et fortement hydrophobe. Alors d'une part, l'acétylation a permis de bloquer définitivement les amines résiduelles avant de passer à l'acide aminé suivant et d'autres part, de diminuer l'encombrement stérique en réduisant le nombre de sites disponibles pour le prochain couplage correspondant, en d'autres termes, à plus d'espace entre chaque chaîne peptidique pour l'élongation. Effectivement, les couplages ont repris de leur efficacité par la suite. Enfin, l'incorporation de l'autre résidu non naturel, en l'occurrence la norleucine, n'a pas occasionné de problème notable et s'est effectuée facilement à l'aide d'un couplage unique.

## 2.2 Évaluation de la synthèse des sondes

L'évaluation, par CLHP analytique, a permis d'observer plusieurs pics suggérant la présence de réactions secondaires telles l'oxydation, l'alkylation et des réarrangements intramoléculaires (Figure 9). Les cycles de déprotection du groupement Boc des amines terminales des acides aminés au TFA favorisent ce type de réaction. Celles-ci sont davantage présentes que lors de l'approche de synthèse de type orthogonal utilisant le groupement protecteur d'amine 9-fluorènylméthoxycarbone (Fmoc) qui est labile en milieu basique, en combinaison avec la stratégie de protection des chaînes latérales par le groupement *tert*-butyle (*t*-Bu) qui est sensible aux acides (Albericio, 2000). Toutefois, les coûts plus élevés associés à l'usage de dérivés Fmoc comparativement aux *N*- $\alpha$ -Boc-acides aminés ont justifié l'usage de cette dernière (les dérivés Fmoc non naturels comme le Bpa sont particulièrement dispendieux). Enfin, les temps de rétention prolongés observés pour des pics lors de l'analyse du peptide brut après clivage à l'acide fluorhydrique laissent supposer que le décrochage de certains groupes protecteurs des chaînes latérales a été incomplet. Ces groupes protecteurs sont majoritairement des dérivés benzyliques

hydrophobes et il est supposé qu'ils sont encore présents et qu'ils causent un délai dans le temps d'élution de la colonne. De plus, la procédure de clivage par l'acide fluorhydrique du lien peptide-résine est une source possible d'alkylation et/ou d'oxydation pour les résidus Trp et Tyr. Cependant, un ajout de capteurs de carbocations comme le m-crésol et d'un agent réducteur tel le DMS est de nature à prévenir, dans une large mesure, ces réactions secondaires (Pennington, 1994).

### 3. Caractérisation des sondes

#### 3.1 Caractérisation CLHP et spectrométrie de masse

Les deux étapes de cyclisation oxydative et l'étape de déformylation se sont déroulées sans problèmes et les purifications subséquentes ont permis d'amener le degré de pureté des sondes à des niveaux de l'ordre de 95% à 99% (Figures 10 à 12, Tableau 3). De plus, le temps d'élution observé sur colonne C<sub>18</sub> pour les quatre analogues bisubstitués (environ 19 à 21 min) est bien supérieur à celui observé pour l'ET-1 (environ 13 min) ce qui indique que l'incorporation des résidus *p*-Bpa a conféré à l'analogue un caractère hydrophobe de loin supérieur à celui de l'ET-1 (Tableau 3, Figures 13 à 18). Ensuite, on constate une différence dans les temps d'élution observés en fonction de la stéréochimie du résidu *p*-Bpa. Effectivement, l'ajout du D-Bpa modifie le niveau de rétention du peptide lorsqu'il est situé en position 12 de la structure puisque les temps d'élution des analogues avec le D-Bpa à cette position sont d'environ 1 à 1,5 min supérieurs à ceux des analogues avec un L-Bpa à cette position. Comme ce phénomène n'est pas observé après une substitution de la position 4 de la structure, il est très probable que l'incorporation du *p*-Bpa en position 12 comparativement à la position 4, affecte à un certain degré le repliement du peptide dû à son important caractère aromatique qui s'ajoute à celui des résidus voisins (Tyr<sup>13</sup> et Phe<sup>14</sup>), dans une région contenant le segment hélicoïdal caractéristique de l'ET-1. L'aromaticité de la chaîne latérale de cet acide aminé et en particulier sa capacité de produire, selon son orientation des recouvrements des orbitales  $\Pi$  des noyaux phényle se veut une explication plausible pour justifier la variation du temps de rétention. De plus, n'oublions pas que, tout près est située une région chargée constituée des résidus Asp<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Glu<sup>10</sup>. L'orientation de la chaîne latérale du D-Bpa pourrait masquer plus efficacement cette région chargée que ne le ferait le L-Bpa.

Finalement, l'analyse en spectrométrie de masse a été effectuée lors de la plupart des étapes qui ont mené à la production des échantillons purifiés de sondes cycliques (Figure 19). Les masses obtenues pour les sondes (2790,64 à 2792,90 Da) correspondent à la masse théorique attendue (2792 Da) et elles nous suggèrent que l'identité des produits de synthèse est conforme à celle attendue (Tableau 5).

### 3.2 Caractérisation par essai pharmacologique et essai de liaison

La caractérisation biologique des sondes mono- et bisubstituées a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence l'impact de la stéréochimie du résidu *p*-Bpa au sein de nos analogues et d'autre part, de nous permettre de sélectionner les analogues au profil le plus prometteur dans le cadre des expériences de photomarquage du ET<sub>A</sub>R (Figures 20 à 23, Tableaux 6 à 9).

