

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Caractérisation du domaine de liaison des récepteurs de l'endothéline à l'aide de sondes
photoréactives

Par
Jacinthe Aubin

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
Maître ès science (M.Sc.)
Sciences Expérimentales de la Santé

Jury d'évaluation :

Évaluateur externe :	Dr. Gaétan Guillemette
Évaluateur interne :	Dr. Jacques Bernier INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche :	Dr. Alain Fournier INRS-Institut Armand-Frappier

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Pr Alain Fournier pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir guidée dans mes recherches. Je tiens à le remercier pour avoir su piquer ma curiosité scientifique et pour m'avoir aidée à développer un esprit critique. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa compréhension lors des moments difficiles.

J'aimerais remercier ma mère Claudine, mon frère Pierre Luc et Christian et François pour leur soutien et leur encouragement. Je voudrais également remercier mon père Guy, qui malheureusement n'a pas pu rester avec moi jusqu'à la fin de mes études, mais qui je suis certaine, a veillé sur moi tout au long de ma maîtrise et continuera de veiller sur moi.

Je voudrais également dire merci au gens de mon laboratoire, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir, pour leur aide au labo et pour leur amitié. Merci à Sophie Tessier qui a été ma mentor et qui m'a légué un énorme bagage de connaissances. Merci à Myriam Létourneau pour être une excellente assistante de recherche, mais surtout pour son amitié et ses bons conseils. Merci à Chantal Langlois, Kathy Turcotte, Steve Bourgault, Stéphane Boivin, Alexandra Louimaire et Yan Fu pour toutes les belles journées que j'ai eues avec vous. Merci aussi à Eugène Francoeur, Josée Frappier et Duc Ngoc Duan, que j'aurais aimé connaître un peu plus.

J'aimerais aussi remercier tous les gens de l'INRS que j'ai côtoyés et avec qui j'ai pu partager de très beaux moments.

Pour finir, je remercie la Fondation Armand-Frappier ainsi que le FRSQ pour le soutien financier.

Table des matières

Remerciements.....	ii
Liste des abréviations.....	v
Liste des Figures.....	viii
Liste des figures de l'article.....	ix
Liste des tableaux de l'article.....	ix
Sommaire.....	x
Préambule.....	xii
1. L'Endothéline.....	1
1.1. Découverte de l'endothéline.....	1
1.2. Caractéristiques moléculaires.....	1
1.3. Les sarafotoxines.....	4
1.4. Études Structure-Fonction.....	5
1.5. Biosynthèse de l'ET.....	7
1.6. L'ECE.....	8
1.7. Effets physiologiques de l'ET.....	8
2. Les récepteurs de l'ET.....	11
2.1. Les récepteurs de l'ET.....	11
2.2. Domaine de liaison des récepteurs de l'ET.....	14
2.3. Voies de signalisation de l'ET.....	17
2.4. Dimérisation des récepteurs de l'ET.....	21
3. La technique du photomarquage.....	24
3.1. Utilité du photomarquage.....	24
3.2. Méthodologie Générale	26
3.3. Les groupements photoactivables	27
3.4. Les Benzophénones.....	28
3.5. L'endothéline et le photomarquage.....	31

4. Article.....	32
4.1. Contribution de l'auteur à l'article.....	32
4.2. Contribution des autres auteurs.....	32
4.3. Résumé de l'article.....	33
4.4. Article soumis dans la revue Biochimie.....	34
5. Discussion.....	46
6. Conclusion.....	54
7. Références.....	55

Liste des abréviations

Acm	Acétamidométhyle
ACN	Acétonitrile
AT ₁ et AT ₂	Récepteurs à l'angiotensine de type 1 et 2
Boc	t-Butyloxycarbone
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium
BP	Benzophénone
Bpa	Benzoylphénylalanine
BSA	Albumine de sérum de bovin
Ca	Calcium
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CLHP	Chromatographie liquide à haute pression
CNBr	Bromure de cyanogène
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DC	Dichroïsme circulaire
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-Diméthylformamide
EC	Extracellulaire
EDCF	<i>Endothelium-derived contracting factors</i>
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
Eq	Équivalent
ET	Endothéline
ET _A	Récepteur de type A de l'endothéline
ET _B	Récepteur de type B de l'endothéline
ET _C	Récepteur de type C de l'endothéline
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GFP	<i>Green florescent protein</i>

GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
HF	Fluorure d'hydrogène
IP ₃	Inositol triphosphate
Maldi-Tof	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight</i>
MPA	<i>Methionine proximity assay</i>
NO	Monoxyde d'azote
NCS	N-Chlorosuccinimide
NPR _A	<i>Natriuretic peptide receptor A</i>
PAGE	Gel de polyacrylamide
PGI ₂	Prostacycline
PLC	Phospholipase C
PKC	Protéine kinase C
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SRTX	Sarafotoxine
SDS	Dodecylsulfate de sodium
SEM	Erreur standard de la moyenne
TFA	Acide trifluoroacétique
TM	Transmembranaire
UV	Ultraviolet

Abréviations des acides aminés

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

Liste des Figures

- Figure 1 : Isoformes de l'ET retrouvées dans le génome humain. Les acides aminés représentés en rouge sont ceux qui diffèrent de l'ET-1 A) ET-1, B) ET-2 et C) ET-3..... p.3
- Figure 2 : Structure primaire des isoformes de l'ET et des Sarafotoxines. Les acides aminés en gras sont ceux qui diffèrent de l'ET-1..... p.4
- Figure 3 : Structure primaire du récepteur ET_A humain de l'ETp. 12
- Figure 4 : Structure primaire du récepteur ET_B humain de l'ET p.13
- Figure 5 : Voie de signalisation de l'ET sur les cellules musculaires lisses, induisant une contractionp.18
- Figure 6 : Internalisation des récepteursp.20
- Figure 7 : Interprétation possible de la liaison de l'ET-1 sur ces récepteurs selon les données obtenues par Harada et son équipe. A) liaison de ET-1, B) liaison de ET-1 en présence de la Sarafotoxine C) liaison de ET-1 en présence de BQ-123 et D) liaison de ET-1 en présence de la Sarafotoxine et de BQ-123..... p.22
- Figure 8 : Principe général de la technique de photomarquage p.26
- Figure 9 : Mécanisme réactionnel des BP avec les protéines p.29
- Figure 10 : Représentation de la structure du *p*-Benzoylphénylalanine (Bpa)..... p.29

Liste des Figures de l'article

- Figure 1 : Structure primaire des récepteurs ET_A et ET_B..... p.35
- Figure 2 : Courbes concentration-réponse des sondes choisies sur ET_A et ET_B (A) Aorte de rat (ET_A) (B) Parenchyme pulmonaire de cobaye (ET_B) p.39
- Figure 3 : Affinité des sondes iodées qui ont été utilisées pour les études de photomarquage sur les cellules CHO exprimant les récepteurs ET_A ou ET_B..... p.40
- Figure 4 : Protéolyse et clivage chimique des récepteurs ET_A photomarqués avec [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr(¹²⁵I)¹³]ET-1p.41
- Figure 5 : Protéolyse et clivage chimique des récepteurs ET_A photomarqués avec [L-Bpa⁷, Tyr(¹²⁵I)¹³]ET-1p.41
- Figure 6 : Protéolyse et clivage chimique des récepteurs ET_B photomarqués avec [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr(¹²⁵I)¹³]ET-1.....p.42

Liste des Tableaux de l'article

- Tableau 1 : Séquence de l'endothéline et des 12 analogues photosensibles.....p.36
- Tableau 2 : Activités des peptides utilisés pour le photomarquage des récepteurs ET_A et ET_B.....p.38
- Tableau 3 : Valeur d'IC₅₀ des peptides radiomarqués p.38

Sommaire

L'endothéline, un des plus puissants vasoconstricteur connus à ce jour a été découvert il y a plus de 20 ans dans les cellules endothéliales. Il est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire via deux types de récepteurs, soit ET_A et ET_B . Différentes études ont montré un lien entre l'ET et certaines maladies vasculaires, telles l'hypertension et l'ischémie. Du point de vue pharmacologique et thérapeutique, il est donc important de mieux comprendre les mécanismes de liaison entre ce peptide et ses récepteurs. Afin de caractériser le domaine de liaison des récepteur de ET, des études de photomarquage avaient déjà été effectuées dans notre laboratoire, avec un antagoniste et un agoniste des récepteurs de l'ET. Cette technique se base sur l'affinité d'une sonde photoréactive aux récepteurs et sur la formation d'un lien covalent entre cette sonde et le récepteur. L'analyse électrophorétique des fragments obtenus après clivage du complexe ligand-récepteur a ainsi permis l'identification de points de contact entre l'ET et ses récepteurs. Pour mieux cibler les sites de liaison, nous avons utilisé la même technique qu'avec l'antagoniste et l'agoniste, mais cette fois avec la molécule endogène, soit l'ET. Les acides aminés des positions 4, 7, 9, 12, 14 et 21 de l'ET ont été successivement remplacés par le L- ou le D-*p*-benzoylphenylalanine (*p*-Bpa), un agent photosensible. L'activité de ces analogues a été vérifiée par des essais pharmacologiques sur des aortes de rat (contenant essentiellement des récepteurs ET_A) et sur le parenchyme pulmonaire de cobaye (contenant une population majoritaire (environ 80%) de récepteurs ET_B). L'affinité des analogues a été ensuite vérifiée par des tests de compétition sur des cellules CHO surexprimant les récepteurs ET_A ou ET_B . Les sondes ayant conservé une bonne affinité pour les récepteurs et une bonne activité et ce malgré l'insertion du groupement photoactivable, soit [L-Bpa⁷, Tyr(¹²⁵I)¹³]hET-1) et [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr(¹²⁵I)¹³]hET-1, ont été choisies pour les études de photomarquage. La digestion des complexes ligand-récepteurs a ainsi permis de déterminer que la sonde [Nle⁷, L-Bpa¹²]hET-1 aurait un point de contact sur la deuxième moitié de la 1^{ère} boucle extracellulaire ou la partie supérieur du domaine transmembranaire III (TMIII), alors que le segment inférieur du TMVI ou la seconde moitié de la boucle intracellulaire III (ECIII) contiendrait un point d'ancrage

pour [L-Bpa⁷]hET-1 au niveau de ET_A. De plus, les travaux ont montré que la 2^e boucle extracellulaire du récepteur ET_B viendrait à proximité du ligand [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr(¹²⁵I)]hET-1 lors de sa liaison.

Préambule

Les peptides participent au maintien des fonctions du corps humain, incluant notamment l'activité cardiaque et vasculaire. Ces substances importantes de l'homéostasie sont par exemple retrouvées dans le cœur lui-même ou dans les parois des vaisseaux sanguins. L'endothéline (ET) est un peptide montrant des effets centraux et périphériques uniques sur le système cardiovasculaire. L'ET figure ainsi parmi les plus puissants vasoconstricteurs découverts à ce jour. Ses activités biologiques suggèrent une implication dans des maladies telles l'ischémie du myocarde et l'hypertension, lesquelles touchant de plus en plus de gens. Par conséquent, l'étude de son mode d'action constitue un domaine majeur de recherche et le Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP) participe depuis plusieurs années à ces travaux en évaluant les fonctions de l'ET et de ses récepteurs. Ainsi, au moyen de diverses approches telles que les études de structure-activité, la mutagenèse dirigée et les récepteurs chimères, de nombreuses études ont été menées pour mieux comprendre l'interaction entre l'ET et ses récepteurs. Par complémentarité aux travaux déjà réalisés, la technique de photomarquage, qui permet d'identifier des régions de contact entre le ligand et son récepteur, peut évidemment être utilisée. Par cette technique, nous avons ainsi été en mesure de déterminer des zones de liaison de l'ET sur ses récepteurs ET_A et ET_B. Pour ce faire, différents objectifs devaient être atteints :

- Synthèse en phase solide d'analogues photosensibles de l'ET
- Évaluer l'activité des analogues sur les récepteurs, à l'aide d'essais pharmacologiques réalisés au moyen de l'aorte de rat et du parenchyme pulmonaire de cobaye.
- Évaluer l'affinité des analogues à l'aide de tests de compétition sur des cellules CHO surexprimant les récepteurs humains ET_A ou ET_B.
- Photomarquer les récepteurs à l'aide des sondes développées.
- Cliver les complexes ligand-récepteur photomarqués afin de déterminer les fragments des récepteurs liés aux sondes.

Ce Mémoire est présenté sous forme de Mémoire par article. La première partie présente une revue de la littérature portant sur l'endothéline, ses récepteurs et la technique du photomarquage. Suit ensuite un résumé du manuscrit, ainsi que le manuscrit lui-même qui a été soumis à la revue internationale Biochimie (facteur d'impact de 3,2). Pour finir, une brève discussion des résultats obtenus suite à mes travaux réalisés dans le cadre du programme de Maîtrise en sciences expérimentales de la santé.

1. L'ENDOTHÉLINE

1.1 La découverte de l'Endothéline

La découverte de la prostacycline (PGI_2) en 1976 et de l'EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) en 1980 (Furchgott et Zawadzki, 1980), qui sont toutes deux des substances vasodilatatrices libérées par l'endothélium, a amené les scientifiques à revoir les rôles de celui-ci, qui autrefois était perçu comme une simple barrière entre les tissus vasculaires et les cellules sanguines. À ce jour, l'endothelium est décrit comme un tissu multifonctionnel ayant un rôle important dans l'homéostasie du système cardiovasculaire. Cette barrière semipermeable est maintenant connue pour ses fonctions métaboliques pouvant libérer certains facteurs vasoactifs (Mateo et Artinano, 1997). Suite à la découverte de l'EDRF, Furchgott et Zawadzki ont démontré que cette substance était en fait le NO. Peu de temps après la découverte de l'EDRF, la présence dans l'endothélium d'une substance ayant des effets opposés (effet vasoconstricteur) a été observée et nommée EDCF (*endothelium-derived contracting factor*).

L'EDCF a finalement été isolé du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc et séquencé en 1988 par Yanagisawa. Ce facteur a été nommé endothéline porcine, mais est maintenant connu sous le nom d'endothéline-1 (ET-1) (Yanagisawa *et al.*, 1988). En 1989, deux autres peptides ressemblant à l'ET-1 et provenant de trois gènes distincts (Inoue *et al.*, 1989) ont été clonés et identifiés comme ET-2 et ET-3.

1.2 Caractéristiques moléculaires

L'ET-1 est un peptide de 21 acides aminés d'un poids moléculaire de 2492 Da. Cette chaîne peptidique est repliée sur elle-même et elle est stabilisée par la présence de deux ponts disulfures reliant les Cys 1 et 15 ainsi que 3 et 11. De plus, les extrémités carboxy- et amino-terminales de ce peptide sont libres. Engendrant des contractions puissantes et soutenues, l'ET-1 est l'un des plus puissants vasoconstricteurs connus à ce jour (Yanagisawa *et al.*, 1988). Seule l'urotensine II est plus puissante, mais son efficacité est

moindre et son action est de beaucoup plus courte durée (Maguire et Davenport, 2002). Les isoformes de l'ET-1, soit ET-2 et ET-3 ne diffèrent que très faiblement de la structure de ET-1. En effet, la séquence de ET-2 n'est différente de celle de ET-1 que par deux acides aminés, soit aux positions 6 et 7. Pour sa part, ET-3 est différente de ET-1 par 6 acides aminés (aux positions 2, 4, 5, 6, 7 et 14) (Figure 1). De plus, les différences entre les trois isoformes ne sont pas seulement structurales, mais également au niveau de leur activité biologique. L'effet vasoconstricteur de ET-1 et ET-2 est plus important que ET-3 et ce dernier pourrait également agir comme vasodilatateur (Masaki et Yanagisawa, 1992). ET-1 a été initialement isolé de l'endothélium, mais est aussi exprimé dans des tissus non-vasculaires tels le cerveau, le foie, les poumons et autres (Sakurai *et al.*, 1991). ET-2 est entre autres très exprimé dans le foie et ET-3 est abondamment exprimé dans les intestins (Bloch *et al.*, 1989; Ohkubo *et al.*, 1990).

