

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**DÉVELOPPEMENT D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE DE TYPE COS-7
EXPRIMANT UNE FORME SOLUBLE D'ENZYME DE CONVERSION DE
L'ENDOTHÉLINE RECOMBINANTE (hECE-1sol) ET CARACTÉRISATION
ENZYMATIQUE PRÉLIMINAIRE**

Par
Philippe Lampron
Baccalauréat en Biologie

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

Jury d'évaluation

Président du jury Pr Michel Sylvestre, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe Pr Jocelyn Dupuis, Institut de Cardiologie de Montréal
Examineur interne Pr Alain Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche Pr Alain Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

L'endothéline est un acteur important impliqué dans plusieurs anomalies cardiovasculaires telles l'hypertension artérielle et l'infarctus. Ce peptide composé de 21 acides aminés est identifié comme un des plus puissants vasoconstricteurs connus. Sa production est assurée par une enzyme de conversion, l'ECE, présente à la surface des cellules endothéliales. Celle-ci clive le précurseur, la Big-endothéline (BigET) en endothéline et ce, entre les acides aminés valine/isoleucine 22 et tryptophane 21. Notre objectif a été de produire l'enzyme par génie génétique et ce, à partir des méthodes de clonage moléculaire et de transfection chez les cellules mammifères de type COS-7.

Le matériel génétique de départ, le pME18ShECE-1sol a été utilisé dans le cadre d'une transfection transitoire avec différents types cellulaires, soit CHO, HEK 293 et COS-7. Par la suite, étant donné une production trop faible de la protéine, la construction d'un vecteur plasmidique exprimant un gène de résistance permettant un processus de sélection a été réalisée à partir du vecteur précédent. Ce nouveau vecteur, porteur de l'ADNc de la portion extracellulaire de l'enzyme fusionné avec le peptide signal de la phosphatase alcaline (pCI-neohECE-1sol) a pu être transfecté dans les cellules COS-7 permettant ainsi l'expression stable de hECE-1 sous une forme soluble. Les cellules recombinantes ont été subséquemment cultivées et sélectionnées en fonction de leur capacité de synthèse de l'enzyme de conversion retrouvée dans le surnageant.

Différents essais de purification ont été tentés, soit une chromatographie sur concanavaline A, une chromatographie d'affinité utilisant un anticorps dirigés contre hECE-1sol, une chromatographie d'affinité utilisant le cofacteur Zn et une résine à haute affinité pour l'albumine. Seules la chromatographie d'affinité pour le Zn suivi de l'élimination de l'albumine au moyen de la résine d'affinité spécifique à cette dernière ont démontré un résultat satisfaisant. La technique d'immunobuvardage de type Western a permis de confirmer la production de l'enzyme après visualisation d'une bande aux environs de 120 kDa dans la fraction brute et semi-purifiée, soit le poids moléculaire de la forme monomérique de l'ECE.

L'activité de cette enzyme recombinante a été vérifiée avec la fraction non purifiée et semi-purifiée. Ainsi, un test ELISA conçu pour le dosage de la production d'ET-1 après réaction de hECE-1sol et de la BigET-1 a permis de fournir différents paramètres caractéristiques. Les résultats partiels ont révélé une concentration enzymatique optimale de 5 µg/mL pour la fraction brute et de 0,3 µg/mL pour la fraction semi-purifiée. Le temps d'incubation optimal pour cette caractérisation a été de 4 heures, mais les paramètres de cinétique enzymatique devront être reconsidérés étant donné l'incapacité de saturation du système enzymatique. Ces résultats devront être vérifiés avec une fraction purifiée adéquatement pour permettre une comparaison plus significative avec les données observées dans la littérature. Toutefois, la production de cette forme soluble permet de fournir un outil unique pour l'étude de la spécificité de son clivage avec différents analogues de son substrat. En effet, certains analogues ont été testés dans la présente étude et les résultats semblent suggérer une réaction croisée entre l'analogue et son substrat favorisant une meilleure orientation au site catalytique résultant en un clivage spécifique par hECE-1sol. Différents essais au moyen d'autres analogues de la BigET devront éventuellement être effectués afin de déterminer les résidus-clés du substrat, ainsi que la longueur minimale de la BigET-1 permettant un clivage spécifique par l'enzyme.



Philippe Lampron

REMERCIEMENTS

« Hâte-toi de bien vivre et songe que chaque jour est à lui seul une vie. Si regarder en arrière te donne du chagrin et regarder en avant t'inspire du chagrin, alors regarde à côté de toi, je serai toujours là. »

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dr Alain Fournier de m'avoir permis de parfaire mes connaissances au sein de sa brillante équipe et d'avoir cru en moi pour l'accomplissement de ce projet d'étude. L'accueil que j'ai reçu avec cette équipe, tout à fait géniale, m'a permis de développer un intérêt pour la recherche et le développement dans le milieu scientifique.

Un merci tout à fait spécial à Myriam Létourneau, l'assistante de recherche du laboratoire, qui a su me fournir tout le support nécessaire de par ses judicieux conseils autant d'un point de vue technique que moral. Merci également à tous les autres membres du laboratoire, plus particulièrement Chantal Langlois, Sophie Tessier, Stéphane Boivin, Steve Bourgault, et Alexandra Louimaire.

Je tiens également à remercier du fond du cœur toute ma famille, spécialement mes parents Lise et Gilles pour leurs nombreux encouragements et leur support inconditionnel ainsi que mon frère Patrice et sa copine Isabel. De plus, sans la présence d'ami(e)s, ce travail n'aurait pas été chose facile, alors je souhaite remercier également ces précieux ami(e)s pour leur support moral et technique (pour certains d'entre eux) ainsi que pour leur présence continue : Danny Sylvain, Luc Pomerleau, Chantale Côté, Simon Paquette, Éric Beaudoin et Stéphanie Charest.

En définitive, je souhaite remercier le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) ainsi que l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
INTRODUCTION	1
Chapitre 1 : L'endothéline	1
1.1 Historique et découverte de l'endothéline	1
1.2 Biosynthèse de l'endothéline (Figure2)	2
1.3 Localisation et actions biologiques de l'ET-1.....	3
1.4 Les récepteurs de l'ET	7
1.5 Signalisation intracellulaire engendrée par l'ET.....	8
Chapitre 2 : L'enzyme de conversion de l'endothéline	11
2.1 Historique et découverte de l'ECE	11
2.2 Propriétés physico-chimiques de l'ECE	11
2.3 Les isoformes de l'ECE	12
2.4 Distribution tissulaire et cellulaire de l'ECE-1	14
2.5 L'ET-1, l'ECE-1 et leurs implications pathologiques	15
2.6 L'inhibition de l'ECE	16
2.7 Les caractéristiques du substrat de l'ECE, la BigET	17
2.8 L'ECE soluble : un outil pour une production enzymatique simplifiée et à grande échelle	17
2.9 Les objectifs de ce projet de recherche	18
MATÉRIEL ET MÉTHODES	19
Section 1 Développement de la lignée cellulaire	19
1.1 Matériel pour la culture cellulaire	19
1.2 Conditions de culture des différentes lignées cellulaires.....	20
1.3 Matériel génétique de départ : le pME18ShECE-1sol, un vecteur d'expression transitoire	21
1.3.1 Vecteur plasmidique de départ.....	21
1.3.2 Production à grande échelle du plasmide dans un système procaryote	22
1.3.3 Purification du plasmide	22
1.4 Construction d'un plasmide d'expression stable : le pCI-neohECE-1sol	25
1.4.1 Choix du vecteur d'expression stable et isolement de l'insert hECE-1sol	25

1.4.2	Construction du plasmide pCI-neohECE-1sol (Figure 9)	26
1.4.3	Analyse et séquençage de la construction pCI-neohECE-1sol	28
1.6	Cotransfection stable de pCIneohECE-1sol avec le vecteur pAdVantage	32
Section 2	Méthodes de détection et de quantification de hECE-1sol	33
2.1	Préparation de l'échantillon	33
2.2	Dosage des protéines par la méthode de Lowry	33
2.3	Immunobuvardage de type Western	34
2.3	Immunobuvardage de type Western	35
2.3.1	Production de l'anticorps Anti-hECE-1sol	35
2.3.1.1	Identification et synthèse d'un fragment antigénique de hECE-1sol	35
2.3.1.2	Clivage, purification et analyse du fragment antigénique hECE-1sol (735-752)	36
2.3.1.3	Réception et purification du sérum polyclonal obtenu de ZYMED	38
2.3.2	Électrophorèse, transfert et immunobuvardage de type Western	38
Section 3	Purification partielle de hECE-1sol	39
3.1	Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie sur Concanavaleine A (ConA)	39
3.2	Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant l'anticorps anti-hECE-1sol	41
3.2.1	Préparation de la matrice Affi-Gel Hydrazide (Figure 13)	41
3.2.2	Purification de hECE-1sol avec la colonne d'affinité anti-hECE-1sol	42
3.3	Purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant le Zn	44
3.4	Purification de hECE-1sol sur une résine de haute affinité pour l'albumine (Affi-Gel Blue)	44
Section 4	Caractérisation de hECE-1sol	45
4.1	Dosage de l'activité enzymatique par ELISA	45
4.1.1	Détermination du temps d'incubation optimal	47
4.1.2	Cinétique enzymatique : Variation de la concentration en BigET-1	47
4.1.3	Inhibition de hECE-1sol par différents inhibiteurs non peptidiques	48
4.2	Test d'inhibition avec les analogues de la BigET-1	48
RÉSULTATS		49
Section 1	Développement de la lignée cellulaire	49
1.1 à 1.4	Matériel génétique de départ et construction de pCIneohECE-1sol	49
1.5	Techniques de transfection cellulaire transitoire et stable avec pME18ShECE-1sol et pCIneohECE-1sol	52
Section 2	Méthodes de détection et de quantification de hECE-1sol	55
2.1 – 2.2	Préparation et dosage des protéines de l'échantillon par la méthode de Lowry	55
2.3	Immunobuvardage de type Western et purification de hECE-1sol	57
2.3	Immunobuvardage de type Western et purification de hECE-1sol	57
2.3.1	Production de l'anticorps Anti-hECE-1sol	57
Section 3	Purification partielle de hECE-1sol et immunobuvardage	60
3.1	Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie sur ConA	62
3.2	Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité	64
3.3	Purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité à l'aide du cofacteur Zn	67
3.4	Purification de hECE-1sol sur la résine AffiGel Blue : élimination de l'albumine	69
Section 4	Caractérisation de hECE-1sol	70

4.1 Dosage de l'activité enzymatique par ELISA.....	71
4.1.1 Détermination d'un temps d'incubation optimal pour un signal convenable lors des tests d'activités enzymatiques avec hECE-1sol	72
4.1.2 Activité spécifique de l'enzyme hECE-1sol en fonction des différentes étapes de purification.....	73
4.1.3 Cinétique enzymatique (Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk)	73
4.1.4 Inhibition de hECE-1sol par différents inhibiteurs non peptidiques.....	75
4.2 Test d'inhibition avec les analogues de la BigET-1	77
DISCUSSION	78
Section 1 Développement de la lignée cellulaire.....	78
Section 2 Méthode de quantification et de détection de hECE-1sol	81
Section 3 Purification de hECE-1sol	83
3.1 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie sur Concanavaline A (ConA)....	83
3.2 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant l'anticorps (anti-hECE-1sol).....	84
3.3 Purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant le cofacteur Zn et au moyen de la résine AffiGel Blue (affinité pour l'albumine)	85
Section 4 Caractérisation de hECE-1sol	87
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	90
APPENDICES	92
RÉFÉRENCES	95

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure primaire des trois isoformes de l'endothéline humaine	4
Figure 2 : Biosynthèse de l'endothéline humaine	5
Figure 3 : Récepteurs de type A et B des Ets	9
Figure 4 : Mécanisme d'action et transduction de signal de l'endothéline-1	10
Figure 5 : Organisation du gène de l'ECE-1 humaine	13
Figure 6 : Modifications apportées à l'enzyme de conversion de l'endothéline-1a (hECE-1a) lui donnant ainsi une forme soluble	18
Figure 7 : Cartographie du plasmide pME18ShECE-1sol	21
Figure 8 : Schéma expérimental de purification du pME18ShECE-1sol de bactérie <i>E.coli</i> XL-1 blue	23
Figure 9 : Schéma illustrant la construction du plasmide pCIneoECE-1sol	27
Figure 10 : Amorces utilisées pour le séquençage de pCIneoECE-1sol	29
Figure 11 : Schéma illustrant les différentes étapes de transfection cellulaire	34
Figure 12 : Séquence du fragment antigénique hECE-1sol (735-750) utilisé pour la synthèse de l'anticorps	35
Figure 13 : Réaction chimique impliquée dans l'oxydation au NaIO ₄ de l'anticorps anti-hECE-1sol et orientation sur la matrice Affi Gel Hydrazide	43
Figure 14 : Principe du test ELISA utilisé pour le dosage de la production d'ET-1	46
Figure 15 : Fragments digérés du pME18ShECE-1sol et du pCIneo ayant servi à la construction du plasmide pCIneoECE-1sol	50
Figure 16 : Photographie du gel d'agarose 1% correspondant au profil de digestion de 3 clones bactériens obtenus pour la construction pCIneoECE-1sol	51
Figure 17 : Photographie des cellules COS-7 durant le processus d'optimisation de la transfection cellulaire par précipitation au CaHPO ₄ à l'aide du plasmide pβgal	54
Figure 18 : Courbe standard du dosage des protéines par la méthode de Lowry	55