Tout d'abord, les sondes bisubstituées [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1, [D-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1, [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 ont été évaluées pour vérifier comment l'orientation de la chaîne latérale du résidu Bpa pouvait affecter l'affinité des sondes pour le récepteur et moduler le potentiel d'activation de celui-ci. Les résultats obtenus montrent, de prime abord, que la stratégie visant à incorporer les résidus Bpa aux positions 4 et 12, et la Nle en position 7, s'est avérée adéquate puisque certains analogues ont affiché des valeurs relativement élevées de liaison et d'activation du récepteur. La difficulté d'incorporation des *p*-Bpa lors de la synthèse et le temps de rétention supérieur à celui de l'ET-1 observé lors de l'analyse par CLHP laissaient craindre une altération de la structure tridimensionnelle ainsi qu'un encombrement stérique accru dans les analogues susceptibles d'affecter l'interaction ligand-récepteur. Or, si cette hypothèse s'est avérée applicable dans une certaine mesure nous avons tout de même constaté que les sondes contenant des L-Bpa ont donné d'excellents résultats dans les deux types d'essai et qu'à l'opposé, les sondes porteuses de D-Bpa offraient des résultats relativement décevants. Ces résultats ne sont pas surprenant puisque la quasi-totalité des acides aminés composant les diverses formes de vie sont des L-acides aminés (Hendry *et al.*, 1981). Nonobstant cette réalité, la stéréochimie a quand même été explorée puisqu'il a été démontré que le remplacement de certains résidus par des D-acides aminés lors d'un D-Scan de l'ET-1 s'avérait profitable au niveau de la modulation de la liaison ou de la contraction de cellules musculaires lisses de vaisseaux sanguins qui sont riches en ET<sub>A</sub>R (Galantino *et al.*, 1995). Aussi, puisque nous sommes en présence d'un résidu non naturel volumineux et à caractère hydrophobe élevé, il est possible que la présence du Bpa occasionne un encombrement stérique et introduise des contraintes au niveau de la structure tertiaire de l'analogue. Or, l'analyse des résultats obtenus pour les deux types de

caractérisation biologique ont montré toute l'importance d'y aller avec les résidus *p*-Bpa d'orientation L non seulement au niveau de la position 4 mais surtout à la position 12 faute de quoi, une chute drastique des valeurs d'affinité envers le récepteur ainsi qu'une perte totale du pouvoir d'activation au récepteur sont observées aux concentrations testées.

Les résultats obtenus pour les sondes mono- et bisubstituées ont permis de sélectionner les analogues au profil le plus intéressant. À l'exception de la sonde [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, D-Bpa<sup>12</sup>]hET-1, qui a donné d'excellents résultats en essai de liaison comparativement aux sondes monosubstituées comportant un L-Bpa en position 4 ou 12, les sondes les plus intéressantes en essai de liaison sont les mêmes que celles sélectionnées lors du bioessai sur l'aorte de rat (activation du ET<sub>A</sub>R). L'ensemble de ces résultats nous a aidés à sélectionner les sondes pour le photomarquage.

#### **4. Production, purification et caractérisation du complexe de photomarquage**

##### **4.1 Production et purification du complexe de photomarquage**

Des résultats très positifs obtenus lors de l'essai de liaison en compétition avec l'ET-1 radiomarquée dans des cellules exprimant le ET<sub>A</sub>R laissaient entrevoir un marquage efficace du ET<sub>A</sub>R par photoaffinité. Dans les faits, le marquage s'est déroulé correctement et suggérait qu'une proportion très significative de celui-ci impliquait spécifiquement le récepteur. Pour nous en assurer, nous avons effectué une expérience de photomarquage de récepteur avec nos sondes sur des cellules qui avaient été préalablement exposées à l'ET-1 froide. Les mesures de radioactivité quasi nulles confirmaient que cette liaison s'effectuait spécifiquement sur le ET<sub>A</sub>R. L'analyse par un gel de SDS-PAGE préparatif montrait une forte émission de radiations concentrées dans la région correspondant à 60 à 70 kDa. C'est donc cette fraction qui a été conservée pour poursuivre une caractérisation visant à confirmer l'identité du complexe et à réaliser les expériences de fragmentation par digestion chimique ou enzymatique.

## 4.2 Caractérisation du complexe de photomarquage

L'analyse par autoradiographie associée à une détection par réactivité immunologique au moyen d'un anticorps anti-ET<sub>A</sub>R a permis de confirmer l'identité du complexe isolé précédemment. Ainsi, l'immunobuvardage de type western a révélé la spécificité du photomarquage envers le récepteur ET<sub>A</sub> par nos sondes. De plus, cette tache est observable dans la même région (60 à 70 kDa) que celle observée précédemment lors de la purification par gel d'électrophorèse (Figure 24). Une région correspondant au poids attendu par un complexe composé d'un récepteur ET<sub>A</sub> glycosylé (environ 60 kDa) et de la sonde (environ 3 kDa). La déglycosylation par la PNGase F effectuée sur la préparation purifiée du complexe a donc été réalisée afin d'évaluer si le poids observé était similaire à celui déterminé suite au clonage du récepteur. Le sous-type A du récepteur humain de l'endothéline est composé de 427 acides aminés pour une masse relative de 48 625 Da (Haendler, Hechler et Schleuning, 1992) et la présence caractéristique d'un produit de déglycosylation observable par gel de polyacrylamide dans la région de 50 kDa concorde avec ces données (Figure 24). D'autre part, la déglycosylation se veut une étape simplifiant l'analyse des fragments de clivage lors des digestions en éliminant un segment non peptidique relativement volumineux.

Le dernier segment du projet a ensuite été abordé puisque les expériences de marquage du ET<sub>A</sub>R à l'aide des nos trois sondes photoactivables ont établi l'identité du complexe. Des essais de digestion à l'aide d'agents de clivage ont été menés sur les trois types de complexe dans le but de délimiter la région de liaison de l'analogue dans le récepteur.