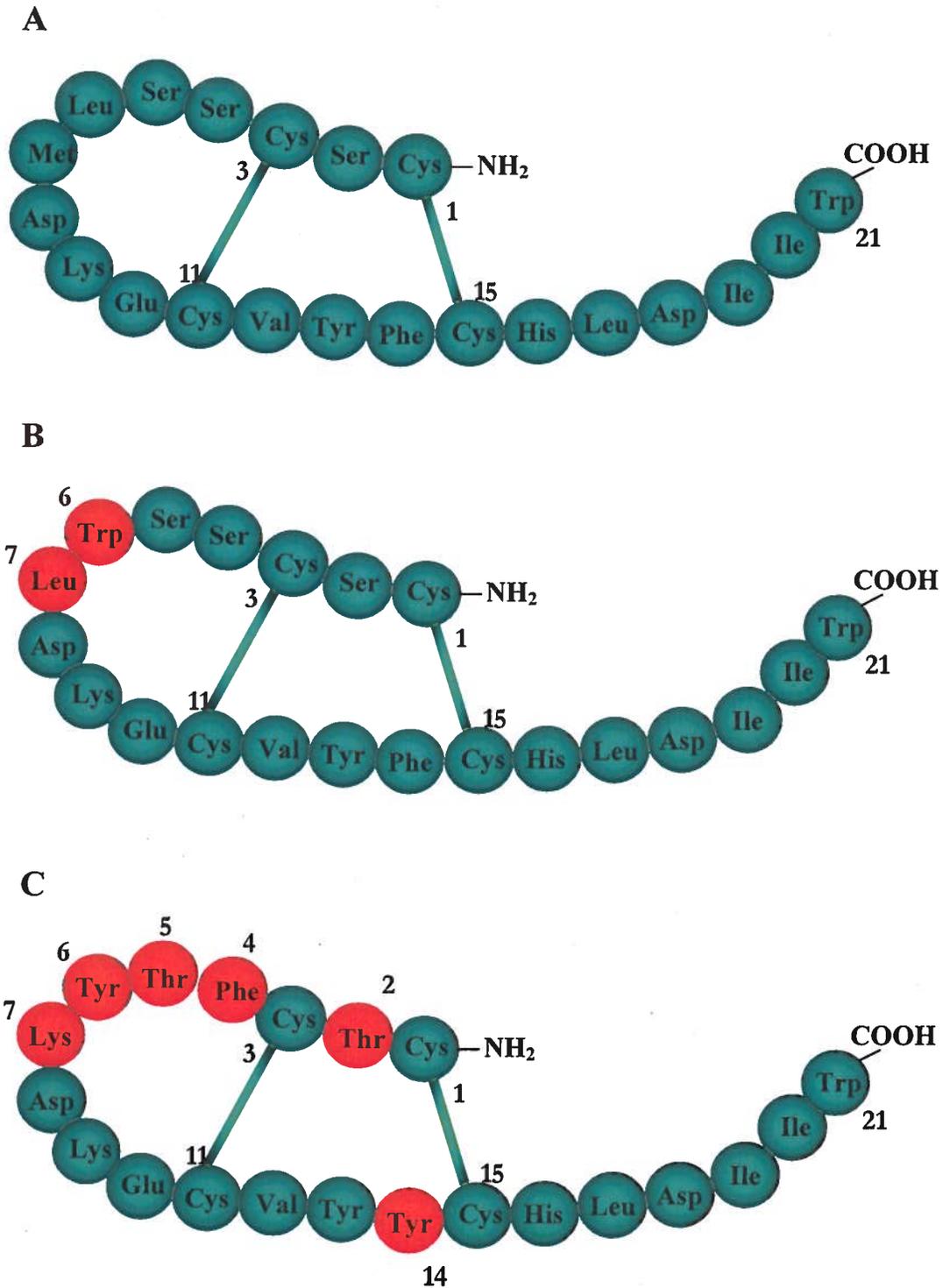


Figure 1. Isoformes de l'ET retrouvés dans le génome humain. Les acides aminés représentés en rouge sont ceux qui diffèrent de l'ET-1 A) ET-1, B) ET-2 et C) ET-3.

1.3 Les sarafotoxines

Il existe aussi une autre famille de peptides homologues à la famille des endothélines. Cette famille se nomme les sarafotoxines (SRTX) et sont des neurotoxines extraites du venin de serpent (*Atractaspis egaddensis*) qui agissent sur les mêmes récepteurs que l'ET dans le cerveau et le cœur (Ambar et al., 1989). En plus de partager les mêmes récepteurs, les sarafotoxines affichent des traits communs de structure. Tout comme les endothélines, elles sont formées de 21 acides aminés, possèdent des extrémités amino et carboxy-terminales libres ainsi que deux ponts disulfures reliant les Cys 1-15 et 3-11 (Figure 2). Ces caractéristiques communes avec les endothélines suggèrent une même origine au niveau de l'évolution des deux familles.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ET-1	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Leu	Met	Asp	Lys	Glu	Cys	Val	Tyr	Phe	Cys	His	Leu	Asp	Ile	Ile	Trp
ET-2	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Trp	Leu	Asp	Lys	Glu	Cys	Val	Tyr	Phe	Cys	His	Leu	Asp	Ile	Ile	Trp
ET-3	Cys	Thr	Cys	Phe	Thr	Tyr	Lys	Asp	Lys	Glu	Cys	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Leu	Asp	Ile	Ile	Trp
S6a	Cys	Ser	Cys	Lys	Asp	Met	Thr	Asp	Lys	Glu	Cys	Leu	Asn	Phe	Cys	His	Gln	Asp	Val	Ile	Trp
S6b	Cys	Ser	Cys	Lys	Asp	Met	Thr	Asp	Lys	Glu	Cys	Leu	Tyr	Phe	Cys	His	Gln	Asp	Val	Ile	Trp
S6c	Cys	Thr	Cys	Asn	Asp	Met	Thr	Asp	Glu	Glu	Cys	Leu	Asn	Phe	Cys	His	Gln	Asp	Val	Ile	Trp
S6d	Cys	Thr	Cys	Lys	Asp	Met	Thr	Asp	Lys	Glu	Cys	Leu	Tyr	Phe	Cys	His	Gln	Asp	Ile	Ile	Trp

Figure 2. Structure primaire des isoformes de l'ET et des sarafotoxines. Les acides aminés en gras sont ceux qui diffèrent de l'ET-1. (Figure tirée de Mateo et Artinano, 1997)

1.4 Études structure-fonction

Les parties les plus conservées dans les isoformes de l'ET-1 suggèrent un rôle important de celles-ci dans la liaison et/ou l'activation des récepteurs. Certaines parties de la molécule sont essentielles à ces processus et la modification de ces pharmacophores nuit à la liaison et à l'activation des récepteurs. Il est donc important de déterminer ces pharmacophores dans le but de mieux comprendre les mécanismes et ainsi permettre le développement de nouvelles molécules pouvant lier les récepteurs. Depuis la découverte de l'ET, maintes études ont été menées afin de cerner ces pharmacophores. De plus, ces études ont montré que les pharmacophores sont différents pour ET_A et ET_B.

La présence des ponts disulfures reliant les Cys est un élément important pour la liaison sur ET_A, tandis qu'elle n'est pas essentielle pour le récepteur ET_B. En effet, les analogues linéaires synthétisés avec des alanines aux positions 1, 3, 11 et 15 (remplaçant les Cys) permettent une aussi bonne activité que l'ET sur ET_B, mais non sur ET_A. Cependant, il semble que le lien 1-15 soit plus important que celui des positions 3-11 sur le récepteur ET_A (Pelton et Miller, 1991, Topouzis *et al.*, 1989).

Les endothélines ainsi que les sarafotoxines ont des extrémités amino- et carboxy-terminales libres, suggérant l'importance de cette caractéristique. En effet, l'ajout d'un groupement acyle sur ces extrémités enlève complètement l'activité de l'ET (Nakajima *et al.*, 1989b). Néanmoins, des études réalisées dans nos laboratoires ont montré que la formylation du résidu Trp n'entraînait pas une perte d'activité mais engendre plutôt un agoniste partiel sur le récepteur ET_B. (Forget *et al.*, 1996). Malgré tout, il est acquis que le résidu Trp en position 21 est important, puisqu'une perte d'activité est observée lors de son remplacement (Tam *et al.*, 1994). Toutefois, la substitution de cet acide aminé par un résidu aromatique, comme Tyr ou Phe, mène à des analogues partiellement actifs (Nakajima *et al.*, 1989a).

Une approche très utilisée pour déterminer les éléments fonctionnels d'un peptide est le balayage de séquence au moyen d'une alanine (Ala scan). Celui-ci consiste à remplacer chaque acide aminé par une Ala et à évaluer l'affinité et l'activité de l'analogue correspondant sur les récepteurs. Cette étude a été menée sur l'ET et elle a montré que les résidus Asp⁸, Tyr¹³, Phe¹⁴, Leu¹⁷ étaient des éléments importants pour la liaison sur les récepteurs. Le remplacement des résidus Tyr¹³, Phe¹⁴ et Leu¹⁷ a donné lieu à une diminution significative de la liaison, ce qui suggère que les chaînes latérales hydrophobes des acides aminés sont des pharmacophores importants pour le contact du ligand sur les récepteurs. De plus, le remplacement de l'Asp⁸ et de Leu¹⁷ fait perdre 90% de l'activité agoniste, sans toutefois empêcher la liaison, qui demeure presque équivalente à celle de ET-1. Ces résultats suggèrent que ces deux acides aminés sont importants pour la transduction du signal (Tam et al., 1994).

La structure tridimensionnelle joue bien sûr un rôle majeur dans la reconnaissance du ligand par le récepteur. Ainsi, certains changements dans la molécule modifiant la structure tridimensionnelle peuvent inhiber complètement le processus de liaison. Pour étudier la conformation de l'ET, des études de résonance magnétique nucléaire (RMN), de cristallographie et de dichroïsme circulaire (DC) ont été réalisées dans les années qui ont suivi la découverte du peptide.

Ainsi, la molécule d'ET est repliée sur elle-même par la présence des deux ponts disulfures. De plus, des études de cristallographie ont suggéré que la partie N-terminale serait une structure en feuillet plissé, avec un coude β , et la partie C-terminale formerait une hélice irrégulière (Wallace et Janes, 1995). Cependant, il y a des divergences concernant la structure de l'ET puisque des études antérieures par RMN ont montré que le peptide adopte une autre conformation. En effet, les résultats ont suggéré que l'ET était sous forme d'hélice- α pour la portion 9-16 (Sokolovsky, 1992) de sorte qu'il n'y a toujours pas de consensus quant à la structure qui diffère selon le milieu et la méthode d'analyse utilisée.

1.5 Biosynthèse de l'ET

L'ET est sécrété par les cellules endothéliales, mais ces dernières ne peuvent pas emmagasiner le peptide en vue de le libérer ultérieurement. La régulation de la sécrétion de l'ET se fait donc au niveau de la synthèse de celui-ci. L'expression du gène est induite par plusieurs facteurs, notamment l'adrénaline, la thrombine, la vasopressine, l'angiotensine II, l'insuline, les cytokines, des facteurs de croissance ainsi que des stimuli physiques. À l'opposé, le NO, la prostacycline, les peptides natriurétiques sont des éléments qui viennent réguler à la baisse la sécrétion de l'ET (Mateo et Artinano, 1997).

L'ET est synthétisé à partir d'un précurseur nommé préproendothéline, qui est composé selon les espèces de 160 à 238 acides aminés. Celui-ci doit être clivé par une endopeptidase de type furine pour former la BigET, aussi connue sous le nom de proET. Ce précurseur est composé de 37 à 41 acides aminés et il est pratiquement biologiquement inactif. Cette protéolyse se fait au niveau de sites dibasiques, plus spécifiquement au niveau de la Lys⁵¹-Arg⁵² et Arg⁹²-Arg⁹³. Une seconde étape de clivage est ensuite requise pour produire le peptide actif de 21 acides aminés. Ce clivage est assuré par une métalloprotéase membranaire à zinc, appelée enzyme de conversion de l'ET (ECE), au niveau du lien peptidique entre les résidus Trp et Val dans le cas de ET-1 et ET-2 et entre les résidus Trp et Ile dans le cas de ET-3 (Xu *et al.*, 1994).

1.6 L'ECE

L'ECE est une métalloprotéase de 758 acides aminés, qui contient un segment transmembranaire, une portion N-terminale cytosolique de seulement 56 résidus et un segment C-terminal extracellulaire de 681 acides aminés, qui comprend le site catalytique. Plusieurs sites de N-glycosylation sont retrouvés dans le domaine extracellulaire de cette protéine membranaire (Goto *et al.*, 1996). Il existe trois isoformes de l'ECE, ECE-1, ECE-2 et ECE-3. ECE-1 a été la première découverte (1994) et est la plus importante au niveau physiologique. ECE-1 possède une spécificité pour la BigET-1 : BigET-1 > BigET-2 > BigET-3, mais peut aussi hydrolyser certains autres peptides comme la bradykinine, la substance P, l'angiotensine I et l'insuline. Cependant, l'hydrolyse de ceux-ci est d'efficacité moindre (Hoang et Turner, 1997; Johnson *et al.* 1999). De plus, quatre isoformes de ECE-1 ont été découvertes, ECE-1a et b (Shimada *et al.* 1995), c (Schweizer *et al.* 1997) et d (Valdenaire *et al.*, 1999). Un seul gène code pour ces isoformes et ceux-ci ne diffèrent que par la partie N-terminale. ECE-1 est exprimée surtout au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. De plus, ECE-1 clive la BigET-1. ECE-2 possède 59% d'homologie avec ECE-1 et est également responsable du clivage de BigEt-1 en ET-1. ECE-3 montre quant à elle une spécificité pour BigET-3 (D'Orléans-Juste, 2003).

1.7 Effets physiologiques de l'ET

Connu surtout pour ses propriétés vasoactives, l'ET est aussi impliqué dans divers systèmes de l'organisme. Suite à la découverte de l'expression de ce peptide dans plusieurs tissus, les chercheurs ont multiplié leurs efforts pour connaître davantage ses rôles. Ainsi, il est d'abord bien connu que l'ET joue un rôle majeur dans le maintien du tonus vasculaire. En effet, au niveau des muscles lisses vasculaires, l'ET aurait un effet constricteur des muscles isolés, un effet vasoconstricteur des artères coronaires et une augmentation de la pression sanguine. De plus, au niveau de l'endothélium vasculaire, l'endothéline via le récepteur ET_B aurait un effet dilatateur suite à une libération de NO.

