

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE DE
SONDES PEPTIDIQUES PHOTOSENSIBLES POUR L'ÉTUDE DU
RÉCEPTEUR DE TYPE B DE L'ENDOTHÉLINE.**

Par
Stéphane Boivin

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

Jury d'évaluation

Président du jury	Pr Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Pr Claude Lazure, IRCM
Examineur interne	Pr Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Pr Alain Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier

©droits réservés de Stéphane Boivin, 2002

RÉSUMÉ

Le photomarquage est reconnu comme un moyen efficace pour l'étude des complexes ligand-récepteur. Cependant, le développement de sondes photosensibles nécessaires au photomarquage impose d'apporter quelques modifications chimiques aux ligands qui, souvent, entraînent une perte d'activité biologique. Pour contrer ce problème, il est préférable de développer des petites bibliothèques de ligands photosensibles et de tenter de minimiser l'impact de ces modifications afin de préserver l'activité et la sélectivité de ces ligands.

Nous proposons donc, d'appliquer la technique de marquage par photoaffinité à l'étude des domaines de liaison des récepteurs de l'endothéline. Ce projet vise à développer et caractériser pharmacologiquement les tous premiers ligands photosensibles destinés à l'identification des acides aminés impliqués dans la reconnaissance et la stabilisation de l'endothéline au niveau de son récepteur de type B. L'IRL-1620, un analogue linéaire de ET-1 ([Suc-Glu⁹,Ala^{11,15})-ET-1 (8-21)] est un puissant peptide agoniste spécifique du récepteur de type B de l'endothéline. En se basant sur sa structure, cinq analogues photosensibles ont été développés par synthèse peptidique en phase solide utilisant la chimie Boc. Le groupement p-benzoyl-phénylalanine (pBpa) a été choisi comme groupement photoactivable et il a été incorporé aux positions 4, 5, 7, 9 et 10 de l'IRL-1620. Des tests pharmacologiques *in vitro* en bain d'organe sur le parenchyme pulmonaire du cobaye et l'aorte thoracique de rat ont permis d'évaluer l'impact (EC₅₀) des modifications structurales apportées par le groupement photosensible sur l'activité et la sélectivité de chacun des peptides photosensibles sous leurs formes natives ainsi que mono- et di-iodées. Par la suite, des tests de liaison ont été réalisés en utilisant les sondes les plus actives, sur des cellules CHO-K1 transfectées avec le récepteur hET_B afin de caractériser leur force de liaison (IC₅₀) avec le récepteur.

L'un des cinq ligands photosensibles synthétisés, le [Tyr(¹²⁵I)]⁶,Bpa⁵]IRL-1620, possède les caractéristiques pharmacologiques et biochimiques requises pour le photomarquage du récepteur ET_B. En effet, il possède un effet constricteur sur le parenchyme pulmonaire [EC₅₀ = 1,27 ± 0,26x10⁻⁷M] et une forte affinité [IC₅₀ = 1,82 ± 0,53x10⁻⁹M] tout en conservant sa sélectivité pour le récepteur ET_B. Cet outil pharmacologique a été utilisé pour photomarquer le récepteur ET_B et résulte en la formation d'un complexe ligand-récepteur de masse moléculaire de 49 kDa. Des études complémentaires seront réalisées prochainement à l'aide de cette sonde afin de caractériser d'avantage le site de liaison de l'endothéline.

Stéphane Boivin
Étudiant

Alain Fournier
Directeur de recherche

REMERCIEMENTS



Leur plus beau temps

Normand Hudon, 1993

Tout d'abord, je remercie le Pr Alain Fournier pour m'avoir accueilli au sein de l'INRS, mais également pour la confiance dont il m'honore. Je remercie tous les membres du laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Un merci particulier à Sophie Tessier pour sa précieuse aide depuis ces deux dernières années.

Je souhaite aussi remercier ma mère Louise, mon frère Yannick, ma copine Karine ainsi toute ma famille pour leurs nombreux encouragements et leur appui inconditionnel.

Vous avez tous contribué à ce que ma maîtrise soit une réussite professionnelle et personnelle.

Sincères Salutations,

Stéphane Boivin

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
REMERCIEMENTS.....	IV
LISTES DES FIGURES.....	VI
LISTES DES TABLEAUX.....	VII
LISTES DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
L'endothéline : ET-1, ET-2 et ET-3.....	1
Découverte des récepteurs de l'endothéline.....	4
Rôle particulier du récepteur ET _B de l'endothéline.....	7
Caractéristique de la liaison [¹²⁵ I]endothéline-1.....	7
Rôle de l'endothéline et de ces récepteurs aux niveaux de pathologies.....	8
Études des domaines des récepteurs de l'endothéline.....	10
Le photomarquage.....	15
Études antérieures.....	19
But et objectifs de travail.....	20
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
Section I : Développement des sondes photosensibles	
Matériel pour la synthèse peptidique.....	22
Principe de la synthèse peptidique en phase solide.....	23
Stratégie de synthèse des analogues.....	24
Choix de la résine pour la synthèse.....	25
Attachement du tryptophane à la résine.....	25
Détermination du taux de substitution de la résine.....	26
Cycle de synthèse.....	27
Réaction avec l'acide succinique.....	28
Clivage des peptides-résine.....	29
Déformylation du tryptophane(for).....	29
Première purification.....	32
Spectrométrie de masse.....	32
Marquage des peptides au NaI.....	33

MATÉRIEL ET MÉTHODES (SUITE).....	34
Section II : Tests pharmacologiques	
Animaux et Réactifs.....	34
Activité sur le récepteur ET _A	34
Activité sur le récepteur ET _B	35
Section III : Tests de liaison	
Réactifs.....	37
Méthode de marquage à ¹²⁵ I.....	37
Cellules transfectées hET _B	38
Courbe de saturation.....	39
Courbe de compétition à l'équilibre.....	39
Section IV : Photomarquage Tests de liaison	
Immunobuvardage de type Wertern blot.....	40
Photomarquage	40
RÉSULTATS.....	41
Section I : Développement des sondes photosensibles	
Synthèse de l'IRL-1620 et des analogues.....	41
Purification et caractérisation des peptides synthétiques.....	41
Section II : Tests pharmacologiques	
Études pharmacologiques sur le récepteur ET _B <i>in vitro</i>	42
Études pharmacologiques sur le récepteur ET _A <i>in vitro</i>	45
Iodation des peptides à l'iodure de sodium (NaI).....	45
Études pharmacologiques des peptides iodés <i>in vitro</i>	48
Section III : Tests de liaison	
Iodation des peptides à ¹²⁵ I.....	50
Études de saturation.....	51
Études de compétition.....	52
Section IV : Photomarquage	
Photomarquage du récepteur ET _B	54
DISCUSSION.....	55
Développement d'analogues photoactivables de IRL-1620.....	55
Évaluation de l'impact du groupement Bpa sur l'activité.....	57
Évaluation de l'impact de l'iodation de la tyrosine sur l'activité.....	59
Caractérisation physico-chimique de la liaison sur ET _B	61
Tests de saturation.....	62
Tests de compétition.....	63
Photomarquage du récepteur ET _B	65
CONCLUSION.....	66
APPENDICES.....	67
LISTES DES RÉFÉRENCES.....	69

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure primaire des trois isoformes de l'endothéline retrouvées dans le génome humain.....	3
Figure 2	Mécanisme d'action de l'endothéline (ET-1) sur les cellules musculaires lisses induisant la vasoconstriction.....	6
Figure 3	Distribution des récepteurs de l'endothéline et identification de leurs actions pharmacologiques exercées au tissu cible.....	6
Figure 4	Principaux domaines d'étude pour la caractérisation des complexes ligand-récepteur.....	10
Figure 5	Structure du récepteur ET _A	13
Figure 6	Structure du récepteur ET _B	14
Figure 7	Structure du <i>p</i> -benzoyl-phénylalanine (<i>p</i> Bpa) de configuration L utilisée comme groupement photosensible.....	17
Figure 8	Démarche pour l'identification du point de contact entre le ligand et un récepteur (site de liaison) par la méthode de marquage par photoaffinité.....	18
Figure 9	Schématisation des étapes utilisées en synthèse peptidique en phase solide.....	31
Figure 10	Microscopie des cellules CHO-K1 transfectées avec le récepteur ET _B	38
Figure 11	Caractérisation du IRL-1620 après purification par CLHP préparative.....	42

Figure 12	Courbes concentration-réponse des peptides photosensibles synthétisés obtenus sur le parenchyme pulmonaire du cobaye.....	44
Figure 13	Mono-iodation du peptide IRL-1620	46
Figure 14	Iodation et purification par CLHP préparative de l'IRL-1620 marqué	47
Figure 15	Courbes concentration-réponse des peptides mono-iodés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.....	49
Figure 16	Profil d'élution du [Tyr(I) ⁶ ,Bpa ⁴]IRL-1620 par CLHP analytique suite à la réaction d'iodation.....	50
Figure 17	Courbes de saturation de [Tyr(¹²⁵ I) ⁶]IRL-1620 sur le récepteur hETB natif transfecté dans des cellules CHO-K1.....	51
Figure 18	Courbes de compétition de la liaison homologue et hétérologue.....	53
Figure 19	Photomarquage et immunobuvardage du récepteur ET _B	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Effets pharmacologiques de ET.....	9
Tableau 2	Description de la structure des sondes peptidiques photosensibles développées pour le photomarquage du récepteur de type B de l'endothéline.....	21
Tableau 3	Protocole suivi pour la synthèse des peptides.....	30
Tableau 4	Caractérisation des peptides synthétiques par CLHP analytique et spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	42
Tableau 5	Activité biologique des analogues photosensibles et de l'IRL-1620 sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.....	44
Tableau 6	Activité biologique des analogues photosensibles mono-iodés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.....	49
Tableau 7	Affinité de la liaison des radioligands sur le récepteur hET _B natif.....	52
Tableau 8	Caractéristiques pharmacologiques de [Tyr(¹²⁵ I) ⁶ ,Bpa ⁵]IRL-1620.....	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acm	Acétamidométhyle
ACN	Acétonitrile
Boc	t-butyloxycarbonyle
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium
2-Br-Z	2-bromobenzoyloxycarbonyle
Bzl	Benzyle
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
2-Cl-Z	2-chlorobenzoyloxycarbonyle
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	Carbonate de dissucinimidyle
EDCF	"Endothelium derived constricting factors"
EDRF	"Endothelium derived relaxing factors"
ET	Endothéline
Fmoc	9-fluorènylméthoxyloxycarbonyle
For	Formyle
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines-G
HF	Acide fluorhydrique
HMPA	Hexaméthylphosphoramide
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
NO	Oxyde nitrique
OcHex	Ester de cyclohexyle
pBpa	para-benzoylphénylalanine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane

INTRODUCTION

L'endothéline : ET-1, ET-2 et ET-3

L'implication de l'endothélium a pris beaucoup d'importance depuis les 25 dernières années plus particulièrement, depuis les travaux démontrant son implication dans le maintien du tonus du système vasculaire. Ces travaux ont présenté l'endothélium comme un tissu multifonctionnel qui possède, entre autres, la capacité de synthétiser et de relâcher des substances vasoactives. L'une de ces substances la plus étudiée est la prostacycline (PGI₂) qui possède un effet vasodilatateur. Par la suite, Furchgott et Zawadzki ont observé un ensemble de substances, qu'ils nommèrent EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), qui avaient le pouvoir d'induire la vasodilatation des cellules du muscle lisse entourant l'endothélium (Furchgott et Zawadzki, 1980). Peu de temps après; en 1987, l'équipe de Palmer et Moncada ont caractérisé l'EDRF qui s'avéra être l'oxyde nitrique [NO] (Palmer, Ferrige et Moncada, 1987). Parallèlement, des tests biologiques démontrèrent que l'endothélium relâchait un autre facteur qui, cette fois-ci, provoquait une forte vasoconstriction (Gillespie *et al.*, 1985). En 1988, ce facteur fut caractérisé par Yanagisawa (Yanagisawa *et al.* 1988) comme étant de nature peptidique. Tout d'abord isolé à partir de cellules endothéliales d'aorte de porc, ce peptide pris le nom d'endothéline (ET) qui, de nos jours, est connu sous le nom d'endothéline-1 (ET-1). L'ET est un petit peptide de 21 acides aminés (2492 Da) comportant quatre cystéines formant deux ponts disulfures en position Cys¹-Cys¹⁵ et Cys³-Cys¹¹. Les extrémités N- et C-terminale de ET sont libres. Par la suite, des études du génome humain ont permis de démontrer l'existence de trois isoformes de ET soit ET-1, ET-2 ([Trp⁶,Leu⁷]ET-1) et ET-3 ([Thr²,Phe⁴,Thr⁵,Tyr⁶,Lys⁷,Tyr¹⁴]ET-1). La région hydrophobe du segment C-terminal des trois isoformes est conservée dans tous les cas (fig.1). L'ET-1 est retrouvé au niveau de l'endothélium vasculaire, mais également au niveau de tissus non-vasculaires comme le cerveau, le foie, le poumon. (Sakurai T *et al.* 1991). ET-2 et ET-3 sont en plus retrouvés au niveau des tissus de l'intestin et des glandes surrénales (Ohkubo *et al.*, 1990

et Shiba *et al.*, 1992). À ce jour, l'endothélium est le site de synthèse du plus puissant peptide vasoconstricteur identifié chez les mammifères (Yanagisawa *et al.*, 1988).

L'endothéline est devenu un sujet d'étude important pour plusieurs recherches traitant de l'hypertension, de l'arythmie cardiaque, de l'inflammation, de l'asthme et des problèmes rénaux. En effet, l'ET pourrait être un médiateur important impliqué dans l'une ou l'autre de ces pathologies. L'endothéline est principalement connue pour son pouvoir vasoactif, mais il est de plus en plus clair que son effet s'étend au-delà de la vasoconstriction. Des études récentes ont démontré que l'endothéline pourrait avoir un rôle dans l'apoptose (Filippatos *et al.*, 2001)

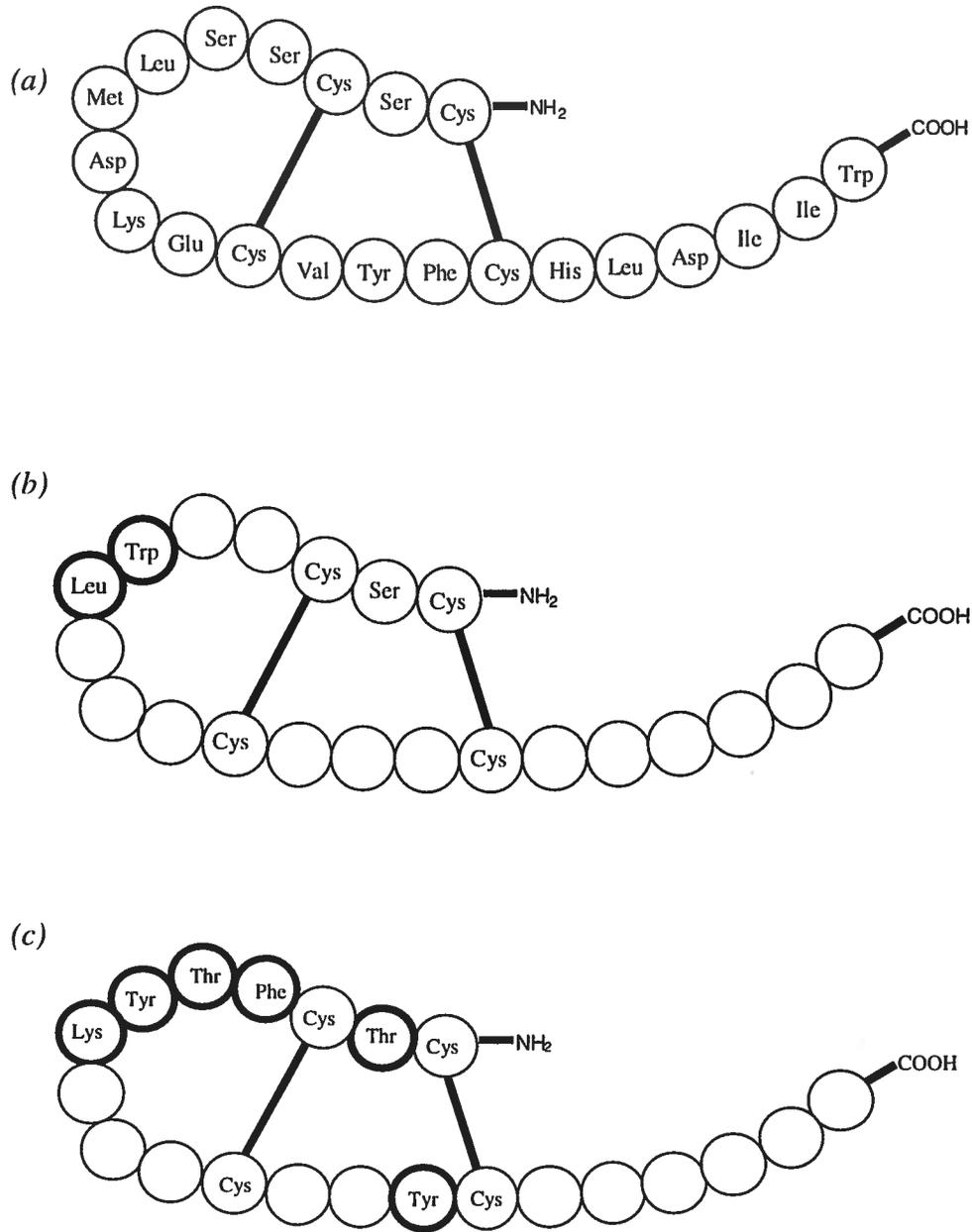


Fig.1 Structure primaire des trois isoformes de l'endothéline retrouvées dans le génome humain. (a) ET-1, (b) ET-2 et (c) ET-3 Les acides aminés qui diffèrent d'une structure à l'autre sont en gras. Les régions conservées sont laissées en blanc.

Découverte des récepteurs de l'endothéline

Depuis la découverte de l'endothéline, des expériences de réticulation moléculaire utilisant le peptide radio-marqué ont permis de mettre en évidence sur gel de polyacrylamide deux complexes ligand-récepteur: une première bande entre 50 et 73 kDa et la seconde entre 30 et 40 kDa (Schvartz *et al.* 1990). Des études complémentaires ont permis également de démontrer que la bande de haut poids moléculaire possédait une affinité plus élevée pour [¹²⁵I]ET-1 et [¹²⁵I]ET-2 et que la seconde bande de plus petit poids moléculaire avait la capacité de lier [¹²⁵I]ET-1 et [¹²⁵I]ET-2 et [¹²⁵I]ET-3 sans discrimination. Ces deux récepteurs ont été identifiés et clonés: le récepteur A humain a été nommé hET_A ou hET_AR (Hosoda *et al.*, 1991) et le récepteur B humain a été nommé hET_B ou hET_BR (Nakamuta *et al.*, 1991). Ces deux récepteurs possèdent une affinité et une sélectivité qui leur sont propres pour les isoformes ET-1, ET-2 et ET-3. Le récepteur ET_A possède une sélectivité 1000 fois plus élevée pour ET-1 que pour ET-3 (Hosoda *et al.*, 1991) contrairement à ET_B qui n'est pas sélectif. L'affinité du récepteur ET_A est plus élevée pour l'isoforme ET-1 > ET-2 >> ET-3 tandis que l'affinité pour ET_B est similaire pour les trois isoformes ET-1 ≅ ET-2 ≅ ET-3. Il existe un troisième type de récepteur de l'endothéline nommé ET_C. Ce récepteur possède une plus grande affinité pour ET-3 que pour ET-1. Pour l'instant, l'équivalent de ce récepteur cloné dans *Xenopus laevis* n'a pas été retrouvé chez les mammifères (Karne, Jayawickreme et Lerner, 1993).

Différentes techniques ont été utilisées pour étudier la distribution des récepteurs de l'endothéline: le RT-PCR, l'hybridation *in situ*, l'autoradiographie et l'immunochimie. Ainsi, il a été démontré que plusieurs tissus expriment les récepteurs de l'endothéline. Cependant, la distribution entre ces tissus est très différente : le récepteur ET_A se retrouve dans les tissus du cœur, poumon, testicules, foie et glandes surrénales ; le récepteur ET_B est abondant au niveau du poumon (particulièrement dense au niveau du parenchyme pulmonaire) et du cerveau. Le système vasculaire exprime les deux types de récepteurs.

Le récepteur ET_A est composé de 427 acides aminés (PM 48,516 Da) et il appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines-G (GPCR) caractérisée par leurs sept passages transmembranaires (7TM). Ce récepteur est retrouvé majoritairement dans les cellules musculaires lisses. Le récepteur ET_A est reconnu pour jouer un rôle important dans le phénomène de la vasoconstriction et de la prolifération des cellules du muscle lisse. L'induction de la contraction est médiée via une protéine-G qui active la phospholipase C (PLC) qui, à son tour hydrolyse le PIP₂ en IP₃ et en DAG. L'ouverture des canaux calcium-dépendants sous l'action de IP₃ amorce une rapide augmentation de la concentration de [Ca²⁺]_i. La forte concentration en ions calcium provoque la contraction musculaire (fig.2).

Le récepteur ET_B est composé de 415 acides aminés (PM 46,901 Da) et il appartient également aux GPCRs. Il existe 68% de similitude entre les récepteurs ET_A et ET_B humains. La région la plus conservée se retrouve dans les segments hydrophobes qui constituent les hélices transmembranaires. En 1993, des études pharmacologiques ont suggéré l'existence de deux sous-types de récepteur ET_B soit ET_{B1} et ET_{B2} mais, seulement un gène a été cloné (Sakurai *et al.*, 1990). La différence entre ET_{B1} et ET_{B2} serait davantage d'ordre histologique et fonctionnel que structural (fig.3) (Warner *et al.*, 1993; Sudjarwo *et al.*, 1994). Les récepteurs ET_{B1} situés à la surface de l'endothélium induisent une élévation du Ca²⁺ intracellulaire qui active la synthèse de NO via la NO-synthase. La diffusion du NO jusqu'aux cellules du muscle lisse résulte en une vasodilatation. Cet effet serait de courte durée contrairement à la contraction induite via ET_A. L'activation du récepteur ET_{B2}, situé dans les cellules musculaires lisses, induirait une vasoconstriction via la voie impliquant la phospholipase C décrite ci-haut.

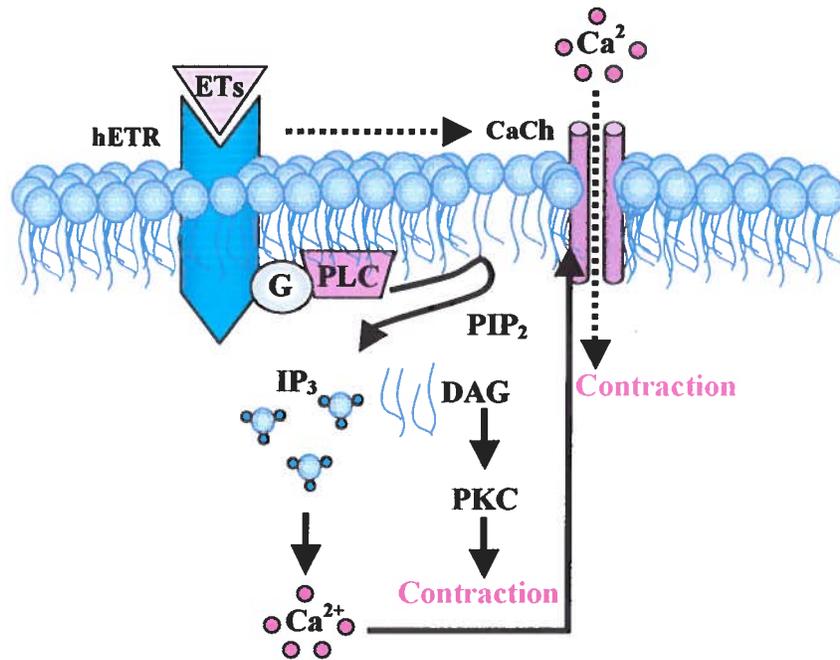


Fig.2 Mécanisme d'action de l'endothéline (ET-1) sur les cellules musculaires lisses induisant la vasoconstriction.