Figure 19 : Profils CLHP analytiques (A et B) et spectres de masse (C et D) du fragment antigénique hECE-1sol (735-750) utilisé pour la synthèse de l'anticorps.....	58
Figure 20 : Profil de purification de l'anticorps anti-hECE-1sol à l'aide de la colonne d'affinité Sépharose-Protéine G (« Mab Trap Kit » d'Amersham)	59
Figure 21 : Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneohECE-1sol (Fraction F1)	61
Figure 22 : Profil de purification de hECE-1sol par chromatographie sur ConA de la fraction F1 provenant du milieu de culture des cellules COS-7	63
Figure 23 : Profil de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant l'anticorps anti-hECE-1sol de la fraction F1 provenant du milieu de culture des cellules COS-7	65
Figure 24 : Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneohECE-1sol après purification par chromatographie d'affinité avec anti-hECE-1sol (Fraction F2 Affinité)	66
Figure 25 : Profil de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant le cofacteur Zn de la fraction F1 provenant du milieu de culture des cellules COS-7	67
Figure 26 : Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneohECE-1sol après purification par chromatographie d'affinité avec le cofacteur Zn (Fraction F2 Zn).....	68
Figure 27 : Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneohECE-1sol après purification sur une résine d'affinité pour l'albumine (Fraction F3).....	69
Figure 28 : Profils CLHP analytiques (A et B) et spectres de masse (C et D) de la BigET-1 humaine (1-38) utilisée pour la caractérisation enzymatique	70
Figure 29 : Courbe standard de la concentration en ET-1 déterminée avec un test ELISA utilisant la trousse diagnostique de BioMedica	71
Figure 30 : Graphique de la production d'ET-1 en fonction du temps d'incubation de BigET-1 avec hECE-1sol (F1).....	72
Figure 31 : Activité enzymatique de hECE-1sol (Fraction F3) en fonction de la concentration en substrat (BigET-1).....	74

Figure 33 : Courbe illustrant l'inhibition de l'activité enzymatique de hECE-1sol en fonction de la concentration en phosphoramidon	76
Figure 34 : Courbe illustrant l'inhibition de l'activité enzymatique de hECE-1sol en fonction de la concentration en CGS 26303	76
Figure 35 : Protocole des bioessais sur l'aorte de rat pour valider la faible réactivité de la BigET-1.....	94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Actions biologiques systémiques de l'ET.....	6
Tableau II : Tableau des différentes lignées cellulaires utilisées et milieux de culture nécessaires pour leur croissance.....	19
Tableau III : Protocole employé pour le couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc....	36
Tableau IV : Tableau de la séquence des analogues de la BigET-1 synthétisés pour les tests de compétition avec la BigET-1.....	48
Tableau V : Tableau résumé des conditions optimales pour la transfection transitoire (au CaHPO_4) et stable (Lipofectamine 2000) des trois différents types cellulaires.....	53
Tableau VI : Tableau des résultats de dosage protéique des différentes fractions étudiées.....	56
Tableau VII : Résultats des analyses en spectrométrie de masse du fragment antigénique hECE-1sol (735-752).....	57
Tableau VIII : Tableau de l'activité enzymatique spécifique pour chacune des fractions de hECE-1sol au cours de la purification.....	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACN	Acétonitrile
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BigET	Big-endothéline
Boc	t-butyloxycarbonyle
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CHO	Cellules d'ovaires d'hamster chinois
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CGS 26303	Inhibiteur non-peptidique spécifique à l'ECE
ConA	Concanavaleine A
COS-7	Cellules rénales du singe vert d'Afrique
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMEM	<i>Dubelcco Modified Eagle Medium</i>
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDCF	<i>Endothelium derived constricting factors</i>
EDRF	<i>Endothelium derived relaxing factors</i>
EDTA	Ethylènediamino tétraacétate
ELISA	<i>Enzyme linked immunoadsorbent assay</i>
ET	Endothéline
Fmoc	9-fluorènylméthoxy-carbonyle
For	Formyle
G418	Géniticine, antibiotique eucaryote
HAM-F12	Milieu de culture cellulaire
HEK 293	<i>Human endothelial kidney cell</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
IgG	Immunoglobulines de type G
IP₃	Inositol triphosphate
LB	Luria Bertani (milieu de culture)
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i>
MDCK	Cellule canine de rein Mardin Darby
NEP	Endopeptidase neutre
NO	Oxyde nitrique
PAEC	<i>Porcine aortic endothelial cell</i>
PBS	Tampon phosphate-NaCl
PIP	Pipéridine

PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PLC	Phospholipase C
PGI₂	Prostacyclines
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS-Tw	Tampon Tris-NaCl avec Tween 20
TFA	Acide trifluoroacétique
TNFα	Facteur de nécrose tumorale α

INTRODUCTION

Chapitre 1 : L'endothéline

1.1 Historique et découverte de l'endothéline

Ayant longtemps été considéré comme une simple barrière entre le sang et la paroi vasculaire, l'endothélium vasculaire est en fait un véritable organe. En effet, cette mince couche cellulaire tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins sécrète de nombreuses substances vasoactives régissant le tonus et la croissance vasculaire. Depuis une vingtaine d'années, plusieurs études ont permis de démontrer son importance au niveau physiologique. Maintenant, il est considéré comme un tissu multifonctionnel jouant un rôle majeur dans l'homéostasie du système cardiovasculaire. En effet, il a été démontré que l'endothélium vasculaire produit et libère des substances vasodilatatrices connues sous le nom de EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factors), qui sont maintenant associés à l'oxyde nitrique et d'autres produits vasodilatateurs tel les prostaglandines et l'adrénomédulline (Furchgott et Zawadzki 1980). De plus, l'équipe de Holden et McCall (1984), a observé qu'un endothélium vasculaire intact est nécessaire pour qu'il y ait vasoconstriction en présence de l'acétylcholine. Au cours de la même année, O'Brien et McMurtry (1984) ont pu démontrer que des cellules endothéliales en culture provoquaient une contraction des artères coronaires suggérant, par le fait même, la libération d'une substance possédant des propriétés vasoconstrictrices nommée EDCF (Endothelium Derived Constricting Factor) par les cellules endothéliales. Deux ans plus tard, il est démontré que l'EDCF perd complètement son effet vasoconstricteur lorsqu'il est soumis à un traitement enzymatique à la trypsine, une protéase. Ceci suggère alors que l'EDCF est de nature protéique (Gillespie *et al.* 1986).

À partir de cette découverte de Gillespie en 1986, la caractérisation complète d'un peptide vasoconstricteur dérivé de l'endothélium a été réalisée et ce, deux ans plus tard, par Yanagisawa *et al.* (1988). Ces derniers ont isolé un puissant vasoconstricteur à effet prolongé à partir du surnageant de cellules aortiques porcines en culture. Ce peptide vasoconstricteur n'appartenant à aucune famille déjà connue, a donc été appelé endothéline. Aujourd'hui, ce peptide est connu sous le nom de endothéline-1 (ET-1). L'ET-1 est un peptide composé de 21 acides aminés et identifié comme un des plus

puissants vasoconstricteurs connus chez les mammifères. En effet, le pouvoir constricteur phénoménal de ce peptide vasculaire est d'une magnitude très supérieure à celle obtenue par l'angiotensine II ou la norépinéphrine. Ayant un poids moléculaire se situant à 2492 Da, la chaîne d'acides aminés de ET-1 est repliée et maintenue par deux ponts disulfures entre les Cys¹-Cys¹⁵ et Cys³-Cys¹¹. De plus, ses extrémités amino- et carboxy-terminales sont libres (Yanagisawa *et al.* 1988).

Depuis sa découverte et son isolement, la séquence codant pour l'ET-1 a été retrouvée dans le génome de plusieurs espèces de mammifères (Saida, Mitsui, et Ishida 1989); (Kimura *et al.* 1989); (Yanagisawa et Masaki 1989). De plus, suite au criblage du génome humain, trois gènes distincts s'exprimant de façon indépendante et encodant pour l'ET ont été identifiés. Inoue *et al.* (1989) ont élucidé une région codant pour la même chaîne d'acides aminés que le peptide originellement isolé du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc, soit l'ET-1. Les deux autres ont alors été appelés endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3). Des variations minimales sont observées entre les trois isoformes. En effet, ET-2 diffère de deux acides aminés par rapport à ET-1 soit, [Trp⁶,Leu⁷]ET-1 ; et ET-3 de six acides aminés, soit [Thr²,Phe⁴,Thr⁵,Tyr⁶,Lys⁷,Tyr¹⁴]ET-1 (Figure 1). D'autre part, la séquence des 21 acides aminés de ET-1 est conservée chez l'humain, le porc, le chien, le rat, la souris et le bœuf.

1.2 Biosynthèse de l'endothéline (Figure2)

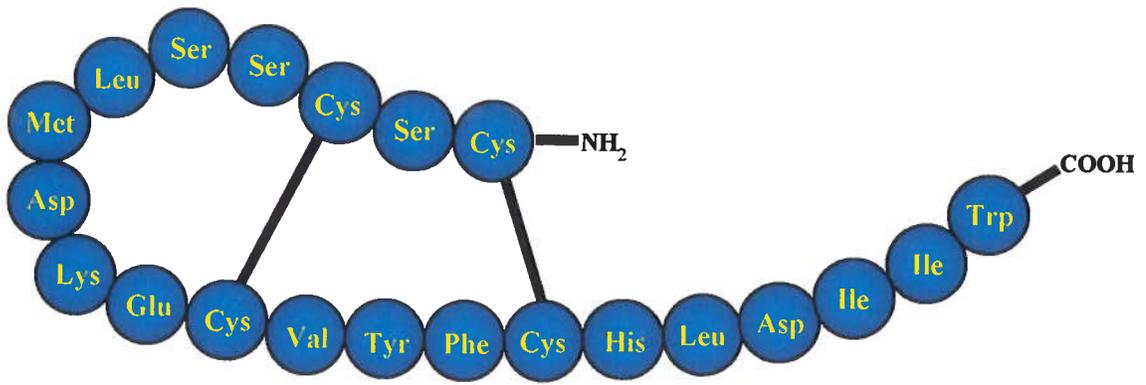
L'étude de la biosynthèse des ETs a révélé une voie métabolique très similaire dans le cas des trois isopeptides (Figure 2). Différents facteurs sont impliqués dans la stimulation de sa biosynthèse, tels que l'adrénaline, l'angiotensine II, l'insuline, la bradykinine, la vasopressine, la thrombine, certaines cytokines (IL-1), certains facteurs de croissance (TGFβ) ainsi que l'hypoxie (Ferro et Webb 1996); (Ortega Mateo et de Artinano 1997). En premier lieu, les ETs sont synthétisées à partir de précurseurs protéiques connus sous le nom de préendothélines formés de 160 à 238 acides aminés (Ortega Mateo et de Artinano 1997). Le peptide signal de ces dernières est éliminé par une signal peptidase. Par la suite, ces protéines subissent un clivage entre les acides aminés 51-52 et 92-93 grâce à l'action d'une convertase, la furine, qui engendre la formation de deux segments, les proendothélines composées de 37 à 41 acides aminés

(dépendamment de l'espèce). Parmi ces segments, la Big-endothéline dibasique est maturée par la carboxypeptidase H pour former la Big-endothéline (BigET) (Denault *et al.* 1995). Finalement, une enzyme particulière, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) va effectuer le travail final pour transformer le précurseur inactif en endothéline. Le pouvoir vasoconstricteur des Big-ET étant négligeable, leur conversion en ET s'avère alors essentielle pour l'obtention d'un effet constricteur *in vivo* (Kashiwabara *et al.* 1989). Les BigET-1 et 2 sont scindées entre les résidus tryptophane 21 et valine 22 permettant l'obtention des peptides actifs ET-1 et ET-2. Dans le cas de BigET-3, un clivage entre les résidus tryptophane 21 et isoleucine 22 conduit à la formation de ET-3. L'ECE est une métalloprotéase membranaire possédant un domaine de liaison au zinc (Ahn, *et al.* 1992); (Shimada, Takahashi, et Tanzawa 1994). L'ECE fera le sujet de la prochaine section puisqu'il s'agit de la molécule à l'étude dans le cadre de ce projet de recherche.