Dans les tissus du cœur, l'ET augmenterait la contractilité ainsi que le débit cardiaque (Doherty *et al.*, 1992). Récemment, il a aussi été montré que suite à un infarctus du myocarde, le système ET serait bénéfique à la réparation tissulaire et au rétablissement des fonctions cardiaques (Ivy *et al.*, 2001). Il a aussi été observé que la libération soutenue d'ET-1 induisait l'angiogénèse (Cruz *et al.*, 2001). En plus d'avoir des effets constricteurs au niveau des vaisseaux sanguins, l'ET est aussi un puissant bronchoconstricteur et est capable d'induire la constriction des muscles lisses de l'intestin, de la trachée et de l'utérus (Doherty *et al.*, 1992).

Le système endothéline est également d'une grande importance dans le développement embryonnaire et néonatal. Entre autres, les gènes codant pour ET-1, ET_A et ECE-1 seraient impliqués dans le développement des structures cranio-faciales et dans le système d'éjection cardiaque dérivé des crêtes neurales. Des expériences avec des souris n'ayant pas de gènes fonctionnels soit pour ET-1, ECE-1 ou ET_A ont montré que ces éléments étaient nécessaires au stage E10 pour un développement normal de la crête neurale. Il y aurait également un dysfonctionnement artériel chez ces souris déficientes (Kurihara *et al.*, 1995; Clouthier *et al.*, 2000). De plus, les gènes pour ET-B, ET-3 et ECE-1 auraient également un rôle à jouer dans le développement embryonnaire. La suppression de ces gènes mène à un défaut de pigmentation dû à l'absence de mélanocytes et à un dérèglement intestinal, qui provoque la mort des animaux (Baynash *et al.*, 1994).

L'homéostasie rénale est aussi en partie régulée par le système endothéline. En effet, l'ET influe entre autres sur l'excrétion d'eau, de sodium et sur la libération de rénine. Également, la vitesse de filtration par le glomérule ainsi que le flux sanguin rénal seraient ralentis grâce à l'ET (Doherty *et al.*, 1992).

Dans le système reproducteur, il y aurait une interaction entre la progestérone, les prostaglandines et l'ET dans la physiologie du corpus luteum. En effet, il a été montré que les cellules lutéales produisaient de l'ET et contrôlaient la production de progestérone (Miceli *et al.*, 2001).

En somme, le système ET est essentiel dans une multitude de mécanismes, il va de soi que son dysfonctionnement l'implique dans diverses maladies, telles l'hypertension, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, l'insuffisance rénale, l'ischémie du myocarde, l'asthme, l'angiogénèse tumorale, etc. (Pinet, 2004; Matco et Artinano, 1997).

2. Les récepteurs de l'ET

2.1 Les récepteurs de l'ET

L'endothéline agit via deux récepteurs qui appartiennent à la classe A de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), qui se caractérisent par 7 segments transmembranaires. Les deux récepteurs ont été clonés et identifiés comme ET_A (Hosoda *et al.*, 1991) et ET_B (Nakamuta *et al.*, 1991). Ils sont situés surtout dans les structures vasculaires, mais également dans différents tissus, dont entre autres le cœur, la rate, les reins, les voies respiratoires, le foie, le pancréas, l'utérus et le système nerveux central (Stjernquist, 1998). Il existe environ 68% de similitude entre les séquences des récepteurs ET_A et ET_B dont les parties les plus conservées sont dans les domaines transmembranaires (Karne *et al.*, 1993). Ces récepteurs ne se distinguent pas seulement par leur structure primaire, mais également par leur distribution et leurs différentes affinités et sélectivités pour les isoformes de l'ET. En effet, le récepteur ET_A possède une très grande affinité pour ET-1, soit environ 1000 fois plus élevée que pour ET-3, mais aussi une bonne affinité pour ET-2 (Hosoda *et al.*, 1991). Il est composé de 427 acides aminés chez l'homme, avec une masse moléculaire de 48 516 Da. On le retrouve surtout à la surface des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et l'activation de ce récepteur engendre une forte vasoconstriction de longue durée (Doherty, 1992) (Figure 3).

Le récepteur ET_B est pour sa part composé de 415 acides aminés (PM 46 901 Da) et il n'a pas de spécificité pour les différentes isoformes de l'ET (Sakamoto *et al.*, 1991). Son activation suite à la liaison de l'ET peut engendrer une vasodilatation ou une vasoconstriction. Deux sous-types de récepteurs sont donc existants mais leur différence est fonctionnelle et non structurale, puisqu'ils proviennent du même gène (Warner *et al.*, 1993). Ils ont été nommés ET_{B1} et ET_{B2}, le premier étant présent à la surface des cellules endothéliales et induit une vasodilatation suite à une libération de NO. Le second entraîne quant à lui une vasoconstriction, mais de plus faible durée que le récepteur ET_A et se situe principalement sur les cellules musculaires lisses (Doherty, 1992) (Figure 4).

Il existerait un autre type de récepteur, le récepteur ET_C, qui n'a par contre jamais été cloné chez l'humain. Il a été découvert chez la grenouille (*Xenopus laevis*) et semble avoir une plus forte affinité pour l'isoforme ET-3 que pour ET-1 et ET-2 (Karne et al., 1993).

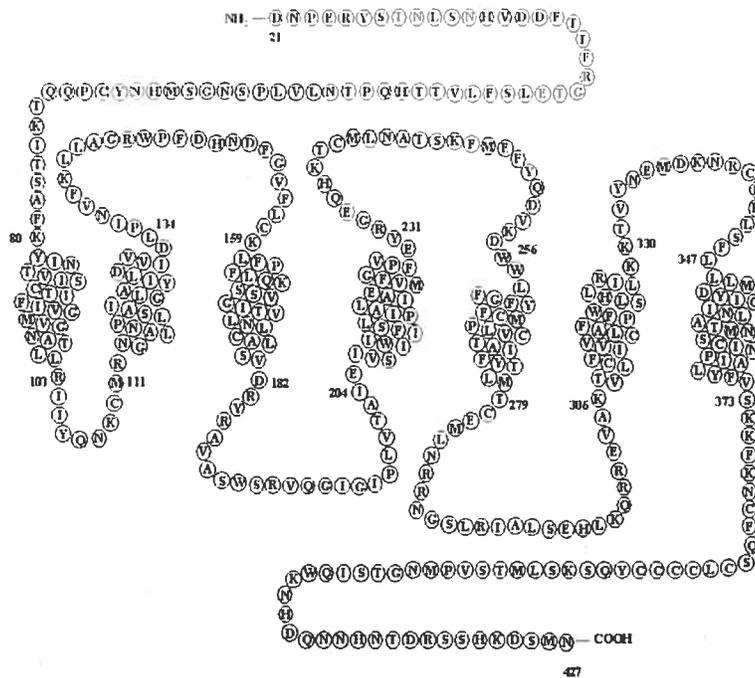


Figure 3 : Structure primaire du récepteur ET_A humain de l'ET.

2.2 Domaine de liaison des récepteurs de l'ET

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), entre autres les récepteurs de l'ET, partagent diverses caractéristiques, dont sept domaines transmembranaires formant des hélices- α reliées par trois boucles extracellulaires ainsi que le même nombre de boucles intracellulaires. La liaison d'un agoniste provoque un changement de conformation ainsi que l'activation d'une protéine G et peut ainsi induire une réponse cellulaire. Ces similarités dans la structure secondaire suggèrent un mécanisme commun de liaison et d'activation des GPCRs. Des dysfonctionnements de ces mécanismes sont à la base de certaines maladies. Or, cibler les GPCRs pour des interventions thérapeutiques est de plus en plus utilisé et d'ailleurs, plus de 50% des médicaments agissent comme antagonistes de cette famille de récepteurs (Baldwin *et al.*, 1997). Le mouvement des domaines transmembranaires est à la source de l'activation des protéines G suite à la liaison des ligands sur les récepteurs. Cependant, le contact du ligand et du domaine transmembranaire n'est pas nécessaire à l'initiation des mouvements de ceux-ci, mais le contact du ligand sur les boucles extracellulaires est requis.

Un autre trait commun des GPCRs est l'importance de l'interaction intramoléculaire entre la boucle extracellulaire où est liée le ligand et le domaine transmembranaire. La liaison du ligand provoque une déformation de la boucle extracellulaire et s'ensuit un mouvement des domaines transmembranaires, qui activeront la protéine G (Karnik *et al.*, 2003). Plusieurs études ont été réalisées sur les récepteurs de l'ET pour déterminer les éléments clés nécessaires à l'activation de ceux-ci. Les informations obtenues de ces études ainsi que les informations sur les GPCRs permettent de mieux comprendre les mécanismes de liaison et d'activation.

Ainsi, des études sur les récepteurs de l'ET ont montré que certaines régions des récepteurs semblent être importantes pour la sélectivité des ligands. En effet, les résultats du groupe de Masaki suite à la construction de récepteurs chimères suggèrent que l'on pourrait visualiser les récepteurs de l'ET en deux parties distinctes, soit les domaines transmembranaires IV et VI et leurs boucles extracellulaires adjacentes ainsi que les TM I, II, III et VII et leurs boucles extracellulaires voisines. La première partie des récepteurs déterminerait la sélectivité des ligands, puisque des agonistes spécifiques à ET_B, tels IRL-1620 et BQ3020 se lient à des récepteurs ET_A chimères qui possèdent les TM I et VI des récepteurs ET_B. Aussi, les récepteurs ET_B auxquelles ont été insérés les domaines transmembranaires IV et VI de ET_A lient le BQ-123, un antagoniste spécifique à ET_A. La seconde partie des récepteurs jouerait quant à elle un rôle dans la liaison du ligand sur le récepteur ainsi que dans la transmission du message (Masaki *et al.*, 1999).

Encore avec les récepteurs chimères, il a été démontré que la substitution de la première boucle extracellulaire du récepteur ET_A par le domaine équivalent de ET_B diminuait de façon importante l'affinité de BQ-123, ce qui suggère que cette boucle du récepteur ET_A est impliquée dans la liaison du ligand (Adachi *et al.*, 1992). Peu de temps après, cette même équipe a montré que les acides aminés 140 à 144 seraient nécessaires à la liaison du ligand (Adachi *et al.*, 1993) et que si la Lys¹⁴⁰ est remplacée par une Ile, la liaison de l'ET-1 est grandement diminuée. Cette même mutation empêcherait également une interaction efficace avec la protéine G, car la concentration calcique intracellulaire n'augmente pas suite à la liaison du ligand (Adachi *et al.*, 1994). Des études plus récentes de modélisation moléculaire sur le récepteur ET_A montrent encore une fois que les résidus 132 à 156 sont très importants pour la liaison et que plus particulièrement, les chaînes latérales des résidus Leu¹⁴², Phe¹⁵³ et Phe¹⁵⁶ seraient en interaction directe avec les acides aminés Leu¹⁷, Asp¹⁸ et Trp²¹ de l'endothéline (Orry et Wallace, 2000). La première boucle extracellulaire semble donc avoir un rôle majeur dans la liaison du ligand. Cette interaction pourrait être importante dans l'activation des mouvements des domaines transmembranaires typiques des GPCRs (Karnik *et al.*, 2003).

Des études sur les récepteurs tronqués ont aussi ciblé des domaines importants pour l'activation des récepteurs. En effet, les résultats de l'équipe de Hashido montrent qu'une partie du domaine N-terminal à proximité du TM I est requis pour l'activation du récepteur ET_A, puisque la délétion de celle-ci mène à une perte de réponse cellulaire (Hashido *et al.*, 1992). Certaines études de mutagénèse dirigée ont montré qu'il est possible d'empêcher la formation du complexe ligand récepteur seulement en altérant un acide aminé, en autant qu'il soit impliqué dans le domaine de liaison. Entre autres, le remplacement de la Tyr¹²⁹ empêche une bonne liaison entre le récepteur ET_A et l'ET (Krysek *et al.*, 1994). De plus, la mutation des acides aminés que l'on retrouve dans les domaines transmembranaires, soit Gly⁹⁷, Lys¹⁴⁰, Lys¹⁵⁹, Gln¹⁶⁵ et Phe³¹⁴ sont d'une grande importance dans le processus de liaison sur ET_A (Breu *et al.*, 1995). Il semble donc que les domaines transmembranaires pourraient jouer un rôle important lors de la liaison du ligand. Des études de marquage par affinité sont aussi venues montrer très récemment que le TM V, soit entre les acides aminés Trp²⁵⁷ et Met²⁷⁸, est important pour la liaison de TTA-386, un antagoniste spécifique à ET_A (Tessier *et al.*, 2005).

En ce qui concerne le récepteur ET_B, les TM IV et VI ont aussi été montrés comme étant importants pour la sélectivité du ligand (Sakamoto *et al.*, 1992). La technique de photomarquage a confirmé l'importance du TM V pour la liaison, puisque les acides aminés Trp²⁷⁵-Met²⁰⁶, ont été identifiés comme le site de liaison d'un agoniste spécifique à ET_B, l'IRL-1620 (Boivin *et al.*, 2004). Une autre étude a cependant pointé comme site de liaison de l'ET une région de 60 acides aminés, des résidus Ile¹³⁷ à Ile¹⁹⁷ (Wada *et al.*, 1995). Les études de Rose et son équipe sont venues corroborer l'importance de cette région en déterminant que l'Asp¹⁴⁷, un acide aminé très conservé dans les récepteurs couplés aux protéines G, est essentiel à l'activation du récepteur ET_B (Rose *et al.*, 1995). Toujours à l'intérieur du segment identifié par Wada, il avait déjà été démontré que le remplacement de la Lys¹⁸² permettait la liaison du ligand mais non l'activation du récepteur (Zhu *et al.*, 1992). Cette portion du récepteur, comprise dans le TM II semble donc jouer un rôle important lors du processus de liaison.

La mutagénèse dirigée a montré que comme dans le cas du récepteur ET_A, une région en N-terminal à proximité du TM I était nécessaire pour une bonne liaison du ligand sur le récepteur ET_B. En effet, une portion de 29 acides aminés en N-terminal serait nécessaire au récepteur pour assurer une stabilité suite à la liaison du ligand. Plus spécifiquement, ce sont les résidus Asp⁷⁵ et Pro⁹³ qui jouerait ce rôle stabilisateur dans le complexe ligand-récepteur. Cette région du récepteur ne serait pas en contact avec le ligand, mais serait en interaction avec le site de liaison pour la stabilisation (Takasuka *et al.*, 1994). Selon la structure cristalline du récepteur de la rhodopsine, ce segment serait en association avec les boucles extracellulaires 1, 2 et 3 pour former une structure compacte stabilisatrice (Teller *et al.*, 2001).

Le segment N-terminal étant important pour la stabilisation du complexe ligand récepteur, celui en C-terminal est quant à lui important pour l'activation du récepteur. En effet, l'ablation des résidus suivant la Cys⁴⁰² engendre un récepteur actif alors que si la Cys⁴⁰² est elle aussi enlevée, le récepteur perd toute son activité (Koshimizu *et al.*, 1995). De plus, des mutations dans le TM VII entraînent des pertes d'activité, suggérant une implication de ce domaine dans l'activation du récepteur (Vichi *et al.*, 1999).