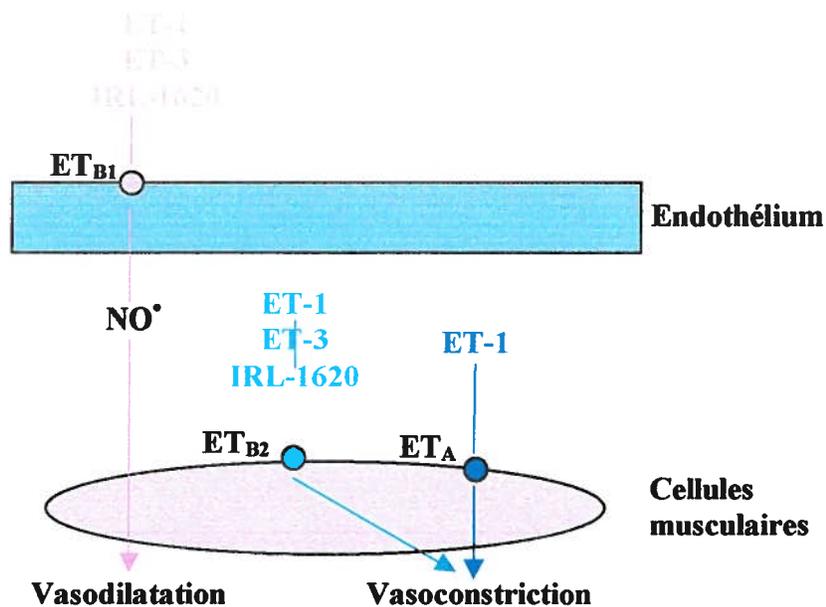


Fig.3 Distribution des récepteurs de l'endothéline et identification de leur action pharmacologique exercée au tissu cible.

Rôle particulier du récepteur ET_B de l'endothéline

Hirita *et al.* ont effectué des expériences de liaison à l'aide de [¹²⁵I]ET-1 sur des cellules musculaires. Ils ont démontré, après 24 heures, une diminution des sites de liaison de l'ET suggérant un phénomène de régulation négative (Hirita *et al.*, 1988). En effet, pour visualiser le devenir de chaque type de récepteur la protéine fluorescente verte (ETR-EGFP) a été fusionnée avec la portion en N-terminal de chaque récepteur. Les résultats ont démontré que le récepteur ET_B est le premier à être internalisé et dirigé vers le lysosome pour y être dégradé. D'un autre côté, ET_A est dirigé vers un endosome où il sera redirigé vers la membrane plasmique (Abe *et al.*, 2000). La différence entre les routes des récepteurs explique en partie les effets soutenus de ET_A. Puisque ET_A est à nouveau disponible à la surface membranaire, celui-ci peut être encore activé ce qui donne des effets biologiques prolongés (Bremnes *et al.*, 2000). Une étude à l'aide de rats a démontré, cette fois-ci *in vivo*, les mêmes résultats (ET-1 exogène) (Fukuroda *et al.*, 1994). Il semblerait que le récepteur ET_B possède un rôle important dans le contrôle du niveaux des endothélines et de leur clairance (Gray et Webb, 1996). Une diminution de la clairance de ET par ET_B provoque une augmentation de ET plasmatique.

Caractéristique de la liaison [¹²⁵I]endothéline-1

Des études de liaison à l'aide de radioligand [¹²⁵I]ET-1 ont démontré que la liaison ET-1/récepteur possède les caractéristiques types d'une interaction hormone-récepteur. La liaison est spécifique, saturable et de haute affinité. Le K_d rapporté pour ET_A est de 83 pmol et son B_{max} est de 3 pmol/mg de protéine. Pour le récepteur ET_B, ces chiffres sont légèrement différents, soit un K_d de 52 pmol et un B_{max} de 60 pmol/mg. Certains facteurs peuvent influencer la liaison de [¹²⁵I]ET-1 dont la température, la présence de cations et le pH du milieu. Les cations divalents (Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺), entre autres, sont reconnus pour augmenter l'affinité de ET-1 pour ces récepteurs (Edwards, Pullen et Nambi, 1992). L'une des caractéristiques de la liaison de l'ET est une dissociation très lente d'avec son récepteur: moins de 10% en 48 heures (Hirata *et al.* 1988). Ce

phénomène pourrait être à l'origine de la vasoconstriction prolongée par l'ET (Yanagisawa et Masaki, 1989). Cette dissociation très lente est dite presque irréversible.

Rôle de l'endothéline et de ses récepteurs au niveau des pathologies

L'implication du système ET dans quelques pathologies est bien élucidée. Par exemple, la maladie de Hirschsprung (incidence de 1:5,000 naissances) a été associée à cinq mutations du récepteur ET_B (Abe *et al.*, 2000). De nature congénitale, cette maladie provoque une absence de ganglion au niveau de l'intestin. Cependant, l'implication de ET dans d'autres pathologies est suspectée et est présentement à l'étude telles que l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance rénale et la maladie de Raynaud. (Cavero *et al.*, 1990 ; Belch, 1991).

Des souris transgéniques (knock-out en ET) développées par l'équipe de Kurihara ont démontré des anomalies morphologiques et une détresse respiratoire qui les ont menées à leur mort. De plus, les animaux sous-exprimant l'ET ont développé une légère hypertension (Kurihara *et al.*, 1994). L'endothéline peut influencer la libération de NO qui joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. Un dysfonctionnement de ce système peut résulter en une hypertension. D'autres pathologies comme le diabète, le cancer et l'apoptose sont aussi étudiées (Bell *et al.*, 1999). Les effets de ET peuvent être médiés via les systèmes vasculaires, nerveux et endocrinien (Schiffrin *et al.*, 1995). C'est pourquoi il est important de mieux caractériser le système de l'endothéline et ces impacts sur l'ensemble des tissus (tableau 1).

Des évidences expérimentales démontrent davantage l'importance de développer des molécules destinées à bloquer la production ou l'action de ET, particulièrement dans le traitement des pathologies du système cardiovasculaire. Par exemple, l'endothéline pourrait jouer un rôle important dans certains cas d'accidents cérébraux vasculaires. L'injection d'un antagoniste ET_A/ET_B a permis de diminuer et de protéger des animaux contre des ischémies cérébrales (Ohlstein *et al.*, 1994)

TABLEAU 1 Effets pharmacologiques de ET

<u>Tissu ou organe</u>	<u>Effets</u>
Vaisseau sanguin	Vasoconstriction et vasodilatation Agent mitogène pour l'endothélium et cellules musculaires lisses
Cœur	Effet chronotrope Sécrétion de peptides natriurétiques
Muscles des voies respiratoires	Constriction
Reins	Vasoconstriction artères rénales Inhibition de la sécrétion de rénine Diurèse Agent mitogène
Glandes surrénales	Libération d'aldostérone et de catécholamines
Foie	Glycogénolyse
Système nerveux central	Augmentation de LH et FSH Stimule la libération de la substance P
Utérus	Constriction
Yeux	Augmentation de la pression intraoculaire

Études des domaines des récepteurs de l'endothéline

Les mécanismes de reconnaissance des ligands au récepteur sont à la base du fonctionnement cellulaire. La compréhension de ces mécanismes constitue un défi majeur pour la biochimie. L'élucidation des mécanismes impliqués dans la reconnaissance des ligands, dans l'activation des récepteurs, dans la cascade de la signalisation, et dans les phénomènes de désensibilisation est essentielle pour remédier à certaines pathologies du système vasculaire. La chimie, la biochimie et la biologie moléculaire ont développé depuis plusieurs années, des outils qui permettent l'étude des complexes ligand-récepteur et l'avancement technologique a également permis le perfectionnement d'instruments de haute performance (Fig.4).

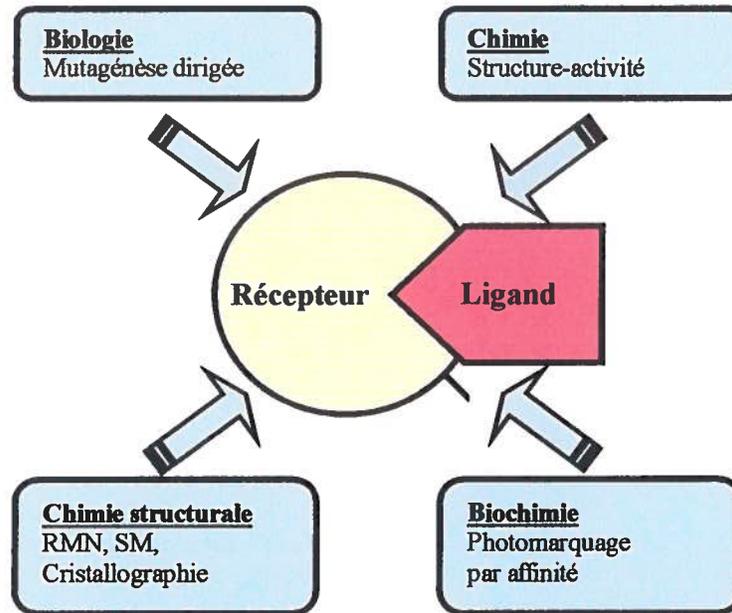


Fig.4 Principaux domaines d'étude pour la caractérisation des complexes ligand-récepteur.

Une série d'études utilisant des moyens originaux comme les récepteurs tronqués, les récepteurs chimères et la mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les régions (domaines), et dans certains cas, le rôle de certains acides aminés dans l'activité de récepteurs couplés aux protéines G. Par exemple, la région extracellulaire N-terminale des récepteurs GPCR est reconnue, en général, pour être importante dans la liaison des ligands (Nagayama *et al.*, 1991). Depuis les années 90, plusieurs chercheurs ont appliqué ces techniques à l'étude des récepteurs de l'ET ce qui a permis d'identifier les acides aminés impliqués dans l'activité et ceux impliqués dans la sélectivité des isoformes de l'ET.

Une équipe a utilisé les récepteurs chimères (hybrides) ET_A/ET_B, obtenues par biologie moléculaire, pour identifier les boucles peptidiques extracytosoliques du récepteur ET_A(fig.5) et ET_B (fig.6) impliquées dans leur sélectivité. Ils ont ainsi démontré qu'il pouvait permettre à ET_B de lier BQ-123, un antagoniste sélectif pour ET_A, en remplaçant les régions transmembranaires I, II, III et VII de ET_B par la séquence de ET_A (Sakamoto *et al.*, 1993). Ils ont également démontré que ET-A pouvait lier l'IRL-1620, un agoniste spécifique de ET_B, s'ils changeaient la région IV-VI de ET_A par la séquence de ET_B. De plus, ils ont prouvé que l'activation du récepteur chimère ET_A (pouvant lier l'IRL-1620) provoquait une augmentation transitoire du taux de [Ca₂₊]_i ce qui démontre que les modifications apportées n'altéraient pas leur activité biologique. Ils ont ainsi démontré que les régions transmembranaires I, II, III et VII semblent responsables de la sélectivité de ET_A pour BQ-123 et la région IV-VI pour la sélectivité de ET_B pour l'IRL-1620. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Adachi (1993) qui a démontré que le remplacement de la première boucle extracellulaire II-III de ET_A par la séquence de ET_B provoquait une perte d'affinité pour BQ-123. Si à l'inverse, la boucle II-III de ET_A est substituée dans le récepteur ET_B, BQ-123 peut s'y lier. Conclusion, BQ-123 se lie sur la boucle II-III du récepteur ET_A (Adachi *et al.* 1992). Peu de temps après, il identifia un court segment dans la boucle II-III, correspondant aux jonction 130-134 (K-L-L-A-G), qui semble être essentiel pour la reconnaissance par ET_A (Adachi *et al.*, 1993). Cette conclusion est également en accord avec l'énoncé de Hashido qui postule que seuls les acides aminés à proximité du premier segment transmembranaire N-terminal étaient

essentiels pour la liaison de l'endothéline (Hashido *et al.*, 1991; Hashido *et al.*, 1993) au récepteur ET_A.

Différemment, une série de récepteurs ET_A et ET_B tronqués ont démontré que la délétion du segment N-terminal côté extracellulaire inactive la réponse cellulaire des récepteurs par ET-1 (Hashido *et al.*, 1992). Ce phénomène fut également observé et mieux caractérisé chez le récepteur ET_B. Par exemple, la perte du segment C-terminal après Cys⁴⁰² n'influence pas l'activité de ET_B mais la suppression incluant Cys⁴⁰² inactive le récepteur ET (Koshimizu *et al.* 1995). Ceci démontre que Cys⁴⁰² est essentiel pour l'activité biologique et que sa perte doit induire un changement structural majeur qui inactive le récepteur. La délétion du segment 403-442 démontre que les 10 sites de phosphorylation potentiels portés par celui-ci ne sont pas essentiels à l'activité du récepteur.

Quelques résidus ont été identifiés par mutagenèse dirigée pour occuper un rôle important dans la sélectivité de ET_A et ET_B. En effet, la mutation d'un acide aminé du récepteur peut à lui seul, s'il est situé ou impliqué dans le site de liaison du ligand, empêcher la formation du complexe ligand-récepteur. Ainsi, la mutagenèse dirigée a permis de démontrer l'importance de plusieurs acides aminés pour conserver l'activité de ET_A et de ET_B. De cette façon, Tyr¹²⁹ et Lys¹⁴⁰ ont été identifiés pour ET_A (Krystek *et al.*, 1994; Cyr, Rudy et Kris, 1993; Adachi *et al.* 1994) et la Lys¹⁸¹ pour le récepteur ET_B (Mauzy *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1992). Deux tryptophanes, Trp²⁷⁵ et Trp²⁷⁶, localisés à la frontière de la membrane et du 5^e segment extracellulaire des récepteurs ET_A et ET_B modulent l'activation de ces deux récepteurs en influençant leur structure tertiaire. En effet, les mutations inactivent la liaison de BQ-123 sur ET_A et de l'IRL1620 sur ET_B (Imamura *et al.*, 2000). De plus, une petite région de 29 acides aminés en N-terminale de ET_B est cruciale pour la stabilisation du complexe ligand-récepteur. Une étude plus approfondie de cette région démontra que la charge de Asp⁷⁵ et le résidu Pro⁹³ seraient essentiels dans la stabilisation du complexe ET_BR-ET-1 (Takasuka *et al.*, 1994). Ce segment pourrait interagir avec une autre région du récepteur qui elle serait, en réalité, le site de liaison (Takasuka *et al.*, 1994).

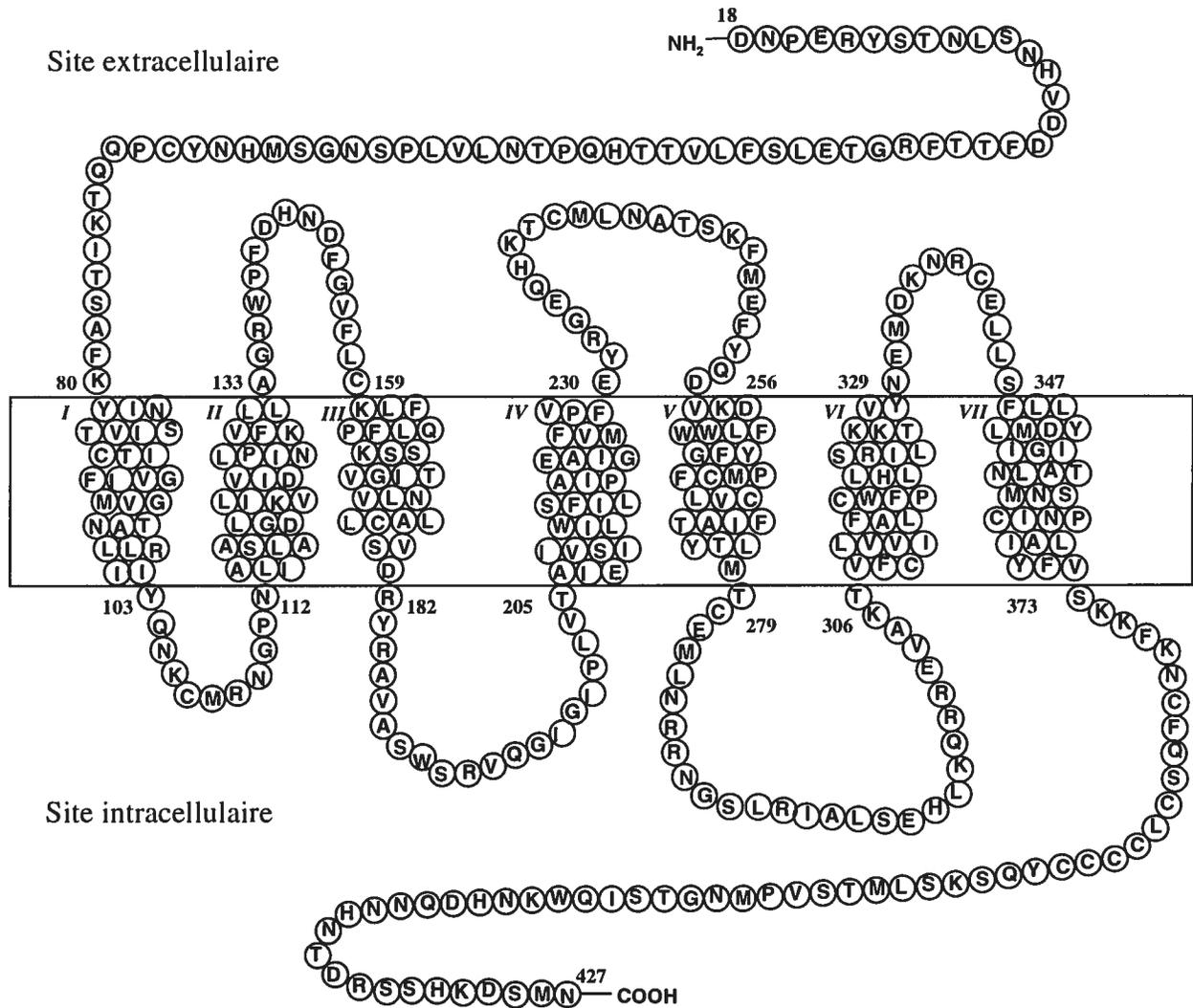


Fig. 5 Structure prédite du récepteur hETA humain avec ses sept domaines transmembranaires (I à VII). (Selon la séquence publiée par Adachi *et al.*, 1991.

Site extracellulaire

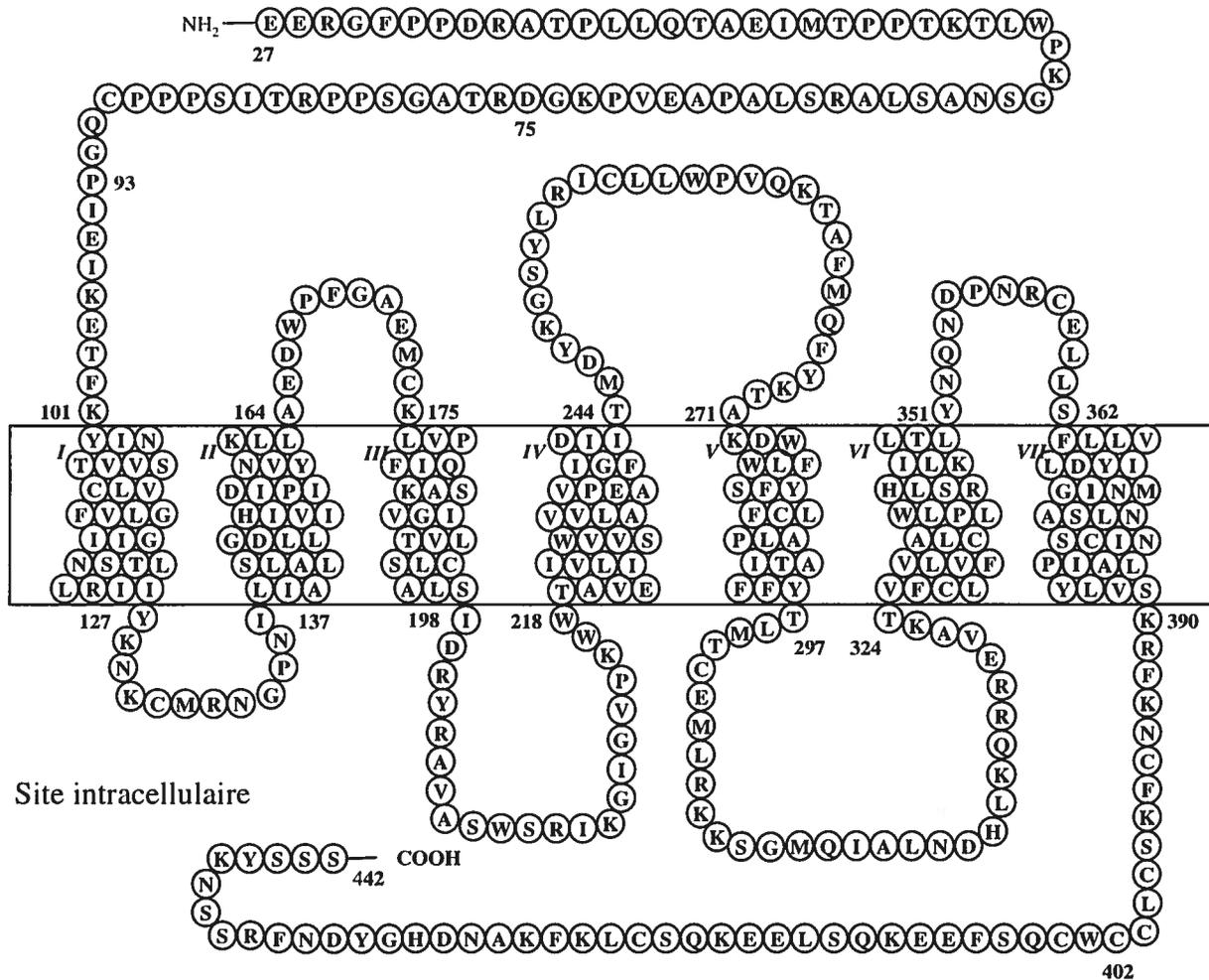


Fig.6. **Structure du récepteur hETB avec ses sept domaines transmembranaires (I à VII).** Selon la séquence publiée par Nakamuta *et al.*, 1991

Le photomarquage

L'identification des zones de contact (interactions fines) entre un peptide et un récepteur se fait par des méthodes chimiques (marquage covalent, pontage, technique d'empreinte) et des méthodes physiques (cristallographie, microscopie électronique). Introduit par Westheimer (Singh *et al.*, 1962), le photomarquage réfère à une variété de méthodes développées depuis les 40 dernières années faisant appel à la photochimie. Le photomarquage est utilisé afin d'obtenir de l'information sur un complexe ligand-récepteur à l'échelle moléculaire. Le marquage par photoaffinité permet, entre autres, de déterminer le récepteur cible de ligands comme les peptides, les médicaments et les toxines, d'identifier le site catalytique d'une enzyme ou de déterminer le rôle que jouent certains acides aminés dans la stabilisation du ligand (Newman A, 1992). Pour se faire, un groupement chimique photoactivable est introduit dans un ligand et, sous irradiation (uv), il forme un intermédiaire hautement réactif qui peut réagir avec son environnement immédiat, créant ainsi un lien irréversible entre le ligand et son récepteur. En utilisant un ligand marqué (^{125}I), le récepteur peut être repéré sur un gel de polyacrylamide, purifié et caractérisé lors d'étapes subséquentes. Bref, le photomarquage est réalisé selon les étapes suivantes: développement de sondes photosensibles, iodation des ligands, incubation en présence du récepteur et formation du complexe ligand-récepteur, photoactivation, digestion enzymatique ou chimique du complexe, isolation et séquençage du fragment radiomarqué (fig.8).