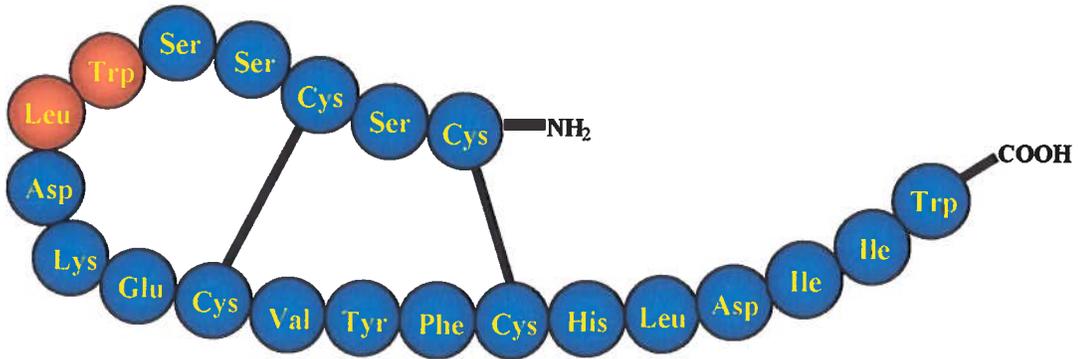
1.3 Localisation et actions biologiques de l'ET-1

Des analyses par buvardage Northern ont permis de détecter l'ARNm de l'ET-1 dans une grande variété de tissus mammifères dont les poumons, le cœur, les reins, le foie, le cerveau, la moelle épinière et le système nerveux périphérique. La grande distribution de l'ET et de ses récepteurs dans l'organisme démontre que ce peptide participe aux fonctions et à la régulation d'une multitude d'organes (Tableau 1). Les propriétés physiologiques des ETs étant nombreuses, ceci suggère alors une implication probable de celles-ci dans plusieurs physiopathologies dont l'hypertension artérielle, portale et pulmonaire, l'ischémie, l'infarctus du myocarde, l'asthme, l'arythmie, l'insuffisance rénale aiguë et l'athérosclérose (Bacon, Cary, et Davenport 1996; Ortega Mateo et de Artinano 1997; Uchida *et al.* 1996). L'étude de sa biochimie et de sa pharmacologie présente donc un intérêt thérapeutique majeur. C'est au niveau du système vasculaire que les effets les plus marquants sont observés. Ainsi, lors d'une injection intraveineuse d'ET-1, ce peptide se lie à son récepteur et un léger effet dilatateur est d'abord observé. Ce phénomène est dû à une libération de vasodilatateurs

ET-1



ET-2



ET-3

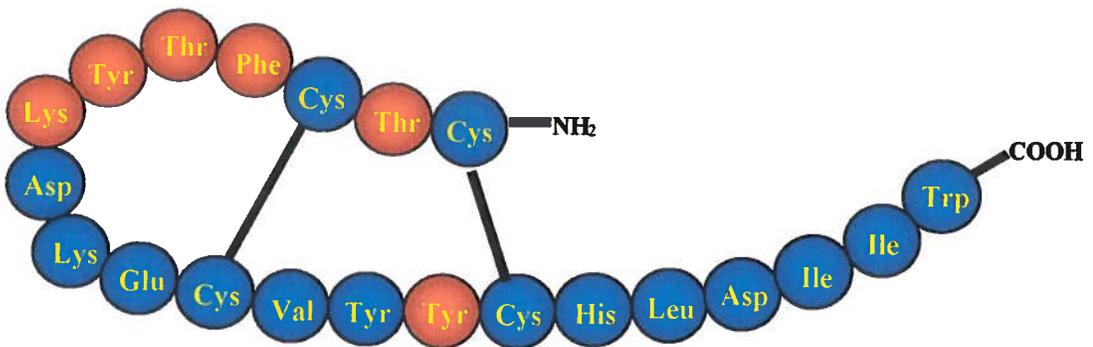


Figure 1 Structure primaire des trois isoformes de l'endothéline humaine
Les acides aminés qui diffèrent sont de couleur orange. Chaque isoforme présente deux ponts disulfures entre les Cys 1 et 15 et les Cys 3 et 11.

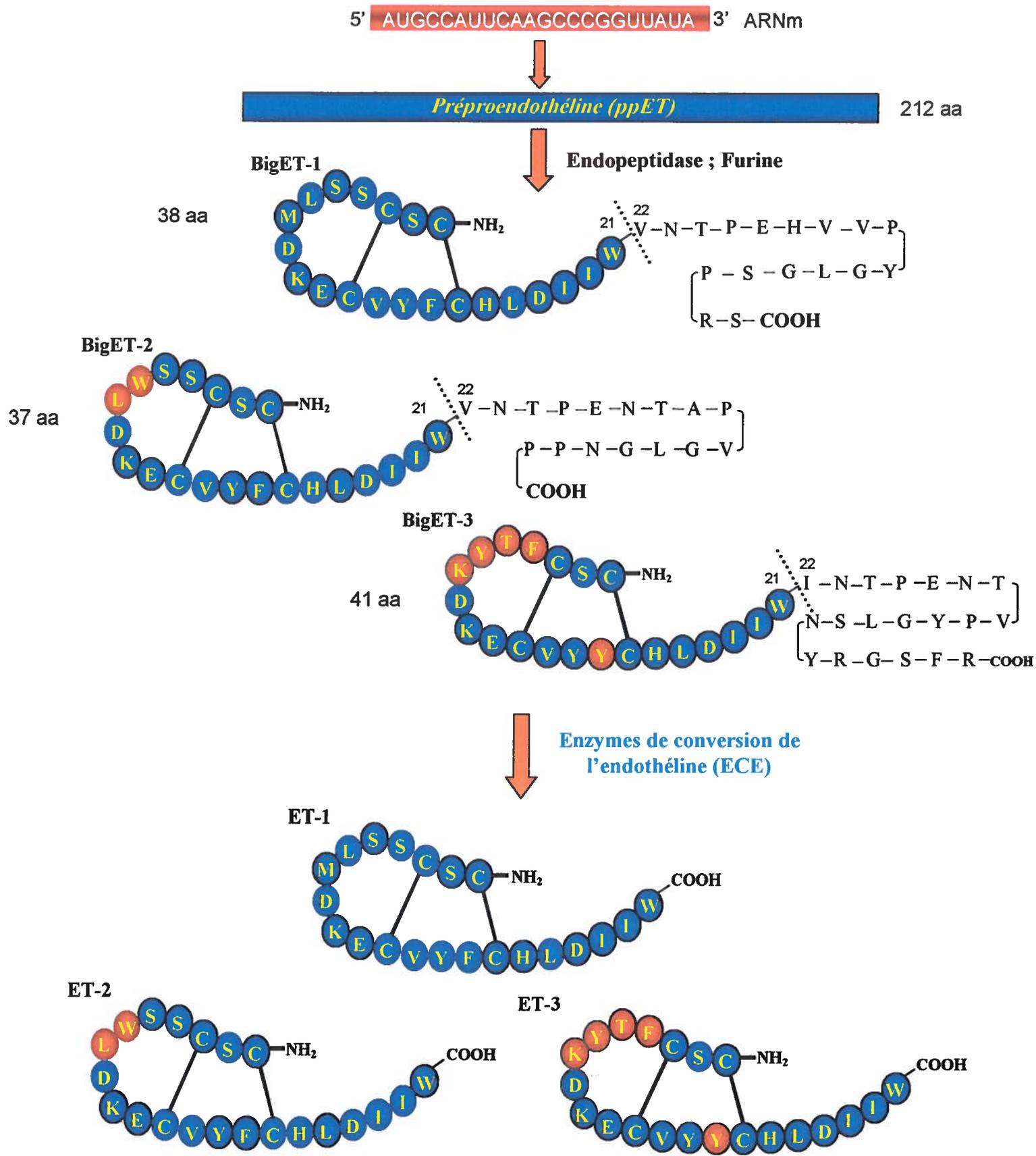


Figure 2 Biosynthèse de l'endothéline humaine

Tableau I Actions biologiques systémiques de l'ET

<u>Tissus ou organes cibles</u>	<u>Effets biologiques</u>
<i>Muscles vasculaires lisses</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Constriction de longue durée des muscles vasculaires isolés ; ✓ Actions mitogènes sur les cellules musculaires lisses en culture ; ✓ Vasoconstriction des artères coronaires ; ✓ Augmentation de la pression sanguine.
<i>Endothélium vasculaire</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Libération d'oxyde nitrique.
<i>Muscles lisses non-vasculaires</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Constriction des muscles lisses de l'intestin, de la trachée et de l'utérus.
<i>Cœur</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Augmentation de la contractilité ; ✓ Augmentation du débit cardiaque ; ✓ Stimulation de la libération d'ANP.
<i>Poumons</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bronchoconstricteur puissant.
<i>Tissu nerveux</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Augmentation de la libération de neurotransmetteurs.
<i>Reins</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inhibition de la libération de la rénine ; ✓ Diminution du flux sanguin rénal ; ✓ Diminution de la vitesse de filtration glomérulaire ; ✓ Diminution de l'excrétion urinaire de Na⁺ et de K⁺.
<i>Foie</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Activation de la glycogénolyse ; ✓ Stimulation de la production de PGE₂ par les cellules Kupffer ; ✓ Augmentation de la pression portale ; ✓ Régulation du flux biliaire.
<i>Glandes surrénales</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Stimulation de la biosynthèse de l'aldostérone ; ✓ Libération de catécholamines.

Source : (Doherty 1992).

tels l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI₂) au niveau de l'endothélium (Moncada, Gryglewski, *et al.* 1976; Palmer, Ferrige, et Moncada 1987). Ensuite, une contraction longue et soutenue est observée, résultant d'une liaison ligand-récepteur quasi irréversible. Effectivement, l'élimination de l'ET de son récepteur est un phénomène très lent aux conditions physiologiques, raison pour laquelle ses effets de constriction possèdent une très longue durée d'action, soit plus de soixante minutes.

1.4 Les récepteurs de l'ET

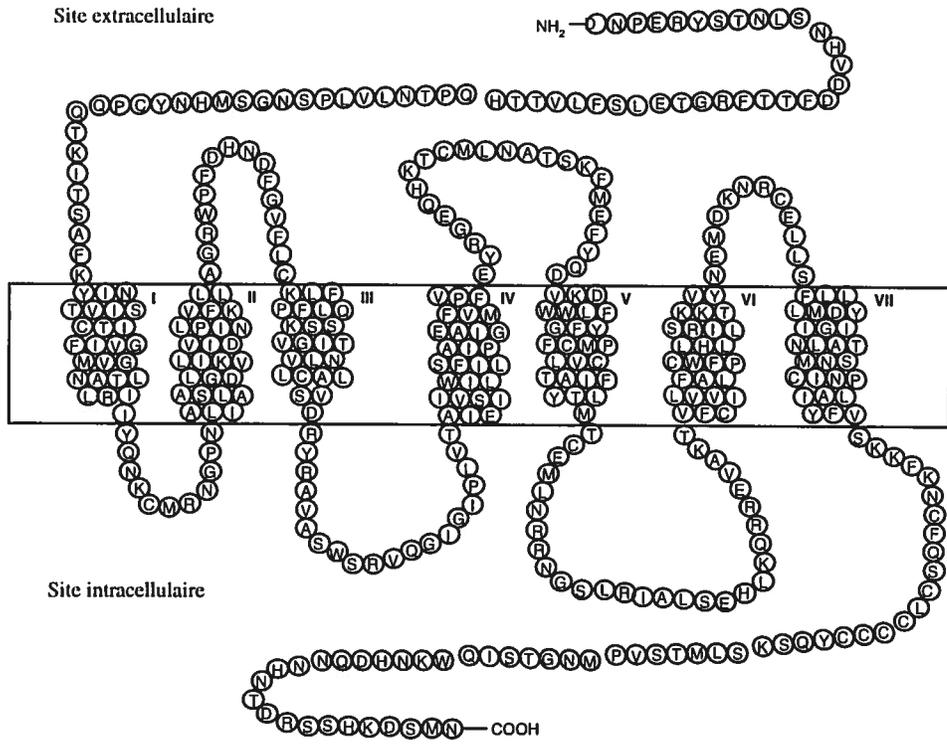
Les multiples effets pharmacologiques observés avec les endothélines suggèrent une hétérogénéité des récepteurs. De ce fait, deux types de récepteur répondent aux ligands ETs. En effet, deux ans après la découverte de ces agents vasoconstricteurs, les équipes de Arai *et al.* (1990) et de Sakurai *et al.* (1990) réussissent le clonage de gènes encodant pour leurs récepteurs. Ils sont connus sous les noms de récepteur ET_A et ET_B. Ces récepteurs se retrouvent surtout au niveau des vaisseaux sanguins. Cependant, ils ont été localisés dans plusieurs tissus non-vasculaires tels que le cœur, la rate, les reins, les voies respiratoires, le foie, le pancréas, l'utérus, les glandes surrénales et le système nerveux central (Stjernquist 1998). Dans le système vasculaire, le récepteur ET_A, composé de 427 acides aminés chez l'homme, se retrouve de façon majoritaire à la surface des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins permettant ainsi de provoquer leur contraction. ET-1 possède une affinité de beaucoup supérieure pour le récepteur ET_A que celle observée pour ET-2 et ET-3 (ET-1 > ET-2 >> ET-3) (Figure 3). En ce qui a trait au récepteur ET_B, il est formé de 442 acides aminés chez l'humain et sa localisation se limite principalement à l'endothélium vasculaire où il peut induire la libération de EDRFs tels que l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline ce qui a pour effet de causer une dilatation du tissu vasculaire (Figure 3). Le récepteur ET_B ne présente pas de sélectivité au niveau de ses ligands puisqu'il permet la liaison de ET-1, ET-2 et ET-3 avec une affinité similaire. Or, ce récepteur est également retrouvé dans le muscle vasculaire lisse où il peut induire un effet vasoconstricteur. Pour différencier ces deux sous-types de récepteurs ET_B, on nomma ET_{B1} le récepteur retrouvé au niveau des cellules endothéliales et ET_{B2}, le récepteur localisé dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Masaki, Yanagisawa, et Goto 1992). Un troisième récepteur de l'ET, le récepteur ET_C, a été identifié et cloné chez la grenouille africaine *Xenopus laevis*. Ce