2.3 Voie de signalisation de l'ET

Les récepteurs ET_A et ET_B, suite à la liaison de l'ET, se lient à une protéine G, ce qui a pour effet d'activer de la phospholipase C. Cette dernière hydrolyse alors le phosphatidyl inositol en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). L'IP₃ va permettre la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire (qui provient du réticulum sarcoplasmique), induisant ainsi une augmentation intracellulaire de cet ion. Cette augmentation intracellulaire initiale va induire l'ouverture des canaux calciques dans la membrane et ainsi permettre une entrée massive de Ca²⁺ extracellulaire pour induire une contraction. Au même moment, le DAG va activer la protéine kinase C (PKC) qui induit aussi une contraction (Simonson et Dunn, 1990) (Figure 5)

Il a été montré que l'activation de la phospholipase C (PLC) provenait de la liaison des récepteurs à une protéine G_q . Cependant, il a aussi été observé que l'activation des récepteurs pouvait également réguler l'adénylyl cyclase via une liaison à des G_s et G_i (Takigawa *et al.*, 1995). Les domaines intracellulaires des récepteurs seraient déterminant pour la liaison de l'une ou l'autre des protéines G. En effet, la seconde boucle intracellulaire du récepteur ET_A est responsable de la liaison à une G_q , tandis que la troisième boucle intracellulaire de ET_B dicte la liaison à une G_i . Les sites de palmytoylation joueraient également un rôle dans le choix de la protéine G (Takagi *et al.*, 1995)

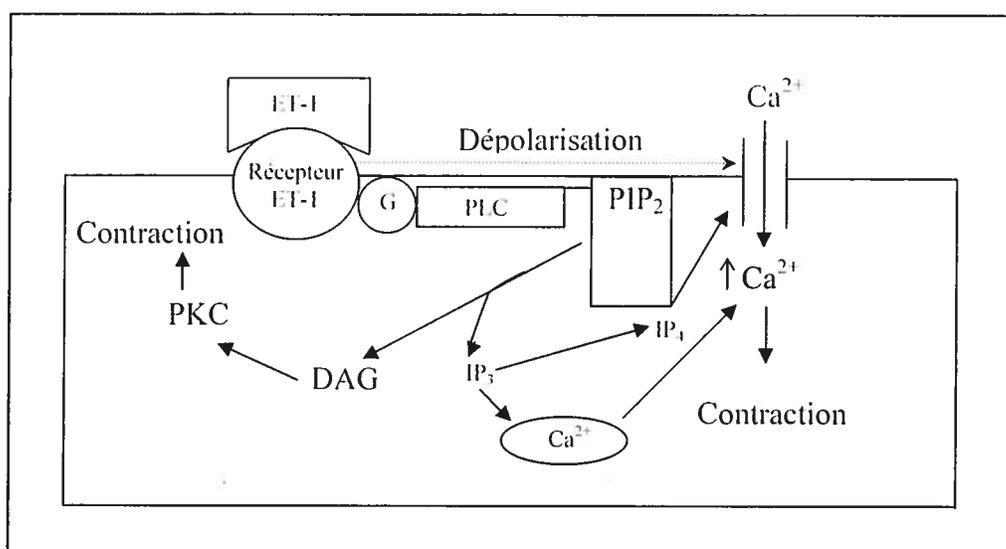


Figure 5 : Voie de signalisation de l'ET sur les cellules musculaires lisses, induisant une contraction (Mateo et De Artñano, 1997) .

Bien que l'action de l'endothéline soit assez prolongée, plusieurs études ont montré une désensibilisation rapide des récepteurs de l'ET. Le complexe ligand-récepteur activé serait phosphorylé par une kinase (GPCR kinases), pour ainsi débiter le processus de désensibilisation. (Freedman *et al.*, 1997). Plus récemment, Bremnes et son équipe ont démontré que cette désensibilisation était associée à une internalisation des récepteurs. Ceux-ci seraient ainsi internalisés via un mécanisme dépendant de l'arrestine, des clathrines et de la dynamine (Bremnes *et al.*, 2000).

Internalisés, les récepteurs de l'ET prennent ensuite deux voies distinctes. Pour démontrer ces deux voies, les récepteurs de l'ET ont été marqués à la GFP (*green fluorescent protein*) pour ainsi pouvoir suivre par microscopie à fluorescence leurs destinations intracellulaires. Il a donc été démontré que ET_A et ET_B sont internalisés dans des puits recouverts de clathrines, pour ensuite être dirigés dans un même endosome de triage (*sorting endosome*). Ces endosomes sont en fait une structure tubulovésiculaire qui permet de séparer les protéines membranaires destinées au recyclage de celles vouées à la dégradation. Par la suite, les récepteurs ET_A sont envoyés dans un compartiment de recyclage et sont vite renvoyés à la membrane plasmique, tandis que le récepteur ET_B prendra le chemin de la dégradation par les lysosomes (Figure 6). Ce recyclage vient ainsi expliquer l'effet de longue durée de ET-1 via les récepteur ET_A. De plus, le fait que ET-1 se lie presque irréversiblement aux récepteurs ET_B et que ce complexe soit directement dégradé par les lysosomes suggère un mécanisme de clairance de ET-1 dans le plasma par les récepteurs ET_B (Bremnes *et al.*, 2000).

Certains chercheurs avaient supposé que la partie C-terminale des récepteurs serait impliquée dans la voie utilisée par ceux-ci après l'internalisation. En effet, une étude a montré que la présence de résidus sérines en C-terminal des GPCRs stabiliserait la liaison avec l'arrestine (qui provoque l'internalisation). Ce serait cette stabilisation qui dicterait l'envoi des récepteurs aux endosomes pour une dégradation (Oakley *et al.*, 1999). Les récepteurs seraient recyclés si la liaison à l'arrestine n'était pas stabilisée. Plus récemment, il a été observé qu'une séquence du récepteur ET_A, soit les acides aminés 390 à 406 permettait de renvoyer celui-ci à la membrane plasmique (Paasche *et al.*, 2005).

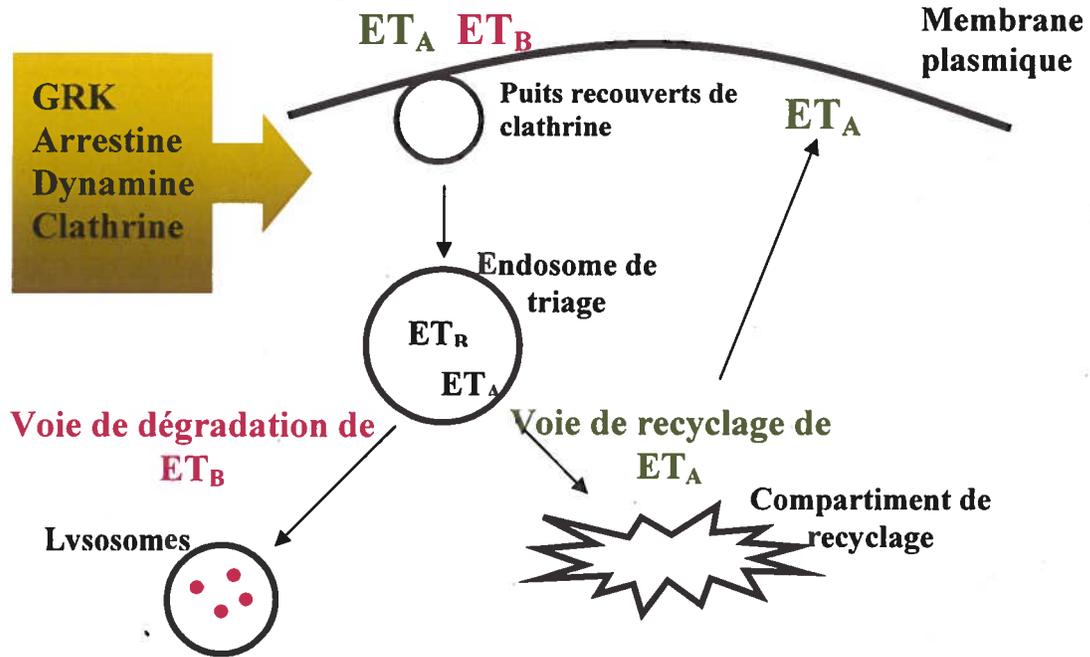


Figure 6. Internalisation des récepteurs (Figure tirée de Bremnes et al., 2000)

2.4 Dimérisation des récepteurs

Depuis le clonage des récepteurs de l'ET, plusieurs informations quant à la signalisation cellulaire, l'internalisation de ceux-ci, les éléments clés des domaines de liaison ainsi que d'activation ont été obtenues. Cependant, les mécanismes de reconnaissance du ligand ainsi que la liaison de celui-ci sur ces récepteurs demeurent encore obscures. L'équipe de Sakamoto avait déjà en 1993 élaboré un modèle hypothétique selon lequel l'ET se liait sur ces récepteurs de façon bivalente. Selon ce modèle, sur le récepteur ET_A, la partie N-terminale de l'ET (*N-terminal adress domain*) se liait aux domaines transmembranaires IV, V et VI et la partie C-terminale (*C-terminal sequence message*) se liait sur les autres domaines transmembranaires. À l'opposé, ET_B ne reconnaît que la partie C-terminale de l'ET sur les domaines transmembranaires I, II, III et VII. Plus tard, il a été montré par l'équipe de Fukuroda que le traitement des bronches isolées d'humain avec BQ-123 et BQ-788 (antagoniste ET_A et ET_B, respectivement) antagonisait la contraction de ces tissus, alors qu'aucune inhibition significative de la contraction n'était observée lorsque les antagonistes étaient utilisés seuls. En se basant sur le modèle de reconnaissance du ligand de Sakamoto, ces résultats suggèrent une collaboration des deux types de récepteurs dans la reconnaissance de l'ET. De plus, la découverte de dimérisation des récepteurs GABA ainsi que pour les récepteurs opiacés (Bouvier, 2001), appartenant respectivement à la classe A et C des GPCRs, a amené certaines équipes à se pencher sur la question de la dimérisation des récepteurs de l'ET, qui rappelons-le, appartiennent aussi à la classe A des GPCRs.

Des tests de compétition et de saturation sur les récepteurs ET_A et ET_B ont confirmé l'hypothèse d'hétérodimérisation de ceux-ci (Harada *et al.*, 2002). Tenant compte des informations déjà publiées, cette équipe a élaboré un nouveau modèle (Figure 7), où 1) ET-1 peut lier ET_A et l'hétérodimère avec une affinité similaire (Figure 7a), 2) En présence d'un composé comme la sarafotoxine, le récepteur ET_B lie celui-ci et est ainsi dissocié de ET_A et ensuite ET-1 peut lier ET_A (monomère) (Figure 7b), 3) En présence de BQ-123, le complexe ET_A-BQ123 se dissocie de ET_B et ensuite, ET-1 lie le récepteur ET_B (monomère) (Figure 7c), 4) En présence de BQ-123 et de sarafotoxine, ET-1 ne peut

lier l'un ou l'autre des récepteurs (Figure 7d).

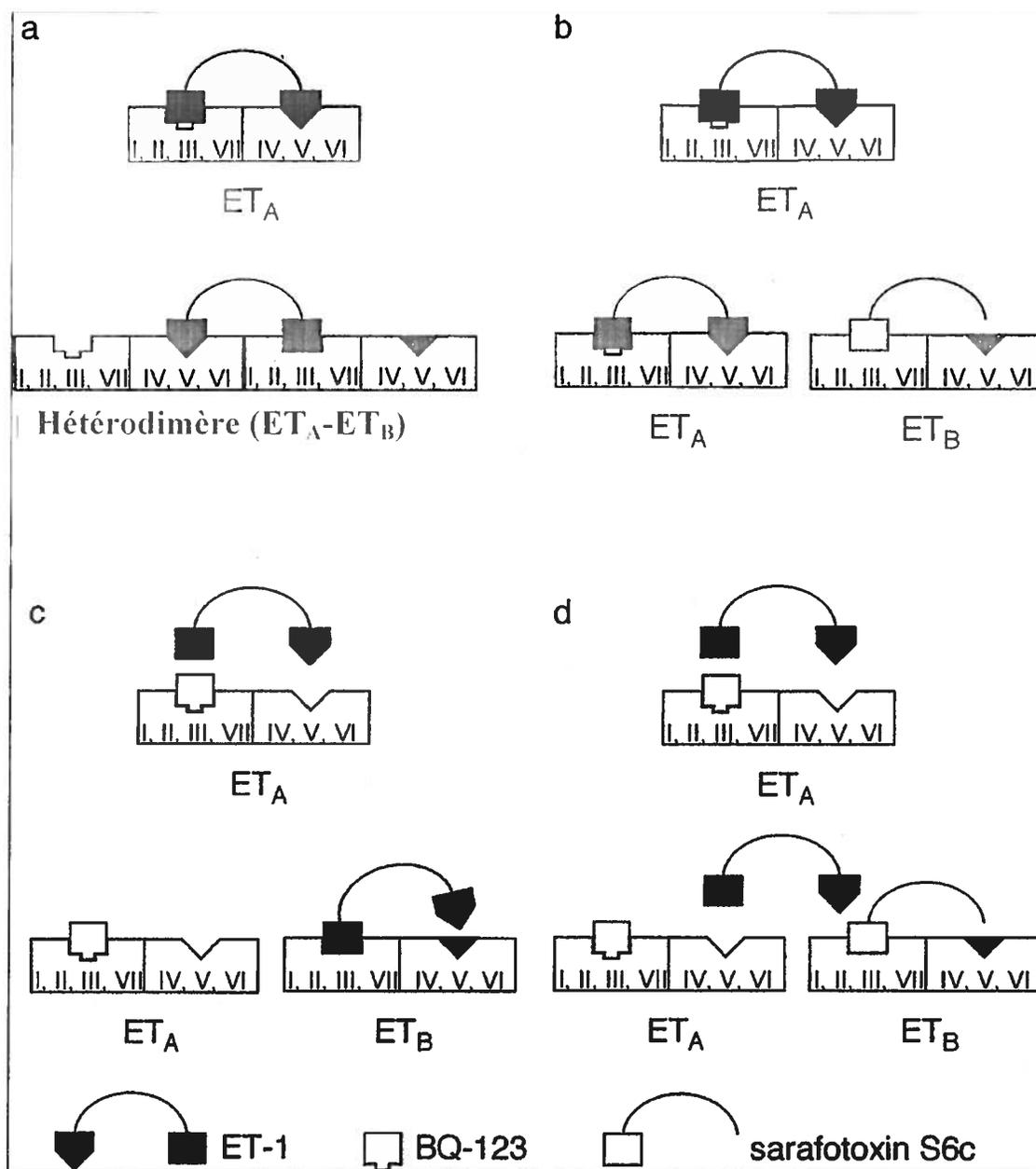


Figure 7. Interprétation possible de la liaison de l'ET-1 sur ces récepteurs selon les données obtenues par Harada et son équipe. A) liaison de ET-1, B) liaison de ET-1 en présence de la sarafotoxine C) liaison de ET-1 en présence de BQ-123 et D) liaison de ET-1 en présence de la sarafotoxine et de BQ-123. (Figure tirée de Harada *et al.*, 2002)

Des études de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), où les récepteurs étaient couplés à des protéines fluorescentes, ont par ailleurs confirmé peu de temps après l'hétérodimérisation des récepteurs. Cette étude a également montré que ces hétérodimères étaient présent de façon constitutive (Gregan *et al.*, 2004 a). Par les mêmes expériences, il a aussi été démontré que les récepteurs étaient également présents de façon constitutive, mais cette fois en association avec lui-même, pour former un homodimère (Gregan *et al.*, 2004 b).