Dans un premier temps, trois types de clivage ont été réalisés sur le complexe formé du récepteur avec la sonde [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. Les fragments théoriques associés aux bandes observées sur l'autoradiographie du gel suite à la digestion au CNBr ou au NCS couvrent une large partie du récepteur et ceci est dû à une digestion partielle qui génère des bandes de haut poids moléculaire. Par conséquent, nous avons davantage focalisé nos efforts sur les données produites à partir du clivage avec de la protéase Endo Arg C comme points de départ. Ainsi, les 4 bandes observées lors du clivage à l'Endo Arg C (Figure 26) nous ont permis d'identifier une région constituée de la séquence d'acides aminés 21 à 232 dont les patrons de fragmentation théorique

intègrent les masses observées pour ces 4 bandes (7,0, 9,7, 16,2 et 24,2 kDa). À l'intérieur de cette région, nous notons 2 possibilités de segments qui puissent être associés à la bande de plus faible poids. Ainsi, les fragments Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>103</sup> et Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>183</sup> sont ciblés, offrant des masses théoriques respectives de 6,8 kDa et 7,8 kDa. D'autre part, la digestion au NCS (Figure 27) a produit des bandes de poids moléculaires approximatif de 14,0 kDa. Au départ, 2 régions avaient été ciblées, soit les régions Asp<sup>21</sup> jusqu'à Trp<sup>146</sup> et Phe<sup>147</sup> jusqu'à Phe<sup>321</sup> puisque les poids moléculaires respectifs sont de 12,9 kDa et de 15,1 kDa. Enfin, les fragments de haut poids moléculaire (21,5 et 30,0 kDa) générés à partir de la digestion au CNBr (Figure 25) sont localisables au niveau des fragments de masse de 22,6 et 30,3 kDa et ils peuvent être associés respectivement au segment His<sup>66</sup>-Met<sup>266</sup> et His<sup>66</sup>-Met<sup>337</sup>. La combinaison des trois types de digestion effectués sur cette sonde a mis en évidence un fragment commun de clivage qui s'étend de His<sup>66</sup> à Trp<sup>146</sup>. En retournant à l'analyse qui a permis de déterminer deux régions possibles correspondant à la bande observée suite à la digestion au NCS, on constate que la région Phe<sup>147</sup> jusqu'à Phe<sup>321</sup> n'est pas incluse dans la région commune qui découle de la superposition des divers segments établis à partir des différents types de digestion du complexe. Par conséquent, la région His<sup>66</sup> jusqu'à Trp<sup>146</sup> est celle qui est la plus probable pour correspondre au site de photomarquage de cette sonde dans le récepteur (Figure 33).

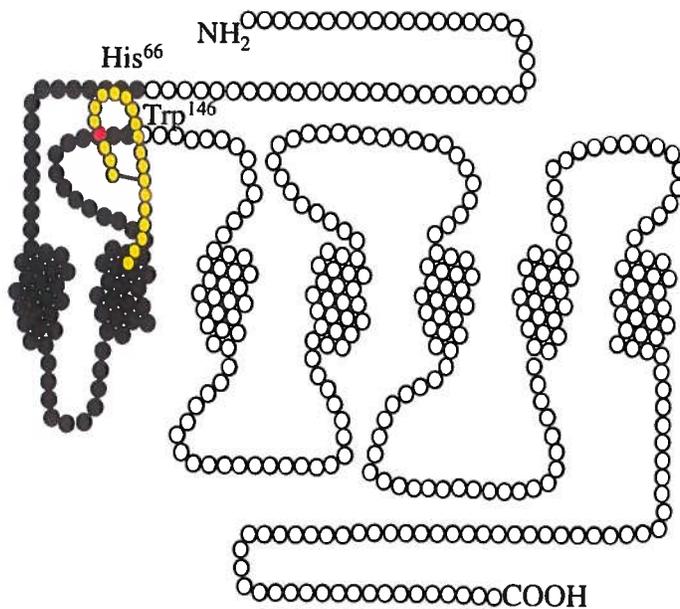


Figure 33: Représentation du complexe formé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. La région en noir correspond au segment commun issue des digestions par le CNBr, le NCS et l'Endo Arg C.

Deuxièmement, l'expérience de clivage à l'Endo Arg C effectuée sur le complexe constitué de la sonde [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 et du récepteur (Figure 29) a été des trois types de clivage effectués, celle qui a été la plus problématique pour l'assignation des fragments théoriques. Ainsi nous avons débuté l'analyse par les données récoltées de la digestion au NCS (Figure 30). Cette digestion a permis de produire des bandes dont le poids moléculaire est de 2,9 et 7,2 kDa. La région associée aux acides aminés Phe<sup>147</sup>-Trp<sup>257</sup> est ciblée ici. En fait, elle inclut le fragment Ser<sup>191</sup>-Trp<sup>210</sup> dont le poids moléculaire de 2,2 kDa est le seul à pouvoir correspondre à cette tache. Toutefois, comme la masse théorique est relativement loin de la masse calculée de la bande, nous nous questionnons à savoir s'il ne s'agirait pas de la sonde elle-même non complexée. La bande de plus haut poids moléculaire est associée à deux possibilités de fragments, soit les résidus Phe<sup>147</sup>-Trp<sup>210</sup> ou Ser<sup>191</sup>-Trp<sup>257</sup> qui ont des poids théoriques respectifs de 7,3 kDa et 7,7 kDa. L'attribution des bandes observées sur l'autoradiographie produite suite à la digestion à l'Endo Lys C (Figure 28) est relativement simple. Ainsi, les masses déterminées (6,4, 11,2 et 17,4 kDa) ont