récepteur semble plutôt sélectif pour l'ET-3 mais n'a pas encore été cloné dans le génome humain ni dans celui d'autres mammifères (Karne, Jayawickreme, et Lerner 1993). Les récepteurs de l'ET sont couplés aux protéines G et sont formés d'une seule chaîne d'acides aminés comprenant sept domaines transmembranaires qui comportent chacun de 20 à 27 acides aminés hydrophobes (Ortega Mateo et de Artinano 1997).

1.5 Signalisation intracellulaire engendrée par l'ET

Les nombreux effets produits par les récepteurs de l'ET sont causés par une cascade d'événements (Figure 4). Tout d'abord, le complexe récepteur-ET se lie à une protéine G activant ainsi la phospholipase C (PLC) située au niveau membranaire. Par la suite, celle-ci hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) générant ainsi deux produits : l'inositolphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) et permet également l'entrée de calcium extracellulaire. Ce phénomène aura pour effet d'entraîner la mobilisation du calcium cytoplasmique par l'IP₃ et le DAG permettra l'activation de la protéine kinase C. De plus, d'autres signaux intracellulaires impliquant l'activation des phospholipases D et A₂ permettent l'ouverture des canaux ioniques (Ortega Mateo et de Artinano 1997). C'est grâce à ces voies de signalisation cellulaire que l'ET peut engendrer les mécanismes contractiles (au niveau des muscles) et sécrétoires (au niveau des cellules endothéliales) (D'Orléans-Juste, *et al.* 1996).

ET_A



ET_B

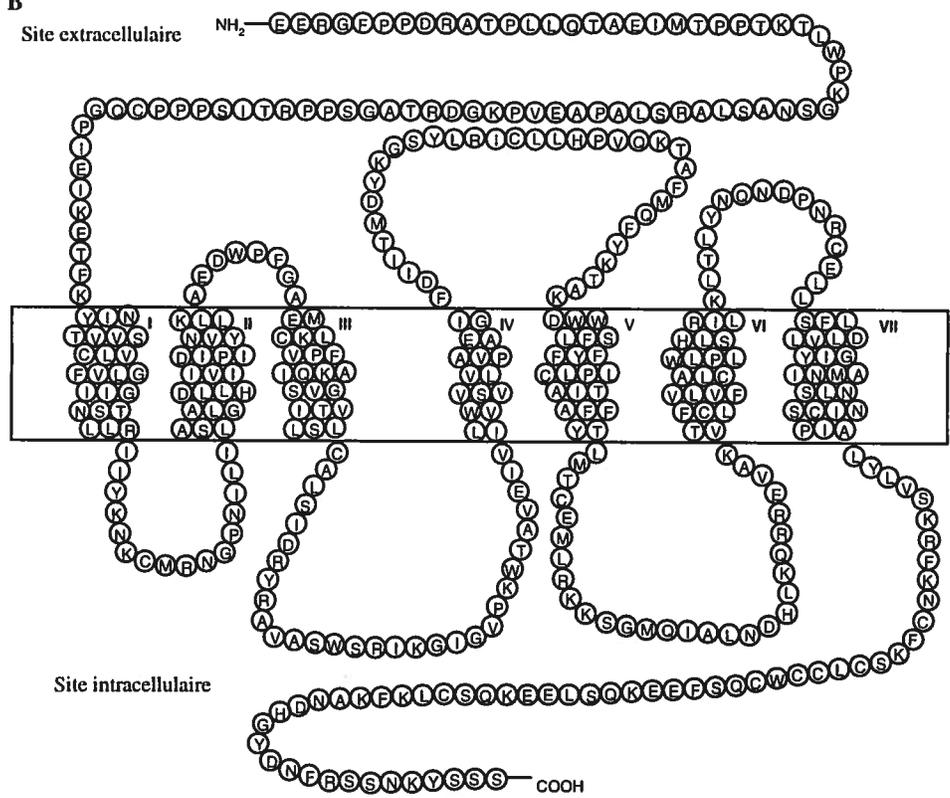


Figure 3 Récepteurs de type A et B des ETs

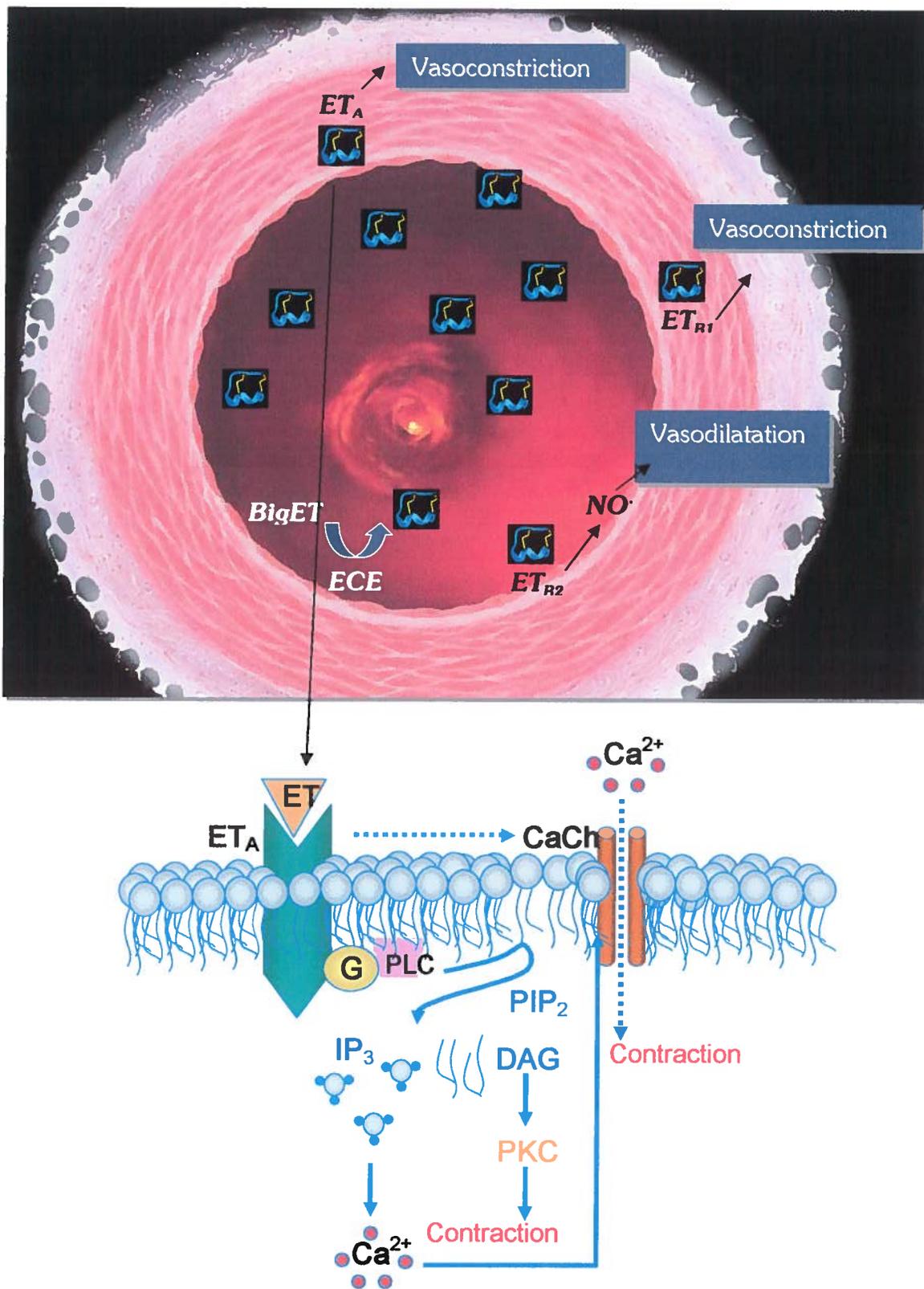


Figure 4 Mécanisme d'action et transduction de signal de l'endothéline

Les signaux impliqués pour générer la contraction musculaire au niveau des cellules musculaires lisses sont décrits en détails dans la portion du bas de la figure. (Tiré de Ortega Mateo et De Artinano, 1997).

Chapitre 2 : L'enzyme de conversion de l'endothéline

2.1 Historique et découverte de l'ECE

Plusieurs candidats ont été soupçonnés comme étant des « ECE » potentielles lors de l'étude de la biosynthèse des ETs. En effet, parmi ceux-ci, on retrouve des aspartyl protéases (Takaoka *et al.* 1990b), des protéases semblables à la chymotrypsine (Takaoka *et al.* 1990a), des cathepsines D et E (Mahmoudian 1996; Sawamura *et al.* 1990), des protéases à thiols (Deng, *et al.* 1992), des sérines protéases ou des membres de la famille de l'endopeptidase neutre (NEP), soit les métalloprotéases. Dans un contexte *in vitro*, l'ensemble de ces enzymes ont eu la capacité de produire de l'ET à partir d'un clivage de la BigET. Toutefois, plusieurs tests de caractérisation du processus de clivage ont démontré que le phosphoramidon inhibe ou diminue la réponse biologique de la BigET (Trapani *et al.* 1995). De plus, des extraits cellulaires ont permis d'identifier l'enzyme responsable de ce clivage et de la localiser au niveau de la membrane cellulaire (Shima *et al.* 1994). Finalement, une enzyme a été purifiée chez plusieurs animaux et cette dernière a alors été nommée enzyme de conversion de l'endothéline (ECE).

2.2 Propriétés physico-chimiques de l'ECE

L'ECE a été isolée et caractérisée par l'équipe de Ohnaka en 1992. Comme mentionné précédemment, l'ECE est une métalloendopeptidase transmembranaire de type II fortement glycosylée (~10 sites de glycosylation de type N) ayant un poids moléculaire variant de 120-130 kDa. Cette enzyme possède un court domaine cytosolique dans sa portion N-terminale, un segment hydrophobe transmembranaire simple sous forme d'hélice et un grand ectodomaine extracellulaire dans lequel est retrouvé la séquence consensus du site de liaison au zinc : HEXXH ainsi que le site catalytique de l'enzyme (Ohnaka, *et al.* 1992; Takahashi *et al.* 1993). Son site catalytique possède un résidu tyrosine semblable au domaine Y157 de la thermolysine bactérienne (Sansom, Hoang, et Turner 1998). Elle est inhibée par le phosphoramidon mais aucune inhibition n'est constatée en présence de thiorphan, un inhibiteur puissant de plusieurs métalloprotéases (Balwierczak, *et al.* 1995). Cette protéine a été clonée et celle-ci apparaît comme étant un membre de la famille des zinc métallopeptidases qui inclue la NEP, la thermolysine bactérienne, l'antigène de surface KELL et la protéase orpheline

PEX (Holm, Huang, et Kunkel 1997; Lee *et al.* 1991; Shimada *et al.* 1995a). Elle présente des similarités de séquence importantes avec la NEP (Valdenaire, Rohrbacher, et Mattei 1995). Cette enzyme est responsable du clivage de la BigET en ET tel que décrit précédemment (Figure 2). La sélectivité pour les différentes isoformes de la BigET est BigET-1 >> BigET-2 = BigET-3 (Battistini, Brown, et Vane 1995). Un homologue bactérien à l'ECE a été découvert avec un pourcentage d'homologie de 31%. Il s'agit de l'enzyme PegPePO isolée de la bactérie pathogène *Porphyromonas gingivalis*, elle-même impliquée dans les anomalies cardiovasculaires de par sa capacité d'invasion des cellules endothéliales aortiques et des plaques athérosclérotiques (Awano *et al.* 1999; Carson *et al.* 2002).