3. La technique du photomarquage

3.1 Utilité du photomarquage

Le photomarquage, une technique faisant appel à la photochimie, est utilisé depuis plus de 40 ans afin d'obtenir de l'information sur les propriétés fonctionnelles et structurales des protéines et des peptides. Utilisant un ligand photoactivable, cette méthode permet entre autres d'identifier les cibles des ligands tels les peptides. Le marquage par photochimie mène aussi à l'identification des cibles d'un ligand impliqué dans une pathologie. Les informations ainsi obtenues rendent le développement de médicaments plus efficace. En effet, il sera plus facile de diminuer la toxicité et les effets secondaires d'un médicament en sachant les sites de liaisons des ligands et une meilleure connaissance de ces sites permettront ainsi d'élaborer un médicament avec une meilleure disponibilité.

Une fois ces cibles identifiées, les sondes photosensibles permettent l'identification du domaine de liaison d'un ligand sur ces récepteurs. Une fois la protéine marquée par le ligand photoactivable, une purification suivie du clivage du complexe et d'un séquençage de la région marquée informe sur le site de liaison du ligand.

De plus, le photomarquage permet l'étude tridimensionnelle des complexes ligands-protéines, et plus particulièrement la conformation de la pochette de liaison avec les acides aminés impliqués dans l'interaction et l'activation. En complémentarité avec des méthodes telles la résonance magnétique nucléaire, le dichroïsme circulaire et la modélisation moléculaire par ordinateur, il est maintenant possible d'obtenir des modèles 3D assez précis des cibles d'intérêt, avant et après le changement conformationnel induit par l'activation des récepteurs (Dorman et Prestwich, 2000).

3.2 Méthodologie générale

Bien que très utile, le photomarquage comprend cependant plusieurs étapes essentielles à l'obtention de bons résultats. Cette technique requiert le développement d'une sonde de haute affinité pour la protéine cible, à laquelle est ajouté un groupement photoactivable. Le développement de cette sonde se fait en tenant compte des études de structure-fonction réalisées avec le ligand. Si aucune étude de ce genre n'a été faite antérieurement, il est nécessaire de discriminer les éléments importants de la molécule. Ainsi, l'insertion du groupement photosensible à l'intérieur du ligand ne doit pas altérer de façon significative l'affinité sur la molécule cible.

Une fois la sonde photolabile synthétisée, la méthode consiste à mettre celle-ci en présence de la protéine cible pour la formation d'une liaison non-covalente. Par la suite, une irradiation de ce complexe permet l'activation du groupement photosensible formant ainsi un lien covalent entre ce dernier et son environnement rapproché. La protéine maintenant liée à la sonde peut alors être purifiée par gel de polyacrylamide. Des digestions chimiques et/ou enzymatiques sont par la suite utiles pour cliver le complexe ligand-récepteur et ainsi permettre l'identification de la région marquée (Figure 8). Une séparation sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante est nécessaire, ce qui permet de déterminer la masse du fragment photomarké et la région marquée peut être séquencée par spectrométrie de masse ou par la dégradation d'Edman.

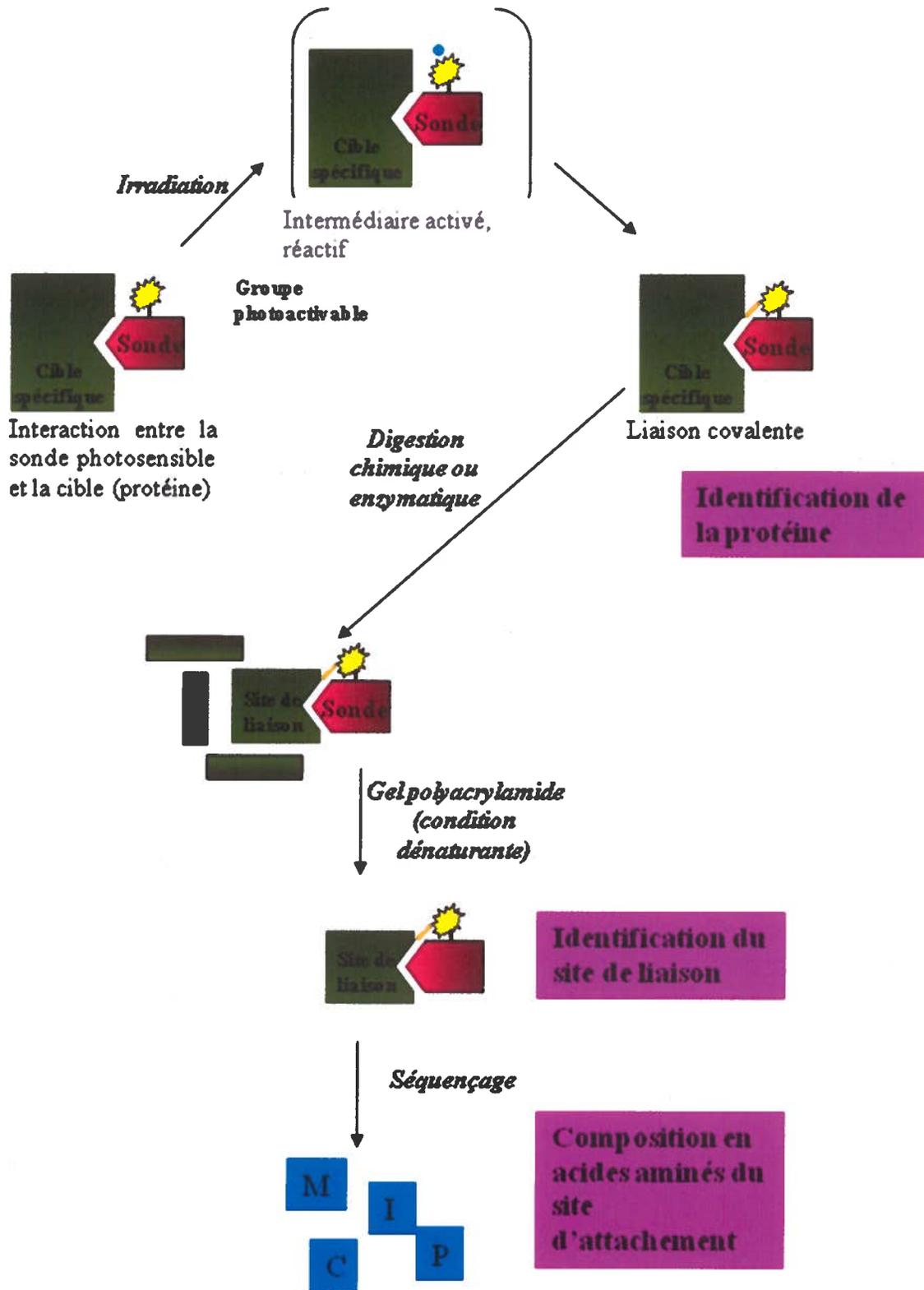


Figure 8. Principe général de la technique de photomarquage (Tiré et adapté de Dorman et Prestwich, 2000)

3.3 Les groupements photoactivables

Il existe différents groupements photoactivables pouvant être utilisés pour le photomarquage. Le choix de ce dernier doit cependant satisfaire quelques critères importants. La forme activée de la molécule photosensible qui sera introduite dans la séquence primaire du ligand doit premièrement être très réactive avec des C-H préférentiellement au lien X-H. De plus, il ne doit pas y avoir de réarrangement intramoléculaire au moment de l'activation du groupement. En effet, les molécules instables peuvent parfois faire ce type de réarrangement pour se stabiliser. Le produit intermédiaire suite à l'activation doit donc avoir un temps de vie plus court que le temps que prend le complexe ligand-récepteur pour se dissocier, mais assez long pour que le lien covalent se forme avec le récepteur, sans qu'il y ait un réarrangement intramoléculaire (Brunner, 1993).

Les groupements photoactivables doivent être assez petits pour limiter l'encombrement stérique. Ils doivent également être stables en absence de lumière ou de préférence à la lumière ambiante, et hautement réactifs à une longueur d'onde qui sera non destructrice pour les échantillons biologiques.

Finalement, l'activation par l'irradiation doit permettre la formation d'un produit stable qui pourra facilement être isolé, purifié et analysé (Dorman et Prestwich, 2000).

La plupart des réactifs élaborés pour le photomarquage sont basés sur la chimie des nitrènes (les azides), des carbènes (diazirines et composés diazos) ou des radicaux (benzophénones).

3.4 Les benzophénones

Parmi les différentes classes de groupements chimiques utilisés pour le photomarquage, les benzophénones (BP) sont très populaires et selon Dorman et Preswitch, seraient les plus performants. En effet, ils sont très utiles car ils sont stables dans les solvants protiques et assez stables à la lumière ambiante. De plus, une fois activés, ils forment des liens seulement avec les carbones se trouvant dans un environnement très rapproché, soit de 3,1 Å, ce qui diminue la liaison à des cibles non spécifiques. Aussi, leurs formes activées est très réactives, permettant au lien covalent entre le ligand et le récepteur de se faire rapidement et leur activation est obtenue à une longueur d'onde d'environ 350-360 nm, ce qui est non dommageable pour les échantillons (Dorman et Prestswitch, 2000; Weber et Beck-Sickinger, 1997).

L'activation des groupements BP s'obtient selon un mécanisme radicalaire bien connu. L'irradiation des BP brise le lien entre les électrons de l'oxygène et du carbone du groupement cétone de la molécule pour générer un carbone et un oxygène radicalaires $[C^{\bullet}-O^{\bullet}]$. Cet intermédiaire très réactif va maintenant pouvoir réagir avec son environnement, préférentiellement avec les liens $C^{\alpha}-H$ des protéines pour former un lien C-C. Le ligand est ainsi lié de façon covalente à la protéine d'intérêt (Dorman et Prestswitch, 1994) (Figure 9).

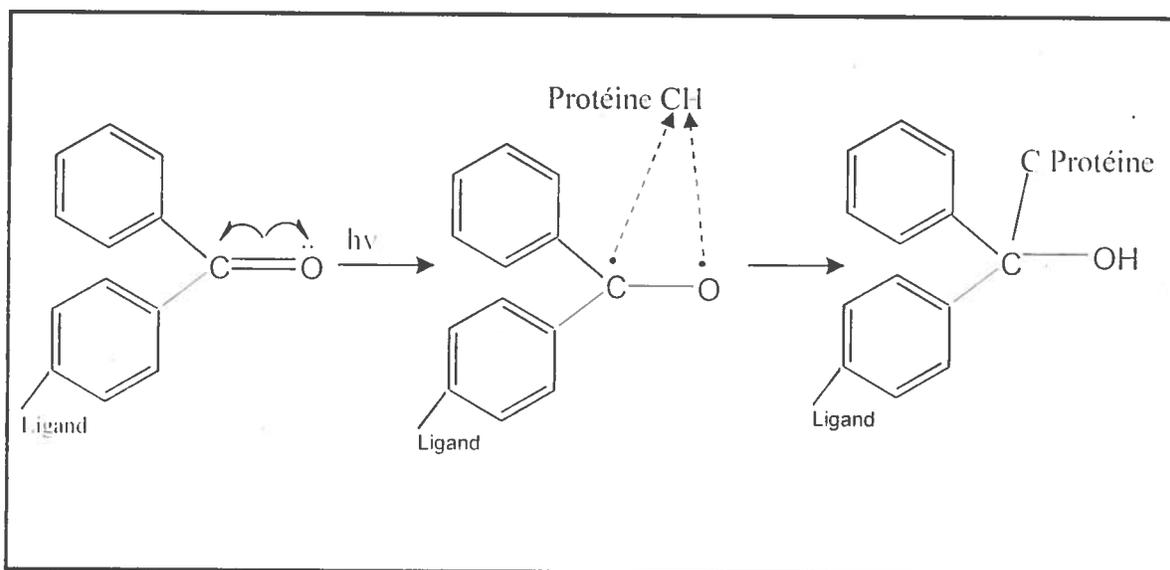


Figure 9. Mécanisme réactionnel des BP avec les protéines

Un des agents photosensibles très utilisés appartenant aux BP est le *p*-benzoyl-phénylalanine (Bpa) (Figure 10), qui a été développé par Kauer en 1986. Ce groupement photosensible, ressemblant à une phénylalanine substituée est très avantageux, car il peut être incorporé de la même manière qu'un acide aminé lors de la synthèse peptidique du ligand en phase solide. Récemment, ce groupement a été modifié (*p*-(5-hydroxybenzoyl)phénylalanine) et permet d'introduire un atome d'iode directement sur la molécule photoactivable. La présence d'une tyrosine à l'intérieur du ligand n'est maintenant plus requise pour le radiomarquage à ^{125}I de celui-ci (Wilson et al., 1997).

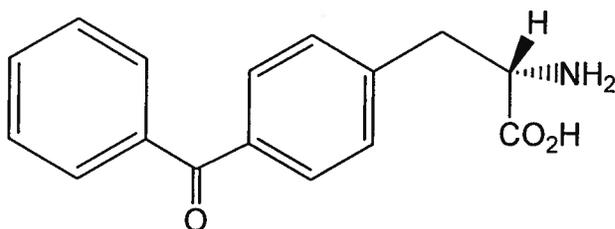


Figure 10. Représentation de la structure du *p*-benzoylphénylalanine (Bpa).

Les benzophénones sont très efficaces et très utiles mais comportent quand même un inconvénient non négligeable. La densité électronique du carbone β de l'acide aminé à proximité du BP influence grandement la réactivité avec le BP. En effet, la présence d'un hétéroatome tertiaire ayant une haute densité électronique affaiblit le lien C-H, qui réagira plus facilement avec le radical de la forme activée du BP. La lysine, la méthionine et l'arginine comportent des hétéroatomes tertiaires et augmentent la probabilité de liaison avec ces acides aminés. L'ordre de réactivité des BP avec les -H d'une protéine donneuse est : $\text{NCH} > \text{SCH} > \text{C}=\text{CH}_2 > -\text{CH}_2- > \text{CH}_3$ (O'Neil *et al.*, 1989). Ainsi, plusieurs études ont montré un ratio élevé de liaison avec des méthionines (Li *et al.*, 1995 ; Kage *et al.*, 1996 ; Bisello *et al.*, 1998 et Bremer *et al.*, 2001).

De façon intéressante, cette réactivité sélective a été exploitée avec la mise au point d'une technique nommée *Methionine Proximity Assay* (MPA). Celle-ci consiste à introduire par mutagenèse dirigée des méthionines dans la portion du récepteur soupçonnée d'être impliquée dans le processus de liaison. L'agent photosensible utilisé pour cette méthode est un analogue du Bpa, c'est-à-dire le *p,p'*-nitrobenzoylphénylalanine (NO_2Bpa), qui possède une plus forte affinité pour les méthionines. Ainsi, ce groupement photoactivable ne liera la protéine cible que si une méthionine se trouve à proximité de celui-ci. Des méthionines introduites à différents endroits dans la portion où se lie le ligand permettent ainsi d'identifier le point de contact exact entre le ligand et le récepteur (Rihakova *et al.*, 2002).