été associé à une région couvrant les acides aminés Asp<sup>21</sup> jusqu'à Lys<sup>166</sup> dont la masse théorique calculé de 18,1 kDa est près de la bande de plus haut poids moléculaire observée. De plus, cette région inclue les séquences Asp<sup>21</sup> jusqu'à la Lys<sup>109</sup> et Cys<sup>110</sup> jusqu'à la Lys<sup>166</sup> dont les masses théoriques respectives sont de 11,6 kDa et 6,5 kDa soit des masses quasi identiques à celles évaluées pour les deux autres bandes révélées. L'attribution d'une région qui inclut les bandes observées issues du clivage à l'Endo Arg C (7,1, 14,5 et 25,5 kDa) offre, sommairement, 2 grandes régions où l'on peut associer chacune des bandes observées. En effet, la première région (Ile<sup>104</sup>-Lys<sup>327</sup>) d'un poids théorique de 25,1 kDa s'approche de la masse de la bande ayant le plus haut poids moléculaire, tout en comprenant les segments Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>183</sup> et Ile<sup>104</sup>-Lys<sup>232</sup> dont les poids théoriques de 7,8 kDa et 14,1 kDa sont voisins des poids des deux autres bandes. Ensuite, la deuxième région est délimitée par la séquence Val<sup>193</sup>-Arg<sup>419</sup> dont la masse théorique est de 26,1 kDa et où l'on peut observer deux segments soit Val<sup>233</sup>-Arg<sup>291</sup> et Val<sup>193</sup>-Lys<sup>327</sup> qui sont associables aux deux autres bandes observées sur l'autoradiographie du gel. Par contre, cette deuxième région n'offre aucune compatibilité avec celle établie lors du clivage à l'Endo Lys C et bien peu également avec ce qui a été observé suite à la digestion au NCS. Ainsi, puisque la première région offre beaucoup de complémentarité avec les deux autres régions de photomarquage établies à partir des clivages, c'est celle-ci qui a été retenue pour servir à l'identification du fragment commun propre aux patrons théoriques observés après les trois types de digestion. L'analyse nous a montré que la région Phe<sup>147</sup>-Lys<sup>166</sup> est présente au niveau des trois types de digestion et elle répond donc au critère de région commune (Figure 34).

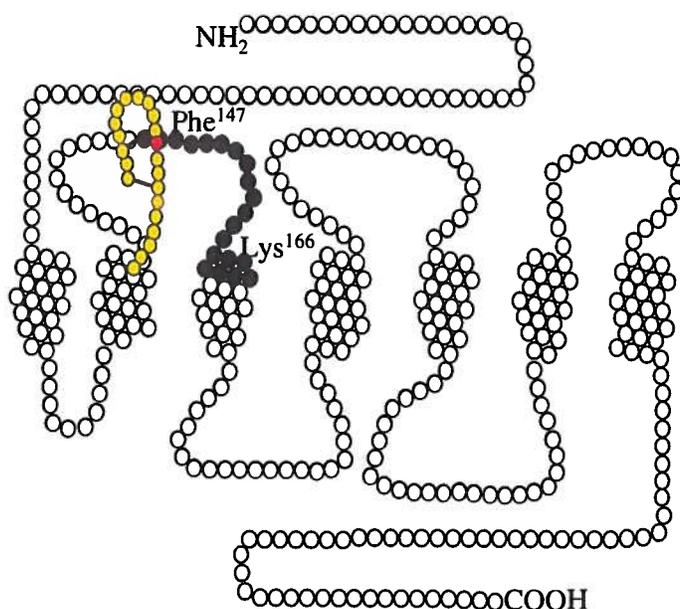


Figure 34: Représentation du complexe formé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. La région en noir correspond au segment commun issue des digestions par le NCS, l'Endo Arg C et l'endo Lys C.

Finalement, deux types de digestion ont été réalisés sur le complexe issu du photomarquage du récepteur par la sonde [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. Sous l'effet protéolytique de l'Endo Arg C, la fragmentation du complexe s'est révélée sous la forme de 4 bandes sur l'autoradiographie du gel SDS-PAGE (16,1, 12,5, 8,0 et 3,6 kDa) (Figure 32). Or, dans ce cas, il a été possible de localiser une région de 15,7 kDa, s'étendant sur 142 acides aminés (Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>183</sup>), qui inclut ces 4 bandes. Si l'association de la bande de masse calculée de 12,5 kDa ne pose aucun problème puisqu'elle correspond au fragment Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>145</sup> (11,4 kDa) il faut reconnaître que l'assignation des segments associés aux bandes de 8,0 et 3,6 kDa laisse pour chacune entrevoir deux possibilités. Ainsi, les portions Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>183</sup> ou Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>102</sup> et Asn<sup>113</sup>-Arg<sup>145</sup> ou Trp<sup>146</sup>-Arg<sup>183</sup> sont respectivement, des candidats valables pour correspondre à ces bandes. Ensuite, l'unique bande obtenue lors de la fragmentation du complexe par le CNBr (Figure 31) a une masse calculée de 12,7 kDa et nous pouvons trouver 4 possibilités de segments dont la masse théorique est relativement près. En effet, les segments Asn<sup>21</sup>-Met<sup>111</sup>, Arg<sup>112</sup>-Met<sup>223</sup>, Gly<sup>224</sup>-Met<sup>336</sup> et Lys<sup>241</sup>-Met<sup>350</sup> ont des masses

respectives de 12,2, 12,5, 12,6 et 12,6 kDa. Toutefois, seuls les 2 premiers fragments ont une région commune avec celle issue de la fragmentation à l'Endo Arg C. Ce sont donc les fragments Asn<sup>21</sup>-Met<sup>111</sup> et Arg<sup>112</sup>-Met<sup>223</sup> que nous mettons en relation avec le fragment Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>183</sup> pour établir que la région commune propre aux fragments théoriques possibles issus des 2 digestions est Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>183</sup> (Figure 35).