2.3 Les isoformes de l'ECE

Plusieurs ADN complémentaires (ADNc) de l'ECE ont été isolés, qui codent pour trois formes de l'ECE : ECE-1, ECE-2 et ECE-3 (Emoto et Yanagisawa 1995; Hasegawa *et al.* 1998; Ikura *et al.* 1994; Schmidt *et al.* 1994; Shimada *et al.* 1995b; Shimada *et al.* 1994; Xu *et al.* 1994). De façon générale, ECE-1 est exprimée majoritairement au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses et est responsable du clivage de la BigET-1 (Orzechowski *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 1995). ECE-2 est exprimée de façon prédominante dans le système nerveux central, plus particulièrement au niveau du cerveau, et clive également préférentiellement BigET-1. Cette dernière a été clonée à partir des cellules cortico-surréaliennes bovines et possède 758 acides aminés correspondant à 59% d'homologie avec ECE-1 (Emoto et Yanagisawa 1995). Pour sa part, ECE-3 clive seulement BigET-3 et non BigET-1. De plus, quatre isoformes de l'ECE-1 humaine ont été décrites à ce jour : ECE-1a et ECE-1b (Valdenaire *et al.* 1995), (aussi nommées ECE-1 β et ECE-1 α respectivement) (Shimada *et al.* 1995), ECE-1c (Schweizer *et al.* 1997) et ECE-1d (Valdenaire *et al.* 1999). Ces quatre isoformes sont codées par le même gène par le biais de quatre promoteurs différents (Orzechowski *et al.* 1997; Valdenaire *et al.* 1999) et ne diffèrent que par la séquence de leur domaine cytosolique N-terminal (Shimada *et al.* 1995; Valdenaire *et al.* 1999). La structure génomique de ECE-1 est complexe (Figure 5). Quatre exons (régions codantes) sont nécessaires pour distinguer les quatre types d'ECE-1. La production de l'ARNm de ces protéines s'effectue selon un épissage alternatif décrit dans la figure 5. La signalisation

intracellulaire et les mécanismes qui régulent la transcription de ce gène sont très peu connus à ce jour. Toutefois, les équipes de Orzechowski *et al.* (2001) et de Valdenaire *et al.* (1999) ont démontré que la protéine kinase C est impliquée dans l'activation de cette isoforme et que le facteur de transcription Ets-1 possède un potentiel d'induction de la transcription de ce gène par une liaison au motif GGAA de deux éléments de liaison (EBS -638 et -658) de la séquence promotrice du gène de l'ECE-1. De plus, la thrombine et le dexaméthasone peuvent réguler l'expression de ce gène (Gomazkov 1998). D'autre part, la production de souris knockout pour ce gène résulte en la production d'embryons démontrant un phénotype similaire à celui obtenu chez des souris dont le gène de ET-1 et du récepteur ET_A n'est pas exprimé. Ceci démontrant également à quel point ECE-1 est étroitement liée à la production d'ET-1 (Yanagisawa *et al.* 1998).

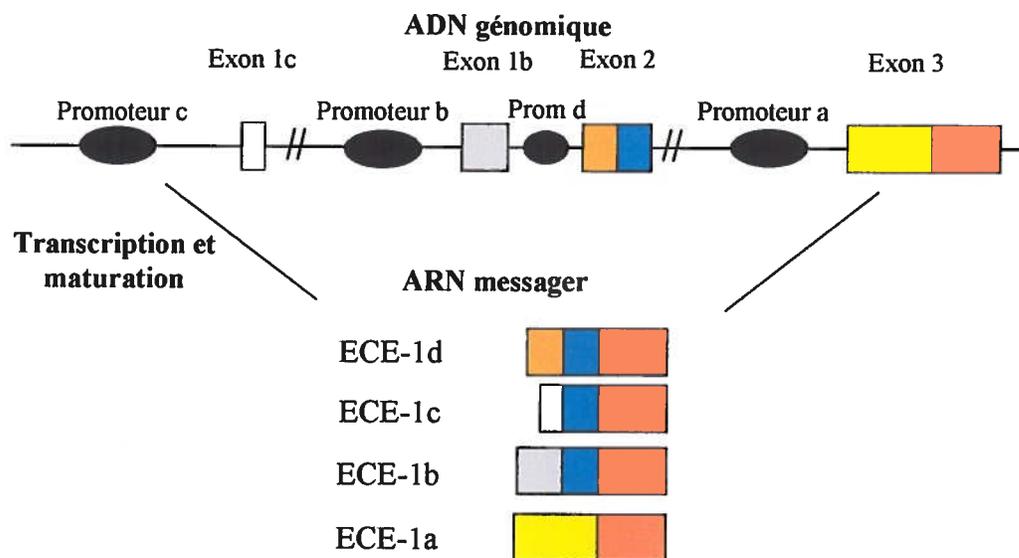


Figure 5 Organisation du gène de l'ECE-1 humaine

Tiré de Funke-Kaiser et al. 2000.

D'autre part, des études récentes utilisant la mutagenèse dirigée ont démontré que les résidus Glu⁵⁹², Glu⁶⁵¹ et His⁷¹⁶ sont responsables de l'activité catalytique chez l'ECE-1a de rat (Johnson *et al.* 2002). Le site catalytique de ECE-1 démontre une structure similaire à celui de la NEP (Sansom *et al.* 1998) mais par contre, ECE-1 diffère significativement de cette dernière par sa liaison avec l'extrémité COOH-terminale du substrat (Johnson *et al.* 2002). De plus, l'ECE possède à son extrémité C-terminale un motif appelé CXAW (retrouvé également chez la NEP) qui est essentiel pour la maturation et l'activité de cette enzyme. En effet, les résidus Cys (C) et Trp (W) de ce motif sont importants pour la maturation et l'activité de l'enzyme respectivement (MacLeod *et al.* 2001). Par surcroît, l'ECE existe sous forme dimérique et cette dimérisation est rendue possible grâce à l'acide aminé Cys⁴¹² chez le rat et Cys⁴²⁸ chez l'homme créant ainsi un pont disulfure entre les deux molécules. (Bur, Dale, et Oefner 2001; Shimada *et al.* 1994). La forme dimérique est requise pour permettre la conversion de la BigET en ET (Gomazkov 1998).

2.4 Distribution tissulaire et cellulaire de l'ECE-1

Ces isoformes ont une distribution tissulaire qui varie d'une forme à l'autre. L'ECE est exprimée par plusieurs types cellulaires retrouvés au niveau de l'aorte, des poumons, des reins, du foie, du cœur, du cerveau, du placenta et des cellules chromaffines des glandes surrénales (Takahashi *et al.* 1995). La première fraction contenant l'ECE provenait d'un homogénat de microsomes de poumons de rat (Takahashi *et al.* 1993). Toutefois, sa localisation exacte au niveau de ces différentes cellules est variable (Schweizer *et al.* 1997). L'ECE-1b est la seule isoforme présente dans des vésicules intracellulaires (Azarani, Boileau, et Crine 1998; Schweizer *et al.* 1997). ECE-1c, qui correspond à une forme tronquée de ECE-1b amputée de ses 17 premiers acides aminés, est majoritairement présente à la surface cellulaire au même titre que l'ECE-1a. On n'en retrouve que de faibles quantités dans les mêmes structures intracellulaires que ECE-1b (Schweizer *et al.* 1997). Différentes études proposent des conclusions opposées concernant la maturation de l'endothéline par l'ECE. Certaines d'entre elles indiquent que l'activité majeure de l'ECE est réalisée en tant qu'ectoenzyme, c'est-à-dire à la surface cellulaire (Corder, Khan, et Harrison 1995; Harrison *et al.* 1993; Takahashi *et al.* 1995; Turner et Murphy 1996). D'autres suggèrent que l'ECE est surtout active dans un compartiment intracellulaire (Gui *et al.* 1993). L'isolement d'ECE bovine de glandes

adrénergiques révèle la localisation de l'enzyme dans des tissus sécrétoires autres que l'endothélium (Xu *et al.* 1994). L'ECE a également été observée dans l'hippocampe de rat ainsi que dans un neuroblastome. La conversion de BigET-1 et BigET-3 avec un relâchement subséquent d'acide arachidonique a été démontré chez les astrocytes de rat en cultures (Deschepper, Houweling, et Picard 1995). Récemment, cette enzyme a été identifiée dans le tissu prostatique de rat (Wan *et al.* 1997). De plus, le clonage de différentes isoformes de l'ECE-1 et l'identification de l'ECE-1b comme forme intracellulaire localisée au niveau de l'appareil de Golgi des cellules CHO, de la lignée de cellules endothéliales HUVEC (Schweizer *et al.* 1997) ou dans les endosomes des cellules MDCK (Azarani *et al.* 1998; Schweizer *et al.* 1997) ont récemment permis de valider les observations rapportés précédemment. En effet, le segment N-terminal de ECE-1b contient un motif di-leucine permettant un signal de rétention intracellulaire (Cailler *et al.* 1999; Schweizer *et al.* 1997). Cependant, malgré cette localisation diversifiée, la conversion de BigET en ET mature se fait principalement dans les cellules endothéliales.

2.5 L'ET-1, l'ECE-1 et leurs implications pathologiques

La synthèse d'ET-1, la présence de récepteurs correspondants dans l'endothélium de plusieurs tissus (organes) et le couplage de ces effets avec l'activation (ou le relâchement) de plusieurs composés physiologiquement actifs, tels le NO, les prostaglandines, des médiateurs à faible poids moléculaire et certains peptides, déterminent une grande variété de réactions physiologiques et pathologiques. Tout d'abord, l'ET et conséquemment l'ECE, sont responsables de la régulation du tonus vasculaire et de la cardiodynamique en général. De ce fait, en utilisant un modèle expérimental de dommages des vaisseaux coronariens du cœur ainsi que des patients présentant une athérosclérose coronarienne, la localisation de l'ECE-1 et son expression ont été démontrées. Le phosphoramidon a permis également de diminuer les changements dans les tissus ayant subi des dommages au niveau de l'intima des artères coronaires (Minamino *et al.* 1997). D'autre part, l'ET est apparemment impliquée dans la pathogenèse de l'hypertension essentielle. La surexpression de l'ARNm de ET-1 augmente de 13 fois le taux d'ET-1 circulant dans les vaisseaux sanguins et dans le foie

généralant ainsi une augmentation marquée de la pression artérielle sanguine (Niranjan *et al.* 1996).