Le photomarquage permet d'obtenir des données sur la structure du complexe ligand-récepteur. La popularité de cette technique repose sur la mise au point de nouveaux arrangements chimiques de groupements photoréactifs tels les benzophénones (BP). Ceux-ci ont deux avantages majeurs. Le premier est leur stabilité chimique à la luminosité. En effet, ils sont plus stables que les diazoaryles, les arylazides et les diazirines, et ils peuvent être manipulés à la lumière ambiante (Weber *et al.*, 1996). De plus, leur activation à 350-360 nm est sans risque pour les protéines. Le second avantage provient de leur exceptionnelle réactivité une fois irradiée. La photochimie impliquant les groupements benzophénones est bien caractérisée. En 1983, l'un des premiers à utiliser

les BP est Bayley (Bayley, 1983). La photoactivation des BPs ($\lambda \geq 320$ nm) génère un carbone et un oxygène radicalaires [$C^{\bullet}-O^{\bullet}$]. L' O^{\bullet} va déloger un proton situé sur le récepteur ($C_{\alpha}-H$), ce qui provoquera sur celui-ci l'apparition d'un carbone C^{\bullet} . Le carbène du ligand peut lier le C^{\bullet} du récepteur et ainsi former un nouveau lien covalent intermoléculaire. Cette réaction ne peut avoir lieu que si l'oxygène de la fonction cétone du BP se trouve à moins de 3.1Å (de rayon) du récepteur (Dormán & Preststwich, 1994). Le carbène hautement instable peut théoriquement s'introduire à l'intérieur d'un lien O-H aqueux. Cependant, le lien $C_{\alpha}-H$ plus faible, est préféré. Il est ainsi possible de travailler en milieux aqueux. Par contre, l'ordre de réactivité du BP avec le $-H$ d'une protéine donneuse étant: $NCH > SCH > C=CH_2 > -CH_2- > CH_3$, le BP réagit particulièrement en présence d'un hétéroatome tertiaire riche en électrons tel que celui qui est retrouvé dans la méthionine, la lysine et l'arginine (O'Neil *et al.* 1989). Cette réactivité des BP pour les SCH est l'une des principales faiblesses de la méthode. La présence de méthionine au niveau du récepteur peut donc induire en erreur. En dépit d'un mécanisme complexe, la méthode demeure assez simple.

Malgré leurs premières synthèses dans les années 70, ce n'est que depuis quelques années que les BPs sont couramment utilisés. En 1986, l'équipe de Kauer développa un dérivé des BP soit le *p*-benzoyl-L-phénylalanine [Bpa] comme puissant outil pour le photomarquage (Kauer *et al.*, 1986). Le grand avantage de ce groupement photosensible est d'être complètement compatible avec la chimie peptidique en phase solide, autant en utilisant la chimie FMOC que BOC, contrairement à la plupart des arylazides et diazirines. De plus, la grande ressemblance du Bpa avec la phénylalanine lui permet d'être introduit à l'intérieur d'un peptide au même titre qu'un acide aminé lors de la synthèse des peptides (fig.7). Il a été notamment utilisé pour le photomarquage des calmodulines. De plus, des modifications récentes du Bpa en *p*-(4-hydroxybenzoyl)phénylalanine permettent son marquage directement à l'iode, la présence d'une tyrosine dans le peptide devient donc inutile (Wilson *et al.* 1997). De plus, ces modifications permettent de séquencer une plus grande zone du fragment protéique analysé. C'est pourquoi les arylazides et les diazirines furent remplacés par leur correspondant benzophénone au cours des années.

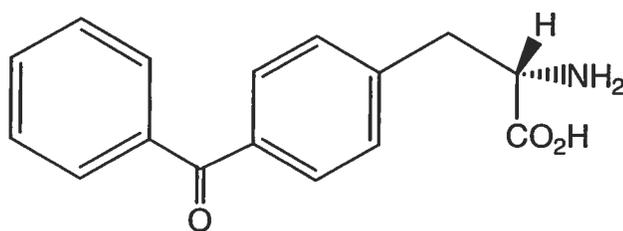


Fig.7 Structure du *p*-benzoyl-phénylalanine (*p*Bpa) de configuration L utilisé comme groupement photosensible.

Le développement de ligands photosensibles a été grandement facilité par de nombreuses études de structure/activité [ALA-scan] de peptides biologiquement actifs. Ces études ont permis d'orienter le choix des acides aminés pouvant être substitués par le groupement photosensible tout en préservant l'activité du peptide. Chez certains peptides, la substitution d'un acide aminé par le photoréactif représente une perturbation trop importante et peut être la raison d'une perte considérable de l'activité et de la sélectivité du peptide. Dans ce cas, il est nécessaire de trouver des méthodes alternatives ou de modifier l'emplacement ou la nature des groupements photoactivables.

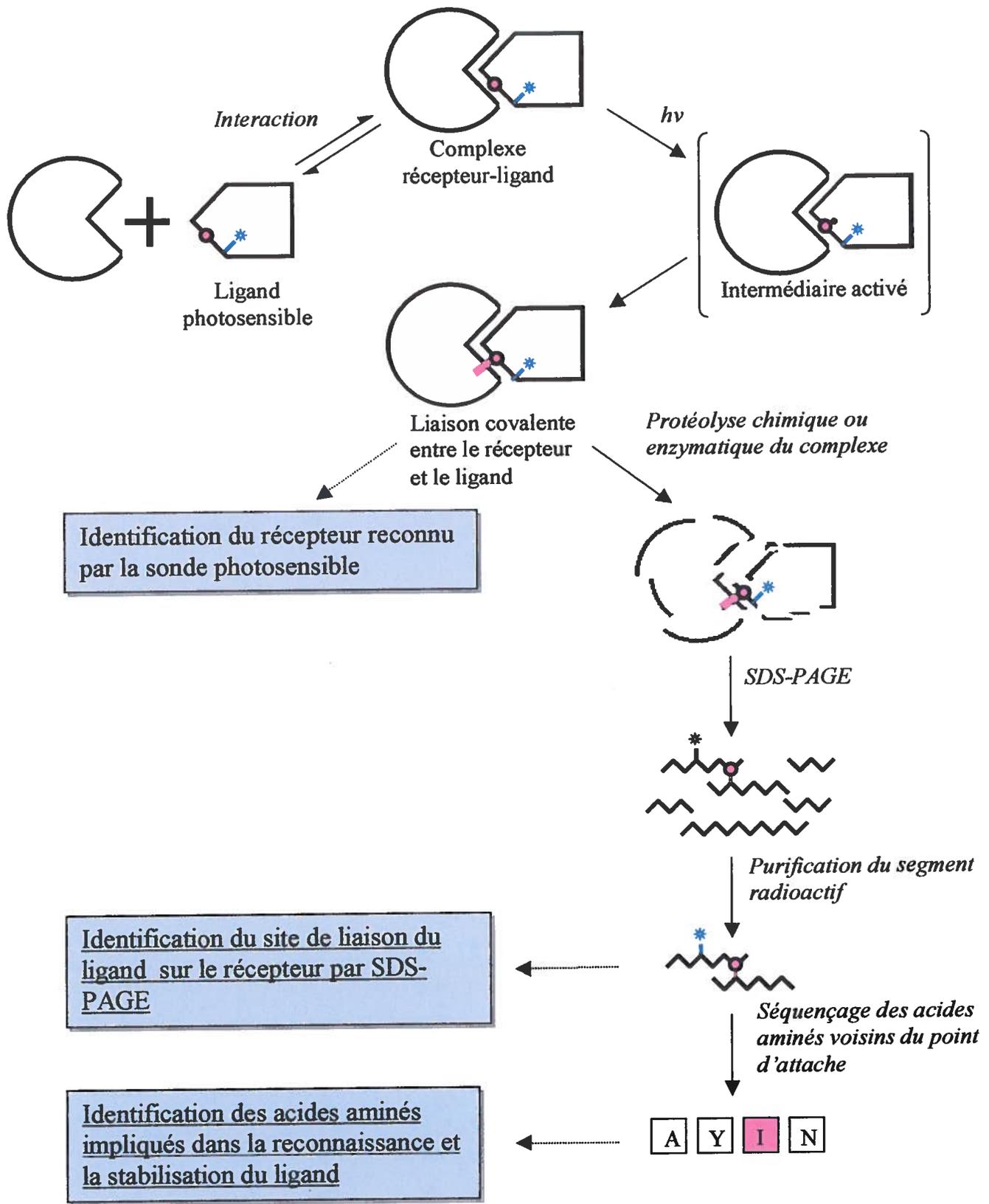


Fig.8. Démarche pour l'identification du point de contact entre le ligand et un récepteur (site de liaison) par la méthode de marquage par photoaffinité.

Études antérieures

Le marquage par photoaffinité a été utilisé avec succès dans le passé pour caractériser différents récepteurs dont les ligands étaient de nature peptidique (Eberle et Graan, 1985). En 1998, Bernier et ses collaborateurs ont utilisé un analogue photosensible de l'angiotensine IV ([L-Bpa]AT4) et ont identifié un récepteur membranaire spécifique de 186 kDa situé dans l'endothélium de l'aorte bovine (Bernier *et al.*, 1998). Une autre équipe a identifié à l'aide d'un analogue photosensible fluorescent d'un tripeptide formyle-MLF, un petit récepteur de 90 acides aminés impliqué dans le phénomène de chimotaxie et dans le processus de défense (Mills JS *et al.*, 1998).

Le premier rôle du photomarquage a longtemps été d'identifier la cible de ligands. Par contre, le photomarquage peut être utilisé à des fins plus élaborées. Des travaux en 1998 menés par Bisello ont permis de séquencer le site de liaison de l'hormone parathyroïde en remplaçant successivement par le Bpa [Bpa-scan) les acides aminés en N-terminal de l'hormone. Deux points de contacts ligand-récepteur, soit Met414 et Met425 présentes dans le 6^e hélice transmembranaire de son récepteur ont été identifiés (Bisello *et al.*, 1988). Le marquage par photoaffinité est maintenant utilisé couramment en association avec la mutagenèse dirigée et la résonance magnétique nucléaire afin de modéliser le site de liaison avec une haute précision tel que démontré par la liaison de la substance P au récepteur NK-1 (Macdonald *et al.*, 2001).

But et objectifs de travail

Notre laboratoire s'intéresse, entre autres, aux sites de liaison de l'endothéline sur les récepteurs ET_A et ET_B. L'objectif de cette étude vise à développer et caractériser pharmacologiquement les tous premiers ligands photosensibles destinés au photomarquage du récepteur ET_B. Par la suite, nous tenterons d'identifier les acides aminés du récepteur de type B impliqués dans la reconnaissance et la stabilisation de l'endothéline-1. Cette étude revêt un intérêt particulier puisque la compréhension des interactions entre le domaine de liaison de l'endothéline et des récepteurs faciliterait grandement le développement, à moyen terme, d'un modèle tridimensionnel du complexe ET-ET_B. Jusqu'à ce jour, aucune structure tridimensionnelle du récepteur de liaison de l'ET n'est disponible. De façon plus générale, cette étude contribuera à la compréhension et à l'explication des processus biologiques au niveau moléculaire et apportera de nouvelles informations en terme de mécanismes de reconnaissance et de sélectivité des ligands.

La chimie a permis de fabriquer par synthèse peptidique des peptides capables de mimer les conformations de ligands naturelles. Or, l'équipe de Takai a synthétisé une série d'analogues peptidiques (succinylés) linéaires de l'endothéline afin de développer un puissant ligand spécifique à ET_B. L'un des composés ainsi élaboré est l'IRL-1620 ([Suc-Glu⁹,Ala^{11,15})-ET-1 (8-21)] (Takai *et al.* 1992). Cet analogue peptidique qui correspond sur la partie carboxy-terminale de l'endothéline s'est révélé être un puissant agoniste, du même ordre que ET-1, en plus d'être 1000 fois plus sélectif pour le récepteur ET_B (Brooks *et al.*, 1995). Il est composé de 14 résidus d'acides aminés (Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp) et peut être obtenu par synthèse peptidique classique en phase solide en utilisant la chimie FMOC ou BOC. De plus, l'IRL-1620 possède une tyrosine qui peut être iodée au besoin. Sa forme linéaire permet d'éliminer l'étape de cyclisation. Notre attention s'est portée sur la structure de l'IRL-1620 qui semble être un excellent modèle pour le développement d'un puissant outil photosensible et spécifique à ET_B. Le groupement photosensible sélectionné pour être introduit dans l'IRL-1620 est le Bpa qui a été présenté plutôt dans l'introduction.

L'obstacle majeur de cette étude est le développement de sondes photosensibles de bonne affinité et sélectifs pour le récepteur ET_B. En comparant les études de structure-activité de l'IRL-1620 et de l'endothéline, cinq acides aminés de l'IRL-1620 ont été substitués par le Bpa à des positions susceptibles de moins influencer ses propriétés pharmacologiques (tableau 2). Des tests pharmacologiques ont été par la suite réalisés sur l'aorte de rat (modèle ET_A) et le parenchyme pulmonaire de cobaye (modèle ET_B) afin de vérifier l'impact des modifications apportées par le Bpa. Les analogues photosensibles ont tous été par la suite mono- et di-iodés puis caractérisés à nouveau sur ces deux tissus puisque l'introduction d'un atome d'iode (ou deux) sur la tyrosine-6 risque d'ajouter des contraintes importantes à la liaison au récepteur. Enfin, l'affinité des peptides démontrant une activité biologique a été caractérisée à l'aide de test de liaison sur des cellules CHO surexprimant le récepteur hET_B.

Tableau 2. Description de la structure des sondes peptidiques photosensibles développées pour le photomarquage du récepteur de type B de l'endothéline. Les 5 sondes développées sont des analogues photosensibles de l'IRL-1620.

<i>Description</i>	<i>Séquence</i>
IRL-1620*	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa ⁴] IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu- Bpa -Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa ⁵] IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala- Bpa -Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa ⁷] IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr- Bpa -Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa ⁹] IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala- Bpa -Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa ¹⁰] IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His- Bpa -Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

*IRL-1620 [Suc-(Glu⁹,Ala^{11,13})ET-1(8-21)]

MATÉRIEL ET MÉTHODES

SECTION I : DÉVELOPPEMENT DES SONDÉS PHOTOSENSIBLES

Matériel utilisé pour la synthèse peptidique

Les peptides ont été synthétisés sur phase solide à l'aide d'une résine de type Merrifield (1,2 méq/g) de la compagnie BioRad (Richmond, CA). La chimie classique des peptides a été utilisée en suivant la stratégie Boc-TFA-HF. Les acides aminés suivants : Boc-Trp(For), Boc-Leu, Boc-Ala et Boc-Phe ont été achetés de la compagnie Chem Impex International (Wood Dale, IL); Boc-Glu(O-Bzl), Boc-Asp(O-cHex), Boc-Ile et Boc-Tyr(2-Br-Z) proviennent de la compagnie Albatros (Montréal, QC); Boc-L-Bpa a été obtenu de Advanced Chem Tech (Louisville, KY). L'agent de couplage l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino)-phosphonium (BOP) a été obtenu de la compagnie Albatros (Montréal, QC). Les solvants de qualité ACS utilisés lors des synthèses et des purifications, soit l'acétonitrile, le dichlorométhane, le diméthylformamide, l'éthanol, l'éther éthylique, le méthanol et le toluène provenaient de Fisher Scientific (Nepean, ON). L'acide trifluoroacétique a été acheté de Halocarbon Products Corporation (River Edge, NJ). Le diméthylsulfure, la diisopropyléthylamine, le bicarbonate de césium et le m-crésol ont été obtenus de Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI) tandis que l'acide fluorhydrique provenait de Matheson Gas Products Inc. (Ottawa ON).

Principe de la synthèse peptidique sur phase solide

La synthèse d'un peptide nécessite plusieurs étapes successives pour accomplir l'enchaînement des différents acides aminés. La synthèse peptidique opérée en milieu liquide s'avère fastidieuse, car il faut à chaque étape isoler et purifier les intermédiaires de la réaction. Cette technique a été grandement simplifiée, grâce à Merrifield, par la méthode de synthèse des peptides sur support solide (Merrifield, 1963 ; Merrifield, 1986). Afin d'arriver à ce résultat, il a fallu développer une résine, mettre au point le site d'ancrage du peptide sur le polymère, rechercher des systèmes de décrochage du peptide final et, finalement, réaliser des groupements chimiques aptes à protéger les fonctions latérales de certains acides aminés. Toutes ces difficultés ont, pendant un certain temps, limité l'emploi de cette méthode de synthèse. Dans une série d'articles parus dans les années 60, Bruce Merrifield a posé les bases de cette stratégie, qui s'est depuis très largement imposée. Par la suite, celle-ci a permis de préparer des centaines de peptides destinés, particulièrement, à la pharmacologie. L'une des prouesses de l'équipe de Merrifield a été de réussir la synthèse complète d'une chaîne polypeptidique de la ribonucléase bovine pancréatique (124 acides aminés), première protéine obtenue en laboratoire. Le principe général est depuis resté le même, mais des améliorations techniques l'ont rendu plus performant. Aujourd'hui, la synthèse peptidique développée par Merrifield demeure un outil de choix pour préparer rapidement des peptides comptant entre 2 et quelques dizaines d'acides aminés.

La synthèse d'une chaîne peptidique débute par la fixation du groupe carboxylique de l'acide aminé en C-terminal sur des billes insolubles de résine via la formation d'un sel de césium. Le second acide aminé, dont la fonction aminée est protégée par un groupement chimique, est introduit dans le réacteur contenant la résine et le groupement COOH de l'acide aminé va réagir en présence d'un agent de condensation avec la fonction aminée libre du résidu couplé précédemment. Il se forme ainsi un dipeptide dont la fonction aminée est bloquée. Le groupe protecteur de la fonction aminée est alors retiré avec un acide. Ces étapes peuvent être répétées ce qui permet l'addition successive d'acides aminés. Lorsque le peptide est complété, il demeure fixé à la résine insoluble. Ces étapes, à l'exception de la fixation du premier résidu sur la résine, peuvent être automatisées.

Lorsque le peptide est complètement assemblé, le dernier acide aminé est déprotégé puis le peptide est clivé de la résine et les groupements protecteurs portés par les chaînes latérales sont éliminés. À la toute fin, le peptide libre doit être purifié et caractérisé.

Stratégie de synthèse des analogues

La synthèse peptidique fait appel à des groupements pour protéger les chaînes latérales de certains acides aminés possédant des fonctions. Ceci évite des réactions secondaires telles que, branchements latéraux, oxydation, acylation, etc, et augmente ainsi les rendements. La labilité des groupements protecteurs étant variable, leur retrait est, par conséquent, effectué dans des conditions différentes assurant ainsi une spécificité réactionnelle. Ainsi, certains groupements sont retirés lors du clivage alors que d'autres résistent à ce traitement et sont retirés ultérieurement. Par exemple, l'acide aminé tryptophane doit porter un groupement formyle afin de protéger son noyau indole contre l'oxydation et l'alkylation lors du clivage au HF. Ce groupement est retiré lors d'un traitement à la pipéridine réalisé après le traitement au HF.

Différentes stratégies sont utilisées pour la synthèse des peptides. La chimie classique de la synthèse de peptides en phase solide fait appel à deux types de protection, soit le Boc ou le Fmoc. La stratégie Boc, la plus ancienne, utilise un groupement tert-butyloxycarbonyle (Boc) pour protéger la fonction amine de l'acide aminé à coupler. Le groupement Boc est labile en milieu acide dans un milieu assez agressif employant l'acide trifluoroacétique (TFA). Les groupements protecteurs des chaînes latérales des résidus doivent résister au TFA. Généralement, ces derniers sont clivés en conditions acides avec un nucléophile comme, par exemple, en présence d'acide fluorhydrique (HF).

La stratégie Fmoc utilise le fluorenylmethoxycarbonyle (Fmoc) comme groupement protecteur. Contrairement à la chimie Boc, le groupement protecteur Fmoc est labile en milieu basique soit généralement la base organique pipéridine dans du diméthylformamide (DMF). Cette fois, les groupements protecteurs des chaînes latérales doivent donc être stables en milieu basique et ils sont clivés sous conditions acides (TFA).

Puisque les Fmoc-AA sont plus coûteux que les Boc-AA et que le pBpa (acide aminé photosensible) que nous disposions était protégé en N-alpha par le groupement Boc, nous avons alors privilégié la chimie Boc pour synthétiser nos sondes photosensibles.

Choix de la résine pour la synthèse

Une résine chlorométhylée de type Merrifield a été employée (Barany et Merrifield, 1980). Elle consiste en un polymère de styrène ponté avec du divinylbenzène auquel sont attachés des groupes chlorométhylés. Cette résine permet d'obtenir, à la suite de son clivage, un peptide avec un groupement carboxy-terminal libre. Cette résine a fait ses preuves et est utilisée depuis plus de vingt ans en synthèse peptidique de type Boc.

Attachement du tryptophane à la résine

Le premier acide aminé a été fixé à la résine chlorométhylée via la formation d'un sel de césium (Gisin, 1973; Wang *et al.*, 1977). L'utilisation du césium plutôt que d'un autre dérivé alcalin tel que le sodium, le potassium ou le lithium donne de meilleurs rendements de substitutions sur la résine. En effet, même s'ils présentent la même charge positive que les ions Na^+ , K^+ et Li^+ , le Cs^+ possède un rayon atomique plus important diminuant ainsi sa densité de charge, donc sa polarité apparente. Cette caractéristique lui permet ainsi de pénétrer plus facilement le réseau hydrophobe des billes de résine formées par la co-polymérisation de styrène et de divinylbenzène. Par conséquent, le sel de césium permet l'obtention d'un taux adéquat de substitution du premier acide aminé

sur la résine chlorométhylée. Le sel de césium a été préparé en dissolvant le Boc-Trp(For)OH (3 équivalents par rapport aux sites chlorométhylés de la résine) dans un mélange éthanol : eau (4:1). Il a ensuite été titré avec une solution de $\text{Cs}^+\text{HCO}_3^-$ 2M jusqu'à pH7. Par la suite, la solution a été asséchée et le sel ainsi obtenu a été dissous dans du DMF en présence de 100 mg de KI par gramme de résine utilisée. La résine a ensuite été ajoutée et le mélange a été agité à 50°C pendant 24 heures. La résine sur laquelle est couplé l'acide aminé a ensuite été filtrée et lavée plusieurs fois avec du DMF, du méthanol et du DCM. Elle a ensuite été séchée au dessiccateur au moyen d'une pompe mécanique.