3.5 L'endothéline et le photomarquage

Peu d'études de photomarquage ont été réalisées avec les récepteurs de l'endothéline. En fait, seulement quatre études utilisant des sondes photosensibles ont été faites sur ces récepteurs. Les deux premières études étaient dans le but de découvrir des récepteurs sur lesquels l'endothéline pouvait agir et ce, sur différents tissus de mammifères (Schvartz *et al.*, 1990 ; Kundu et Misono, 1991). L'équipe de Kundu a introduit un groupement azidobenzoyl sur la chaîne latérale de la lysine (position 9) de l'ET. Une fois radiomarquée, cette sonde a été incubée avec des préparations membranaires pulmonaires de bœuf ou de rat. L'irradiation subséquente à la lumière UV a permis à l'ET de se lier de façon covalente à des protéines membranaires (les récepteurs). L'analyse électrophorétique de ces préparations membranaires a permis l'identification d'une bande dont le poids apparent était de 34 kDa. Cette bande était cependant absente, si l'irradiation était précédée d'une incubation avec de l'ET non-radiomarquée, suggérant que la liaison était spécifique (Kundu et Misono, 1991). Les résultats de cette équipe venaient corroborer ceux obtenus peu de temps auparavant par d'autres chercheurs. Ceux-ci avaient utilisé des protéines membranaires de cerveau de rat et avaient découvert deux protéines ayant un poids moléculaire de 52 et 30 kDa. Ils ont ensuite démontré par protéolyse que la bande de plus faible poids moléculaire était en fait un produit de dégradation de la plus grosse protéine. Le poids des récepteurs de l'ET était donc de 50 kDa et non pas 30 kDa (Schvartz *et al.*, 1990).

Plus récemment, le photomarquage des récepteurs de l'ET est venu apporter des informations supplémentaires sur le domaine de liaison de ceux-ci. En effet, des travaux réalisés dans nos laboratoires ont démontré que l'IRL-1620, un agoniste sélectif à ET_B, se lie sur le 5^e domaine transmembranaire (Boivin *et al.*, 2004), une portion déjà suggérée par l'équipe de Sakamoto (1993). De plus, il a aussi été montré qu'un antagoniste sélectif de ET_A, TTA-386 se lie au 5^e domaine transmembranaire de ET_A. C'était la première fois que cette portion du récepteur ET_A était pointé comme site de liaison (Tessier *et al.*, 2005).

4. ARTICLE

4.1 Contribution de l'auteur à l'article

Tous les résultats présentés dans l'article de ce mémoire ont été obtenus à la suite d'expériences que j'ai menées au cours de mes deux années de recherche dans le cadre du programme de Maîtrise en sciences expérimentales de la santé sous la supervision du Pr Alain Fournier.

Pour débiter le projet, j'ai choisi, en me basant sur la littérature portant sur la structure-activité de l'endothéline, les positions où l'insertion d'un groupement photosensible serait bénéfique pour le projet, tout en minimisant l'influence sur l'activité du peptide. Par la suite, j'ai synthétisé les douze analogues par synthèse chimique en phase solide. Cette étape a ensuite requis la purification et la cyclisation des peptides synthétiques. J'ai ensuite fait l'évaluation pharmacologique des analogues sur deux préparations, soit l'aorte de rat ainsi que le parenchyme pulmonaire de cobaye et l'évaluation de l'affinité par des tests de compétition sur des cellules transfectées. Ces cellules ont été mises à la disposition du laboratoire par la compagnie Euroscreen. J'ai ensuite fait le photomarquage de deux sondes ($[L\text{-Bpa}^7, \text{Tyr}^{(125)\text{I}}]^{13}\text{hET-1}$ et $[L\text{-Bpa}^{12}, \text{Tyr}^{(125)\text{I}}]^{13}\text{hET-1}$) pour déterminer au moyen de clivages enzymatiques et chimiques le domaine de liaison sur les deux types de récepteurs de l'endothéline. J'ai finalement rédigé le manuscrit avec l'aide des co-auteurs.

4.2 Contribution des autres auteurs

Myriam Létourneau a contribué aux travaux en m'initiant aux techniques de synthèse peptidique, de purification de peptides ainsi que de caractérisation pharmacologique. Elle m'a aussi guidée sur le choix des stratégies de synthèse des peptides. Myriam a également révisé l'article.

Emmanuelle Bugeon a développé les cellules CHO surexprimant les récepteurs de l'endothéline.

Alain Fournier m'a quant à lui dirigé lors de ces deux années de recherche et a révisé l'article.

4.3 Résumé de l'article

En se basant sur la structure de l'endothéline comme modèle, une série de 12 analogues photosensibles a été développée afin d'étudier les domaines de liaison des récepteurs ET_A et ET_B. Pour ce faire, le résidu p-hcn7oyi-L-phénylalanine (Bpa) a été introduit à différents endroits dans la chaîne peptidique de l'ET. Ainsi, parmi les analogues synthétisés, deux ont montré une capacité à activer les deux récepteurs de l'ET, soit les analogues contenant le Bpa en position 7 ([L-Bpa⁷, Tyr^{125,131}]¹¹hET-1) et 12 ([Nle⁷, L-

Bpa¹², Tyr^{125,131}]¹¹hET-1), suggérant ainsi que ces résidus ne jouent pas un rôle primordial dans le processus d'activation des récepteurs. L'affinité des sondes a aussi été évaluée sur des cellules CHO transfectées surexprimant le récepteur ET_A ou ET_B. De plus, ces cellules ont été utilisées pour photomarquer les récepteurs ET_A et ET_B suite à la liaison des sondes choisies. Des clivages enzymatiques et chimiques ont été effectués sur les complexes ligand-récepteur et les fragments obtenus ont ensuite été analysés pour définir la région d'interaction sur les récepteurs. Les résultats ont montré que le segment Phe¹⁴⁷-Lys¹⁴⁸ situé essentiellement dans la 1^{ère} boucle extracellulaire, contient lors de la liaison un point de contact pour la sonde [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr^{13,125,131}]¹¹hET-1 sur les récepteurs ET_A alors que le segment Ile⁹⁷-Trp¹⁰⁹ contenant le 6^{ème} domaine transmembranaire peut interagir avec [L-Bpa⁷, Tyr^{13,125,131}]¹¹hET-1. De plus, les acides aminés Thr²¹³-Met²¹⁴, situés dans la 2^e boucle extracellulaire du récepteur ET_B, viendrait à proximité du ligand [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr^{13,125,131}]¹¹hET-1 lors de la liaison.

4.4 Article soumis dans la revue Biochimie

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Biochimie, 2008 Jun;90(6):918-29.

Identification of ETA and ETB binding domains using ET-derived photoprobes.

Aubin J, Létourneau M, Francoeur E, Burgeon E, Fournier A.

doi: 10.1016/j.biochi.2008.02.015.

5. Discussion

L'endothéline possède de multiples actions physiologiques, entre autres au niveau du système cardiovasculaire où elle agit comme un puissant vasoconstricteur. Cette caractéristique la met par conséquent en lien avec diverses pathologies, comme par exemple l'hypertension et l'ischémie. L'étude des pharmacophores de ce peptide ainsi que l'étude de ses récepteurs sont donc des domaines importants de recherche depuis sa découverte dans les cellules endothéliales. Une bonne compréhension de l'interaction entre le peptide et ses récepteurs et l'identification des résidus clés participant à la formation de ce complexe sont évidemment primordiaux pour développer de nouveaux agents thérapeutiques. Une technique bien connue pour étudier l'interaction récepteur-ligand est le photomarquage. La caractérisation du domaine de liaison des deux récepteurs de l'endothéline a déjà été amorcée par cette technique en utilisant des agonistes et des antagonistes (Tessier *et al.*, 2005, Boivin *et al.*, 2004). Nous avons donc décidé de poursuivre les études de photomarquage sur les récepteurs ET_A et ET_B, mais cette fois-ci au moyen de dérivés très proches de la molécule endogène.

La technique du photomarquage requiert l'insertion d'un groupement photoactivable dans un ligand. Or, plusieurs types de groupements photoactivables sont disponibles dont les azides, les sels de diazonium, les composés diazo, les diazirines et les benzophénones. Notre choix s'est arrêté sur un benzophénone, soit le *p*-benzoyl-L-phénylalanine (Bpa). L'avantage de ce composé est sa compatibilité avec la synthèse peptidique en chimie acide- (Boc) ou base- dépendante (Fmoc). Il est donc facile d'incorporer ce résidu dans la chaîne d'acides aminés lors de la synthèse du peptide. De plus, l'activation du Bpa est obtenue à une longueur d'onde se situant entre 350-360 nm, ce qui permet de travailler à la lumière ambiante, sans risquer d'activer le résidu photosensible (Dorman et Preswitch, 1994). Pour notre étude, la synthèse peptidique en phase solide utilisant la chimie Boc a été utilisée pour produire les dérivés de l'endothéline. De façon inattendue cette étape s'est avérée ardue, entre autres à cause de nombreuses réactions de couplage d'acides aminés particulièrement difficiles à compléter. Ces problèmes ont eu pour effet de diminuer le rendement de synthèse des différentes sondes. Néanmoins, il a été possible

d'isoler tous les produits désirés par purification en CLHP préparative. Des études antérieures accomplies dans notre laboratoire avaient montré que les synthèses des divers analogues de l'ET étaient facilitées en utilisant plutôt la chimie Fmoc. Néanmoins, nous n'avons pas utilisé cette avenue et nous avons plutôt préféré le dérivé Boc-Bpa dont la disponibilité était garantie et le coût nettement inférieur au dérivé porteur d'un groupe Fmoc. Par contre, dans le futur, puisque le résidu photosensible Bpa est compatible avec les deux méthodes de synthèse, il serait probablement préférable d'utiliser la chimie Fmoc pour effectuer la synthèse d'autres sondes photosensibles de l'ET.

Le remplacement d'un acide aminé de l'ET par le résidu Bpa n'est pas nécessairement sans conséquence et il peut apporter des modifications physico-chimiques et contraintes structurales pouvant affecter les propriétés pharmacologiques du peptide. Afin de minimiser l'influence du Bpa sur l'activité et l'affinité de l'ET sur ses récepteurs, nous avons privilégié pour les substitutions les acides aminés tolérants aux modifications, comme identifiés dans la littérature par des études de type structure-activité. Ainsi, depuis la découverte de l'ET, plusieurs études ont été effectuées afin de connaître les éléments essentiels du peptide dans le processus de liaison et d'activation des récepteurs. Donc, en se basant sur les résultats de ces études, les résidus Ser⁴, Met⁷, Lys⁹, Val¹², Phe¹⁴ et Trp²¹ ont été remplacés successivement par un L- ou D-Bpa. De plus, l'acide aminé Met⁷ a été remplacé par le résidu Nle. Des études avaient déjà montré que le remplacement de la Met⁷ affecte peu l'activité biologique. En effet, Tam *et al.* (1994) avait démontré que la substitution de la méthionine en position 7 par une alanine avait peu d'effet sur l'activité biologique. Dans le cadre de nos travaux, le remplacement de ce résidu par une Nle a pour avantage d'éviter la production de Met oxydée et également de protéger la sonde contre le clivage lors de l'utilisation de l'agent chimique CNBr nécessaire à l'identification du site de liaison suite au photomarquage.

Selon Pelton *et al.* (1989), les ponts disulfures reliant les cystéines de l'ET seraient des éléments importants pour la liaison aux récepteurs ET_A. Quoique la présence de ces ponts disulfures semblent moins cruciale pour la liaison aux récepteurs ET_B, nous avons conservé ces résidus intacts dans le but d'obtenir des sondes efficaces sur les deux

récepteurs, ET_A et ET_B. Aussi, les acides aminés chargés (Asp⁸, Glu¹⁰) ont été conservés, puisqu'il a été montré que leur présence est indispensable pour l'affinité du peptide pour les récepteurs (Tam *et al.*, 1994). Enfin, la Tyr¹³ a également été conservée pour permettre la radioiodation du peptide.

Certaines études ont montré que le résidu Trp²¹ en C-terminal est important pour l'activation des récepteurs (Forget *et al.*, 1996, Tam *et al.*, 1994). D'un autre côté, des agonistes partiellement actifs ont été obtenus lorsque le Trp a été remplacé par un composé aromatique (Nakajima *et al.*, 1989a). Nous avons donc décidé de remplacer ce résidu par le groupement photoactivable Bpa, lequel possède un caractère aromatique important. Nos résultats corroborent les études qui ont décrit que le résidu Trp ne peut être modifié sans influencer grandement l'activité et l'affinité du peptide, ce qui a malheureusement mené à un analogue contenant une Trp en position 21 dépourvu d'une activité significative. De plus, nos résultats vont dans le sens des observations de Galantino *et al.* (1995), qui ont montré que la configuration du résidu en position 21 est importante. Par exemple, l'analogue [Nle⁷, D-Bpa²¹]hET-1 est complètement dépourvu d'activité tandis que l'analogue [Nle⁷, L-Bpa²¹]hET-1 possède une faible activité sur les préparations d'aorte de rat et sur les préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

De plus, bien que les études de Tam *et al.*, (1993) et Hunt *et al.*, (1993) avaient démontré que le résidu Phe¹⁴ est important pour la liaison aux récepteurs et à la transduction du signal, cet acide aminé a été remplacé par le groupement photoactivable, puisqu'il possède aussi des propriétés semblables à Phe, soit l'aromaticité et l'hydrophobicité. Le remplacement de Phe¹⁴ par Bpa a été bien toléré par le récepteur ET_B mais non par le récepteur ET_A. Vraisemblablement, la présence du groupement photoactivable à cette position engendre de l'encombrement stérique qui résulte en une contrainte structurale au niveau de la région médiane du peptide. D'ailleurs, une étude a déjà démontré que la structure en hélice dans la partie médiane du peptide (des acides aminés 11 à 15) est d'une grande importance dans le processus d'activation du récepteur ET_A (Langlois *et al.*, 2003). Finalement, tous les autres analogues synthétisés avec le Bpa en position 4, 7, 9 ou 12 se sont avérés actifs sur les deux récepteurs, quoique généralement, ils se sont

comporté comme des agonistes partiels. Ceci confirme l'étude de Tam *et al.*(1994), qui a montré que le remplacement de ces résidus par des Ala produit des agonistes à activité intrinsèque réduite.

L'affinité des analogues a ensuite été vérifiée par des tests de compétition sur des cellules CHO surexprimant l'un ou l'autre des récepteurs. Ces tests ont été exécutés contre l'endothéline marquée à l'iode-125. Ce criblage a permis de choisir deux sondes avec une affinité sur les deux récepteurs et qui se comportaient également comme des agonistes sur les deux récepteurs. Les deux sondes remplissant ces critères ont été [L-Bpa⁷]hET-1 et [Nle⁷,L-Bpa¹²]hET-1. En plus de bien lier et activer les récepteurs, l'utilisation de ces deux sondes avait l'avantage de contenir le résidu photosensible sur deux parties distinctes de l'ET, soit à proximité du regroupement de résidus chargés et à l'intérieur de la structure en hélice. Il était alors postulé que les résultats du photomarquage pourraient donner davantage d'indices sur la façon dont l'ET se place dans la pochette de liaison.

Les deux peptides choisis ont donc été radiomarqués sur la tyrosine-13 au moyen de l'iode-125. Préalablement au photomarquage, des tests de compétition ont été effectués contre de l'ET non-marquée, afin de confirmer que l'ajout de l'iode sur la chaîne latérale n'avait pas modifié l'affinité des peptides pour les récepteurs. Les peptides ont ensuite été liés de façon covalente sur les récepteurs par photomarquage. L'analyse subséquente des résultats obtenus suite aux clivages enzymatiques et chimiques du complexe ligand-récepteur, ainsi que les résultats d'études effectuées précédemment nous ont ainsi permis d'approfondir les connaissances sur le domaine de liaison de l'ET au niveau de ses récepteurs.