2.6 L'inhibition de l'ECE

Pour permettre son activité, l'enzyme nécessite du zinc. Elle est cependant inhibée par les inhibiteurs classiques des métalloprotéases comme les chélateurs de métaux (EDTA) et le phosphoramidon, un métabolite produit par *Streptomyces tomashiensis* (Kukkola *et al.* 1995). Une comparaison du potentiel inhibiteur des chélateurs de métaux sur l'ECE a permis de démontrer que les composés, 2,3-dimercapto-1-propanol, toluène-3,4-dithiol et 8-mercaptoquinoline inhibent l'enzyme de façon plus efficace que l'EDTA (Ashizawa *et al.* 1994). Cependant, l'ECE n'est pas inhibée par le thiorphan, un inhibiteur à large spectre. Cette caractéristique permet de distinguer l'ECE des autres métalloprotéases. D'autre part, des dérivés de l'acide hydroxamique et de l'acide phosphonique exercent un potentiel inhibiteur sur l'ECE (Bihovsky *et al.* 1995). Depuis la découverte de l'ECE, plusieurs inhibiteurs non peptidiques ont été développés dans le but d'élaborer certaines molécules ayant un potentiel thérapeutique dans le traitement des maladies associées à l'endothéline. Effectivement, l'équipe de Jeng (2002) a développé une série d'inhibiteurs puissants démontrant une sélectivité élevée pour l'enzyme. De ce fait, le CGS 26303, le CGS 26393, le CGS 34043, le CGS 34226 et le CGS 35066 ont été élaborés comme nouveaux outils pharmacologiques pour évaluer le rôle de ECE-1 dans différentes conditions pathologiques et permettre également de développer des inhibiteurs spécifiques à ECE-1, avec un double effet, soit une inhibition NEP/ECE et également avec un effet triple, soit une inhibition NEP/ECE/ACE. (De Lombaert *et al.* 2000; De Lombaert *et al.* 1994; Jeng *et al.* 2002; Wallace *et al.* 1998). Un autre inhibiteur pour ECE, le TMC-66 a également été découvert par l'équipe de Asai et collaborateurs en 1999. Ce dernier est produit par une souche spécifique de *Streptomyces* : sp. A5008 et inhibe de façon sélective l'ECE (Asai *et al.* 1999). De plus, la combinaison de deux inhibiteurs, soit le benazepril (spécifique à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)) et le CGS 35066 (spécifique à l'ECE) permettent de donner un effet antihypertenseur additif chez le rat (Battistini *et al.* 2002). L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens pour l'ECE-1c a également été à l'étude chez des cellules musculaires lisses bovines et n'a pas été

déterminant pour le développement de molécules inhibitrices à potentiel thérapeutique. Effectivement, malgré une réduction du pool d'ARNm et de l'expression protéique de ECE-1c, le taux d'ET-1 observé (de façon basale et après stimulation au TNF α) n'a pas été diminué, suggérant alors l'existence d'une autre endopeptidase distincte de l'ECE-1 responsable de la maturation de la BigET en ET (Barker *et al.* 2001).

2.7 Les caractéristiques du substrat de l'ECE, la BigET

La séquence minimale exacte de la BigET pour permettre un clivage spécifique entre les résidus 21 et 22 par l'ECE n'est pas clairement décrit dans la littérature. Or, quelques études suggèrent que le segment 18-34 de la BigET est important pour la reconnaissance du substrat par l'enzyme (Okada *et al.* 1993). D'autre part, des inhibiteurs peptidiques à haut poids moléculaire sont obtenus lors de l'incorporation d'une D-valine en position 22 d'un analogue tronqué de la BigET, soit la BigET (16-38) (Morita *et al.* 1994). De plus, le remplacement de la valine 22 par une phénylalanine pour l'analogue BigET (19-37) semble être également un ligand potentiel de l'ECE agissant comme inhibiteur (Claing 1995). De plus, les fragments BigET-1 (16-39) et BigET-1 (16-29) porcine sont également de bons substrats pour l'enzyme, mais les modifications de la portion C-terminale de la molécule mène à une diminution importante de l'activité de l'ECE (Keller *et al.* 1996).

2.8 L'ECE soluble : un outil pour une production enzymatique simplifiée et à grande échelle

Pour permettre d'avoir un outil de travail facilitant la production et la purification de ECE-1a, une équipe de chercheur ont mis au point une forme soluble de l'ECE (Korth *et al.* 1997). En effet, après analyse de la séquence génétique de l'enzyme, ces derniers ont effectué des modifications de l'ADNc dans le but de la rendre soluble. Pour ce faire, le segment transmembranaire a été tronqué et la portion extracellulaire de l'enzyme a été fusionnée avec le peptide signal de la phosphatase alcaline (Figure 6). Ce nouvel ADNc recombinant code alors pour l'ECE-1a soluble, une protéine de 704 acides aminés ayant un poids moléculaire allant de 100 –120 kDa, dépendamment de son taux de glycosylation (en fonction du type cellulaire utilisé pour l'expression) (Ahn, Herman, et Fahnoe 1998). L'activité enzymatique de cette forme soluble démontre des résultats similaires à la forme membranaire la rendant un outil intéressant pour la caractérisation

et la compréhension du mode d'action de l'ECE (Ahn *et al.* 1998; Korth *et al.* 1997). Cet outil moléculaire est celui utilisé dans le cadre de la présente étude.

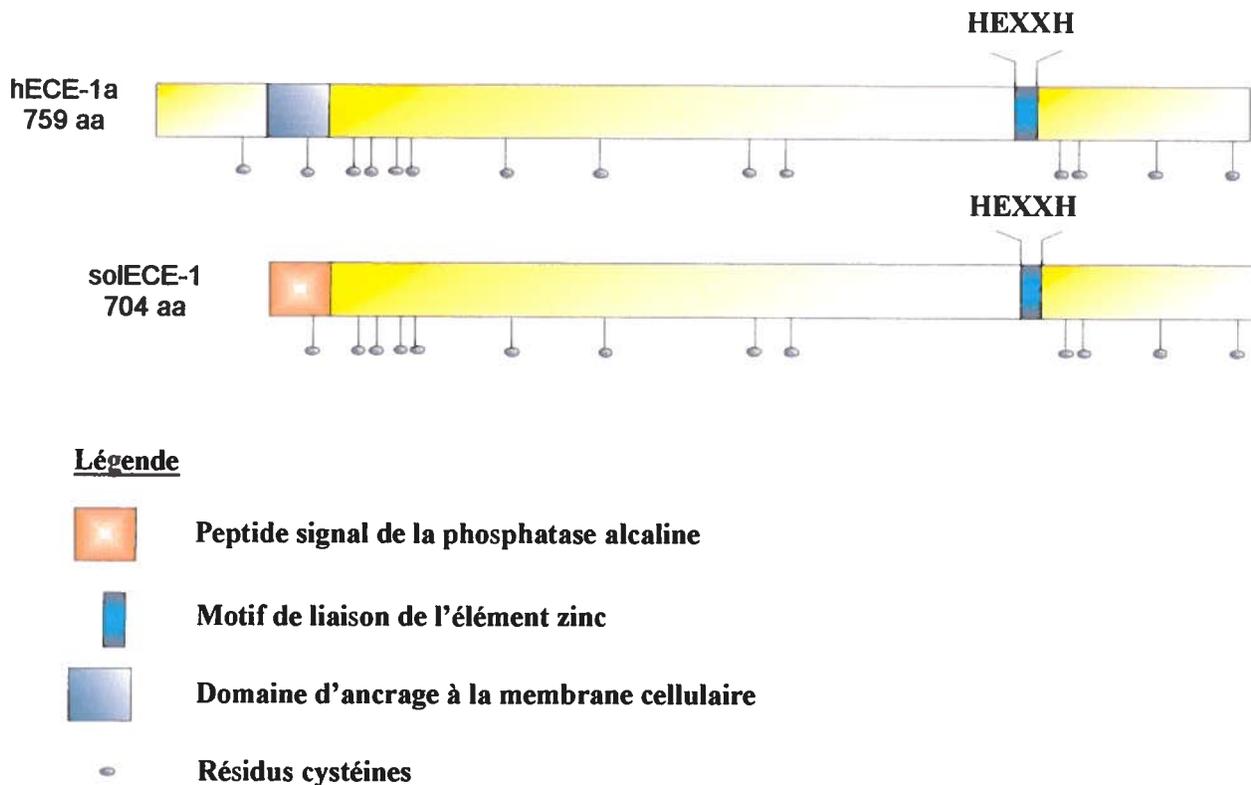


Figure 6 Modifications apportées à l'enzyme de conversion de l'endothéline-1a (hECE-1a) pour la rendre soluble

2.9 Les objectifs de ce projet de recherche

L'objectif du présent projet de recherche est le développement d'une lignée cellulaire exprimant la forme soluble de l'enzyme de conversion de l'endothéline humaine (hECE-1). Cette lignée cellulaire est alors utilisée comme outil pour la caractérisation de l'activité protéolytique de l'ECE. Ceci permettra éventuellement de développer des analogues du substrat de l'enzyme, de courte taille, ayant des propriétés inhibitrices ainsi que de déterminer les résidus clés devant être présents dans le substrat pour permettre un clivage spécifique par l'enzyme. Ces informations permettront également de déterminer le mode d'action de l'enzyme laissant place à un contrôle de ce dernier dans les cas de pathologies associées au processus métabolique de cette protéine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Section 1 Développement de la lignée cellulaire

1.1 Matériel pour la culture cellulaire

Dans le cadre de ce projet, trois différents types cellulaires ont été testés pour leur potentiel d'expression de la forme soluble de l'enzyme de conversion de l'endothéline humaine. Le tableau II ci-dessous fait l'énumération de celles-ci et informe sur les conditions de cultures de ces dernières.

Tableau II Tableau de différentes lignées cellulaires utilisées et milieux de culture nécessaire pour leur croissance

	Origine	Utilisation	Milieux de culture
CHO (chinese hamster ovary)	cellules cancéreuses d'ovaires d'hamster chinois	Transfection cellulaire	HAM-F12, 4,5g/L glucose 4mM L-Gln, 3,7 g/L NaHCO ₃ 10% SVF, 1% pénicilline, streptomycine
HEK 293 (human endothelial kidney)	Cellules cancéreuses de l'endothélium rénal humain	Transfection cellulaire	DMEM, 4,5g/L glucose, 4mM L-Gln, 3,7 g/L NaHCO ₃ 10% SVF, 1% pénicilline, streptomycine
COS-7	Cellules cancéreuses fibroblastiques rénales du singe africain vert <i>Cercopithecus aethiops</i>	Transfection cellulaire médiée par SV-40	DMEM, 4,5g/L glucose, 4mM L-Gln, 3,7 g/L NaHCO ₃ 10% SVF, 1% pénicilline, streptomycine

Toutes ces lignées cellulaires ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Les milieux de cultures utilisés : DMEM (Dubelcco Modified Eagle Medium) et HAM-F12, le sérum de veau foetal (SVF), le mélange pénicilline/streptomycine (10g/L), la trypsine, le tampon phosphate (PBS) et le G418 (géniticine) provenaient de BioMedia (France). Le réactif utilisé pour la lipofection (transfection médiée par des vésicules lipidiques) a été la Lipofectamine 2000. Elle provenait de la compagnie Invitrogen (Burlington, ON, CA). Les bouteilles de culture cellulaire et les plats de Pétri utilisés provenaient de la compagnie Sarstedt (Montréal, QC, CA).

1.2 Conditions de culture des différentes lignées cellulaires

Chaque lignée cellulaire a été reçue congelée dans un vial contenant 95% du milieu de culture décrit précédemment additionné de 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les cellules ont alors été décongelées à 37°C, 2 minutes, centrifugées à 1000g pour 10 minutes dans le but d'enlever le DMSO. Les cellules ont été resuspendues dans leur milieu de culture respectif (DMEM ou HAM-F12, 10% SVF (dont le complément a été préalablement inactivé à 56°C pour une période de 30 minutes), 1% pénicilline et streptomycine) et transférées dans un flacon de culture (75 cm²) propre aux cellules adhérentes (surface de culture préalablement traitée, « Cell+ »). Par la suite, ces dernières ont été placées dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ jusqu'à ce qu'elles aient adhéré et atteint la confluence. Ceci constituait alors le passage 0. Après une période d'environ 2 ou 3 jours (atteinte de la confluence), les cellules ont subi un premier passage. L'utilisation d'une solution 0,05% trypsine, 0,02% EDTA (2 mL par flacon) a permis de décoller le tapis cellulaire. Les cellules étaient déposées par centrifugation (1200 RPM pour 10 minutes) et resuspendues dans une proportion 1 : 10 dans leur milieu de culture respectif. Ce nouveau flacon correspondait alors au passage P1. Le maintien des cultures a été effectué de cette façon tout au long de l'expérience.

Des aliquots de cellules étaient congelés après différents passages (surtout lors des 3 ou 4 premiers passages) à raison de 1-2 millions de cellules/mL par tubes pour assurer l'approvisionnement de la lignée cellulaire. Le milieu de congélation était constitué de 95% milieu de culture respectif plus 5% DMSO. De plus, les cellules étaient jetées après le 100^e passage et ce, dans le but de conserver les mêmes propriétés morphologiques et métaboliques entre les différents passages. En effet, étant donné qu'il s'agit de lignées cancéreuses qui prolifèrent de façon anarchique et continue, certaines modifications pouvaient apparaître au cours de leur croissance. Il devenait alors nécessaire de les utiliser lors des 100 premiers passages pour éviter ce phénomène.

1.3 Matériel génétique de départ : le pME18ShECE-1sol, un vecteur d'expression transitoire

1.3.1 Vecteur plasmidique de départ

Pour permettre l'expression de l'ECE-1 soluble par la technique de transfection cellulaire, le matériel génétique de départ a été fourni par le Dr Masashi Yanagisawa (Dallas, TX, USA). Un plasmide navette (bactérie/mammifère) comportant un fragment d'ADN complémentaire codant pour une forme soluble de l'ECE-1 humaine, a été obtenu. Ce plasmide portait alors le nom de pME18ShECE-1sol (Figure 7) (Ahn *et al.* 1998). Étant donné l'absence de marqueur de sélection eucaryote, ce vecteur a été seulement utilisé dans le cadre d'une transfection de type transitoire (expliquée dans la section 1.5).