Détermination du taux de substitution de la résine

Afin d'évaluer le degré de substitution de la résine, nous avons par la suite procédé à un test quantitatif au moyen de l'acide picrique (Gisin, 1972). Pour ce faire, environ 20 mg de résine sèche sont pesés précisément et introduits dans une colonne avec robinet munie d'un filtre en laine de verre. La première étape consiste à déprotéger l'amine alpha de l'acide aminé c'est-à-dire d'enlever le groupe Boc. La résine est tout d'abord lavée trois fois avec 4 mL de DCM et une fois avec 4 mL de TFA 40 % dans du DCM. Ensuite un autre volume de 4 mL de 40% TFA / DCM est ajouté dans l'ampoule pour vingt minutes. La deuxième étape du protocole a consisté à retirer la solution de TFA et à laver puis à neutraliser l'acide aminé-résine. Le protocole suivant a donc été appliqué: lavage avec 1 x 4 mL 40% TFA / DCM, 5 x 3 mL de DCM, 2 x 4 mL DCM:dioxane (1:1), 4 x 3 mL de DCM et 2 x 4 mL DIEA 5% dans le DCM. Par la suite, 4 mL de DIEA 5% / DCM sont ajoutés pour 5 minutes. La troisième étape consiste à former un complexe entre l'acide picrique et l'amine libre de l'acide aminé. La résine est alors lavée avec 5 x 3 mL de DCM et 1 x 4 mL d'acide picrique 0,05M / DCM . Un autre 4 mL d'acide picrique 0,05M / DCM est ensuite ajouté, et la réaction est poursuivie pendant 10 minutes. Par la suite, l'excès d'acide picrique est lavé: 4 x 3 mL de DCM, 4 x 3 mL d'éthanol absolu et 4 x 3 mL de DCM. Finalement, un volume de 10 mL de 5% DIEA / DCM est ajouté dans l'ampoule afin de déplacer l'acide picrique lié à l'amine

alpha de l'acide aminé et de former un complexe stable entre l'acide et le DIEA. Ce complexe soluble est recueilli dans une fiole jaugée de 100 mL. La résine est lavée à l'aide d'éthanol absolu jusqu'à disparition de la couleur jaune. Le volume de filtrat recueilli dans la fiole jaugée a été complété à 100 mL avec de l'éthanol absolu. L'absorbance de la solution a ensuite été mesurée à 358 nm, au moyen d'un spectrophotomètre de marque LKB Biochrom Novaspec. À l'aide de la formule suivante, dérivée de la formule de Beer-Lambert ($A = \epsilon cd$), le taux de substitution de la résine peut être facilement calculé:

$$\text{Substitution (mmol/g)} = \frac{\text{Absorbance} \times 1000 \times 10 \times 10}{16250 \times \text{poids pesé de la résine}}$$

Cycle de synthèse

L'addition des acides aminés subséquents est effectuée à l'aide d'un synthétiseur manuel à multiréacteurs permettant la synthèse simultanée de six peptides. Le couplage des acides aminés se compose en un cycle comprenant plusieurs étapes, soit dans l'ordre : (1) la déprotection, (2) la neutralisation, (3) le couplage, (4) le lavage et (5) la vérification. (1) La première étape consiste à enlever le groupement protecteur Boc de l'amine alpha de l'acide aminé fixé à la résine à l'aide d'un mélange 40% TFA / DCM. Sous agitation d'azote, la solution de TFA agit pendant cinq minutes avant d'être filtrée. La résine subit un autre traitement, mais cette fois-ci pendant 20 minutes. La solution est par la suite drainée sous pression d'azote. L'amine libre ainsi obtenue est chargée positivement puisqu'elle est en condition acide. (2) Une série de lavages au DCM, EtOH, 1% DIEA / DMF et DMF sont ensuite effectués pour éliminer le TFA résiduel. L'extrémité N-terminale du peptide est du même coup neutralisée par le DIEA, une base organique dont le pKa est largement supérieur à celui de l'amine alpha de l'acide aminé. L'étape suivante consiste à coupler l'acide aminé suivant. (3) Les réactifs de couplage sont toujours utilisés en excès pour s'assurer de l'efficacité de la réaction. C'est ainsi que 3 équivalents de Boc-AA et 3 équivalents de BOP sont dissous dans un volume minimal de DMF avant d'être ajoutés dans les réacteurs. Les mécanismes impliqués dans la synthèse peptidique avec le réactif BOP ont été décrits précédemment par les membres de

notre équipe (Forest & Fournier, 1990). De plus, le DIEA, une amine tertiaire, est ajouté dans les réacteurs afin d'arracher le proton de la fonction carboxylique de l'acide aminé à coupler. Le Bop réagit avec celui-ci pour favoriser la formation d'un dérivé acyloxyphosphonium et d'un ester actif de l'hydroxybenzoate qui peuvent ensuite réagir avec l'amine libre de la chaîne peptidique en élongation. (4) Après le couplage, une série de lavages au DMF et au DCM permet d'éliminer les sous-produits de la réaction ainsi que les excès de réactifs. (5) Pour vérifier si le couplage a bel et bien eu lieu, un test Kaiser est effectué sur un aliquot de peptide-résine. Ce test qualitatif, qui est à base de ninhydrine, permet d'évaluer la présence d'amines libres (Kaiser *et al.*, 1970). Lorsqu'aucune amine libre n'est détectée, le cycle de synthèse est répété jusqu'à l'assemblage complet du peptide (Tableau 3).

Réaction avec l'acide succinique

L'IRL-1620 ainsi que les cinq analogues ont nécessité un traitement particulier pour fixer un groupement succinyle en N-terminale. Le protocole utilisé est semblable à celui d'un couplage d'un acide aminé cependant; les trois équivalents d'acide aminé sont remplacés par trois équivalents d'acide succinique.

Lorsque la synthèse du peptide est terminée, il n'est pas nécessaire de faire une déprotection finale à l'aide de TFA puisque, dans notre cas, l'acide succinique ne contient pas de groupement protecteur Boc. Les peptides-résines sont ensuite retirés des réacteurs et lavés abondamment au DMF, au DCM et finalement au méthanol avant d'être séchés sous vide.

Clivage des peptides-résine :

L'étape subséquente à la synthèse consiste à séparer le peptide du support solide. Pour ce faire, l'acide fluorhydrique, qui est un acide plus fort que le TFA a été utilisé. Le HF permet non seulement de cliver le peptide du support solide, mais aussi de retirer plusieurs groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés tels que OcHex, OBzl, Bzl et 2-Br-Z. Toutefois, le groupement formyle sur le noyau indole du tryptophane est résistant au HF ce qui le protège ainsi contre une oxydation ou une alkylation possible.

Déformylation du Tryptophane(For) :

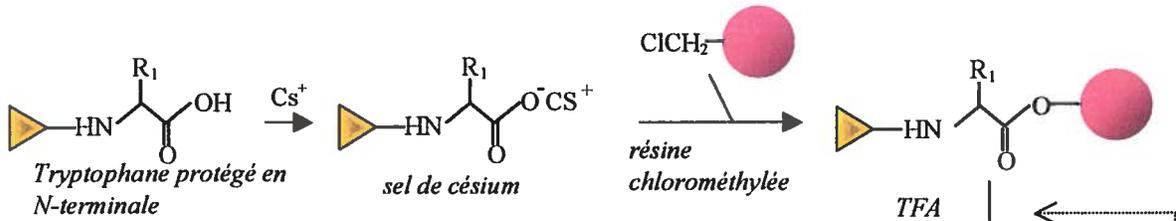
La déformylation du tryptophane a été réalisée à l'aide d'une solution 0,1N pipéridine (1 mL / mg) à 4°C sous agitation pendant 10 minutes. La réaction a été arrêtée en diluant la solution dans un grand volume d'eau (2 L).

TABLEAU 3 Protocole suivi pour la synthèse des peptides.

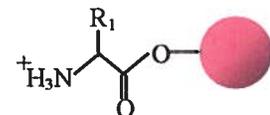
Étapes	Réactifs	Temps de réaction
Déprotection	40% (v/v) TFA, / DCM 40% (v/v) TFA, / DCM	1 x 5 min 1 x 20 min
Lavages	DCM Éthanol DCM	2 x 2 min 1 x 2 min 1 x 2 min
Neutralisation*	1% (v/v) DIEA/DMF DMF	1 x 2 min 1 x 2 min
Couplage	3 éq. Boc-AA ou 3éq. ac. succinique 3 éq. BOP 5 éq. DIEA	1 x 45 min
Lavages	DMF DCM	2 x 2 min 2 x 2 min
Test de Kaiser	Phénol Ninhydrine KCN	5 min.

**L'étape de neutralisation avec le DIEA est omise lorsque l'acide aminé couplé est l'acide glutamique. Ceci prévient la formation de l'acide pyroglutamique*

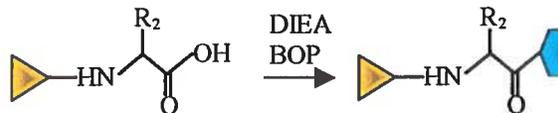
1) FIXATION DE L'ACIDE AMINÉ C-TERMINAL À LA MATRICE :



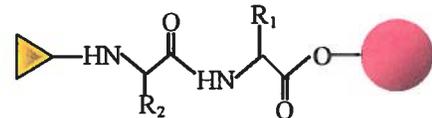
2) DÉPROTECTION DE L'AMINE TERMINALE :



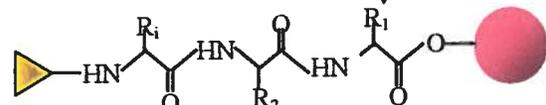
3) ACTIVATION DE L'ACIDE AMINÉ



4) COUPLAGE DE L'ACIDE AMINÉ



5) ÉLONGATION DU PEPTIDE



6) COUPLAGE DE L'ACIDE SUCCINIQUE

7) CLIVAGE DU PEPTIDE-RÉSINE

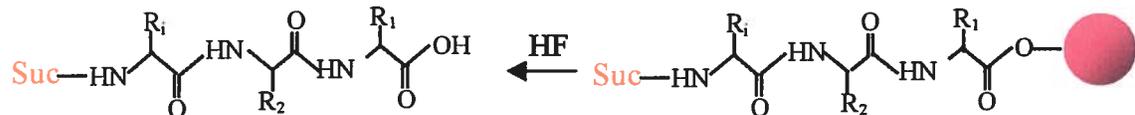


Fig. 9 Schématisation des étapes utilisées en synthèse peptidique en phase solide.



Première purification

La purification des sondes synthétisées est effectuée au moyen d'un système CLHP préparatif Waters Prep LC500A couplé à une colonne DeltaPak C18 (15 μm ; 300 Å). Le matériel est ensuite élué au moyen d'un gradient linéaire de 0 à 40%ACN/ 0,05% NH_4OH , en 120 minutes. Le débit est maintenu à 40mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 230 nm. Des fractions de 5mL ont été recueillies et elles ont été analysées par CLHP analytique au moyen d'un système de marque Beckman. Pour ce faire, les peptides ont alors été injectés sur une colonne Vydac C18, de phase inverse (5 μm ; 300 Å) de 25 x 0,45cm. L'éluion, avec un débit de 1 mL/min, a été effectuée au moyen d'un gradient linéaire de 20 minutes allant de 30 à 60% ACN / 0.05% H_2O -TFA. Les fractions ont été regroupées, évaporées et lyophilisées selon la nature du produit et de sa pureté. Les peptides ont finalement été conservés à -20°C .

Spectrométrie de masse

Les peptides sont ensuite caractérisés par spectrométrie de masse, au moyen de la technologie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight), avec un spectromètre Voyager-DE de Applied Biosystem. Le voltage est alors ajusté à 20kV, le laser à 337 nm et le balayage est effectué à une vitesse de 20 pulses/sec. La matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique est utilisée pour les analyses. L'appareil avait d'abord été calibré avec l'angiotensine I, l'ACTH et l'insuline bovine.

Marquage des peptides au NaI

Un ou deux atomes d'iode non radioactif ont été introduits sur la tyrosine des peptides afin de vérifier leur impact sur l'activité des analogues et sur leur sélectivité pour les récepteurs de l'endothéine. La méthode utilisant le NaI et la chloramine-T a alors été privilégiée. L'iode, sous l'action de la chloramine-T se présente sous sa forme oxydée de I^+ vient alors réagir avec le groupement phénol de la chaîne latérale de la tyrosine. La fixation de l'iode se fait en ortho du groupement hydroxyle par substitution électrophile (Hunter, 1970). Cependant, l'utilisation de la chloramine-T conduit rapidement à la formation de la diiodotyrosine et peut également entraîner des dommages irréversibles aux peptides. Un temps de réaction de 30 secondes et un tampon 25 mM Tris-HCl pH7,5, 0,05M NaCl) ont été privilégiés, en particuliers, pour empêcher l'oxydation irréversible du tryptophane. Ce protocole a été appliqué au marquage de plus grandes quantités de peptide (mg). En effet, l'iodation de 20 mg de peptide dissous dans un tampon Tris-HCl [25mM], pH7,5 et NaCl [0,05M] a été réalisée en ajoutant 1,2 éq de NaI et 0,8 éq. de chloramine-T sous agitation pendant 30 secondes. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 1,0 éq de bisulfite de sodium qui neutralise l'excès de chloramine-T. Les peptides ont ensuite été immédiatement purifiés par CLHP préparative afin d'éliminer les espèces réactives en excès. Ainsi, les formes mono- et di-iodées ont été isolées et caractérisées par CLHP analytique et spectrométrie de masse.

SECTION II : TESTS PHARMACOLOGIQUES

Animaux et réactifs :

Les rats mâles Sprague-Dawley (250 à 300g) et les cobayes mâles Durkin Hartley (300 à 350 g) provenaient de la compagnie Charles River Canada (St-Constant, QC). Les rats et les cobayes étaient gardés sous un cycle lumière-obscurité de 12 heures avec nourriture et eau *ad libitum*, selon les standards établis par le Comité canadien sur les soins aux animaux (CCAC). Les produits entrant dans la composition du tampon Krebs, soit le NaCl, le glucose, le KCl, le KH_2PO_4 et le CaCl_2 ont été achetés chez Fisher Scientific (Ottawa, ON) tandis que le NaHCO_3 et le MgSO_4 ont été obtenus de Anachemia Canada Inc. (Montréal, QC). L'histamine et l'acétylcholine provenaient de Sigma (St-Louis, MO) et l'anesthésiant utilisé, le Somnotol, a été obtenu de CDMV (St-Hyacinthe, QC).

Essais biologiques sur récepteur ET_A

Les rats mâles Sprague-Dawley ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de Somnotol (65 mg/kg). Une fois sous l'effet de l'anesthésie, les rats ont été sacrifiés par rupture de la veine cave et l'aorte thoracique a été prélevée et rapidement plongée dans un tampon Krebs-Henseleit (mmol/L) NaCl 120; NaHCO_3 25; KCl 4,7; MgSO_4 1,6 ; KH_2PO_4 1,17; CaCl_2 2,5; glucose 10 à pH 7,4. Les tissus conjonctifs et adipeux entourant l'aorte ont été ensuite minutieusement enlevés. L'endothélium a également été retiré en frottant délicatement la surface interne de l'aorte. Finalement l'aorte a été coupée en anneaux de 5 mm de longueur et ceux-ci ont été installées dans des bains à organe tempérés à 37°C et remplis de tampon physiologique Krebs-Henseleit oxygéné (95% O_2 ; 5% CO_2). Les tissus ont alors été fixés à un transducteur Grass modèle FT03 relié à un polygraphe Grass 7E qui permet l'enregistrement isométrique des réponses mécaniques (appendice A). Une tension initiale de 1 g. a été appliquée sur le

tissu pour une période d'équilibration de soixante minutes. Ensuite, une injection de 80 mmol/L de KCl a permis de vérifier la viabilité et la contractilité de chacun des tissus et d'établir une valeur de référence. Lorsque la contraction maximale a été atteinte, les tissus ont alors été lavés jusqu'à ce qu'une ligne de base stable soit obtenue. Des injections de concentrations cumulatives de l'IRL-1620 et des analogues allant de $1 \times 10^{-10} \text{M}$ à $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ont été effectuées afin d'obtenir les courbes concentration-réponse pour chacun des peptides. Les dérivés ont été d'abord dissous dans 15 μL de DMSO puis ensuite dans l'eau déionisée afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/mL. Les courbes concentration-réponse ont été dessinées et analysées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM 3.02® afin de mesurer le potentiel agoniste de chaque peptide. En absence de réponse des tissus, une concentration unique [$1 \times 10^{-6} \text{M}$] d'ET-1 a été ajoutée au bain afin de vérifier le potentiel antagoniste des analogues. L'activité des formes mono- et di-iodées a été également évaluée.

Activité sur le récepteur ET_B :

Les cobayes mâles Dunkin Hartley ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de Somnotol (65 mg/kg). Une fois anesthésiés, les cobayes ont été sacrifiés par rupture de la veine cave et les poumons ont été rapidement prélevés puis plongés dans du tampon Krebs-Henseleit. Les poumons ont ensuite été coupés en bandelettes longitudinales de 3 mm de largeur, 15 mm de longueur et de 3-5 mm d'épaisseur (Jan, 1984). Chaque bandelette a été installée dans un bain à organe isolé tempéré à 37°C rempli de tampon physiologique Krebs-Henseleit oxygéné (95% O_2 ; 5% CO_2). L'une des extrémités du tissu pulmonaire a alors été reliée, à l'aide d'un fil chirurgical, à un crochet fixe dans le fond du bain; l'autre, quant à elle, a été rattachée à un transducteur de force Grass modèle FT03, relié à un polygraphe Grass 7E permettant l'enregistrement isométrique des réponses mécaniques (appendice B). Les bandelettes ont alors été installées de façon à subir une tension initiale de 1g. À la suite d'une période d'équilibration de soixante minutes, une injection de $1 \times 10^{-6} \text{M}$ d'histamine a permis de vérifier la viabilité et la contractilité de chaque bande de poumon. Lorsque la contraction

maximale a été atteinte, les tissus ont alors été lavés jusqu'à ce qu'une ligne de base stable soit obtenue. Des concentrations cumulatives de chacun des analogues, allant de $1 \times 10^{-10} \text{M}$ à $1 \times 10^{-6} \text{M}$, ont finalement été effectuées afin d'obtenir une courbe concentration-réponse pour chacun des peptides. Lorsqu'un analogue ne démontrait aucune activité agoniste sur le parenchyme pulmonaire, une concentration dose de 10^{-7}M d'ET-1 était alors injectée afin de vérifier le potentiel antagoniste de l'analogue sur ce tissu.

SECTION III : TESTS DE LIAISON

Réactifs

Les peptides synthétisés ont été mono-iodés à l'aide de l'iodure de sodium et de chloramine-T achetés de la compagnie Fischer. L'iode-125 qui a servi aux marquages des peptides a été acheté de Amersham Biosciences par fraction de 1 mCi (10 μ L) dans un milieu NaOH (activité spécifique de $^{125}\text{I} = 2190 \text{ Ci/mmol}$).

Méthode de marquage à ^{125}I

L'iode-125 (Na^{125}I) est une molécule peu coûteuse, peu ionisante, mais suffisamment énergétique pour que le rayonnement émis soit mesurable. Généralement, le rendement de conversion électro-chimique sur film photo de l' ^{125}I est de 3-10% alors que celui du tritium (^3H) est inférieur à 1 %. Donc, l'image peut être obtenue de 200 à 500 fois plus rapidement avec un ligand marqué à l'iode-125 qu'avec le tritium. De plus, la demi-vie de 60 jours est 60 fois plus courte que celle de ^3H (12,3 ans), ce qui permet d'éliminer les déchets radioactifs plus rapidement. C'est pourquoi nous avons choisi cet isotope.

Il existe deux voies d'incorporation du radioélément ^{125}I qui peuvent être utilisées: directe ou indirecte. La méthode directe nécessite la présence d'une tyrosine; dans le cas contraire, il est nécessaire d'utiliser un réactif chimique marqué à ^{125}I qui sera par la suite greffé au peptide (Seevers RH *et al.*, 1982 ; Kienhuis CBM *et al.*, 1991). Dans le cas de l'IRL-1620 et des analogues photosensibles, la présence d'une tyrosine permet un marquage direct. La méthode décrite par Watakabe *et al.*, 1992 a été légèrement modifiée. Tout d'abord, un aliquot de peptide [6,6 nmoles] est dissous dans un tampon phosphate [50mM] et mélangé dans un tube conique Eppendorf de 0,5 mL contenant 1 mCi de Na^{125}I (Amersham). La réaction est amorcée par l'ajout de 100 μ l soit 14 nmol de chloramine-T dissous dans le tampon phosphate. Après 45 secondes, la réaction est

arrêtée par l'ajout de 40 μL de m-bisulfite dans l'eau [10 mg/ 50 mL]. La séparation du produit marqué et du produit non-marqué est effectuée par CLHP analytique. L'éluat est recueilli par fractions de 500 μL et la radioactivité de chacune de ces fractions est mesurée à l'aide d'un compteur gamma de marque Packard. L'activité spécifique de l'iode-125 est de 2200 Ci/mmol (1Ci = $2,2 \times 10^{12}$ dpm et 1 dpm = 0,45 cpm [efficacité du compteur] donc, $\approx 2,2 \times 10^{15}$ cpm/mmol de ligand. La fraction la plus radioactive est choisie, diluée 1:10 dans un tampon phosphate puis conservée à -20°C .

Cellules transfectées exprimant hET_B

Les cellules surexprimant le récepteur hET_B ont été fournies de Euroscreen (ES-321-C)(fig.10). Brièvement, le gène du récepteur hET_B a été cloné par PCR à partir de l'ADNc isolé d'un placenta humain. Le séquençage de ADNc du clone obtenu a résulté en un fragment de 1353 nucléotides codant pour le récepteur de type B de l'endothéline humaine (hETB) identique à celui qui avait été publié par Nakamuta, à l'exception de 2 nucléotides ayant subi une mutation silencieuse (Nakamuta *et al.*, 1991). Par la suite, ce fragment a été inséré dans le plasmide pCDNA3 en *BamHI-XbaI* et transfecté dans des cellules CHO-K1 par la méthode utilisant la lipofectamine. Les clones résistant au G418 [400 $\mu\text{g}/\text{mL}$] ont été sélectionnés pour amplification. Les cellules hETB-C1 ont été maintenues à 37°C , avec 5% CO_2 , dans un milieu HAMF12 contenant 10% de sérum de veau fœtal, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418, 100 U/mL de pénicilline, 100 μg de streptomycine, et 5 μl d'amphotéricine B.

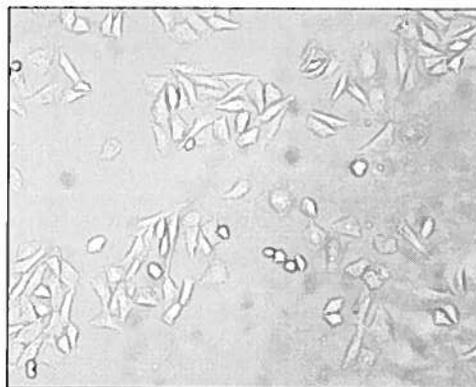


Fig. 10 Microscopie des cellules CHO-K1 transfectées avec le récepteur ET_B.

Courbe de saturation

Les tests de liaison ont été réalisés afin de déterminer la capacité de liaison maximale (B_{max}) de l'IRL-1620 radiomarqué. L'ensemble des tests s'est déroulé comme suit : 250 000 cellules ont été déposées dans chacun des puits (plaque en polystyrène de 12 puits), dans un volume final de 1 mL de milieu de culture HAM F12. Après 24h d'incubation à 37°C, les plaques ont été lavées deux fois avec un tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl). Les cellules ($\cong 13\mu g$ de protéine) ont été incubées en présence d'analogues radiomarqués allant de 10^{-12} à $10^{-6}M$ à 4°C, pour une période de 24h, dans un volume de 500 μl de tampon de liaison (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0,01% BSA, 0,01% inhibiteurs de protéases). La liaison non spécifique est déterminée en présence de $1 \times 10^{-6}M$ d'IRL-1620 non-marqué. Suivant la période d'incubation, les puits ont été lavés deux fois avec le tampon de lavage. Pour déterminer la liaison spécifique, il a suffi de soustraire la liaison non spécifique (compte résiduel) de la liaison totale (compte total). Les résultats obtenus ont été analysés graphiquement au moyen du logiciel PRISM 3.02. La concentration des protéines contenues dans les puits a été évaluée avec la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) avec comme standard la BSA.

Courbe de compétition à l'équilibre

Pour déterminer l'affinité des analogues (K_d) pour le récepteur ET_B , une quantité fixe d'analogue radio-marqué $3 \times 10^{-10}M$ a été incubée en présence d'une concentration croissante de peptide froid, soit d'ET-1 (compétition hétérologue) ou d'IRL-1620 (compétition homologue). La concentration de $3 \times 10^{-10}M$ représente environ 70% du B_{max} évalué à l'aide des tests de saturation de l'IRL-1620. Les conditions expérimentales ont été les mêmes que pour les tests de saturation.