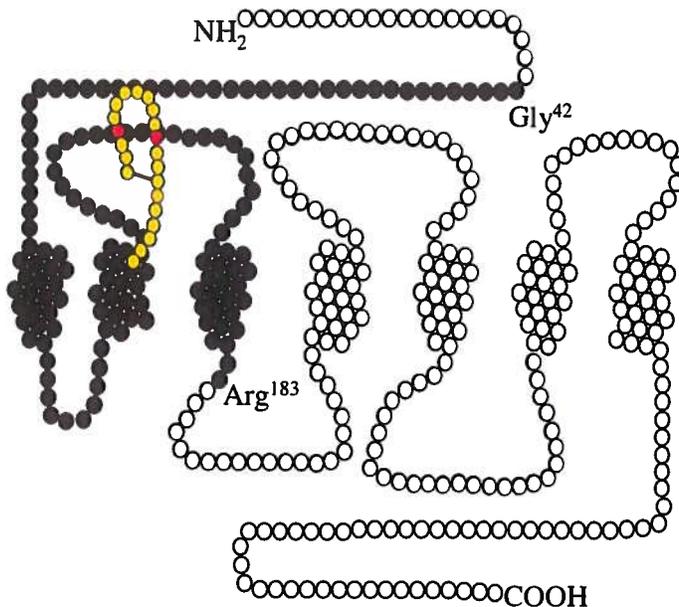


Figure 35: Représentation du complexe formé du ET<sub>A</sub>R et de la sonde [[L-Bpa<sup>4</sup>, Nie<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. La région en noir correspond au segment commun issue des digestions par l'Endo Arg C et le CNBr.

Des expériences de photomarquage du ET<sub>A</sub>R avaient été menées par le passé au sein de notre laboratoire. Ainsi, des sondes dérivées d'un antagoniste spécifique du ET<sub>A</sub>R (TTA-386) avaient été synthétisées pour caractériser le domaine de liaison dans ce récepteur (Tessier *et al.*, 2005). Celles ci ([(<sup>125</sup>I)Tyr<sup>5</sup>, D-Bpa<sup>6</sup>]TTA-386 ou [(<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>, L-Bpa<sup>6</sup>]TTA-386) avaient permis d'identifier une région (Trp<sup>257</sup>-Met<sup>278</sup>) dans le 5<sup>e</sup> TM.

Par la suite, notre laboratoire a cherché à récolter plus de données expérimentales à ce sujet en adoptant une stratégie d'investigation du domaine de liaison dans le ET<sub>A</sub>R utilisant des sondes fortement apparentées à l'ET. Cette publication (Aubin *et al.*, 2008) à laquelle j'ai contribué a mis en évidence les domaines de liaison probables

pour deux sondes. Ainsi, la région du récepteur suspectée d'interagir avec la sonde [L-Bpa<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1) à été identifiée comme étant Ile<sup>292</sup>-Trp<sup>319</sup>. De même, la sonde [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 a formé un complexe avec ce récepteur avec un point de liaison situé dans la première EC (Phe<sup>147</sup>-Lys<sup>166</sup>). En rapport avec les résultats obtenues et affichés dans le présent mémoire, on constate que les résultats actuels confirment les données observés précédemment en ce qui à trait à la sonde [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1. La stratégie de synthétiser des sondes mono- et bivalentes se voulaient une autre manière d'approfondir l'étude du site d'ancrage de l'ET dans le ET<sub>A</sub>R. Les sites de liaison relevés précédemment qui impliquaient les sondes [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 et [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>, (<sup>125</sup>I)Tyr<sup>13</sup>]hET-1 ont avancé notre connaissance de la nature de cette interaction. Leur utilisation offraient la possibilité d'obtenir une appréciation du phénomène en 3 dimensions compte tenu de la présence de 2 groupes photoactivables séparés dans l'espace. Ce projet bénéficierait grandement de l'utilisation de modelage moléculaire assisté par ordinateur où les résultats de clivage de complexe de photomarquage obtenus seraient utilisé pour élaborer une structure du complexe exposant le profil d'insertion de l'ET dans le ET<sub>A</sub>R en 3 dimensions. Cette approche pourrait, entre autre, constituer une avenue future pour la poursuite du projet.

Quelques publications produites depuis le début des années 90 ont trait à la détermination des régions du ET<sub>A</sub>R impliquées dans la liaison avec l'ET-1. Ainsi, l'arrimage de la structure cristalline de l'ET-1 dans un modèle numérique mimant la structure du ET<sub>A</sub>R à partir du squelette de la rhodopsine a mis en évidence l'importance des acides aminés Ile<sup>132</sup>-Phe<sup>156</sup> avec une forte interaction entre des paires d'acides aminés du complexe ET<sub>A</sub>R-ET-1 pour les résidus Lys<sup>142</sup>-Leu<sup>17</sup>, Phe<sup>156</sup>-Asp<sup>18</sup> et Phe<sup>153</sup>-Trp<sup>21</sup> (Orry et Wallace., 2000). La synthèse, à partir de vecteur d'expression spécialement construit, de récepteurs chimères du ET<sub>A</sub>R avec une de ses 4 boucles extracellulaires (A, B, C et D) interchangeée avec la même région du ET<sub>B</sub>R a permis de caractériser, via des tests de liaison de opposant de l'ET-1 radiomarquée compétitionnant contre un antagoniste compétitif spécifique au ET<sub>A</sub>R (BQ123), le domaine de liaison de l'ET-1 (Adachi, Yang, *et al.*, 1992). Ces mêmes tests ont confirmé que seul le remplacement de la boucle B (acides aminés 139 à 175) réduisait drastiquement la liaison de l'ET-1. Un phénomène non observé lors du remplacement des 3 autres boucles. De plus, l'expérience miroir a montré que le récepteur ET<sub>B</sub>