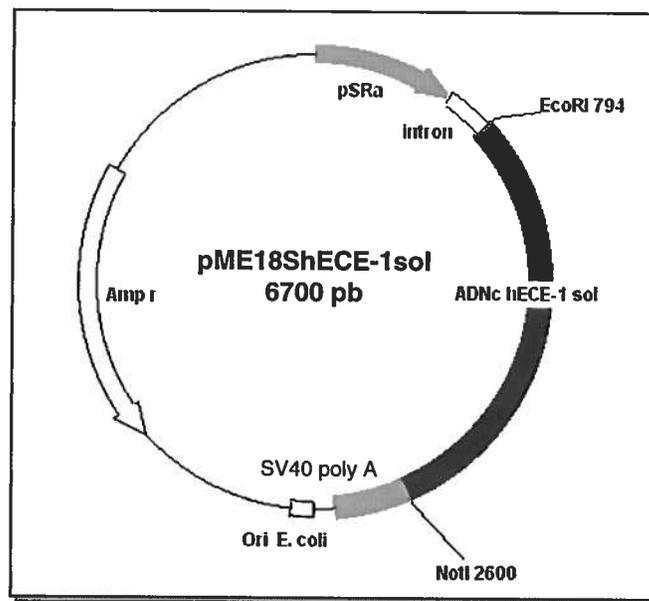


Figure 7 Cartographie du plasmide pME18ShECE-1sol
Ce plasmide a été fourni par le Dr Masashi Yanagisawa du Texas.

1.3.2 Production à grande échelle du plasmide dans un système procaryote

Le plasmide pME18ShECE-1sol a été propagé dans *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene, (Texas, USA) Les protocoles de transformation des cellules compétentes et de purification du plasmide sont décrites à la figure 8.

Les bactéries *E. coli* XL-1 blue ont été cultivées dans un milieu liquide Luria Bertani (LB) composé de bacto-tryptone, d'extraits de levure et de chlorure de sodium (NaCl). Ces différents composés provenaient de la compagnie Fisher (Ottawa, CA). Ce milieu a été également supplémenté en tétracycline (20 µg/mL) servant d'agent de sélection permettant le maintien d'un plasmide à l'intérieur de la bactérie. Les bactéries en phase logarithmique de croissance (densité optique à 600 nm entre 0,4 et 0,6) ont été recueillies par centrifugation à 4000 RPM pour 10 minutes. Elles ont, par la suite, été resuspendues dans une solution de CaCl₂ 0,1 M pour une période d'environ 16 heures. Après ce traitement, les bactéries ont été transformées avec le pME18ShECE-1sol (50ng) et conservées sur glace pendant 30 minutes. Le choc thermique a consisté à soumettre le mélange bactéries-ADN à une température de 42°C pour 90 secondes et le transférer rapidement sur glace pour 2 minutes. Le milieu de culture LB (1mL) a été ajouté au mélange et une incubation de 45 minutes à 37°C a été effectuée pour permettre l'expression de la résistance à l'ampicilline (marqueur positif de la transformation). De ce fait, les bactéries ayant été transformées par le plasmide ont survécu dans des conditions sélectives mettant en jeu l'ampicilline, un antibiotique procaryote. Des témoins de bactéries non transformées cultivées avec et sans ampicilline ont également été effectués dans le but de valider la méthode. Une colonie bactérienne ayant cru sur la gélose additionnée d'ampicilline était transférée dans 200 mL de milieu LB avec ampicilline (0,5mg/mL) et la purification de l'ADN plasmidique était effectuée le jour suivant.

1.3.3 Purification du plasmide

La purification du plasmide a été effectuée avec la trousse de purification d'ADN plasmidique (Hispeed plasmid MidiPrep) de QIAGEN selon les directives du fabricant. Les différentes étapes de purification comprennent une lyse alcaline des bactéries, une filtration du lysat bactérien sur un tamis permettant le passage de l'ADN plasmidique

tout en retenant les débris cellulaires et une chromatographie sur résine échangeuse d'anions. (Figure 8). Une précipitation à l'isopropanol, un lavage à l'éthanol 70% et l'éluion avec l'eau ultrapure (produite par osmose inverse) ont permis d'obtenir une préparation d'ADN plasmidique purifié. Finalement, l'ADN a été quantifié par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 260, 280 et 320 nm. Le dosage s'est effectué sur microplaque avec un spectrophotomètre UV PowerWaveX de Biotek Instruments, inc. L'application des formules suivantes par le logiciel KC Junior (Biotek Instruments, inc.) a permis d'obtenir la concentration en ADN ainsi que la pureté de l'échantillon :

$$\textcircled{1} (\text{DO à } 260 \text{ nm} - \text{DO à } 320\text{nm}) \times 25^* = \text{concentration d'ADN en } \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

$$\textcircled{2} \frac{\text{DO à } 260\text{nm} - \text{DO à } 320\text{nm}}{\text{DO à } 280\text{nm} - \text{DO à } 320\text{nm}} = \text{Pureté}^{**}$$

* Ce facteur de dilution est utilisé dans le cas d'une dilution 1/500.

Pour ce qui est des autres dilutions, ce facteur a été corrigé en fonction de celle-ci.

** Pureté excellente lorsque ce rapport est > à 1,5

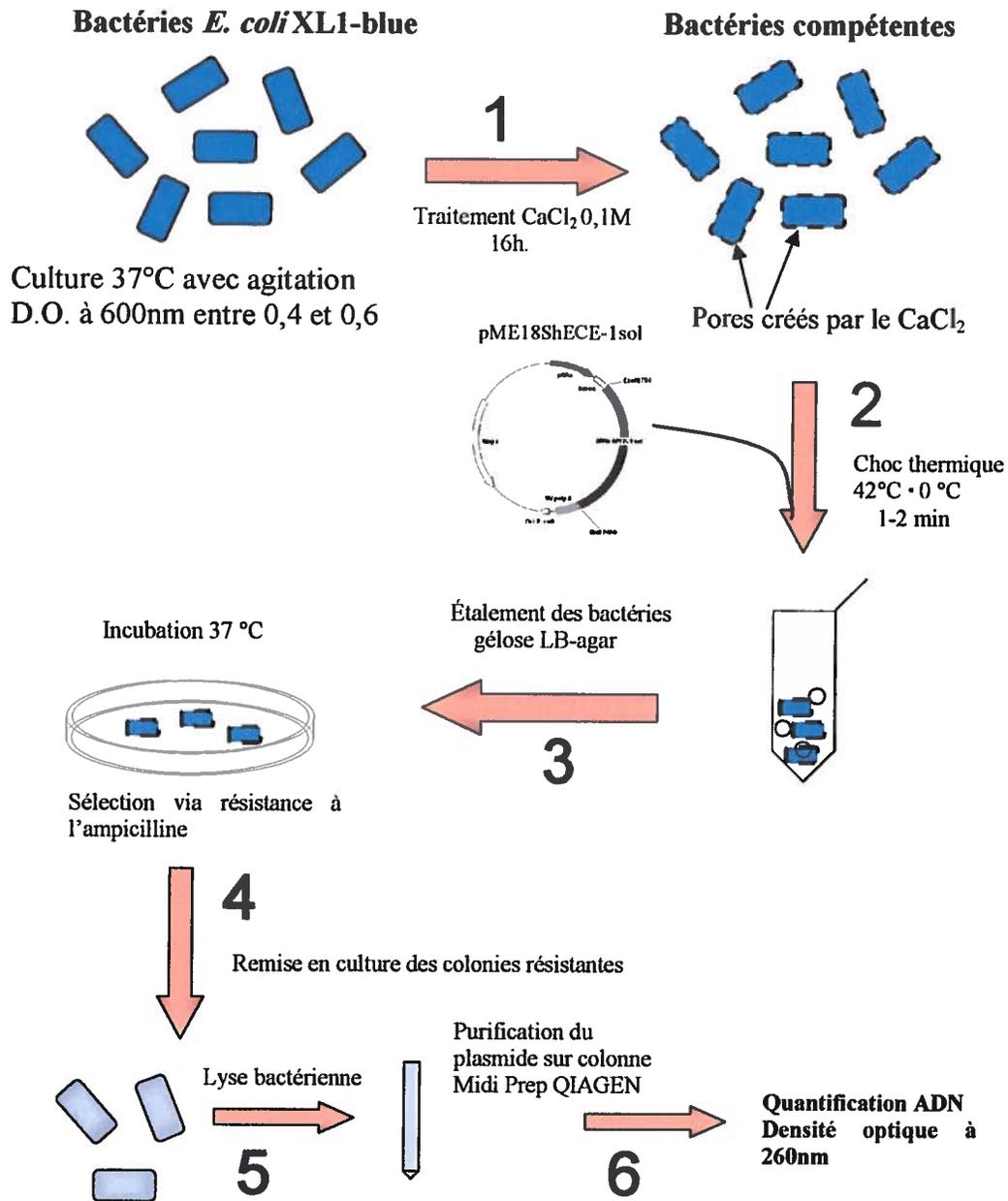


Figure 8 Schéma expérimental de purification du pME18ShECE-1sol de bactérie *E.coli* XL-1 blue

1.4 Construction d'un plasmide d'expression stable : le pCI-neohECE-1sol

1.4.1 Choix du vecteur d'expression stable et isolement de l'insert hECE-1sol

Dans le but d'obtenir une lignée cellulaire exprimant l'ECE-1 soluble de façon stable, une construction plasmidique a été nécessaire, utilisant le vecteur d'expression mammifère pCI-neo obtenu de la compagnie Promega, WI (USA). Ce vecteur porte un gène de résistance à la néomycine permettant d'activer la géneticine (G418) comme agent de sélection des cellules eucaryotes ayant intégré le plasmide. De plus, le plasmide pCI-neo porte le promoteur du cytomégalo virus (pCMV) qui permet une bonne expression de la protéine d'intérêt. Pour ce faire, le plasmide pME18ShECE-1sol a été utilisé pour obtenir un fragment d'ADNc codant pour l'ECE-1 soluble. En se basant sur la cartographie de restriction du vecteur original, deux enzymes, EcoRI et Not I, ont été choisies pour sortir l'insert du vecteur. La digestion du plasmide par ces deux enzymes a été effectuée séparément selon les directives du fabricant (Promega). Cinq unités d'enzyme ont été utilisées pour la digestion de 1 µg d'ADN et la digestion a été effectuée pendant 1h à 37°C. Le plasmide pCI-neo a également subi cette double digestion. Chaque préparation d'insert hECE-1sol et de pCI-neo linéarisé a été purifiée sur mini colonne (QIAquick spin column) en suivant le protocole du fabricant de la trousse de purification de réactions de PCR obtenu de la compagnie QIAGEN. Le volume d'élution des échantillons était de 30 µL.

Par la suite, les produits de digestion purifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% après une migration de 2 heures à 100V en présence de témoins ayant subi une seule digestion ou n'ayant subi aucune digestion. Une échelle de paires de bases (obtenue de la compagnie BioRad, CA (USA)) servait à évaluer la longueur des fragments obtenus. Le gel était coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/mL de TBE) pour visualiser l'ADN. Les bandes d'ADN étaient visualisées à l'aide du Fluor-S MultiImager (BioRAD).

1.4.2 Construction du plasmide pCI-neohECE-1sol (Figure 9)

L'utilisation du transilluminateur (Foto/Prep I de Bio/Can Scientific) a permis le découpage des bandes d'ADN correspondant au gène hECE-1sol et au pCI-neo linéarisé. Ensuite, l'extraction de l'ADN de l'agarose a été effectué avec la trousse (QIAquick gel extraction kit) de QIAGEN qui est basée sur le même principe que celui utilisé pour la purification des réactions de digestion décrit précédemment. L'ADN a été élué avec 30 µl d'H₂O ultrapure et quantifié selon le protocole décrit précédemment (section 1.3.3). Pour permettre la réaction de ligation, nous devons d'abord connaître la quantité d'insert à utiliser. Pour ce faire, la quantité de vecteur (pCI-neo linéarisé) a été fixée à 50 ng et le calcul de la quantité d'insert a été effectué par la formule suivante :

$$\text{ng d'insert} = \frac{\text{ng vecteur} \times \text{taille en kilobases de l'insert}}{\text{taille en kilobases du vecteur hôte}}$$

Le mélange de la réaction de ligation (volume final de 10 µL) comportait le vecteur pCI-neo linéarisé (50ng), l'insert hECE-1sol (111ng), de l'eau ultrapure (osmose inverse) (1,7 µL), un tampon pour la ligase (1 µL) et une unité de l'ADN ligase du phage T4. Ces deux derniers constituants ont été obtenus de la compagnie Promega. La réaction s'est poursuivie pour une période de 3 heures à la température de la pièce (Figure 9). La réaction a été arrêtée en chauffant les échantillons à une température de 70°C pendant 10 minutes.