Chaque complexe récepteur-ligand a généralement été soumis à différents procédés de clivage, soit l'endoprotéinase Arg-C, l'endoprotéinase Lys-C, le CNBr ainsi que le NCS. Le choix de la méthode de clivage a été déterminé en fonction de la position du Bpa et du radiotracteur (¹²⁵I) de sorte que lors du clivage, le signal radioactif restait sur le fragment photomarqué. Suite aux clivages, les masses moléculaires des fragments obtenus ont été comparées à celles déduites à partir de la séquence du récepteur.

Les résultats du photomarquage sur le récepteur ET_A ont montré que le segment comprenant les acides aminés Phe¹⁴⁷-Lys¹⁶⁶ contiendrait un point de contact pour la sonde [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr¹³(¹²⁵I)]hET-1. Ce segment du récepteur fait partie de la fin de la 1^{ère} boucle extracellulaire jusqu'au haut du domaine transmembranaire III. En effet, le chevauchement des fragments obtenus à la suite des trois différents clivages (endo Arg-C, endo Lys-C et NCS) indique cette section du récepteur. En 1992 et 1993, des études avec des récepteurs chimères effectuées par Adachi et ses collaborateurs avaient suggéré ce même domaine de liaison pour l'ET et plus particulièrement, la portion comprenant les acides aminés 140 à 144. Plus récemment, une étude de modélisation moléculaire a proposé que les chaînes latérales de certains acides aminés de la première boucle extracellulaire du récepteur ET_A, soit les résidus Leu¹⁴², Phe¹⁵³ et Phe¹⁵⁶ interagiraient respectivement avec Leu¹⁷, Asp¹⁸ et Trp²¹ de l'ET (Orry et Wallace, 2000). Ainsi, nos résultats viennent montrer que la première boucle extracellulaire jouerait un rôle important dans le processus de liaison au récepteur ET_A.

Les résultats des clivages du complexe [L-Bpa⁷, Tyr¹³(¹²⁵I)]hET-1-ET_A pointent quant à eux la seconde portion de la 3^e boucle intracellulaire jusqu'au milieu du 6^e domaine transmembranaire du récepteur ET_A incluant les acides aminés Ile²⁹²-Trp³¹⁹. Quoique ce domaine n'a jamais été ciblé comme ayant un rôle dans le processus d'activation, nos résultats viennent appuyer un modèle théorique d'interaction de l'ET sur ses récepteurs. Ce modèle suggère que l'ET-1 viendrait, en ce qui concerne le récepteur ET_A très proche des domaines transmembranaires IV-VI et leurs domaines extracellulaires adjacents. Selon ce modèle, le récepteur ET_A se diviserait en deux parties distinctes. Une partie serait composée des domaines transmembranaires I, II, III et VII ainsi que des domaines extracellulaires adjacents, tandis que l'autre comprendrait les domaines transmembranaires IV à VII. La première partie serait responsable de la liaison du ligand et la deuxième région jouerait un rôle dans la sélectivité du ligand. Puisque la portion N-terminale de l'ET formerait «l'adresse» de la molécule alors que la portion C-terminale formerait le «message» (Sakamoto *et al.*, 1993) il apparaît alors que la position 7 de l'ET lierait le 6^e domaine transmembranaire, soit une partie de l'adresse du récepteur. La

position 12, faisant partie du message de la molécule, viendrait quant à elle près de la 1^{ère} boucle extracellulaire pour permettre au récepteur de prendre une conformation menant à une activité biologique. On peut aussi postuler que le 5^e domaine transmembranaire serait à proximité de cette pochette de liaison. En effet, une étude précédente de photomarquage a démontré que des ligands des récepteurs de l'ET se liaient au 5^e domaine transmembranaire (Tessier *et al.*, 2005). Par conséquent, la 1^{ère} boucle extracellulaire ainsi que les 5^e et 7^e domaines transmembranaires formeraient donc une partie du domaine de liaison de l'ET sur le récepteur ET_A.

Les résultats des clivages du complexe [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr¹³(¹²⁵I)]hET-1-ET_B ont pour leur part montré une portion de la 2^e boucle extracellulaire du récepteur ET_B, soit des acides aminés Thr²⁶³-Met²⁶⁶, comme étant une région de contact. Une autre étude de photomarquage réalisée avec un agoniste compétitif de l'ET, l'IRL-1620, avait déjà identifié une portion de la 2^e boucle extracellulaire et une région du 5^e domaine transmembranaire comme zone de contact (Boivin *et al.*, 2004). Malgré le fait que le segment obtenu avec le clivage du complexe [Nle⁷, L-Bpa¹², Tyr¹³(¹²⁵I)]hET-1-ET_B soit très rapproché de celui identifié par photomarquage avec [L-Bpa⁵, Tyr⁶(¹²⁵I)]IRL-1620, la divergence au niveau des régions étaient inattendue puisque la position 12 de l'ET est équivalente à la position 5 de l'IRL-1620. Par contre, cet agoniste étant plus petit que l'ET, il est possible qu'il puisse bouger plus librement dans la pochette de liaison et ainsi favoriser un autre site d'attache. Par ailleurs, une autre étude avait déjà montré suite à des études au moyen de récepteurs chimères que les acides aminés Ile¹³⁸ à Ile¹⁹⁷, chevauchant le 2^e domaine transmembranaire, la 1^{ère} boucle extracellulaire et le 3^e domaine transmembranaire formeraient un domaine important pour la liaison (Wada *et al.*, 1995). Néanmoins, il est plausible que les différences entre nos résultats et ceux obtenus par l'équipe de Wada soient attribuables aux méthodes utilisées. Préalablement aux études sur les récepteurs chimères, cette équipe avait observé après incubation des récepteurs ET_B purifiés avec de l'ET-1 radiomarquée que les acides aminés 85 à 200 étaient impliqués dans le processus de liaison du ligand sur ce récepteur. Par la suite, des récepteurs chimères ont été fabriqués en remplaçant la 1^{ère} boucle extracellulaire dans les deux types de récepteur et l'hypothèse a été vérifiée par des études de liaison avec deux

antagonistes le BQ-123 et le Bosentan, le premier étant spécifique à ET_A, tandis que l'autre ne présentant pas de sélectivité. Cette portion de la 1^{ère} boucle extracellulaire, ciblée par Wada comme importante pour la liaison, pourrait permettre une bonne conformation du récepteur ET_B et assurer la liaison du ligand à la 2^e boucle extracellulaire, laquelle a été ciblée par nos résultats de photomarquage.

Les résultats des clivages du complexe [L-Bpa⁷, Tyr¹³(¹²⁵I)]hET-1-ET_B n'ont malheureusement pas mené à l'élucidation exacte du domaine de liaison. Par contre, les résultats ont montré deux possibilités de segment pour la liaison de l'ET sur le récepteur ET_B, soit les acides aminés Ile²¹² à Arg²⁵³, situés dans le 4^e domaine transmembranaire et la 1^{ère} boucle extracellulaire, et les acides aminés Glu³²⁰-Met³⁷⁴ couvrant une portion du 6^e domaine transmembranaire, la 3^e boucle extracellulaire et le 7^e domaine transmembranaire. En suivant le modèle théorique de Sakamoto (Sakamoto *et al.*, 1993), le domaine de liaison se trouverait dans le 7^e domaine transmembranaire, ce qui serait en accord avec l'obtention du segment formé de Glu³²⁰-Met³⁷⁴, suite aux clivages du complexe [L-Bpa⁷, Tyr¹³(¹²⁵I)]hET-1-ET_B.

Les études de photomarquage nous ont donc fourni de l'information sur la pochette de liaison et permis d'identifier de courts fragments de liaison de l'ET sur les récepteurs. Cependant, il serait essentiel de poursuivre l'investigation pour connaître plus précisément des points de contact sur les récepteurs. Une technique développée par Rihakova *et al.*(2002) pourrait permettre de trouver des zones de contact davantage ciblées. Cette méthodologie, nommée "Methionine Proximity Assay" consiste à insérer dans le récepteur des résidus de méthionine aux endroits soupçonnés de lier le ligand. Cette technique a été conçue après que des études de photomarquage utilisant le Bpa comme agent photosensible eurent montré qu'une grande proportion des sites de liaison observés contenait des Met (Boucard *et al.*, 2003; Kage *et al.*, 1996). Le Bpa affiche une forte affinité pour cet acide aminé lors de la liaison au récepteur. Or, en développant par mutagenèse dirigée des récepteurs contenant des Met à divers endroits dans le site de liaison du récepteur, il est possible d'obtenir la position probable qui est en contact avec

le ligand. Par exemple, le site de liaison des récepteurs NPR_A (Jossart *et al.*, 2005), AT₁ et AT₂ (Rihakova *et al.*, 2002) a été étudié de cette façon.

Tous les résultats de nos expériences de photomarquage ont été obtenus suite à l'incubation des cellules et du ligand à 4°C. Or, il a été démontré que la température peut modifier la géométrie du site de liaison sur le récepteur (Arsenault *et al.*, 2007). Il serait donc utile de refaire les expériences à différentes températures, tout particulièrement à 37°C, étant donné que ces conditions de liaison refléteraient davantage celles rencontrées *in vivo*. Bien entendu, les conditions expérimentales devraient être revues afin de limiter le phénomène d'internalisation et de dégradation cellulaire, en particulier lors d'études du récepteurs ET_B, lequel est identifié comme un récepteur de clearance.

6. Conclusion

Mes travaux ont conduit au développement de sondes photosensibles utiles au photomarquage, lesquelles ont permis d'identifier des sites importants de liaison de l'ET sur les récepteurs ET_A et ET_B et de confirmer les résultats de certaines études déjà menées sur ces récepteurs. Cependant, il reste encore des observations divergentes dans la littérature et nos études de photomarquage n'ont été menées qu'avec seulement deux des sondes développées. Or, il serait pertinent de poursuivre l'investigation des sites de liaison avec des sondes contenant le groupement photosensible à d'autres positions ou encore avec des sondes substituées avec deux groupements photosensibles.

Ainsi, des études plus approfondies des récepteurs et l'ET, que ce soit par mutagenèse dirigée ou encore photomarquage avec des sondes comprenant le groupement photosensible à différentes positions, permettraient de mieux caractériser les domaines de liaison et assureraient une meilleure compréhension de l'interaction de l'ET avec ses récepteurs. Cette stratégie s'ajoute à celles déjà explorées afin de favoriser le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

7. RÉFÉRENCES:

ADACHI, M., Y.Y. Yang, A. Trzeciak, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1992. «Identification of a domain of ET_A receptor required for ligand binding». FEBS Letters, vol.311, p.179-183.

ADACHI, M, K. Hashido, A. Trzeciak, T. Watanabe, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1993. «Fonctional domains of human endothelin receptor». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22, p.S121-124.

ADACHI, M., Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1994. «Identification of a ligand-binding site of the human endothelin-A receptor and specific regions required for ligand selectivity». European Journal of Biochemistry, vol. 220, p. 37-43.

AMBAR, L. Y. Kloog, I. Schwartz, E. Haxum et M. Sokolovsky. 1989. «Competitive interaction between endothelin and sarafotoxin: binding and phosphoinositides hydrolysis in rat atria and brain». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 158, p. 195-201.

ARAI, H., S. Nori, I. Aramori, H. Ohkubu et S. Nakanishi. 1990. «Cloning and Expression of a cDNA Encoding an Endothelin Receptor». Nature, vol. 348, p. 730-732.

ARSENAULT, J., M.P. La Haye Renaud, M. Clement, D. Fillion, G. Guillemette, R. Leduc et P. Lavigne. 2007. «Temperature-dependant variations of ligand-receptor contact points in hAT₁». Journal of Peptide Sciences, vol. 13, p. 575-580.

BALDWIN, J.M., G.F. Nori et V.M. Unger. 1997. «An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors». Journal of Molecular Biology, vol. 272, p. 144-164.

BAYNASH, A.G., K. Hosoda, A. Giaid, J.A. Richardson, N. Emoto, R.E. Hammer et M. Yanagisawa. 1994. «Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons». Cell, vol. 79, p. 1277-1285.

BISELLO, A., A.E. Adams, D.F. Mierke, M. Pellegrini, M. Rosenblatt, L.J. Suva et M. Chorev. 1998. «Parathyroid hormone-receptor interactions identified directly by photocross-linking and molecular modeling studies». Journal of Biological Chemistry, vol.273, p. 22498-22505.

BLOCH, K.D. R.L. Eddy, T.B. Shows et T. Ouertermous. 1989. «cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3». Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 18256-18261.

BOIVIN, S., S. Tessier, J. Aubin, P. Lampron, M. Detheux et A. Fournier. 2004. «Identification of a Binding Domain of the Endothelin-B Receptor Using a Selective

IRL-1620-Derived Photoprobe». Biochemistry, vol 43, p. 11516-11525

BOUCARD, A.A., S.S. Sauv , G. Guillemette, E. Escher et R. Leduc. 2003. «Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain». Biochemical Journal, vol. 370, p.829-838.

BOUCARD, A.A., B.C. Wilkes, S. A. Laporte, E. Escher, G. Guillemette et R. Leduc. 2000. «Photolabeling identifies position 172 of the human AT₁ receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure». Biochemistry, vol. 39, p.9662-9670.

BOUVIER, M. 2001. «Oligomerization of G protein-coupled transmitter receptors». Nature reviews neurosciences, vol. 2, p.274-286.

BREMER, A.A., S.E. Leeman et N.D. Boyd. 2001. «Evidence for spatial proximity of two distinct receptor regions in the substance P (SP)*neurokinin-1 receptor (NK-1R) complex obtained by photolabeling the NK-1R with p-benzoylphenylalanine³-SP». Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 22857-22861.

BREU, V., K. Hashido, C. Broger, C. Miyamoto, Y. Furuichi, A. Hayes, B. Kalin, B.M. Loffler, H. Ramuz and M. Clozel. 1995. «Separable binding sites for the natural agonist endothelin-1 and the non-peptide antagonist bosentan on human endothelin-A receptors». European Journal of Biochemistry, vol. 231, p.266-270.

BRUNNER, J. 1993. «New photolabeling and crosslinking methods». Annual Review of Biochemistry, vol. 62, p.483-514.

CL MENT, M., S.S. Martin, M-E. Beaulieu, C. Chamberland, P. Lavigne, R. Leduc, G. Guillemette et E.Escher. 2005. «Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT₁) receptor using the methionine proximity assay». Journal of biological chemistry, vol. 280, p. 27121-27129.

CIOUTHIER, D.E., S.C. Williams, H. M. Wieduwilt, J.A. Richardson et M.Yanagisawa, 2000. «Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptordeficient mice». Developmental Biology, vol. 217, p. 10-24.

CRUZ, A., C. Parnot, D. Ribatti, P. Corvol et J.M. Gasc. 2001. «Endothelin-1, a regulator of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane». Journal of Vascular Research, vol. 38, p. 536-545.

DOHERTY, A.M. 1992. «Endothelin : A New Challenge». Journal of Medicinal Chemistry, vol.35, p.1493-1508.

D'ORLEANS JUSTE, P., M. Plante, J.C. Honor , E. Carrier et J. Labont . 2003. «Synthesis and degradation of Endothelin-1». Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 81, p. 503-510.

DORMAN, G. et G.D. Prestwich, 2000. «Using photolabile ligands in drug discovery and development». Trends in biotechnology, vol. 18, p.64-77.

DORMAN, G. et G.D. Prestwich. 1994. «Benzophenone Photophores in Biochemistry». Biochemistry, vol.33, p.5661-5673.