Immunodétection du récepteur ET_B

Des analyses par immunobuvardage de type western ont été utilisées afin d'identifier le poids moléculaire du récepteur ET_B. Les cellules CHO-ET_B ont été cultivées dans un puits de 100 mm jusqu'à confluence et solubilisées dans 1,5 mL de détergent froid i.e. 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Igepal, 0,1% (p/v) SDS, 0,1% Triton X-100, contenant 0,01% (v/v) d'inhibiteurs de protéases. Après une centrifugation à 13 000 rpm, un aliquot du surnageant a été analysé par SDS-PAGE (10%). Après avoir réalisé le transfert sur une membrane de PVDF, le récepteur ET_B a été révélé avec un anticorps anti-ET_B (Sigma) et un anticorps anti-IgG conjugué à la peroxidase selon le protocole du distributeur. Le récepteur ET_B a été visualisé à l'aide d'un film (Universal X-Ray Company of Canada Ltd.) après sa révélation à l'ECL.

Marquage par photoaffinité du récepteur ET_B

Les cellules CHO-ET_B ont été incubées en présence de 6 nmoles (750 µL) de [Tyr(¹²⁵I)⁶]peptide avec ou sans la présence d'un excès d'ET-1 (10⁻⁶M) ou d'IRL-1620 (10⁻⁶M) dans un milieu composé de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,01% BSA contenant 0,01% (v/v) d'inhibiteurs de protéases pour une période de 16h à 4°C. Après cette période d'équilibration, les cellules ont été lavées deux fois et placées à 6 cm d'une lampe UV irradiant à 360 nm pour 60 minutes. Ensuite, les cellules ont été solubilisées à l'aide de 750 µL d'une solution contenant des détergents (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Igepal, 0,1% (p/v) SDS, 0,1% Triton X-100, 5 mM EDTA et 0,01% (v/v) d'inhibiteurs de protéases). Le tube a été alors placé sous agitation pour une période de 45 minutes (4°C), soumis à une centrifugation (13 000 rpm) pendant 45 minutes (4°C), et son contenu a été analysé par SDS-PAGE (10%). Le complexe ligand-récepteur a été détecté à l'aide d'un film Biomax (Kodak) par autoradiographie.

RÉSULTATS

SECTION I : DÉVELOPPEMENT DES SONDÉS PHOTOSENSIBLES

Synthèse de l'IRL-1620 et des analogues

Pour synthétiser l'IRL-1620 ainsi que les 5 analogues, un sel de césium a été préparé puis couplé à 5 grammes de résine de type Merrifield. Selon le test à l'acide picrique, le taux de substitution du premier acide aminé le Boc-Trp(For)OH, avec la résine, a été évalué à $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. Du total de la résine préparée, 2 g. ont servi à la synthèse de l'IRL-1620 et 0,5 g. à la synthèse de chaque analogue ce qui représente respectivement des échelles de synthèse de 1,0 mmole et 0,25 mmole. La synthèse peptidique s'est déroulée pratiquement sans difficulté mis à part quelques acides aminés qui ont nécessité plus d'un couplage afin d'obtenir un résultat négatif lors du test de Kaiser. Suite au clivage à l'acide fluorhydrique, la pureté des peptides bruts a été évaluée par CLHP analytiques et se situait entre 30 % et 40 %.

Purification et caractérisation des peptides synthétisés

Les peptides ont été purifiés par CLHP préparative suite à la déformylation du tryptophane. Chacun des produits majoritaires obtenus a été caractérisé par CLHP analytique et spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Puis les fractions contenant le produit correspondant à la masse moléculaire attendue du peptide ont été regroupés afin d'optimiser la pureté finale des composés (fig.11). Les résultats obtenus sont résumés au tableau 4.

Tableau 4 : Caractérisation des peptides synthétiques par CLHP analytique et spectrométrie de masse MALDI-TOF

<i>Peptides</i>	<i>MALDI-TOF</i> <i>masse moléculaire (Da)</i>		<i>CLHP analytique</i>
	<i>expérimentale</i>	<i>théorique</i>	<i>pureté^a (%)</i>
IRL-1620	1821	1821	90
[Bpa ⁴]IRL-1620	2001	2001	92
[Bpa ⁵]IRL-1620	1972	1972	89
[Bpa ⁷]IRL-1620	1924	1924	82
[Bpa ⁹]IRL-1620	1935	1935	80
[Bpa ¹⁰]IRL-1620	1957	1958	91

^a Après déformylation du tryptophane

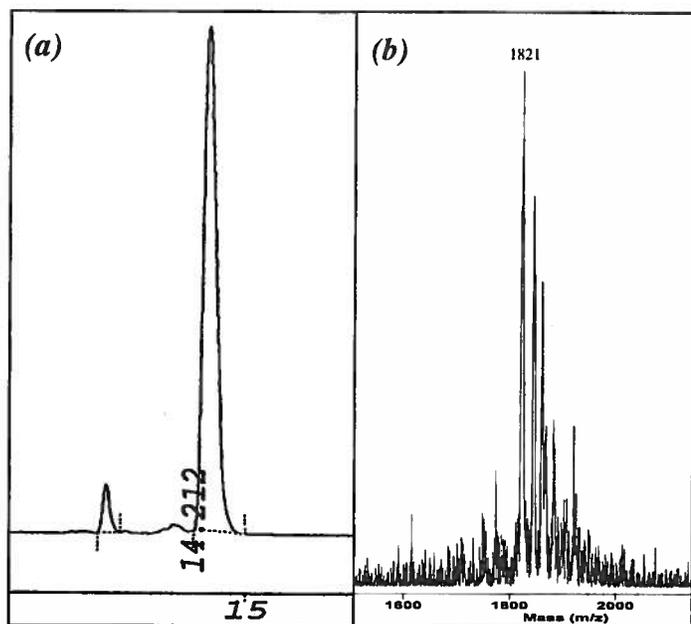


Figure 11 : Caractérisation du IRL-1620 après purification par CLHP préparative. (a) évaluation du degré de pureté et (b) identification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les pics résiduels correspondent à la masse $M^+ + Na(+23)$ et $M^+ + K(+39)$

SECTION II : TESTS PHARMACOLOGIQUES

Études pharmacologiques in vitro sur le récepteur ET_B

La réponse pharmacologique sur les récepteurs ET_B a été évaluée lors de tests de contractilité du parenchyme pulmonaire de cobaye, un tissu exprimant très majoritairement le récepteur de type B. Ainsi, l'obtention des courbes concentration-réponse de l'activité biologique des peptides photosensibles [Bpa⁴]IRL-1620, [Bpa⁵]IRL-1620 et [Bpa⁷]IRL-1620 a permis de constater que ces trois analogues sont des agonistes complets de ET_B puisqu'ils induisent sur le parenchyme pulmonaire une contraction comparable à celle induite par l'IRL-1620. Cependant, les analogues possédant le résidu Bpa aux positions 4, 5 ou 7 sont environ de 5 à 10 fois moins puissants que l'IRL-1620. Une régression non-linéaire des courbes obtenues a permis de calculer la valeur des EC₅₀ des peptides (figure 12 ; tableau 5). Le [Bpa¹⁰]IRL-1620 n'a démontré aucune activité agoniste ou antagoniste sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. Enfin, le [Bpa⁹]IRL-1620 possède une activité biologique située entre celles de [Bpa⁷]IRL-1620 et de [Bpa¹⁰]IRL-1620.

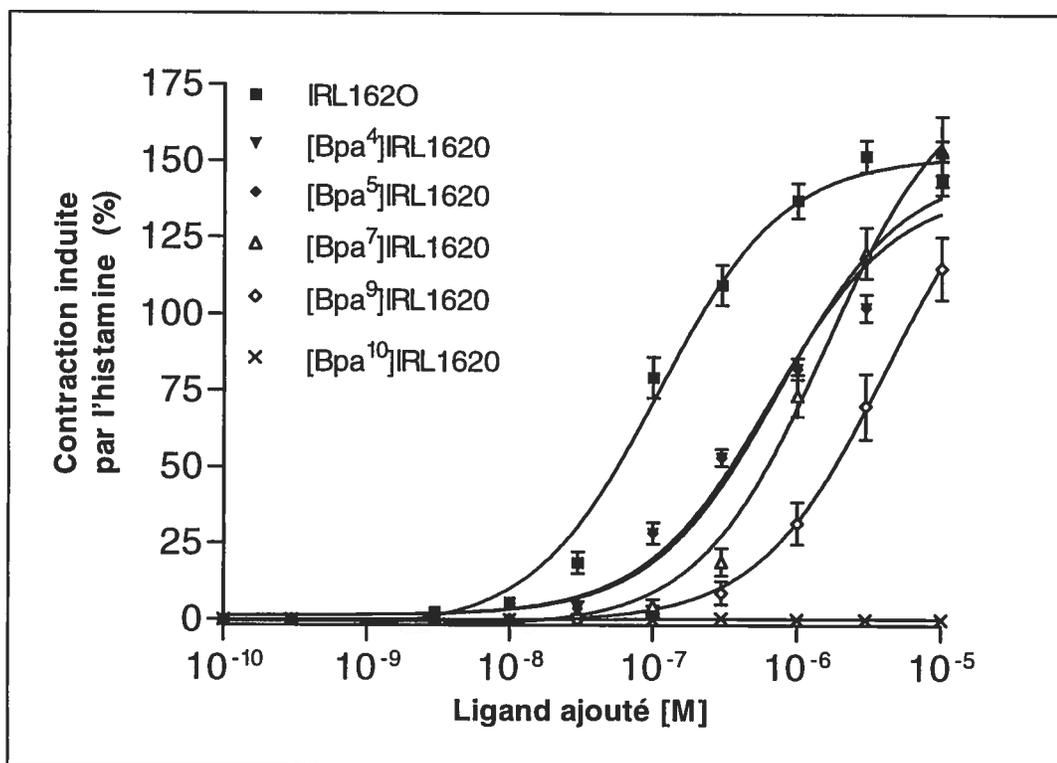


Figure 12 : Courbes concentration-réponse des peptides photosensibles obtenus sur le parenchyme pulmonaire du cobaye. La contraction par l'histamine a été induite par une concentration unique de 10^{-6} M.

Tableau 5 : Activité biologique des analogues photosensibles et de l'IRL-1620 sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.

Peptides	EC ₅₀ (ET _B)
IRL-1620	$1,09 \pm 0,25 \times 10^{-7}$ M
[Bpa ⁴]IRL-1620	$7,43 \pm 1,86 \times 10^{-7}$ M
[Bpa ⁵]IRL-1620	$6,51 \pm 1,65 \times 10^{-7}$ M
[Bpa ⁷]IRL-1620	$1,56 \pm 0,44 \times 10^{-6}$ M
[Bpa ⁹]IRL-1620	$>1 \times 10^{-6}$ M
[Bpa ¹⁰]IRL-1620	aucun effet

Études pharmacologiques in vitro sur le récepteur ET_A

L'activité des analogues photosensibles a également été vérifiée à l'aide de tests de contractilité *in vitro*, sur un tissu exprimant le récepteur de type A soit l'aorte thoracique de rat. Comme attendu, l'IRL-1620 ainsi que ses analogues n'ont pas démontré d'activité agoniste ou antagoniste. La substitution d'un acide aminé par le groupement photosensible ne semble pas modifier la sélectivité des analogues pour le récepteur ET_B.

Iodation des peptides à l'iodure de sodium (NaI)

Le photomarquage implique l'utilisation de radioligand afin de rapporter, sur gel, la position du récepteur et de ses fragments. Le marquage à l'iode se fait sur la chaîne latérale de la tyrosine. Cependant, l'introduction d'un (mono-iodation) ou de deux atomes d'iode (di-iodation) sur le ligand peut entraîner une perte d'activité de celui-ci en modifiant la densité électronique locale et ajouter une contrainte stérique supplémentaire. Afin de vérifier l'impact de l'introduction de l'iode sur l'activité des sondes photosensibles synthétisées, il a été nécessaire de marquer les peptides et de revérifier expérimentalement leur activité et leur sélectivité pour le récepteur de type B. Après quelques essais à petite échelle, le protocole d'iodation utilisant le NaI et la chloramine-T a été appliqué à de plus grandes quantités (≈ 200 mg). Ainsi, les formes mono- et di-iodées de l'IRL-1620, [Bpa⁴]IRL-1620, [Bpa⁵]IRL-1620, [Bpa⁷]IRL-1620, [Bpa⁹]IRL-1620 et [Bpa¹⁰]IRL-1620 ont été produites, isolées par CLHP préparative et caractérisées par CLHP analytique et spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (fig.14). La chloramine-T étant un puissant oxydant, elle favorise la formation de la forme di-iodée au détriment de la forme mono-iodée. Il a donc été nécessaire d'optimiser les conditions d'iodation afin de favoriser la mono-iodation (fig.13) mais également afin de prévenir l'oxydation du tryptophane (Karonen, 1990). En effet, ces réactions indésirables ont considérablement diminué nos rendements car seulement quelques milligrammes ont pu être obtenus (≈ 20 mg). Les analogues peptidiques mono- et di-iodés bruts ont ensuite été

purifiés par CLHP. De 1 à 5 mg de chacun des analogues ont été obtenus avec une pureté supérieure à 85% de façon à pouvoir effectuer les tests pharmacologiques de ces peptides.

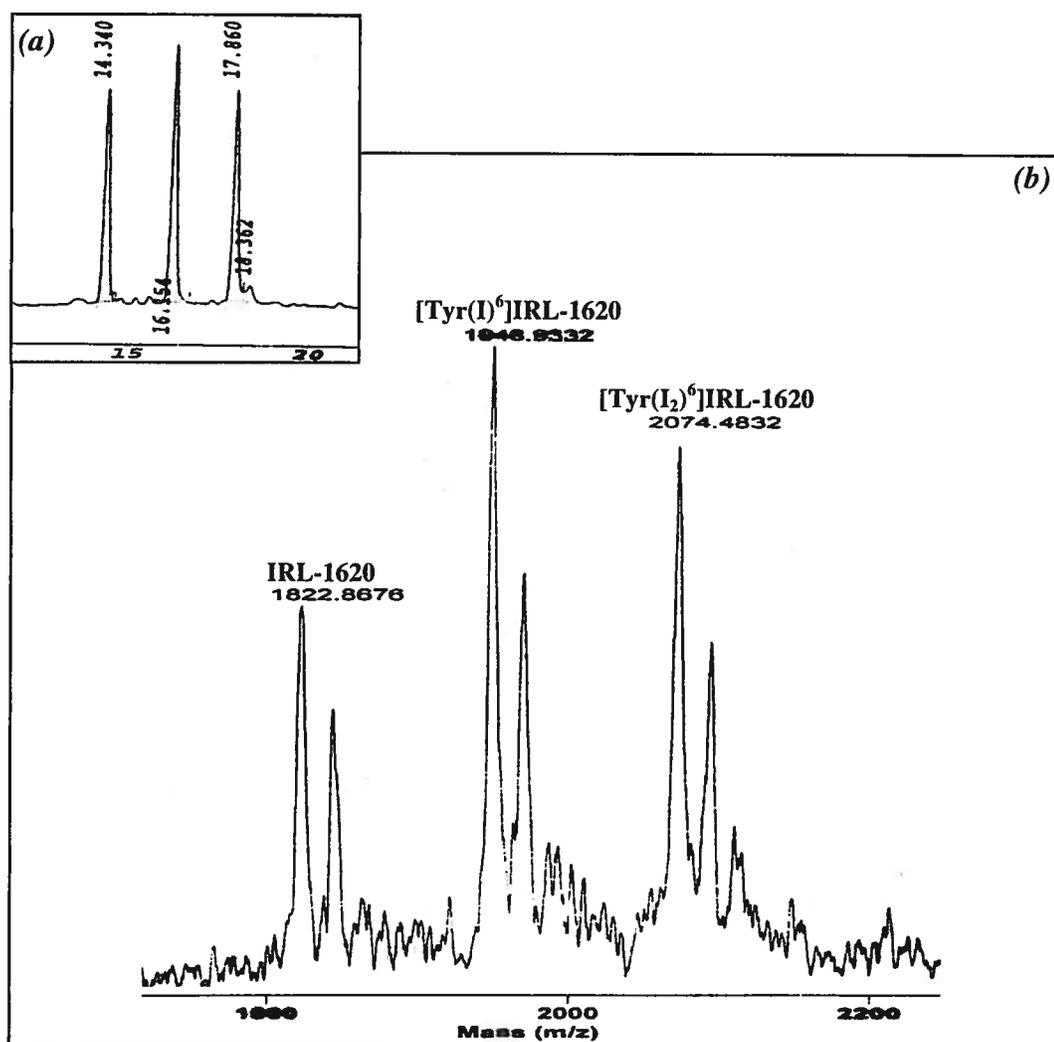


Figure 13 : Mono-iodation du peptide IRL-1620. (a) analyse du produit de la réaction après iodation à l'aide de la chloramine-T et NaI par CLHP analytique. (b) Identification des masses moléculaires de l'IRL-1620 sous forme non-iodée, mono-iodée et di-iodée. Les pics résiduels correspondent à la masse $M^+ + Na(+23)$.

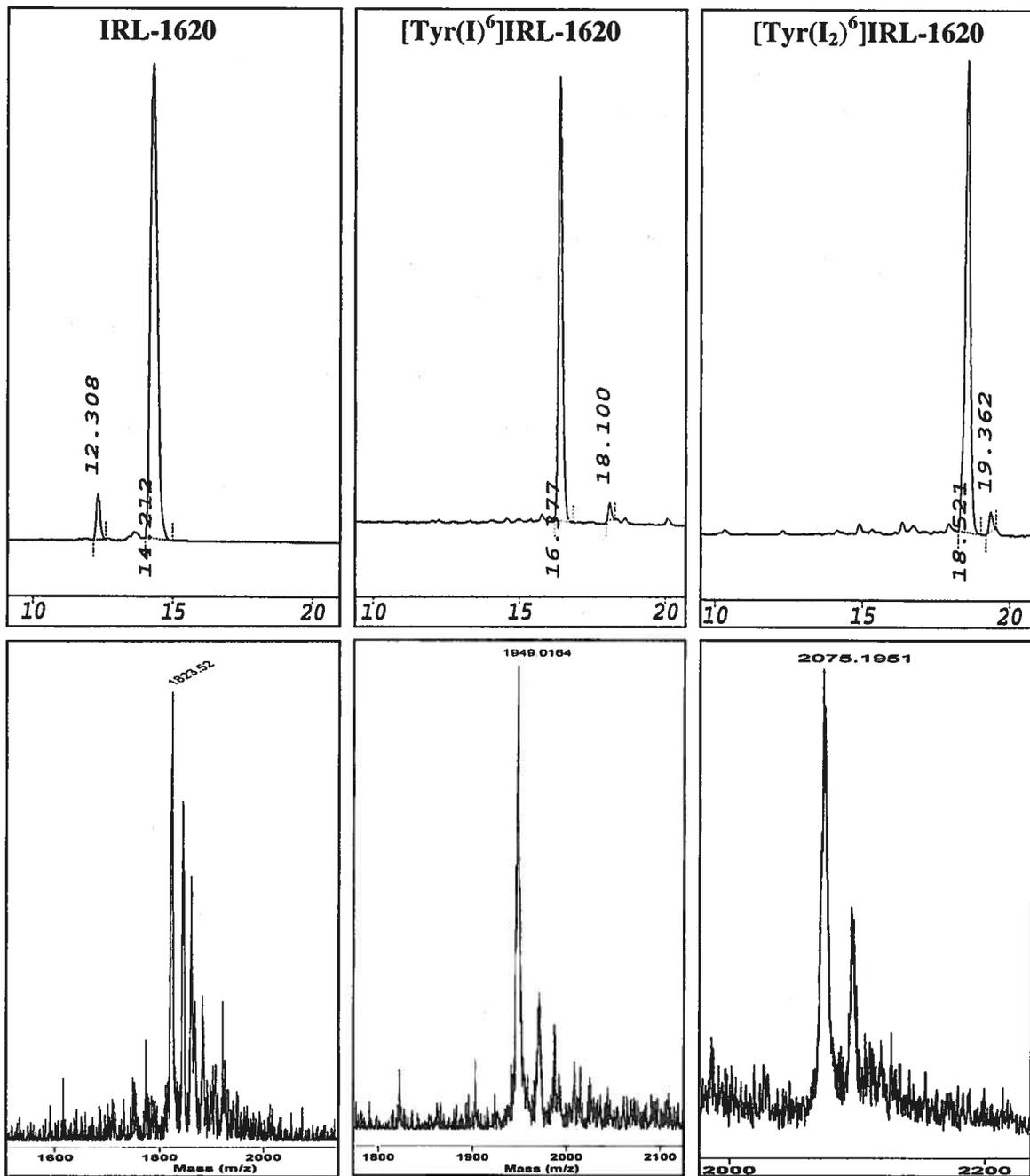


Figure 14 : Iodation et purification par CLHP préparative de l'IRL-1620 marqué. Analyse par CLHP analytique et spectrométrie de masse MALDI-TOF des fractions obtenues après purification des produits marqués.

Études pharmacologiques in vitro des peptides iodés

Étant donné que l'activité des peptides peut être modifiée par la présence de l'iode sur la tyrosine, les tests pharmacologiques ont été repris afin de comparer l'activité des analogues iodés et non-iodés. L'introduction d'un atome d'iode sur la tyrosine a eu un impact majeur sur l'activité du [Bpa⁷]IRL-1620 et du [Bpa⁹]IRL-1620. En effet, la mono-iodation a entraîné la perte complète de leur activité agoniste sur le récepteur ET_B et ceux-ci ne possèdent pas non plus de pouvoir antagoniste. De façon un peu surprenante, l'EC₅₀ de [Bpa⁴]IRL-1620 et de [Bpa⁵]IRL-1620 n'a subi qu'une légère diminution suite à l'iodation des peptides (tableau 6). Par contre, la contraction maximum représente environ 50% de la contraction induite par l'histamine (fig.15). Ces deux analogues sont donc des agonistes partiels de l'IRL-1620.

À première vue, l'iodation de la tyrosine semble défavorable à la liaison des peptides au récepteur B. Cependant, une régression non-linéaire de la réponse en fonction de la concentration permet de constater que le EC₅₀ de [Tyr(I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620 et celui de [Tyr(I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 sont identiques à celui calculé pour [Tyr(I)⁶]IRL-1620 (tableau 6). Tous les analogues et l'IRL-1620 sous forme di-iodée sont inactifs sur le récepteur ET_B et le récepteur ET_A.

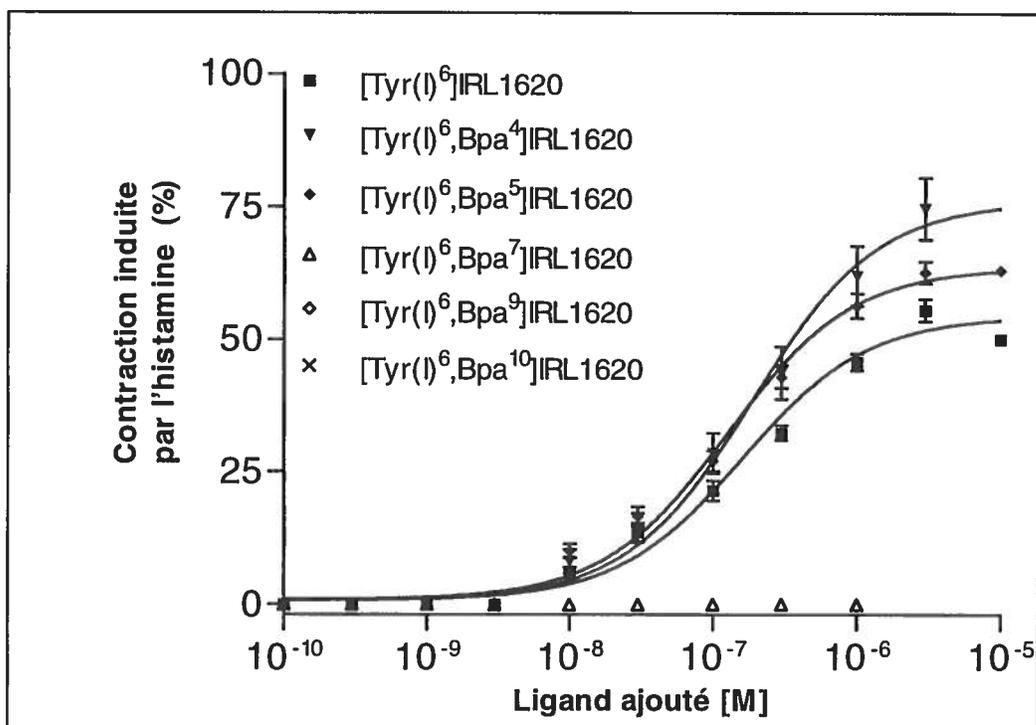


Figure 15 : Courbes concentration-réponse des peptides mono-iodés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. La contraction par l'histamine a été induite par une concentration de 10^{-6} M.