chimère dans lequel la boucle B du récepteur ET<sub>A</sub> a été introduite acquiert une sensibilité au BQ123 (Adachi, Yang, *et al.*, 1992). Le même type d'expérience a été reproduit mais en investigant cette région (boucle B du ET<sub>A</sub>R) un peu plus en profondeur (Adachi, Hashido, *et al.*, 1993). Les chimères construites contenaient des séquences de 5 acides aminés successifs dans cette région remplacées par la séquence correspondante du récepteur  $\beta_2$  adrénergique humain. La région déterminante de liaison de l'ET-1 a été ramenée à une séquence de 5 acides aminés (140 à 144). Suite à ces résultats, il a été démontré par un essai de mutagenèse dirigée où chacun des 5 acides aminés de cette région a été alternativement remplacé par celui du récepteur  $\beta_2$  adrénergique humain, qu'un résidu était déterminant au niveau de la liaison. Seule la substitution de l'acide aminé Lys<sup>140</sup> a fortement inhibé la liaison de l'ET-1 à ce récepteur (chute de 90% de l'affinité). Un autre groupe de recherche (Sakamoto, Yanagisawa, *et al.* 1993) a effectué le même protocole expérimental pour fabriquer un ET<sub>A</sub>R chimère dont les passages transmembranaires ont été alternativement remplacés par ceux du ET<sub>B</sub>R. Leur conclusion a été que les TM I, II, III et VII et leurs boucles proximales sont déterminants pour l'aspect liaison de l'ET-1. L'expérience miroir a permis de mettre de l'avant la sélectivité de liaison attribuée aux TM IV, V et VI et leurs boucles voisines lorsque ces TM du ET<sub>B</sub>R sont insérés dans le ET<sub>A</sub>R. La chimère ET<sub>A</sub>R ainsi construite a montré une sélectivité en tout point équivalente à celle du récepteur ET<sub>B</sub> sauvage (ET-1 = ET-2 = ET-3) alors que l'on sait que le ET<sub>A</sub>R sauvage n'a que peu d'affinité pour l'ET-3.

Bien que plusieurs résultats de la littérature ont montré par des voies indirectes (modélisation ou chimères) la localisation des régions impliquées dans la liaison de l'ET-1 dans son récepteur et ce parfois de manière précise, nous estimons que notre apport est des plus tangibles puisque nos données se veulent directes et en temps réel (utilisation de sondes virtuellement identiques en structures à l'ET-1, dans le cadre d'expérience de photomarquage de récepteur sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET<sub>A</sub>). Ainsi, nos trois régions identifiées résultant de l'analyse des différents produits de digestion effectuées sur les complexes formés du récepteur ET<sub>A</sub>R et des sondes [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>]hET-1, [Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 et [L-Bpa<sup>4</sup>, Nle<sup>7</sup>, L-Bpa<sup>12</sup>]hET-1 soit (His<sup>66</sup>-Trp<sup>146</sup>, Phe<sup>147</sup>-Trp<sup>166</sup> et Gly<sup>42</sup>-Arg<sup>183</sup>) confirme les conclusions des analyses par approches indirectes. Toutefois, il reste à accomplir un travail d'optimisation des conditions expérimentales propres aux différents types de clivage

de complexe afin de nous permettre d'obtenir des digestions plus complètes. Effectivement, sur ce plan, les nombreux essais de digestion n'ont pas toujours permis d'obtenir des bandes de faible poids moléculaire comme attendu du point de vue théorique. L'attribution des segments théoriques associés à des bandes de faible masse moléculaire est beaucoup plus aisée et elle offre plus de fiabilité et de précision. La séparation des fragments de digestion aurait sûrement été facilité par l'utilisation d'un gel d'acrylamide de type gradient, surtout pour les bandes de faible poids moléculaire. La détermination de la nature séquentielle de ces bandes de clivage pouvait théoriquement se faire par spectrométrie de masse en tandem (SM-SM). Toutefois, des obstacles comme de nombreux clivages partiels et la présence d'un traceur radioactif ont rendu cette approche difficile à justifier en pratique dans le cadre de ce projet. En continuant à optimiser les méthodes de clivage de complexe de photomarquage, il sera plus facile d'obtenir des digestions complètes. En présence d'une stratégie utilisant un autre type de traceur nous pourrions utiliser la méthode d'identification des fragments par SM-SM.

## Conclusion

Le nombre sans cesse grandissant de pathologies attribuables à des désordres du système de l'ET est le principal moteur alimentant la recherche dans ce domaine. L'ET, un peptide hormone au pouvoir vasomodulateur puissant agit via les ET<sub>A</sub>R et ET<sub>B</sub>R disséminés dans une variété de tissus ou organes. La contraction des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins est la réponse finale d'une transduction de signaux intracellulaires qui sont dépendant d'une protéine G. Le déclenchement de cette cascade est initié par la liaison de l'ET-1 au récepteur ET<sub>A</sub>. Par conséquent, identifier les principaux intervenants moléculaires impliqués dans la liaison du ligand au récepteur et l'activation de celui-ci représente un objectif toujours essentiel. Pour le récepteur ET<sub>A</sub> il est déjà acquis que certaines régions sont de la plus haute importance dans le phénomène de liaison de l'ET-1 et d'activation du récepteur. Néanmoins, ces résultats ont été obtenus par des essais de mutagénèse dirigée du récepteur, la fabrication de récepteur chimères (Adachi *et al.*, 1992; Adachi *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1994) et selon des études d'arrimage assistées par ordinateur d'ET-1 dans le ET<sub>A</sub>R à partir de structure cristalline d'ET-1 et de la rhodopsine (Orry et Wallace, 2000). La nature de l'information récoltée est, par conséquent, indirecte ou virtuelle et un système expérimental pouvant apporter des informations directes et en temps réel se veut appropriée pour compléter les connaissances actuelles.