FORGET, M. A., N. Lebel, P. Sirois, Y. Boulanger et A. Fournier. 1996. «Biological and molecular analyses of structurally reduced analogues of endothelin-1». Molecular Pharmacology, vol. 49, p. 1071-1079.

FUDURODA, T., S. Okazaki, M. Ihara, K. Ishikawa, M. Yano, T. Miyauchi, S. Ishikawa, M. Onizuda, K. Goto et M. Nishikibe. 1996. «Necessity of dual blockade of endothelin ETA and ETB receptor subtypes for antagonism of endothelin-1-induced contraction in human bronchi». British Journal of Pharmacology, vol. 117, p.995-999.

FREEDMAN, N.J., A.S. Ament, M. Oppermann, R.H. Stoffel, S.T. Exum et R.J. Lefkowitz. 1997. «Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity». Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 17734-17743.

GOTO, K., H. Hama et Y. Kasuya 1996. «Molecular Pharmacology and pathophysiological significance of Endothelin». Japan Journal of Pharmacology, vol. 72, p. 261-290.

GREGAN, B., J. Jürgensen, G. Papsdorf, J. Furchert, M. Schaefer, M. Beyermann, W. Rosenthal et A. Oksche. 2004 a. «Ligand-dependant Differences in the Internalization of Endothelin A and Endothelin B receptor Heterodimers». The journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 27679-27687.

GREGAN, B., M. Schaefer, W. Rosenthal et A. Oksche. 2004 b. «Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis Reveals the Existence of Endothelin-A and Endothelin-B Receptor Homodimers». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 44, sup 1, p. S30-S33.

HARADA, N., A. Himeno, K. Shigematsu, K. Sumikawa et M. Niwa. 2002. «Endothelin-1 Binding to Endothelin Receptors in the Rat Anterior Pituitary Gland: Possible Formation of an ET_A-ET_B Receptor Heterodimer». Cellular and molecular Neurobiology, vol. 22, p.207-226.

HICKEY KA, G. Rubanyi, R.J. Paul et R.F. Highemith. 1985. «Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells». American Journal of Physiology, vol. 248 p. C550.

HOANG, M.V. et A.J. Turner. 1997. «Novel activity of endothelin converting enzyme: hydrolysis of bradykinin». Biochemical Journal, vol. 327, p. 23-26.

HOSODA, K., K. Nakao, Hiroshi-Arai, S. Suga, Y. Ogawa, M. Mukoyama, G. Shirakami, Y. Saito, S. Nakanishi, H. Imura. 1991. «Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA». FEBS Letters, vol. 287, p. 23-26.

INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto et T. Masaki. 1989. «The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 86, p. 2863-2867.

IVY D., I.F.,McMurtry, M.Yanagisawa C.E. Garipey, T.D. Le Cras, S.A. Gebb, K.G. Morris, R.C.Wiseman et S.H. Abman. 2001. «Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction». American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology, vol. 280, p. L1040-1048.

JOHNSON, G.D., T. Stevenson et k. Ahn. 1999. «Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 4053-4058.

JOSSART, C., M. Coupal, N. McNicoll, A. Fournier, B.C. Wilkes, et A. De Lean. 2005. «Photolabeling study of the ligand binding domain of natriuretic peptide receptor A: development of a model». Biochemistry, vol. 44, p. 2397-2408.

KAGE, R., S.E. Leeman, J.E. Krause, C.E. Costello et N.D. Boyd. 1996. «Identification of methionine as the site of covalent attachment of a p-benzoyl-phenylalanine-containing analogue of substance P on the substance P (NK-1) receptor». Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 25797-25800.

KARNE, S., C.K. Jayawickreme et M.R. Lerner. 1993. «Cloning and Characterization of an Endothelin-3 Specific Receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* Dermal Melanophores» The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 19126-19133.

KARNIK, S.S., C Gogonea, S. Patil, Y Saad et T Takezako. 2003. «Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism». Trends in endocrinology and Metabolism, vol. 14, p. 431-437.

KAUER, J.C., S. Erickson-Viitanen, H.R. Wolfe et W.F. DeGrado. 1986. «p-Benzoyl-L-phenylalanine, a New Photoreactive Amino Acid». Journal of Biological Chemistry, vol.261, p. 10695-10700.

KOSHIMIZU T.A., G. Tsujimoto, K. Ono, T. Masaki et A. Sakamoto. 1995. «Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs membrane signalling but not ligand binding of human ET_B endothelin receptor». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.217, p.354-362.

KRYSTEK, S.R., P.S. Patel, P.M. Rose, S.M. Fisher, B.K. Kienzle, D.A. Lach, E.C.K. Liu, J.S. Lynch, J. Novotny et M.L. Webb. 1994. «Mutation of Peptide Binding Site in Transmembrane Region of a G-Protein-Coupled Receptor Accounts for Endothelin

Receptor Subtype Selectivity». Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 12383-12386.

KUNDU, G.C., K.S. Misono. 1991. «Affinity labeling of endothelin receptors in bovine and rat lung membranes by N epsilon 9-azidobenzoyl-125I-endothelin-1». Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 79, p.85-92.

KURIHARA, Y., H. Kurihara, H. Oda K. Maemura, R. Nagai, T. Ishikawa et Y. Yazaki. 1995. «Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1». Journal of Clinical Investigation, vol. 96, p. 293-300.

LANGOIS, C., M. Létourneau, P. Lampron, V. St-Hilaire et A. Fournier. 2003 «Development of agonists of endothelin-1 exhibiting selectivity towards ET_A receptors». British Journal of Pharmacology, vol. 139, p. 616-622.

LI, Y.M., M. Mamerakis, E.R. Stimson et J.E. Maggio. 1995. «Mapping peptide-binding domains of the substance P (NK-1) receptor from P388D1 cells with photolabile agonists». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 1213-1220.

MASAKI, T., 2004. «Historical Review: Endothelin». Trends in Pharmacological Sciences, vol.12, p.391-421.

MASAKI, T., H. Ninomiya, A. Sakamoto et Y Okamoto. 1999. «Structural basis of the function of endothelin receptor». Molecular and Cellular Biochemistry, vol.190, p.153-156.

MATEO, A.O. et A.A. De Artinano. 1997. «Highlights on Endothelins : a Review». Pharmacological Research, vol.36, p.339-351.

MAGUIRE, J. J. et A. P. Davenport. 2002. «Is urotensin-II the new endothelin? ». British Journal of Pharmacology, vol. 137, p. 579-588.

MASAKI, T. et M. Yanagisawa. 1992. «Endothelins». Essays in Biochemistry, vol. 27, p. 79-89.

MICELI, F., F. Minici, P.M. Garcia, M. Pardo, C. Proto, S Mancuso, A. Lanzone et R. Apa. 2001. «Endothelins enhance prostaglandin (PGE2 and PGF2alpha) biosynthesis and release by human luteal cells : evidence of a new paracrine/autocrine regulation of luteal function». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 86, p. 811-817.

NAKAMUTA, M., R. Takayanagi, Y. Sakai, S. Sakamoto, H. Hagiwara, T. Mizumo, Y. Saito, S. Hirose M. Yamamoto et H. Nawata. 1991. «Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 177, p. 34-39.

NAKAJIMA, K., S. Kubo, S. Kumagaye, H. Nishio, M. Tsunemi, T. Inui, H. Kuroda, N. Chino, T. X. Watanabe, T. Kimura et a. l. et. 1989a. «Structure-activity relationship of endothelin: importance of charged groups». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 163, p. 424-429.

NAKAJIMA, K., S. Kumagaye, H. Nishio, H. Kuroda, T. X. Watanabe, Y. Kobayashi, H. Tamaoki, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989b. «Synthesis of endothelin-I analogues, endothelin-3, and sarafotoxin S6b: structure-activity relationships». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S8-12; discussion S18.

OAKLEY, R. H., S.A. Laporte, J.A. Holt, L.S. Barak et M.G. Caron, 1999. « Association of β -Arrestin with G Protein-coupled Receptors during Clathrin-mediated Endocytosis Dictates the Profile of Receptor Resensitization » Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 32248-32257.

OHKUBO S., K. Ogi, M. Hosoya, H. Matsumoto, N. Suzuki, C. Kimura, H. Ondo et M. Fujino. 1990. «Specific expression of human endothelin-2 (ET-2) gene in a renal adenocarcinoma cell line». Febs Letters, vol. 274, p. 136-140.

O'NEIL K.T., S. Erickson-Viitanen et W.F. DeGrado. 1989. «Photolabeling of calmodulin with basic, amphiphilic alpha-helical peptides containing p-benzoylphenylalanine». Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p.14571-14578.

ORRY, A.J.W. et B.A. Wallace. 2000. «Modeling and Docking the Endothelin G-Protein-Coupled Receptor». Biophysical Journal, vol. 79, p. 3083-3094.

PAASCHE, J.D., T. Attramadal, K. Kristiansen, M.P. Oksvold, H.K. Johansen, H.S. Huitfeldt, S.G. Dahl et H. Attramadal. 2005. «Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors». Molecular Pharmacology, vol. 67, p.1581-1590.

PELTON, J. T. et R. C. Miller. 1991. «The role of the disulphide bonds in endothelin-1». Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 43, p. 43-45.

PINET, F. 2004. «À quoi sert le système endothéline?». Médecine/Science, vol. 20, p. 339-345.

RIHAKOVA, L., M. Daraët, M. Auger-Messier, J. Perodin, AA. Boucard, G. Guillemente, R. Leduc, P. Lavigne et E. Escher. 2002. «Methionine proximity assay, a novel method for exploring peptide ligand-receptor interaction». Journal of Receptor Signalisation and Transduction Research, vol. 22, p. 297-333.

ROSE, P.M., S. R. Krystek, P.S. Patel, E.C.K.Liu, J. S. Lynch, D. A. Lach, Fisher et M. L. Webb. 1995. «Aspartate mutation distinguishes ET_A but not ET_B receptor subtype-selective ligand binding while abolishing phospholipase C activation in both receptors». Febs letters, vol. 361, p. 243-249.

SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sawamura, T. Enoki, T. Ohtani, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyooka et T. Masaki. 1993. «Distinct Subdomains of Human Endothelin Receptors Determine their Selectivity to Endothelin A-Selective Antagonist and Endothelin B-selective agonists». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 8547-8553.

SAKURAI, T., M. Yanagisawa, Y. Takawa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1990. «Cloning of a cDNA Encoding a Non-Isopeptide-Selective Subtype of the Endothelin Receptor». Nature, vol. 348, p. 732-735.

SAKURAI, T., M. Yanagisawa, A. Inoue, U.S. Ryan, S. Kimura, I. Mitsui, K. Goto et T. Masaki. 1991. «cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat pre-proendothelin-1 mRNA». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 175, p. 44-47.

SCHVARTZ, I., O. Ittoop et E. Hazum. 1990. «Identification of endothelin receptors by chemical cross-linking». Endocrinology, vol. 126, p.1829-1833.

SCHWEIZER, A., O. Valdenaire, P. Nelbock, U. Deuschle, J.B. Dumas Milne Edwards, J.G. Stumpf, J.G. et B.M. Loffler. 1997. «Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations». Biochemical Journal, vol. 328, p. 871-877

SHIMADA, K., M. Takahashi, M. Ikeda, et K. Tanzawa, K. 1995. «Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1». FEBS Letters, vol. 371, p. 140-144.

SIMONSON, M.S. et M.J. Dunn. 1990. «Pathways of transmembrane signaling». Hypertension, vol. 15, p. I5-I12.

SOKOLOVSKY, M. 1992. «Structure-function relationships of endothelins, sarafotoxins, and their receptor subtypes». Journal of Neurochemistry, vol. 59, p. 809-821.

STJERNQUIST, M. 1998. «Endothelins-Vasoactive Peptides and Growth Factors». Cell and Tissue Research, vol.292, p.1-9.

TAKAGI, Y., H. Ninomiya, A. Sakamoto, S. Miwa et T. Masaki. 1995. «Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelin-A/-B chimeras». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 10072-10078.

TAKASUKA, T., T. Sakurai, K. Goto, Y. Furuichi et T. Watanabe. 1994. «Human endothelin receptor ET_B. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand» Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p.7509-7513.

TAKIGAWA, M., T. Sakutai, Y. Kasuya, T. Masaki et K. Goto. 1995. «Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors». European Journal of Biochemistry, vol. 228, p. 102-108.

TAM, J. P., W. Liu, J. W. Zhang, M. Galantino, F. Bertolero, C. Cristiani, F. Vaghi et R. de Castiglione. 1994. «Alanine scan of endothelin: importance of aromatic residues». Peptides, vol. 15, p. 703-708.

TELLER, D.C., T. Okada, C.A., Behnke, K. Palczewski et R.E. Stenkamp. 2001. «Advances in determination of a high-resolution three dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors» Biochemistry vol. 40, p. 7761-7772.

TESSIER, S., S. Boivin, J. Aubin, P. Lampron, M. Detheux et A. Fournier. 2005. «Transmembrane Domain V of the Endothelin-A Receptor Is a Binding Domain of ET_A-Selective TTA-386-Derived Photoprobes» Biochemistry, vol. 44, p.7844-7854.

TOPOUZIS, S., J.T. Pelton et R.C. Miller. 1989. «Effects of Calcium Entry Blockers on Contractions Evoked by Endothelin-1, [Ala^{3,11}]Endothelin-1 and [Ala^{1,15}]Endothelin-1 in Rat Isolated Aorta». British Journal of Pharmacology, vol.98, p.669-677.

VALDENNAIRE, O., D. Lepailleur-Enouf, G. Egidy, A. Thouard, A. Barret, R. Vranckx, C. Tougard et J.B. Michel. 1999. «A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization». European Journal of Biochemistry, vol. 264, p. 341–349.

VICHI, P., A. Whelchel et J. Posada. 1999. «Transmembrane Helix 7 of the Endothelin B Receptor Regulates Downstream Signaling». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 10331-10338.

WADA, K., K. Hashido, H. Terashima, M. Adachi et Y. Fujii. 1995. «Ligand binding domain of the Human Endothelin-B Subtype Receptor». Protein expression and purification, vol 6, p. 228-236.

WALLACE, B.A. et R.W. Janes. 1995. «The Crystal Structure of Human Endothelin-1 and how it relates to receptor binding». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26, p. S250-253.

WARNER, T.D., G.H. Allock, E.J. Mickley, R. Corder et J.R. Vane. 1993. «Comparative studies with endothelin receptor antagonists BQ-123 and PD 142893 indicate at least three endothelin receptors». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22, p. S117-S120.

WEBER, P.J.A. et A.G. Beck-Sickinger. 1997. «Comparison of the photochemical behavior of four different photoactivatable probes». Journal of Peptide Research, vol. 49, p.375-383.

WILSON, C.J., S.S. Husain, E.R. Stimson, L.J. Dangott, K.W. Miller et J.E. Maggio. 1997. « p-(4-Hydroxybenzoyl)phenylalanine: a photoreactive amino acid analog amenable to radioiodination for elucidation of peptide-protein interaction. Application to substance P receptor». Biochemistry, vol.36, p.4542-4551.

XU, D., N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaus, D. DeWit et M. Yanagisawa. 1994. «ECE-1: a membranebound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1». CELL, vol. 78, p. 473-485.

YANAGISAWA, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto et T. Masaki. 1988. «A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells». Nature, vol. 332, p.411-415.

ZHU, G., L.H. Wu, C. Mauzy, A.M. Egloff, T. Mirzadegan et F.Z. Chung. 1992. «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». Journal of Cellular Biochemistry, vol. 50, p. 159-164.