Tableau 6 : Activité biologique des analogues photosensibles mono-iodés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye.

Peptides synthétisés	EC ₅₀ (ET _B)
[Tyr(I) ⁶]IRL-1620	$1,62 \pm 0,35 \times 10^{-7}$ M
[Tyr(I) ⁶ ,Bpa ⁴]IRL-1620	$1,89 \pm 0,69 \times 10^{-7}$ M
[Tyr(I) ⁶ ,Bpa ⁵]IRL-1620	$1,27 \pm 0,26 \times 10^{-7}$ M
[Tyr(I) ⁶ ,Bpa ⁷]IRL-1620	nul
[Tyr(I) ⁶ ,Bpa ⁹]IRL-1620	nul
[Tyr(I) ⁶ ,Bpa ¹⁰]IRL-1620	nul

SECTION III : TESTS DE LIAISON

Iodation des peptides à ^{125}I

Suite au marquage à l'iode-125 des dérivés de l'IRL-1620 par la chloramine-T, ceux-ci ont été purifiés par CLHP analytique. La figure 16 est un exemple du profil d'élution obtenu avec les peptides marqués à ^{125}I . Sur cette figure, le pic de radioactivité de la fraction 47 représente le peptide mono-iodé. Ainsi, le peptide $[\text{Tyr}(^{125}\text{I})^6, \text{Bpa}^4]\text{IRL-1620}$ éluerait à un pourcentage de 54% d'ACN lors d'un gradient de 30 à 60% en 30 minutes. Le rendement de l'incorporation de l'iode radioactif (radioactivité incorporée / radioactivité totale utilisée) est inférieur à 1%.

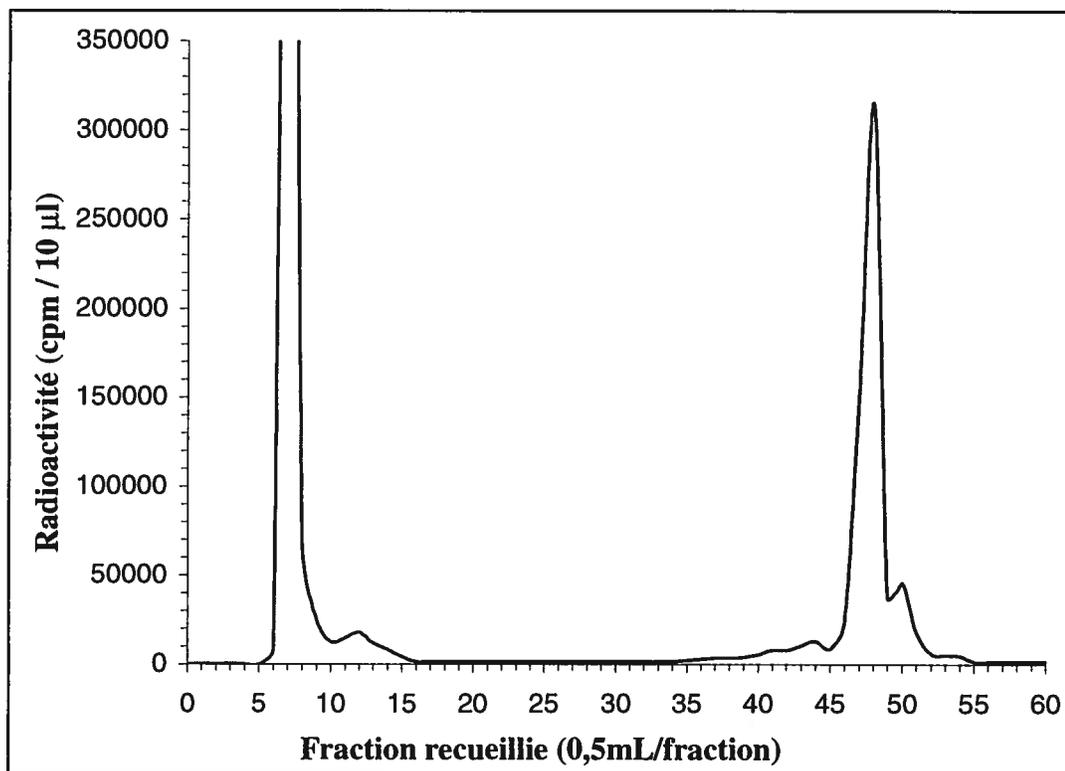


Figure 16 : Profil d'élution du $[\text{Tyr}(^{125}\text{I})^6, \text{Bpa}^4]\text{IRL-1620}$ sur CLHP analytique suite à la réaction d'iodation. L'élution est obtenue au moyen d'un gradient linéaire de 30-70% ACN/ $\text{H}_2\text{O}^*\text{TFA}$ (0,05%) à raison de 1%/minute, à un débit de 1mL /minute. Les fractions ont été recueillies à toutes les 30 secondes (0,5 mL).

Études de saturation

La figure 17 montre la courbe de saturation typique des sites de liaison de $[\text{Tyr}^{(125)\text{I}}]^6\text{IRL-1620}$ sur le récepteur ET_B surexprimé dans des cellules CHO-K1. Nous observons que la liaison du peptide $[\text{Tyr}^{(125)\text{I}}]^6\text{IRL-1620}$ augmente en fonction des concentrations croissantes du radioligand pour atteindre un plateau correspondant au maximum des sites de liaison. Les résultats révèlent une liaison qui est saturable (B_{max} de 3500 ± 660 cpm / μg de protéines) et de haute affinité (EC_{50} de 58 ± 21 pM). La liaison non spécifique représente environ le tiers de la liaison totale. Chaque point des courbes a été obtenu en duplicata et l'expérience a été réalisée un minimum de 3 fois.

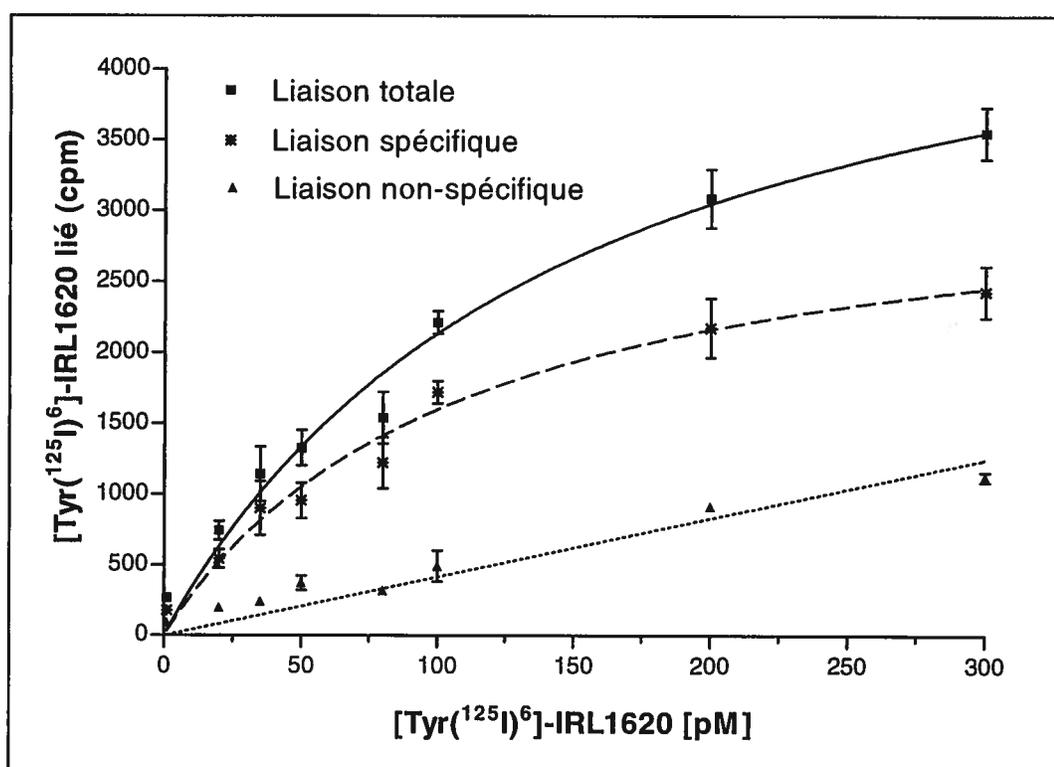


Figure 17 : Courbe de saturation de $[\text{Tyr}^{(125)\text{I}}]^6\text{IRL-1620}$ sur le récepteur hET_B natif transfecté dans des cellules CHO-K1. Des concentrations croissantes de radioligand ont été incubées dans des plaques à 12 puits pendant 1 heure à 4°C en présence de cellules ($13\mu\text{g}$ de protéines / puits) surexprimant le récepteur ET_B . La liaison non-spécifique a été déterminée en présence de $1\mu\text{M}$ d'IRL-1620.

Études de compétition

L'affinité de [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 a été comparée à celle de [Tyr(¹²⁵I)⁶]IRL-1620 pour le récepteur ET_B. Une quantité fixe de radioligand (3×10^{-10} M) a été incubée en compétition avec des quantités croissantes (entre 10^{-12} M et 10^{-6} M) d'endothéline-1 (courbe hétérologue) et d'IRL-1620 (courbe homologue) (fig.18). Le tableau 7 nous indique le IC₅₀ des ligands c'est-à-dire la concentration d'analogue requise pour inhiber de 50% la liaison de la sonde au récepteur : l'endothéline déplace 50% des radioligands à une concentration de 1nM. L'IRL-1620 déplace également 50% de la liaison de [Tyr(¹²⁵I)⁶]IRL-1620 à une concentration similaire soit de $2,34 \pm 0,52$ nM. Cependant, une plus grande quantité d'IRL-1620 est nécessaire pour déplacer [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 soit $5,19 \pm 1,08 \times 10^{-8}$ M. Les valeurs IC₅₀ illustrent la puissance relative de l'analogue par rapport à l'IRL-1620 original.

Tableau 7 : Affinité de la liaison des radioligands sur le récepteur hET_B natif.

Peptides	IC ₅₀ ET-1 (M)	IC ₅₀ IRL-1620 (M)
[Tyr(¹²⁵ I) ⁶]IRL-1620	$0,95 \pm 0,14 \times 10^{-9}$	$2,34 \pm 0,52 \times 10^{-9}$
[Tyr(¹²⁵ I) ⁶ ,[Bpa ⁵]IRL-1620	$1,82 \pm 0,53 \times 10^{-9}$	$5,19 \pm 1,08 \times 10^{-8}$

IC₅₀ : Concentration en compétiteur froid qui déplace 50% de la liaison du ligand marqué.

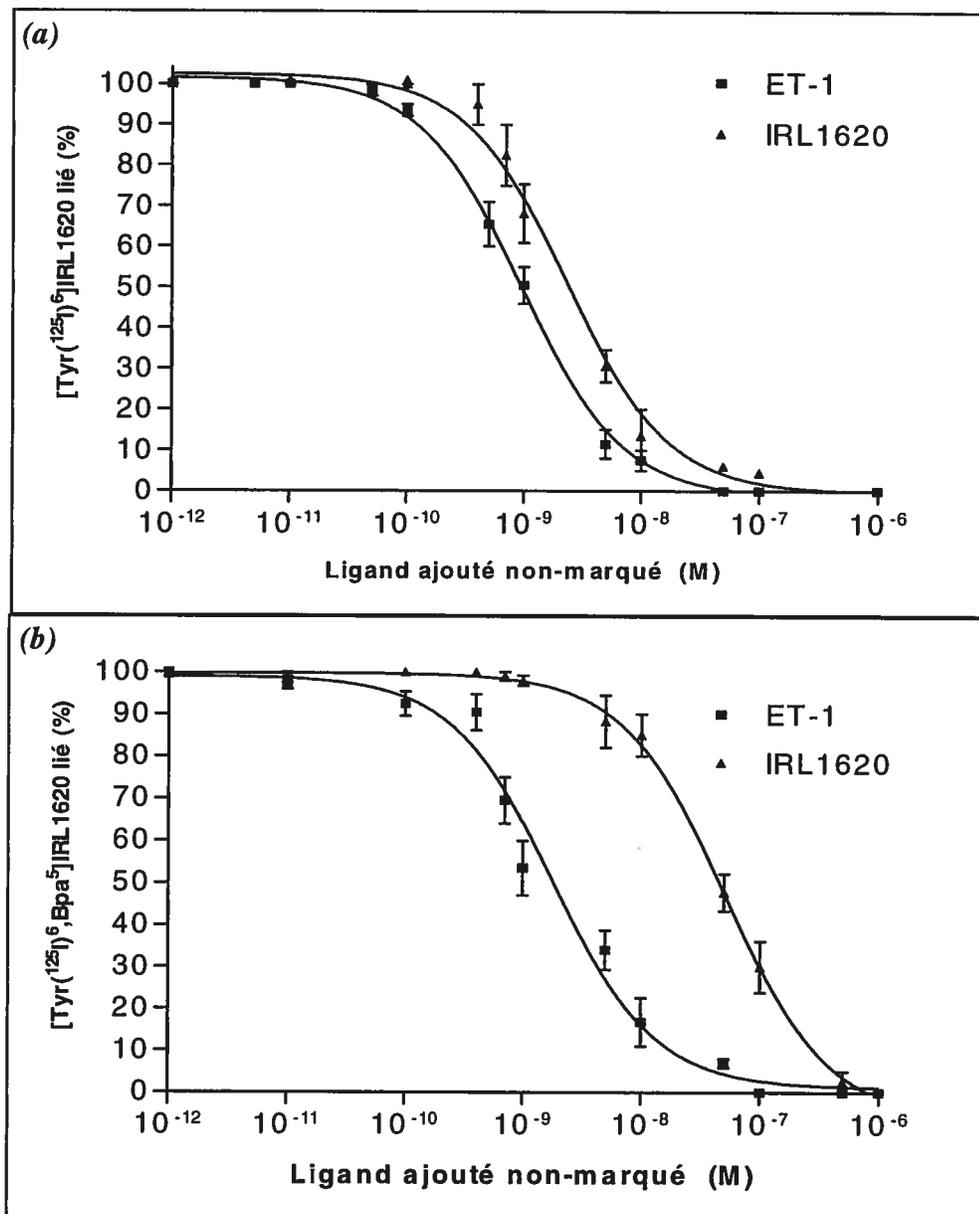


Figure 18 : Courbe de compétition de la liaison, homologue et hétérologue de (a) $[Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620$ et de (b) $[Tyr(^{125}I)^6,Bpa^5]IRL-1620$ sur le récepteur hETB natif. Des concentrations croissantes d'endothéline-1 ou d'IRL-1620 non-radioactif ont été incubées à 4°C pour 24 heures en présence de $3 \times 10^{-10}M$ de radioligand dans des plaques à 12 puits contenant les cellules surexprimant le récepteur ET_B . Le pourcentage de la liaison est exprimé par rapport à la liaison maximale obtenue avec le ^{125}I -ligand.

Photomarquage du récepteur ET_B

L'analyse par gel de polyacrylamide à 10% a permis d'identifier deux protéines photomarkées par [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 (fig. 19a). Un premier complexe ligand-récepteur de ≈49 kDa et un second de ≈37 kDa. La présence d'un excès d'endothéline ou d'IRL-1620 a aboli complètement le photomarquage de ces deux protéines (fig. 19 b et c). Le complexe ligand-récepteur de ≈49 kDa correspond à la masse calculée (47 kDa) à partir de la séquence théorique du récepteur ET_B. De plus, les analyses par immunobuvardage ont confirmés la présence du récepteur ET_B avec un poids moléculaire de ≈47 kDa (fig. 19d). Ainsi, le complexe majeur ligand-récepteur de ≈49 kDa correspond à [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 — ET_B. Il semblerait que le complexe de ≈37 kDa soit le récepteur ET_B tronqué indiquant la présence d'une activité protéolytique.

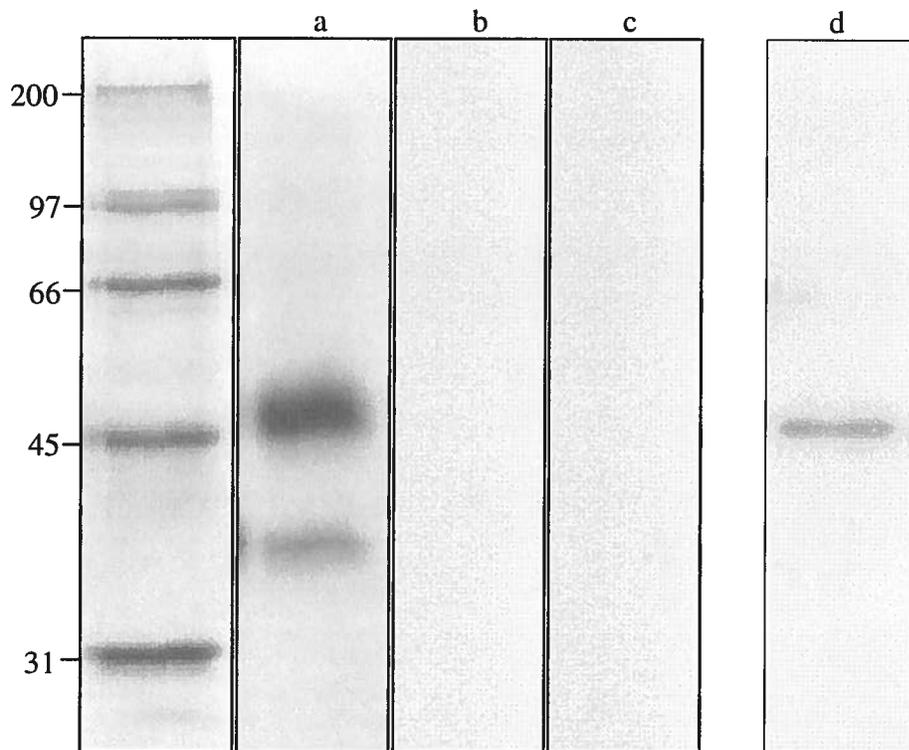


Figure 19 : Photomarquage et immunobuvardage du récepteur ET_B. (a) Photomarquage du récepteur ET_B à l'aide de [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 seul (b) en présence d'un excès d'ET-1 (c) en présence d'un excès d'IRL-1620. analyse par immunobuvardage de tye werstern blot du récepteur ET_B.

DISCUSSION

Développement d'analogues photoactivables de IRL-1620

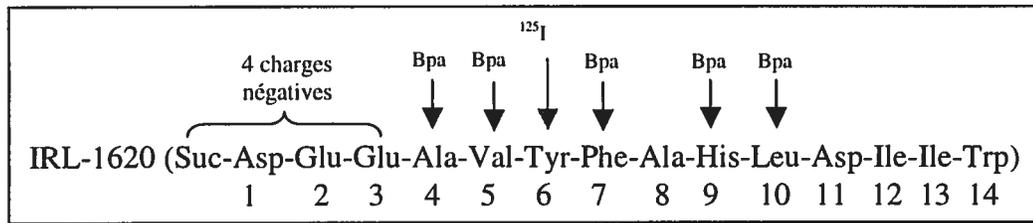
Six peptides, soit l'IRL-1620 et cinq analogues photosensibles, ont été synthétisés sur phase solide en utilisant la chimie Boc. Pour l'étape d'assemblage de la chaîne peptidique, un taux de substitution élevé aurait pu entraîner des interactions entre les peptides ou les chaînes latérales des acides aminés ce qui aurait pu nuire considérablement aux divers couplages. Le taux de substitution utilisé de 0,5 mmol/g a probablement aidé à obtenir les analogues photosensibles avec des rendements satisfaisants. Les peptides ont été par la suite clivés à l'acide fluorhydrique, déformylés, purifiés et analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF afin d'identifier leur poids moléculaire respectif. Ainsi, le poids moléculaire des six peptides a été confirmé soit celui de l'IRL-1620 [1821 Da], de [Bpa⁴]IRL-1620 [2001 Da], de [Bpa⁵]IRL-1620 [1973 Da], de [Bpa⁷]IRL-1620 [1925 Da], [Bpa⁹]IRL-1620 [1935 Da] et de [Bpa¹⁰]IRL-1620 [1959 Da]. L'analyse par spectrométrie de masse a également confirmé l'introduction du groupement photosensible, le départ des groupements protecteurs des chaînes latérales, l'absence de réaction secondaire, et la présence du groupement succinoyl en N-terminal de tous les peptides. La purification à l'aide d'une colonne phase inverse C18 par CLHP préparative a permis d'obtenir quelques milligrammes de chaque peptide, avec un taux de pureté avoisinant les 90%, nécessaires pour les tests *in vitro*.

En substituant un acide aminé de l'IRL-1620 par un groupement photosensible (Bpa), on induit une contrainte structurale et on influence vraisemblablement les propriétés pharmacologiques de ce peptide. C'est pourquoi, le choix du lieu d'introduction du Bpa a été minutieusement étudié avant la synthèse des analogues, afin de conserver l'activité biologique et de préserver la sélectivité pour le récepteur ET_B. Plusieurs études de structure-activité de l'IRL-1620 ont permis de nous orienter dans le choix des positions pour l'incorporation du Bpa. En effet, un Ala-scan a démontré que la région Suc-Asp¹-Glu²-Glu³ occupe un rôle important et ne peut être modifiée. Il semblerait que les quatre groupements carboxyliques de ce segment soient directement impliqués dans la sélectivité

de l'IRL-1620 pour ET_B. De plus, le remplacement de Asp¹¹ par un acide non chargé comme Gly a pour effet de modifier la structure de l'IRL-1620 et de diminuer de 10 fois sa sélectivité envers ET_B (Katahira *et al.*, 1998). C'est pourquoi nous avons préféré conserver ces acides aminés. Une série d'analogues non-succinylés et succinylés ont démontré que ce groupement est en grande partie responsable de la sélectivité de l'IRL-1620 pour ET_B. En effet, l'analogue IRL-1961 qui est identique en tout point à l'IRL-1620, mais sans le groupement succinyle conserve une certaine activité envers le récepteur mais est 100 fois moins sélectif (Takai *et al.* 1992). De plus, des analyses ont démontré que l'ajout d'acides aminés en N-terminal de l'IRL-1620 ou une délétion du côté C-terminal résulte en une diminution graduelle de la liaison avec ET_B. C'est pourquoi nous avons choisi la substitution du Bpa plutôt que son addition à la chaîne peptidique. Enfin, Tyr⁶ ne peut être pris en considération car il est essentiel au radio-marquage. Il reste donc Ala⁴, Val⁵, Phe⁷, Ala⁸, His⁹, Leu¹⁰, Ile¹², Ile¹³, Trp¹⁴ qui peuvent être substitués. Afin de déterminer les acides aminés à substituer par le Bpa, nous nous sommes inspirés des études réalisées avec ET-1.