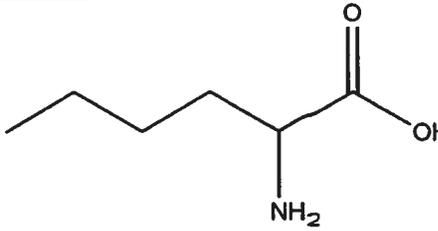
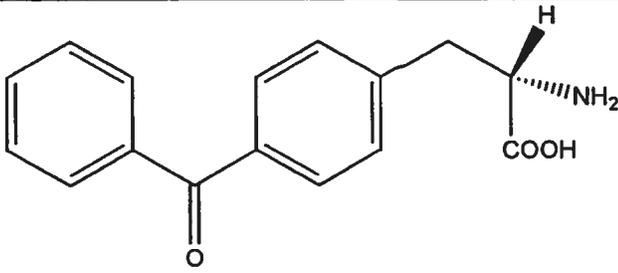
Des positions d'incorporation de résidus photoactivables ont été déterminées stratégiquement à partir des connaissances actuelles de structure activité de l'ET-1. Elles ont ainsi permis le développement d'analogues mono- et bisubstitués dont certains affichaient des profils d'affinité envers le récepteur et d'activité les identifiant comme des outils performants pour des expériences de photomarquage. Nos résultats ont aussi mis en évidence l'importance de la stéréochimie du résidu *p*-Bpa au sein de la molécule. Puisque, le résidu D-Bpa s'est avéré néfaste, notre sélection s'est donc arrêtée sur les analogues mono- et bisubstitués porteurs du L-Bpa pour accomplir le photomarquage du récepteur ET<sub>A</sub>. L'obtention d'un complexe formé d'une des 3 sondes liée irréversiblement au récepteur ET<sub>A</sub> se voulait la pierre angulaire du projet visant à déterminer les sites d'ancrage spécifiques. Des séries de digestion du complexe à l'aide de différents agents de clivage ont permis de cibler des domaines probablement impliqués dans la liaison du ligand. Ainsi, les TM I, II et III avec les EC

I et II ont été identifiés comme des sites de liaison des 3 sondes. De plus, nous avons observé que le segment d'acides aminés His<sup>66</sup>-Arg<sup>183</sup> constitue une région qui inclut des segments cruciaux de liaison. Ce domaine a aussi été proposé par d'autres groupes. Par conséquent, nos résultats convergent vers ces mêmes données qui ont été obtenus à partir d'expériences en temps réel et au moyen de sondes ressemblant à l'ET-1.

**Appendices****Appendice 1****Abréviation des acides aminés**

<b>Acide Aminé</b>	<b>Abréviation à 3 lettres</b>	<b>Abréviation à 1 lettre</b>
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Norleucine	Nle	
<i>p</i> -Benzoyl-phénylalanine	<i>p</i> -Bpa	

**Appendice 2****Structure des acides aminés norleucine (Nle) et *p*-benzoyl-phénylalanine (*p*-Bpa)**

Norleucine	 <p>The structure shows a five-carbon chain. The first carbon is part of a carboxylic acid group (COOH). The second carbon has an amino group (NH<sub>2</sub>) attached. The remaining three carbons form a propyl chain.</p>
<i>p</i> -benzoyl-phénylalanine	 <p>The structure shows a central chiral carbon atom bonded to a hydrogen atom (H) on a wedge, an amino group (NH<sub>2</sub>) on a dash, and a carboxylic acid group (COOH). This chiral carbon is also bonded to a propyl chain that is substituted at the para position with a benzoyl group (a benzene ring attached to a carbonyl group, which is further attached to another benzene ring).</p>

Liste des références

- ADACHI, M., Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1994. Identification of a ligand-binding site of the human endothelin-A receptor and specific regions required for ligand selectivity *Eur. J. Biochem.* 220, 37-43
- ADACHI, M., K. Hashido, A. Trzeciak, T. Watanabe, Y. Furuichi, et C. Miyamoto. 1993. Functional domains of human endothelin receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8: S121-4.
- ADACHI, M., Y. Yang, A. Trzeciak, Y. Furuichi, et C. Miyamoto. 1992. Identification of a domain of ETA receptor required for ligand binding. *FEBS Lett* 311, no. 2: 179-83.
- ALBERICIO, F. 2000. Orthogonal protecting groups for N(alpha)-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers* 55, no. 2: 123-39.
- ANDERSEN, N. H., C. P. Chen, T. M. Marschner, S. R. Krystek Jr, et D. A. Bassolino. 1992. Conformational isomerism of endothelin in acidic aqueous media: a quantitative NOESY analysis. *Biochemistry* 31, no. 5: 1280-95.
- ARAI, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo, et S. Nakanishi. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348, no. 6303: 730-2.
- AUBIN, J., M. Létourneau, E. Francoeur, E. Burgeon et A. Fournier. 2008. Identification of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> binding domains using ET-derived photoprobes. *Biochimie* 90, no. 6: 918-29.
- BALLESTEROS, J., et K. Palczewski. 2001. G protein-coupled receptor drug discovery: implications from the crystal structure of rhodopsin. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4, no. 5: 561-74.
- BAYLEY, H., et J. R. Knowles. 1980. Photogenerated, hydrophobic reagents for intrinsic membrane proteins. *Ann N Y Acad Sci* 346: 45-58.
- BOIVIN, S., S. Tessier, J. Aubin, P. Lampron, M. Detheux, et A. Fournier. 2004. Identification of a binding domain of the endothelin-B receptor using a selective IRL-1620-derived photoprobe. *Biochemistry* 43, no. 36: 11516-25.
- BREMNES, T., J. D. Paasche, A. Mehlum, C. Sandberg, B. Bremnes, et H. Attramadal. 2000. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 275, no. 23: 17596-604.
- CHUN, M., H. Y. Lin, Y. I. Henis, et H. F. Lodish. 1995. Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *J Biol Chem* 270, no. 18: 10855-60.
- DORMAN, G., et G. D. Prestwich. 2000. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol* 18, no. 2: 64-77.

- DOHERTY, A.M. 1992. Endothelin: a new challenge. *J Med Chem* 35, no. 9: 1493-508
- DORMAN, G., et G. D. Prestwich. 2000. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol* 18, no. 2: 64-77.
- FOREST, M., et A. Fournier. 1990. BOP reagent for the coupling of pGlu and Boc-His(Tos) in solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res* 35, no. 2: 89-94.
- FURCHGOTT, R. F., et J. V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, no. 5789: 373-6.
- GALANTINO, M., R. de Castiglione, C. Cristiani, F. Vaghi, W. Liu, J. W. Zhang, et J. P. TAM. 1995. D-amino acid scan of endothelin: importance of amino acids adjacent to cysteinyl residues in isomeric selectivity. *Pept Res* 8, no. 3: 154-9.
- GISIN, B. F. 1972. The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid. *Anal Chim Acta* 58, no. 1: 248-9.
- HAENDLER, B., U. Hechler, et W. D. Schleuning. 1992. Molecular cloning of human endothelin (ET) receptors ETA and ETB. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 12: S1-4.
- HENDRY, L. B., E. D. Bransome Jr, M. S. Hutson, et L. K. Campbell. 1981. First approximation of a stereochemical rationale for the genetic code based on the topography and physicochemical properties of "cavities" constructed from models of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, no. 12: 7440-4.
- KAISER, E., R. L. Colescott, C. D. Bossinger, et P. I. Cook. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* 34, no. 2: 595-8.
- KAUER, J. C., S. Erickson-Viitanen, H. R. Wolfe Jr, et W. F. DeGrado. 1986. p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J Biol Chem* 261, no. 23: 10695-700.
- KEDZIERSKI, R. M., et M. Yanagisawa. 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 851-76.
- LOWRY, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, no. 1: 265-75.
- MARSHALL, G. R. 2003. Solid-phase synthesis: a paradigm shift. *J Pept Sci* 9, no. 9: 534-44.
- MASAKI, T. 2004. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 25, no. 4: 219-24.
- MASAKI, T., S. Miwa, T. Sawamura, H. Ninomiya et Y. Okamoto. 1999a. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol*

375, no. 1-3: 133-8.

MASAKI, T., H. Ninomiya, A. Sakamoto et Y. Okamoto. 1999b. Structural basis of the function of endothelin receptor. *Mol Cell Biochem* 190, no. 1-2: 153-6.

MASAKI, T., et M. Yanagisawa. 1992a. Endothelins. *Essays Biochem* 27: 79-89.

MASAKI, T., M. Yanagisawa, et K. Goto. 1992b. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 12, no. 4: 391-421.

MATEO, A.O., de Artinano, M.A. 1992. Effect of high extracellular Ca(2<sup>+</sup>) levels in spontaneously hypertensive rat aorta.. *Eur J Pharmacol.* 432 no. 2-3: 177-85.

MERRIFIELD, R. B. 1969. Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32: 221-96.

OHLSTEIN, E. H., J. D. Elliott, G. Z. Feuerstein, et R. R. Ruffolo Jr. 1996. Endothelin receptors: receptor classification, novel receptor antagonists, and potential therapeutic targets. *Med Res Rev* 16, no. 4: 365-90.

ORRY, A. J., et B. A. Wallace. 2000. Modeling and docking the endothelin G-protein-coupled receptor. *Biophys J* 79, no. 6: 3083-94.

ORTEGA, A., et A. A. de Artinano. 1997. Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res* 36, no. 5: 339-51.

PENNINGTON, M. W. 1994. HF cleavage and deprotection procedures for peptides synthesized using a Boc/Bzl strategy. *Methods Mol Biol* 35: 41-62.

SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyo-oka, M. Yano, et T. Masaki. 1993. The ligand-receptor interactions of the endothelin systems are mediated by distinct "message" and "address" domains. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8: S113-6.

SAKURAI, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. et Masaki, T. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, no. 6303: 732-5

SCHIFFRIN, E. L., et R. M. Touyz. 1998. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3: S2-13.

SINGH, A., E. R. Thornton, et F. H. Westheimer. 1962. The photolysis of diazoacetylchymotrypsin. *J Biol Chem* 237: 3006-8.

TAM, J. P., W. Liu, J. W. Zhang, M. Galantino, F. Bertolero, C. Cristiani, F. Vaghi, et R. de Castiglione. 1994. Alanine scan of endothelin: importance of aromatic residues. *Peptides* 15, no. 4: 703-8.

TESSIER, S., S. Boivin, J. Aubin, P. Lampron, M. Detheux, et A. Fournier. 2005. Transmembrane domain V of the endothelin-A receptor is a binding domain of ETA-selective TTA-386-derived photoprobes. *Biochemistry* 44, no. 21: 7844-54.

TESSIER, S., C. Langlois, A. Brkovic, M. Coupal, A. De Lean, et A. Fournier. 2000. Development of a photolabile ligand for the endothelin-A receptor of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, no. 5 Suppl 1: S53-4.

WALLACE, B. A., et R. W. Janes. 1995. The crystal structure of human endothelin-1 and how it relates to receptor binding. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3: S250-3.

WANG, S. S., B. F. Gisin, D. P. Winter, R. Makofske, I. D. Kulesha, C. Tzougraki, et J. Meienhofer. 1977. Facile synthesis of amino acid and peptide esters under mild conditions via cesium salts. *J Org Chem* 42, no. 8: 1286-90.

WATAKABE, T., Y. Urade, M. Takai, I. Umemura, et T. Okada. 1992. A reversible radioligand specific for the ETB receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 185, no. 3: 867-73.

YANAGISAWA, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, et T. Masaki. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, no. 6163: 411-5.