L'Ala-scan de l'endothéline a souligné le rôle clé des résidus Phe¹⁴, Leu¹⁷, Trp²¹ dans l'activité de ET-1 (Tam *et al.*, 1994). La substitution de l'un de ces trois résidus par Ala a réduit l'affinité de la liaison (<2% ET). Phe¹⁴, Leu¹⁷, Trp²¹ semblent importants pour le contact avec le récepteur contrairement à la substitution de Asp⁸ ou Leu¹⁷ qui semble diminuer l'activation du récepteur tout en conservant une bonne affinité (>90%). La modification de Val¹², Asp¹⁸ ou Ile²⁰ résulte en une diminution partielle de l'activité de ET-1 (86 à 50 %) de la puissance (Tam *et al.*, 1994). Ile²⁰ et Trp²¹ de ET-1 sont intolérants à la substitution avec Ala tandis que Glu¹⁰, Phe¹⁴, Leu¹⁷ et Asp¹⁸ sont connus pour jouer un rôle plus important dans l'activation que dans la liaison (ET_A). Ainsi il semble que Val¹², Phe¹⁴, Leu¹⁷, Ile²⁰ et Trp²¹ de ET-1, qui correspondent respectivement aux positions Val⁵, Phe⁷, Leu¹⁰, Ile¹³ et Trp¹⁴ de l'IRL-1620, soient directement impliqués dans la liaison avec le récepteur et ne supportent pas d'importants changements. Ce phénomène les rend particulièrement intéressants pour le photomarquage d'autant plus, qu'ils présentent les mêmes caractéristiques que le Bpa, soit d'être assez volumineux et de nature hydrophobe. Cependant, nous avons préféré éviter de substituer Trp¹⁴ qui est en

C-terminal de l'IRL-1620 puisqu'une étude a démontré que ce résidu est nécessaire pour la stabilisation avec le récepteur ET_B (Kimura *et al.*, 1988). De plus, notre laboratoire a déjà démontré que la charge de la chaîne latérale de His¹⁶ de ET-1 peut être retirée sans perte complète d'activité. Devant ces faits, nous avons substitué Ala⁴, Val⁵, Phe⁷, His⁹ et Leu¹⁰ de l'IRL-1620 par le Bpa.



Structure de l'IRL-1620 et des analogues synthétiques.

Évaluation de l'impact du groupement Bpa sur les propriétés pharmacologiques

À l'aide d'un système *in vitro*, on peut reconstituer l'activité biologique et évaluer l'impact de chacune des modifications apportées aux analogues photosensibles, en les comparant à l'IRL-1620. Des bioessais ont été réalisés pour effectuer l'évaluation pharmacologique des analogues sur deux modèles biologiques différents, soit l'aorte thoracique de rat (dénudée de son endothélium) et le parenchyme pulmonaire de cobaye. L'aorte thoracique de rat exprime uniquement le récepteur ET_A et le parenchyme pulmonaire de cobaye exprime très majoritairement le récepteur ET_B. Ces deux modèles sont fréquemment utilisés *in vitro* pour démontrer l'activité biologique d'analogues de l'endothéline sur les récepteurs ET_A et ET_B. Dans les deux cas, la formation du complexe agoniste-récepteur induit une forte contraction du tissu.

Dans un premier temps, l'IRL-1620 ainsi que les cinq sondes photosensibles ont été testées sur le modèle ET_B (parenchyme pulmonaire du cobaye). Quatre des cinq sondes [Bpa⁴, Bpa⁵, Bpa⁷ et Bpa⁹] ont provoqué une contraction du parenchyme. Les EC₅₀ obtenues expérimentalement varient selon la position du Bpa dans la structure des analogues peptidiques: [Bpa⁴]IRL-1620 [7,43 x 10⁻⁷ M], [Bpa⁵]IRL-1620 [6,51 x 10⁻⁷ M], [Bpa⁷]IRL-1620 [1,56 x 10⁻⁶ M] et [Bpa⁹]IRL-1620 [EC₅₀ > 1 x 10⁻⁶ M]. Ces résultats confirment que la région N-terminal 1-7 ainsi que les deux ponts disulfures de ET-1 ne sont pas essentiels pour la liaison avec ET_B. L'IRL-1620 a induit une forte contraction et possède un plus petit EC₅₀ [1,09 x 10⁻⁷ M] que les sondes photosensibles développées. En effet, les sondes sont moins puissantes mais tout aussi efficaces que IRL-1620 à l'exception du [Bpa⁹]IRL-1620. Le [Bpa¹⁰]IRL-1620 n'a induit aucune activité biologique sur le récepteur ET_B. De plus, l'ajout d'endothéline (1x10⁻⁶M) au milieu a induit une forte contraction du tissu ce qui démontre que [Bpa¹⁰]IRL-1620 n'a pas les caractéristiques d'un antagoniste puisque aucune diminution de la contraction a été enregistrée. Ainsi, la substitution de Leu¹⁰ par le Bpa a aboli complètement l'activité biologique. La modification apportée par le Bpa résulte en une perte d'activité croissante dans l'ordre d'importance suivant: Val⁵ < Ala⁴ ≅ Phe⁷ << His⁹ <<< Leu¹⁰. La région His⁹-Leu¹⁰ de l'IRL-1620 semble être plus sensible aux modifications apportées par le Bpa que les résidus situés entre les positions 4-7 inclusivement. Notre laboratoire avait démontré que His⁹ pouvait moduler l'activité biologique sur ET_B. En effet, His⁹ permettrait l'orientation correcte du segment C-terminal d'analogues linéaires-tronqués de ET-1 sur ET_B. Les résultats obtenus avec [Bpa⁹]IRL-1620 démontrent une perte d'activité ce qui correspond aux résultats observés dans le passé (Forget *et al.*, 1995). La perte d'activité de [Bpa¹⁰]IRL-1620 n'est pas expliquée à ce stade-ci. Cependant, la modélisation de fragments linéaires C-terminaux de ET-1 a montré que le tryptophane-14 forme un repliement qui vient interagir avec Leu¹⁰ ce qui permettrait d'activer le récepteur ET_B (Forget *et al.*, 1995 ; Forget *et al.*, 1996). La substitution de Leu¹⁰ pourrait de même avoir compromis cette interaction dans la structure de l'IRL-1620. Ainsi, l'activité biologique dépendrait d'une interaction hydrophobe entre ET-1 et ses récepteurs. Cependant, les résultats obtenus par Atkins en 1995 ont démontré que l'IRL-1620 en solution n'adopterait pas de conformation précise (Atkins *et al.*, 1995). Toutefois, il est possible

que l'IRL-1620 (et les sondes photosensibles) n'adoptent une structure qu'en présence du récepteur membranaire.

Dans un second temps, les tests pharmacologiques à l'aide de l'aorte thoracique de rat ont permis de vérifier l'activité des sondes sur le récepteur ET_A. L'IRL-1620 ainsi que les cinq sondes photosensibles développées n'ont pas induit de contraction de l'aorte pour des concentrations variant de 10⁻¹⁰ M à 10⁻⁵ M. De plus, ces peptides n'ont pas démontré un pouvoir antagoniste sur le récepteur ET_A. Ces résultats suggèrent fortement que l'IRL-1620 et les sondes ont conservé leur activité ainsi que leur sélectivité pour le récepteur ET_B. Des études de structure-activité ont révélé que le récepteur ET_A nécessite un ligand avec une conformation plus rigide que ET_B pour se lier. Les deux ponts disulfures semblent essentiels pour une affinité élevée avec ET_A tandis que ET_B nécessiterait plutôt un ligand linéaire et souple.

Évaluation de l'impact de l'iodation de la tyrosine sur les propriétés pharmacologiques des sondes photosensibles

La technique de photomarquage implique l'utilisation de sondes radio-marquées. Dans cette étude, l'iode-125 a été choisi comme molécule traceur. Tout d'abord, l'IRL-1620 et les cinq sondes photosensibles ont été mono- et di-iodées avec de l'iodure de sodium (non-radioactif) et purifiées par CLHP afin de récupérer une quantité (≈mg) suffisante de matériel nécessaire pour évaluer, à nouveau, leurs activités biologiques.

L'analyse pharmacologique des sondes mono-iodées [Tyr(I)⁶-sondes] sur le parenchyme pulmonaire de cobaye (modèle ET_B) a permis de constater une perte complète d'activité de [Tyr(I)⁶,Bpa⁷]IRL-1620 et de [Tyr(I)⁶,Bpa⁹]IRL-1620. La sonde [Bpa¹⁰]IRL-1620 inactive s'est également montrée être inactive sous forme mono-iodée. Étonnamment, la mono-iodation de [Bpa⁴]IRL-1620 et de [Bpa⁵]IRL-1620 a permis de retrouver une puissance (EC₅₀) identique à celle de l'IRL-1620 qui, sous forme mono-iodée, a demeuré inchangée. En effet, le [Tyr(I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620 possède un EC₅₀ de 1,89 x 10⁻⁷ M,

[Tyr(I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 un EC₅₀ de 1,27 x10⁻⁷ M et [Tyr(I)⁶]IRL-1620 un EC₅₀ de 1,62 x 10⁻⁷ M. Il est difficile d'expliquer ces observations, cependant, il est possible de penser que la présence d'un atome d'iode sur la tyrosine favorise la forme tyrosinate augmentant ainsi la possibilité que le l'oxygène participe à une liaison hydrogène avec le récepteur ce qui pourrait compenser pour l'encombrement stérique provoquer par le groupement photosensible «Bpa» voisin. Par contre, l'iodation semble avoir un effet majeur sur la contraction induite par le Bpa⁴(IRL-1620) et le Bpa⁵(IRL-1620) ainsi que par l'IRL-1620. Les peptides mono-iodés sont moins efficaces: la contraction induite ne représente qu'environ 50% de la force de contraction observée avec l'IRL-1620 sous forme non-iodée (fig. 12 et fig. 14). De plus, tous les peptides sous forme di-iodée sont inactifs. L'iode est un atome volumineux, riche en électrons, ce qui doit induire une contrainte conformationnelle majeure et nuire à l'activation du récepteur ET_B. Ce phénomène peut expliquer l'absence d'activité observée chez tous les analogues di-iodés.

Les sondes sous forme mono- et di-iodées ont été également testées sur le modèle ET_A. Comme attendu, aucun peptide n'a démontré une activité agoniste ou antagoniste. La présence d'un atome d'iode ne semble pas influencer la sélectivité du [Bpa⁴]IRL-1620 et du [Bpa⁵]IRL-1620 mais il y a un impact sur leur activité. Il est à noter que la forme mono-iodée est suffisante pour la réalisation du photomarquage et que l'étude pharmacologique de la forme di-iodée ne visait qu'à établir des informations nouvelles concernant la relation de structure à activité.

Les tests pharmacologiques ont permis d'identifier deux sondes photosensibles soit le [Tyr(I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620 et le [Tyr(I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 comme outils potentiels pour le photomarquage du récepteur ET_B. Ces deux sondes photosensibles sont des agonistes partiels et sélectifs du récepteur ET_B.

Caractérisation de la liaison des sondes photosensibles pour le récepteur ET_B.

Deux des cinq sondes [Bpa⁴]IRL-1620 et le [Bpa⁵]IRL-1620 semblent avoir les caractéristiques nécessaires pour le photomarquage de ET_B. Ces deux sondes ont été marquées à l'iode-125 à l'aide de la chloramine-T. Seule la forme mono-iodée a été isolée et caractérisée via des tests de liaison des cellules CHO surexprimant le récepteur hET_B. Le rendement d'incorporation de l'iode obtenu (1%) est légèrement inférieur à celui retrouvé par Watakabe, soit de 3%, pour des peptides similaires (Watakabe *et al.*, 1992). L'une des explications apportées est la diminution de la quantité de chloramine-T utilisée pour amorcer la réaction. En effet, la mise au point de la technique de marquage sur CLHP analytique avait démontré qu'il était préférable d'utiliser l'iode en excès plutôt que la chloramine-T. De plus, l'étape de développement avait démontré que la réaction était complète après 30 secondes et non pas une 1 minute, tel que décrit par Watakabe. Ainsi, en diminuant le temps alloué à la réaction, nous évitons la formation de réactions secondaires. Cela a entraîné une perte dans le rendement, mais a assuré le maintien de l'intégrité du peptide, plus particulièrement du résidu tryptophane sensible à l'oxydation.

Pour déterminer si les deux sondes photosensibles peuvent être utilisées pour la caractérisation du site de liaison de ET_B, il est primordial de démontrer que le site occupé par les sondes est le même que celui par l'endothéline. Dans un premier temps, il a été nécessaire de déterminer la liaison spécifique maximale du peptide (B_{max}), et par la suite de réaliser des tests de déplacement entre ligands marqués (chauds) et ligands non-marqués (froids). Les deux peptides photosensibles retenus pour ces tests ont été le [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 et le [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620 tandis que le [Tyr(¹²⁵I)⁶]IRL-1620 a servi de contrôle.

Tests de saturation

Le test de saturation ne révèle pas d'information utilisée directement pour le photomarquage. Cependant, il permet d'établir la densité de récepteurs exprimés à la surface des cellules et surtout de fixer la concentration nécessaire du ligand chaud (marqué ^{125}I) à utiliser pour réaliser les tests de compétition. En effet, la concentration du ligand chaud ne doit pas saturer l'ensemble des récepteurs ET_B . Ceci entraînerait une valeur erronée du IC_{50} puisque l'équilibre serait déplacé en faveur du ligand chaud. Afin de déterminer la quantité du ligand chaud à utiliser, les cellules CHO-K1 transfectées avec le récepteur hET_B ont été exposées à des concentrations croissantes de $[(^{125}\text{I})^6]\text{IRL-1620}$ (fig.17). Après soustraction de la liaison non spécifique, le Bmax a été évalué à 0,12 pmol/mg protéine (Bmax de 3500 cpm / 13 μg protéine par puits) pour ce type cellulaire. Cette valeur se rapproche à celle retrouvée dans la littérature soit 0,9 à 62,3 pmol/mg pour le même type de cellule (Watakabe *et al.*, 1992 ; Nambi *et al.*, 1993). Le Bmax obtenu expérimentalement est un peu inférieur à celui retrouvé dans la littérature. L'une des hypothèses de cette variation réside dans le mode de dosage des protéines. La majorité des études dosent les protéines à partir de préparations membranaires tandis que nous, nous avons utilisé des cellules lysées (processus gel / dégel) qui contiennent évidemment plus de protéines. Les préparations membranaires sont plus populaires pour l'étude d'agonistes afin de prévenir le phénomène d'internalisation, et ce, plus particulièrement sur de longues périodes. Toutefois, l'étude Mariko *et al.* 1998 a démontré que l'IRL-1620 n'induisait pas d'internalisation sous certaines conditions. Ainsi, en abaissant la température (4°C), nous défavorisons le phénomène d'internalisation ce qui permet de prolonger les temps d'incubation à 12 heures. Cette méthode est la plus efficace pour atteindre l'état d'équilibre. De plus, des études ont proposé que la conformation des récepteurs dans les cellules intactes est beaucoup plus flexible et peut changer plus facilement que dans une préparation membranaire (Kenakin, 1995). Ces conditions représenteraient mieux la situation naturelle.

Tests de compétition

Les expériences de déplacement permettent de mesurer la force de l'interaction entre le ligand et le récepteur ET_B. La concentration du ligand chaud a été fixée à environ 70% du B_{max} évalué soit 3×10^{-10} M afin d'éviter la saturation des sites. Les tests de compétition ont été réalisés à l'aide des peptides chauds suivants: [Tyr(¹²⁵I)⁶]IRL-1620, [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620 et le [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620. L'IRL-1620 a été utilisé comme peptide froid pour la compétition homologue tandis que ET-1 a servi de peptide froid pour la compétition hétérologue.

Les résultats ont démontré que la liaison de [(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 à ET_B était réversible et que le déplacement (homologue et hétérologue) s'effectuait à l'intérieur d'une échelle de concentrations ne dépassant pas deux unités logarithmiques, ce qui est un signe d'une interaction compétitive au niveau du site de liaison de l'endothéline sur le récepteur ET_B. Le déplacement de [Tyr(¹²⁵I)⁶]IRL-1620 par ET-1 ($IC_{50} = 0,95 \pm 0,14 \times 10^{-9}$ M) est très semblable à celui observé avec l'IRL-1620 ($IC_{50} = 2,34 \pm 0,52 \times 10^{-9}$ M). Cependant, il nous est apparu que ET-1 déplace plus aisément [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 ($IC_{50} = 1,82 \pm 0,53 \times 10^{-9}$ M) comparativement à l'IRL-1620 ($IC_{50} = 5,19 \pm 1,08 \times 10^{-8}$ M) (Tableau 8). Ces résultats concordent avec le fait que l'ET-1 peut induire une réponse biologique à des concentrations beaucoup plus faible ($\approx 10^{-10}$ M) par rapport à l'IRL-1620, dont la concentration seuil est de l'ordre de 10^{-8} M. De plus, ces résultats viennent confirmer ceux retrouvés dans la littérature. Par exemple, Hara *et al.* (1998) ont obtenu à partir des cellules entières transfectées avec le récepteur ET_B, dans des conditions similaires aux nôtres (mais 1h d'incubation), un déplacement de [Tyr(¹²⁵I)⁶]IRL-1620 par ET-1 ($IC_{50} = 2,3$ nM). Cette valeur est légèrement plus élevée que celle que nous avons obtenu. Chiou *et al.*, (1997), à l'aide d'une lignée cellulaire CHO transfectée exprimant le récepteur hET_B, ont démontré que le IC_{50} peut varier selon le temps d'incubation appliqué soit 1,2 nM après 1h et 8,2 nM après 24 heures. Bref, les tests de compétition ont démontré que la sonde (Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 possède une de l'ordre du 1×10^{-9} M. Nous considérons ce peptide photosensible comme un outil pharmacologique ayant un grand potentiel pour

le photomarquage du récepteur ET_B. Il est biologiquement actif, sélectif et possède une excellente affinité pour le récepteur ET_B (tableau 8).

Les résultats des tests de compétitions avec le [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620 n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Il semblerait que, malgré une bonne activité biologique, cette sonde ait peu d'affinité pour le récepteur ET_B. Lors des tests de liaison, la liaison non spécifique représentait environ 80% de la liaison totale. De plus, l'ajout d'une faible quantité d'endothéline ou d'IRL-1620 avait pour effet de dissocier la majorité de la liaison de [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620 / ET_B. Ce peptide possède les caractéristiques d'un agoniste partiel de ET_B, mais il semble que le complexe formé soit très instable. C'est pourquoi, il n'a pas été possible de déterminer le IC₅₀ de [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁴]IRL-1620. Cette sonde pourrait, en théorie, être utilisée pour le photomarquage du récepteur ET_B puisqu'elle adopte une conformation qui peut activer le récepteur. Cependant, son utilisation risquerait d'entraîner des problèmes techniques majeurs lors du marquage. En effet, la liaison non spécifique très élevée compliquerait grandement la localisation des fragments marqués sur gel et entraînerait des incertitudes non négligeables. De plus, en ayant une affinité très faible, les résultats seraient peu fiables et par le fait même discutables.

Tableau 8 Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques de [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620

<i>[Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620</i>	EC ₅₀ (ET _A)	nul
	EC ₅₀ (ET _B)	1,27 ± 0.26x10 ⁻⁷ M
<i>[Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620</i>	IC ₅₀ (ET-1)	1,82 ± 0.53x10 ⁻⁹ M
	IC ₅₀ (IRL-1620)	5,19± 1.08x10 ⁻⁸ M

Photomarquage du récepteur ET_B

L'utilisation de la sonde [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 a permis de lier deux protéines, soit une première de 49 kDa et une seconde de 37 kDa. Le photomarquage de ces deux protéines est aboli par la présence d'ET-1 et d'IRL-1620 ce qui démontre que le ligand photosensible occupe le même site de liaison. L'analyse par immunobuvardage à l'aide d'un anti-corps spécifique au récepteur a confirmé que le complexe ligand-récepteur de 49 kDa correspond au récepteur ET_B. Le poids moléculaire identifié par photomarquage et immunobuvardage du récepteur ET_B est en accord avec celui proposé par d'autres équipes qui a été établi à l'aide d'agents de réticulation et de l'endothéline[¹²⁵I] (Takasuka *et al.*, 1994 ; Miyazaki *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1997; Nambi *et al.* 1997).

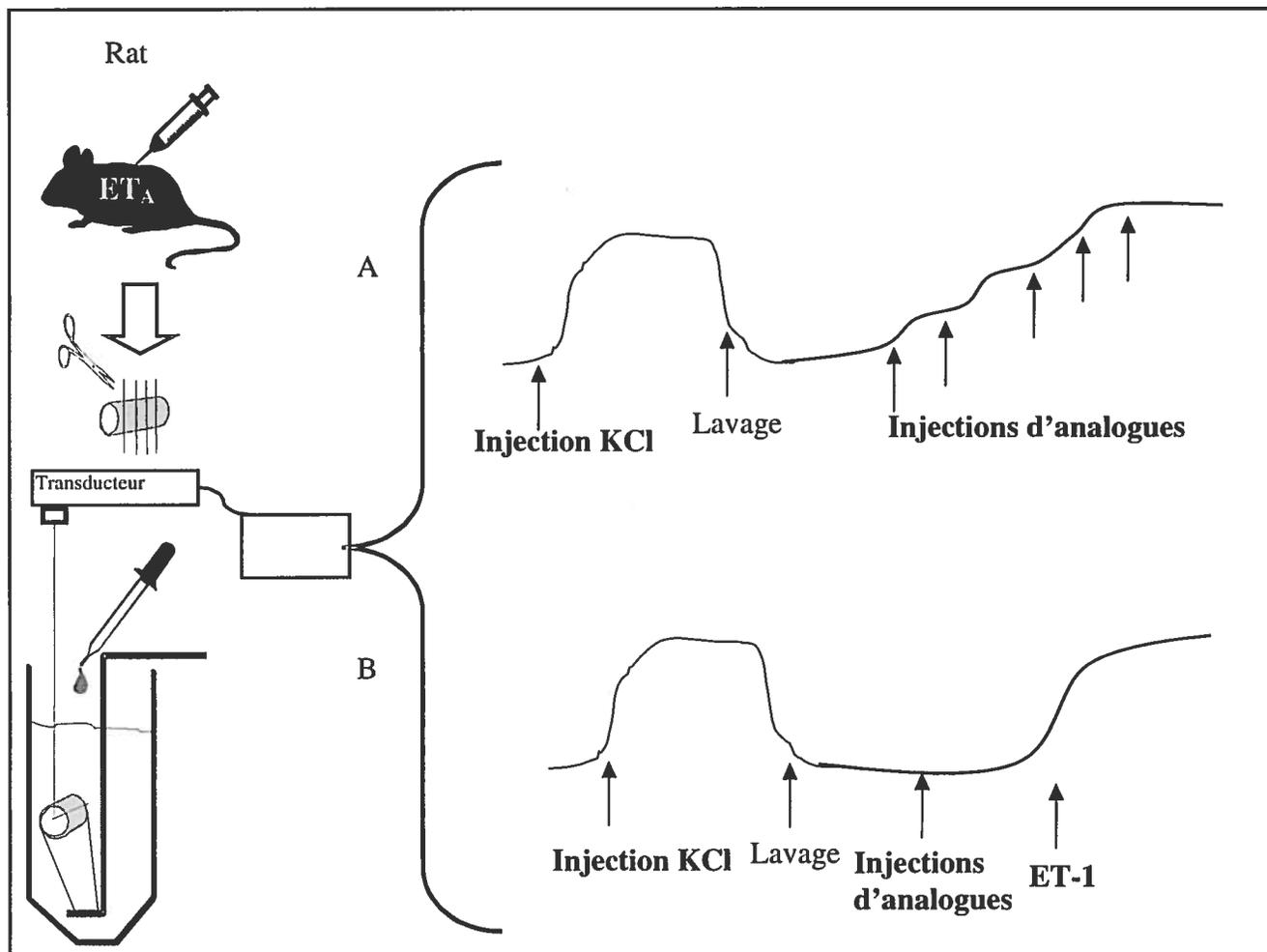
La protéine de 37 kDa représente le complexe [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 — récepteur ET_B tronqué. En effet, le récepteur ET_B serait très sensible à la protéolyse ce qui a pour effet de produire un long fragment de 37 kDa et un second de 10 kDa. Un site de protéolyse (partielle) a déjà été caractérisé par Grantcharova *et al.* (2002) et il semble bien que nos conditions expérimentales conduisent à l'obtention des fragments correspondant. Ainsi, la région N-terminale (extracellulaire) de ET_B serait clivée entre les résidus R64 ↓ S65 résultant, par conséquent, en la formation de deux fragments (37 kDa et 12 kDa). La molécule de 37 kDa a été identifiée comme étant le récepteur tronqué en N-terminale. La protéolyse est un phénomène non recherché. Cependant, dans ce cas ci, elle apporte des informations préliminaires utiles à la caractérisation du site de liaison de la sonde. En effet, nos résultats suggèrent que la région N-terminale du récepteur ET_B ne serait pas impliquée dans le site de liaison de la sonde photosensible. Ainsi, la sonde interagirait avec l'une des boucles extracellulaires II, III ou IV. Ces résultats démontrent que la sonde photosensible [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 est un ligand spécifique et un outil approprié pour caractériser le récepteur ET_B.

Conclusion

Afin de préciser le mode d'action moléculaire des endothélines, une série de courts peptides photosensibles, analogues de l'endothéline, ont été synthétisés et caractérisés pharmacologiquement. Le [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 s'est montré comme l'analogue le plus actif biologiquement et sélectif pour le type B des récepteurs de l'endothéline, lors de tests *in vitro*. De plus, des tests de compétition sur des cellules CHO-K1 transfectées avec le récepteur hET_B ont démontré que l'endothéline déloge le [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 du récepteur ET_B indiquant par le fait même que la sonde occupe le site de liaison de l'endothéline sur le récepteur ET_B. Le [Tyr(¹²⁵I)⁶,Bpa⁵]IRL-1620 a permis également de photomarquer le récepteur ET_B.

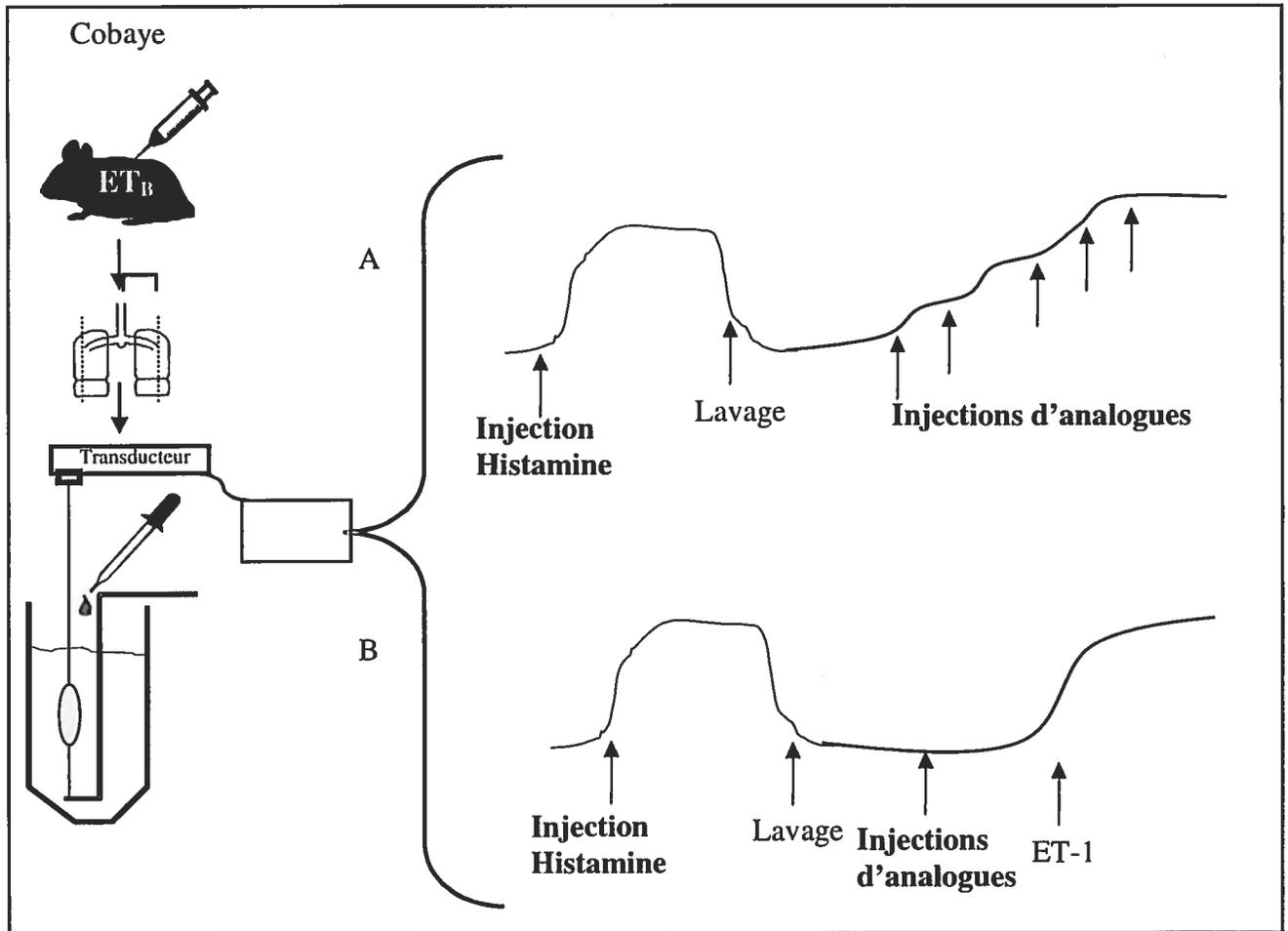
Ce type de molécule permettra d'approfondir notre compréhension des mécanismes impliqués dans la formation et la stabilisation de récepteur du système vasculaire. Entre autres, la caractérisation du site de liaison pourra aider aux développements d'outils pharmacologiques et/ou conduire aux raffinements d'agonistes et d'antagonistes hautement sélectifs destinés à la prévention ou au contrôle de maladies cardiovasculaires. L'une des perspectives intéressantes du photomarquage réside dans le fait que les informations obtenues pourront contribuer à la modélisation tridimensionnelle du complexe ET-ET_B. En effet, le Bpa ne réagissant qu'avec les acides aminés situés à moins de 3.1 Å, les résultats constitueraient donc des paramètres géométriques additionnels utiles pour établir un modèle tridimensionnel. En identifiant le site de liaison du récepteur de l'endothéline ET_B, il sera possible d'utiliser ces données pour établir un premier modèle de l'arrangement structural agoniste-ET_B et contribuerons aux données générales portant sur l'étude des récepteurs couplés aux protéines-G.

Appendice A



Protocole des bioessais sur l'aorte de rat pour un peptide agoniste.

Appendice B



Protocole des bioessais sur le parenchyme pulmonaire de cobaye pour un peptide agoniste.

RÉFÉRENCES

- Abe Y, Sakurai T, Yamada T, Nakamura T, Yanagisawa M et Goto K. Functional analysis of five endothelin-B receptor mutations found in human Hirschsprung disease patients. *BBRC* 2000; **275**: 524-531.
- Adachi M, Yang YY, Trzeciak A, Furuichi Y et Miyamoto C. Identification of a domain of ET_A receptor required for ligand binding. *FEBS* 1992; **311**(2): 179-183.
- Adachi M, Hashido K, Trzeciak A, Watanabe T, Furuichi Y et Miyamoto C. Functional domains of human endothelin receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; **22** (8): S121-4.
- Atkins AR, Martin RC et Smith R. ¹H NMR studies of sarafotoxin SRT_b, a nonselective endothelin receptor agonist, and IRL-1620, an ET_B receptor-specific agonist. *Biochemistry* 1995; **34**(6): 2026-33.
- Barany G, Merrifield RB. 1980. Peptides. E. Gross et J. Meienhofer Eds. New York : Academic Press
- Bayley, H. Photogenerated reagents in biochemistry and molecular biology (Eds : T.S. Work, R.H. Burdon), Elsevier, Amsterdam. (1983)
- Belch JFF. Raynaud's phenomenon. *Curr Opin Rheumatol* 1991; **3**: 960-966
- Bell KM, Chaplin DJ, Poole BA, Prise VE et Tozer GM. Modification of blood flow in the HSN tumour and normal tissues of the rat by the endothelin ET_B receptor agonist, IRL-1620. *Int J Cancer* 1999; **80**: 295-302
- Bernier SG, Bellemare JM, Escher E et Guillemette G. Characterization of AT₄ receptor from aortic endothelium with photosensitive analogues of angiotensin IV. *Biochemistry* 1998; **37**: 4280-4287.1998
- Bisello A, Adam AE, Mierke DF, Pellegrini M, Rossenblatt M, Suva LJ et Chorev M. Parathyroid hormone-receptor interactions identified directly by photocross-linkage and molecular modeling studies. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2298-22505.
- Boulanger Y, Biron É, Khat A et Fournier A. Conformational analysis of biologically active truncated linear analogs of endothelin-1 using NMR and molecular modeling. *J Peptide Res* 1999; **53**: 214-222.
- Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B et Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; **275**(23): 17596-17604.

- Brooks, D.P., De Palma, P.D., Pullen, M., Gellai, M., et Nambi, P. Identification and function of putative ETB receptor subtypes in the dog Kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **3**: S322-S325.
- Cavero PG, Miller WL, Heublein DM, Margulies KB et Burnett JC. Endothelin in experimental heart failure in the anaesthetized dog. *Am J Physiol* 1990; **259**: 312-317.
- Chiou WJ, Magnuson SR, Dixon D, Sundy S, Opgenorth TJ et Wu-Wong JR. Dissociation characteristics of endothelin receptor agonists and antagonists in cloned human type-B endothelin receptor. *Endothelium* 1994; **5**: 179-189.
- Chiou, W. J.; Magnuson, S. R.; Dixon, D.; Sundy, S.; Opgenorth, T. J., and Wu-Wong, J. R. Dissociation characteristics of endothelin receptor agonists and antagonists in cloned human type-B endothelin receptor. *Endothelium*. 1997; **5**:179-89.
- Cyr CR, Rudy B et Kris RM. Prolonged desensibilization of the human endothelin receptor A receptor in *Xenopus oocytes*: comparative studies with the human neurokinin A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **268**: 26071-26074
- Dormán G et Prestwich GD. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* 1994; **33**:5661-5673.
- Eberle AN et De Graan PNE, General principle for photoaffinity labeling of peptide hormone receptors. Dans L. Birnbaumer et B.W. O'Malley (Eds), 109, Hormone action Part 1: Peptides hormones. Academic Press inc., Orlando, (1985), pp. 129-157
- Edwards RM, Pullen M et Nambi P. Activation of ET ET_B receptors increases glomerular cGMP via an L-arginine-dependent pathway. *Am J Physiol* 1992; **263**: 1020-1025.
- Filippatos, G.S., Gangopadhyay, N., Lalude, O., Parameswaran, N., Said, S.I., Spielman, W. et Uhal, B.D. Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **281**: L749-L761
- Forest M et Fournier A. Bop reagent for coupling of pGlu and Boc-His(Tos) in solid phase peptide synthesis. *Int J Peptide Prot Res.* 1990; **35**: 89-94
- Forget MA, Lebel N, Sirois P, Boulanger Y, Battistini B et Fournier A. Structure-activity studies of the C-terminal segment of structurally reduced analogues of ET-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **26**: S107-S110.
- Forget MA, Lebel N, Sirois P, Boulanger Y et Fournier A. Biological and molecular analyses of structurally reduced analogues of endothelin-1. *Mol Pharmacol*. 1996; **49**: 1071-1079.

- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M et Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats. *BBRC* 1994; **199**: 1461-1465.
- Furchgott RF et Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**: 373-376.
- Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF et O'Brien RF. Substained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; **236**: 339-343.
- Gisin BF. The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid. *Anal Chim Acta* 1972; **58**: 248-249.
- Gisin BF. The preparation of Merfield-resins through total esterification with cesium salts. *Helv Chim Acta.* 1973; **56**: 1476-1482.
- Gray GA et Webb DJ. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 1996; **72**: 129-148.
- Hara M, Tozawa F, Itazaki K, Mihara SI et Fujimoto M. Endothelin ET_B receptors show different binding profiles in intact cells and cell membrane preparations. *Eur J Pharmacol* 1998; **345**: 339-342.
- Hashido K, Gamou T, Adachi M, Tabuchi H, Watanabe T, Furuichi Y et Miyamoto C. Truncation of N-terminal extracellular or C-terminal intracellular domains of human ET_A receptor abrogated the binding activity to the ET-1. *BBRC* 1992; **187**: 1241-8.
- Hashido K, Adachi M, Gamou T, Watanabe T, Furuichi Y et Miyamoto C. Identification of specific intracellular domains of human ET_A required for binding activity and signal transduction. *Cell Mol Biol Res* 1993; **39**: 3-12.
- Hewage CM, Jiang L, Parkinson JA, Ramage R et Sadler IH. Solution conformation of an ET_B selective agonist, ET-1[Cys(Acm)1,15,Ala3,Leu7,Aib11], in CD3OH/H₂O by 1H NMR and molecular modelling. *FEBS Lett* 1998; **425**: 234-238.
- Hewage CM, Jiang L, Parkinson JA, Ramage R et Sadler IH. Solution structure of a novel ET_B receptor selective agonist ET1-21[Cys(Acm)1,15, Aib3,11,Leu7] by nuclear magnetic resonance spectroscopy and molecular modelling. *J Peptide Res* 1999; **53**: 223-233.
- Hirata Y, Yoshimi H, Takaichi S, Yanagisawa M et Masaki T. Binding and receptor down regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in culture rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; **239**: 13-17.

- Hunter R. Standardization of the chloramine-T method of protein iodination. *Proc. Soc. Exp Biol Med* 1970; **133**: 989-992.
- Hosoda K, Nakao K, Arai H, Suga S, Ogawa Y et Mukoyama M. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; **287**: 23-26.
- Imumara F, Arimoto I, Fujiyoshi Y et Doi T. W276 mutation in the endothelin receptor subtype B impairs Gq coupling but not Gi or Go coupling. *Biochemistry* 2000; **39**: 686-692.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K et Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacology distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2863-2867.
- Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD et Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* 1970; **34**: 595-598.
- Karne S, Jayawickreme CK et Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19126-19133.
- Karonen SL. Developpements in techniques for radioiodination of peptides hormones and other proteins. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; **50**:135-138.
- Katahira R, Umemura I, Takai M, Oda K, Okada T et Nosaka AY. Structural studies on endothelin receptor subtype B specific agonist IRL-1620 [suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]ET-1(8-21)] and its analogs with dipalmitoyl phosphatidylcholine vesicles by RMN spectroscopy. *J Pept Res* 1998; **51**: 155-164.
- Kauer JC, Erickson-Viitanen S, Wolfe HR Jr. et DeGrado WF. p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J Biol Chem* 1986; **261**:10695-10700.
- Kenakin T. Agonist-receptor efficacy. I: Mechanism of efficacy and receptor promiscuity. *Trends Pharmacol Sci* 1995; **16**: 188-192.
- Kienhuis CBM, Heuvel JJTM, Ross HA, Swinkels LMJ, Foekens JA et Benraad ThJ. Six methods for direct radioiodination of mouse epidermal growth factor compared: effect of non-equivalence in binding behavior between labelled and unlabeled ligand. *Clin Chem* 1991; **37**: 1749-1755.
- Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K et Masaki T. Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *BBRC* 1988; **156**: 1182-1186.

- Krystek SR (Jr), Partel PS, Rose PM, Fisher SM, Kienzle BK, Lach DA, Liu ECK, Lynch JS, Novotny J et Webb ML. Mutation of peptide binding site in transmembrane region of a G protein-coupled receptor accounts for the receptor subtype selectivity. *J Biol Chem* 1994; **269** : 12383-12386.
- Koshimizu TA, Tsujimoto G, Ono K, Masaki T et Sakamoto A. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs membrane signalling but not ligand binding of human ET_B endothelin receptor. *BBRC* 1995; **217**: 354-362.
- Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, Jishage K, Ouchi Y, Azuma S, Toyoda Y, Ishikawa T, Kumada M et Yazaki Y. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994; **368**: 703.
- Lowry OG, Rosebrough NJ, Farr AL et Randall RJ. Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-269.
- MacDonald D, Mierke DF, Li Hanzhong, Pellegrini M, Sachais B, Krause JE, Leeman SE et Boyd ND. Photoaffinity labelling of mutant neurokinin-1 receptor reveals additional structural features of the substance P/NK-1 receptor complex. *Biochemistry* 2001; **40**: 2530-2539.
- Mauzy C, Wu LH, Egloff AM, Mirzadegan T et Chung FZ. Substitution of lysine-181 to aspartic acid in the third transmembrane region of endothelin (ET) type B receptor selectivity reduces its high-affinity binding with ET-3 peptides . *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; **20**: 5-7.
- Merifield, RB. Solid phase synthesis. *Science* 1986; **2**: 341-347
- Merrifield, RB. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1963; **85**: 2149-2154.
- Mills JS, Miettinen HM, Barnidge D, Vlases MJ, Wimer-Mackin S, Dratz EA, Sunner J et Jesaitis AJ. Identification of a ligand binding site in the human neutrophil formyl peptide receptor using a site-specific fluorescent photoaffinity label and mass spectrometry. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10428-10435.
- Miyazaki, H., Kondoh, M., Watanabe, H., Masuda, Y., Murakami, K., Takahashi, M., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K, and Masaki, T. Afinity labelling of endothelin receptor and characterization of solubilized endothelin – nendothelin-receptor complex. *Eur J Biol.* 1990; **187**:125-129.
- Nagayama Y, Wadsworth HL, Chazenbalk GD, Russo D, Seto P et Rapoport B. Thyrotropin-luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor extracellular domain chimeras as probes for thyrotropin receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 902-905.

- Nambi P, Pullen M, et Spielman W. Species differences in the binding characteristics of [¹²⁵I]IRL-1620, a potent agonist specific for endothelin-B receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; **268** : 202-207.
- Nambi, P.; Pullen, M.; Kincaid, J.; Nuthulaganti, P.; Aiyar, N.; Brooks, D. P.; Gellai, M., and Kumar, C. Identification and characterization of a novel endothelin receptor that binds both ETA- and ETB-selective ligands. *Mol Pharmacol.* 1997 ; **52**:582-9.
- Nakamuta, M., Takayanagi R, Sakai Y, Sakamoto S, Hagiwara H, Mizumo T, Saito Y, Hirose S, Yamamoto M et Nawata H. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *BBRC* 1991; **177**: 34.
- Newman A. Irreversible ligands for drug receptor characterization. *Ann Rev Medicinal Chem* 1991; **25** : 375-383.
- Ohlstein EH, Nambi P, Douglas SA, Edwards RM, Gellai M, Lago A, Leber JD et Elliott JD. SB 209670, a rationally designed potent nonpeptide endothelin receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 8052-8056.
- Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Matsumoto H, Suzuki N, Kimura C, Ondo H et Fujino M. Specific expression of human endothelin-2 (ET-2) gene in a renal adenocarcinoma cell line. *FEBS Lett* 1990; **274**:136-140.
- O'Neil KT et Erickson-Viitanen S. Degrado. Photolabeling of calmodulin with basic, amphiphilic alpha-helical peptides containing p-benzoylphenylalanine. *J Biol Chem.* 1989; **264**(24):14571-14578.
- Palmer RMJ, Ferrige AG et Moncada S. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327**: 524-526
- Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T, Enoki T, Ohtani T, Sakurai T, Nakao K, Toyo-Oka T et Masaki T. Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagoniste and selective agonists. *J Biol Chem* 1993; **268**: 8547-8553.
- Sakurai T, Yanagisawa M et Masaki T. Molecular characterization of the endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **13**: 103-108.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Inoues A, Ryan US, Kimura S, Mitsui I, Goto K et Masaki T. cDNA cloning porendothelin-1 mRNA. *BBRC* 1991; **175**: 44-47.
- Schiffirin EL. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1995; **25**: 1135-1143.

- Schwartz I, Ittoop O et Hazum E. Identification of endothelin receptors by chemical cross-linking. *Endocrinology* 1990; **126**: 1829-1833.
- Seevers RH et Counsell RE. Radioiodination techniques for small organic molecules. *Chem Rev* 1982; **82**: 575-590.
- Shiba R, Sakurai T, Yamada G, Morimoto H, Saito A, Masaki T et Goto K. Cloning and expression of rat preproendothelin-3 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 588-594.
- Sigh A, Thornton ER et Westheimer F.H. The Photolysis of diazoacetyl chymotrypsin. *J Biol Chem* 1962; **237**: 3006-3008.
- Sudjarwo SA, Hori M, Tanaka T, Matsuda Y, Okada T et Karaki H. Subtypes of endothelin ET_A and ET_B receptors mediating venous smooth muscle contraction. *BBRC* 1994; **200**: 627-633.
- Takai M, Umemura I, Yamasaki K, Watakabe T, Fujitani Y, Oda K, Urade Y, Inui T, Yamamura T et Okada T. (1992) A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹,Ala¹¹,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. *BBRC* 1992; **184**: 953-959.
- Takasuka T, Sakurai T, Katsutoshi G, Furuichi Y et Wanatabe T. Human endothelin receptor ET_B: amino sequence requirements for super stable complex formation with its ligand. *J Biol Chem* 1994; **269**: 7509-7513.
- Tam JP, Liu Wen, Zhang JW, Galantino FB, Cristiani C, Vaghi F et Castiglione R. Alanine scan of endothelin: Importance of aromatic residues. *Peptides* 1994; **15**: 703-708.
- Wang SS, Gisin BF, Winter DP, Makofske R, Kuleska C, Tzougraki C et Meienhofer J. Facile synthesis of amino acid and peptide ester mild conditions via cesium salts. *J Org Chem.* 1977; **42**: 1286-1290.
- Warner TD, Allock GH, Mickley EJ, Corder R et Vane JR. Comparative studies with endothelin receptor antagonists BQ-123 and PD 142893 indicate at least three endothelin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; **22**: S117-S120.
- Watakabe T, Urade Y, Takai M, Umemura I et Okada T. A reversible radioligand specific for the ET_B receptors: [¹²⁵I]Tyr¹³-Suc-[Glu⁹,Ala¹¹,15]-endothelin-1(8-21), [¹²⁵I]IRL-1620. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **185**: 867-873.
- Wilson CJ, Husain SS, Stimson ER, Dangott LJ, Miller KW et Maggio JE. p-(4-Hydroxybenzoyl)phenylalanine: a photoreactive amino acid analog amenable to radioiodination for elucidation of peptide-protein interaction. Application to substance P receptor. *Biochemistry* 1997; **36**(15):4542-4551.

- Weber PJA et Beck-Sickinger AG. Comparison of the photochemical behavior of four different photoactivable probes. *J Pept Res* 1996; 375-383.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazake Y, Goto K et Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; **332**: 411-415.
- Yagisawa M et Masaki T. Endothelin, a novel endothelium-derived peptide: pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular disease. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**:1877-1883.
- Zhu G, Wu LH, Mauzy C, Egloff AM, Mirzadegan T et Chung FZ. Replacement of lysine-181 by aspartic acid in the third transmembrane region of endothelin type B receptor reduces its affinity to endothelin peptides and sarafotoxin 6c without affecting G protein coupling. *J Cell Biochem* 1992;**50**:159-164