Le produit de ligation a servi à transformer les cellules compétentes de *E. coli* XL1-blue. Le nouveau plasmide pCIneahECE-1sol a été purifié à l'aide de la trousse Midi prep de QIAGEN, selon la procédure expliquée aux sections 1.3.2 et 1.3.3. La quantification de l'ADN a également été effectuée.

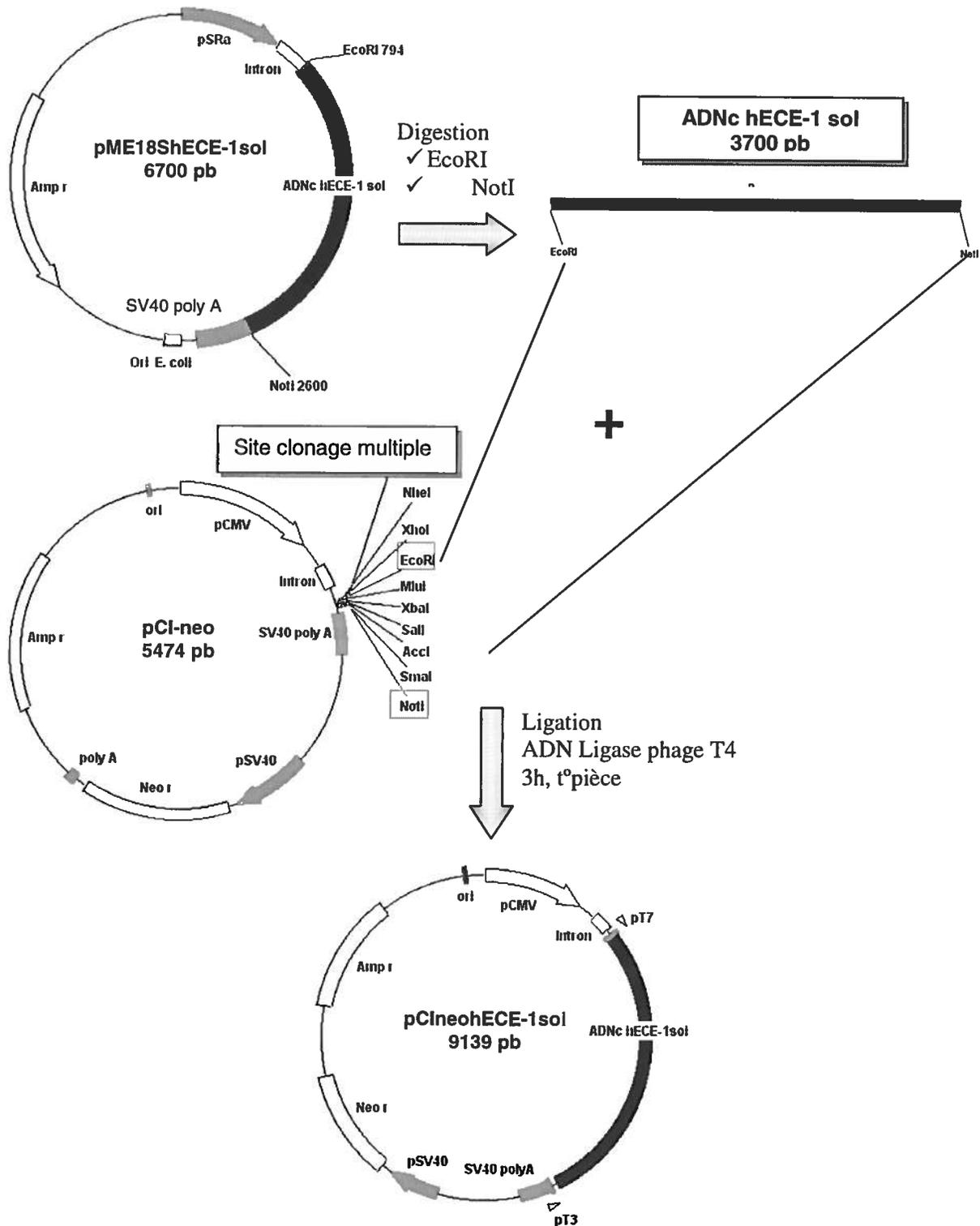


Figure 9 Schéma illustrant la construction du plasmide pCIneo hECE-1 sol
 Le plasmide pME18ShECE-1 sol a été obtenu du Dr Yanagisawa.

1.4.3 Analyse et séquençage de la construction pCI-neohECE-1sol

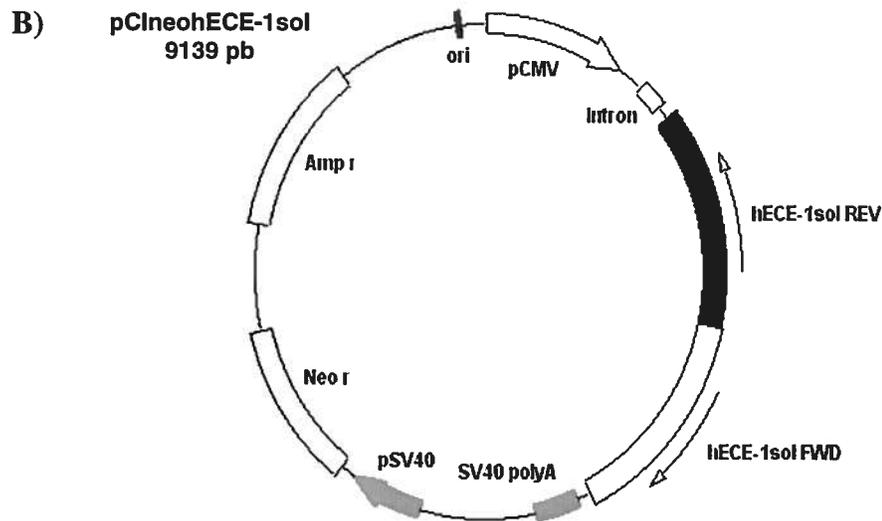
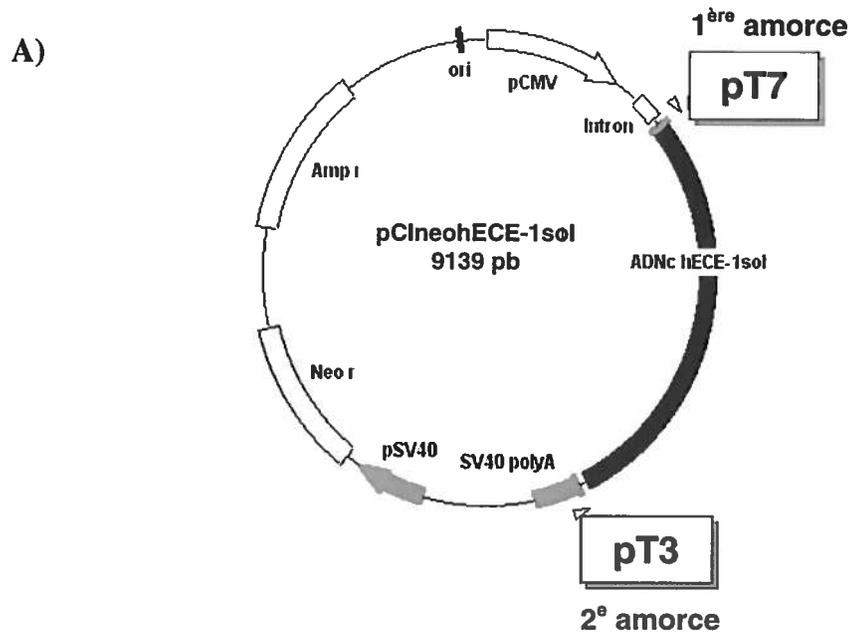
Dans le but de s'assurer que cette nouvelle construction plasmidique comportait le fragment d'ADN correspondant à l'insert hECE-1sol, le nouveau plasmide a été digéré avec les enzymes EcoRI et Not I et l'ADN a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

Une partie de l'ADN de la nouvelle construction a été séquencée en utilisant comme amorces des oligonucléotides dont les séquences correspondaient aux promoteur du phage T7 (direction 5'→ 3' « forward ») et T3 (direction 3'→ 5' « reverse ») présentes sur le vecteur pCI-neo et utilisées couramment pour la technique de séquençage (Figure 10A). L'analyse des séquences a été effectuée par le laboratoire Sheldon Biotech, McGill, (CA).

Une seconde approche a été tentée, qui faisait appel aux amorces dont la séquence correspondait à des séquences connues de l'insert hECE-1sol. Ces oligonucléotides ont été synthétisés par le laboratoire Sheldon Biotech, McGill, (CA). L'échelle de synthèse des amorces a été de 50 nmoles. Une de ces amorces permettait la lecture de la séquence de l'extrémité 5' vers 3' (hECE-1sol FWD) de l'insert et l'autre de l'extrémité 3' vers 5' (hECE-1sol REV) (Figure 10B). La séquence des amorces a été la suivante :

hECE-1sol FWD (1080-1097) = 5'-CGCCGAGGACAGCAAGAG-3'

hECE-1sol REV (1140-1158) = 5'-GGAAAGCCTGAGCACCCCTG-3'



Séquence amorces : hECE-1sol FWD (1080-1097) = 5'-CGCCGAGGACAGCAAGAG-3'
 hECE-1sol REV (1140-1158) = 5'-GGAAAGCCTGAGCACCCCTG-3'

Figure 10 Amorces utilisées pour le séquençage de pCIneo hECE-1sol

- A) *Première approche de séquençage* : les amorces utilisées ont été celles incluses aux abords du site de clonage multiple du plasmide pCI-neo, soit pT7 (direction « forward ») et pT3 (direction « reverse »).
- B) *Deuxième approche de séquençage* : les amorces utilisées ont été des amorces synthétiques choisies par notre équipe à l'intérieur de l'insert hECE-1sol et ce, pour les deux directions.

1.5 Techniques de transfection cellulaire transitoire et stable avec pME18ShECE-1sol et pCIneoHECE-1sol

1.5.1 Transfection cellulaire transitoire par précipitation au phosphate de calcium (CaHPO₄)

La technique de transfection cellulaire utilisant le phosphate de calcium fait appel à un principe selon lequel l'ADN est précipité en présence de ce sel et pourra être introduit dans la cellule par un processus de phagocytose (Figure 11A). Dans le but d'optimiser le rendement de la transfection et de déterminer les paramètres optimaux pour chacun des types cellulaires à l'étude, les premiers essais de transfection ont été effectués avec le plasmide p β gal. Ce plasmide possède dans sa séquence le gène qui code pour la β -galactosidase, une enzyme bactérienne responsable de la dégradation du X-galactose en générant un chromophore bleu. De ce fait, les cellules transfectées pouvaient être facilement et rapidement détectées par la présence d'une coloration bleue après un traitement avec le X-galactose. Le nombre optimal de cellules pour initier une culture a été déterminé pour chaque type cellulaire en ensemençant des quantités croissantes de cellules dans des plaques à 12 puits. Une analyse de la confluence était effectuée le matin suivant pour fixer le nombre de cellules optimal. Par la suite, la transfection des cellules avec p β gal a été optimisée en variant la quantité d'ADN de 0,25 à 2 μ g/puits. Le protocole de transfection était le suivant. L'ADN était dilué avec de l'eau ultrapure (osmose inverse) et des solutions de CaCl₂ (Tris-HCl 2 mM, EDTA 0,2 mM, CaCl₂ pH 7,9) et de HBS (Hepes 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM pH 7,1) étaient stérilisées par autoclavage. Ces trois solutions étaient conservées à la température de la pièce. La solution de CaCl₂ était incorporée au mélange ADN-eau de façon stérile, et cette solution avait ensuite été ajoutée au HBS qui avait préalablement été introduit dans des tubes stériles. Des bulles d'air ont été produites par aspiration du mélange de transfection dans chaque tube, avant de les laisser reposer pour 30 minutes pour permettre la précipitation. Après ce temps, l'ADN précipité par le phosphate de calcium était ajouté au milieu de culture des cellules en prenant soin d'inclure un puits servant de témoin cellulaire non transfecté. Les cultures ont été incubées pour une période de 24 à 48 heures et après ce délai, les cellules ont été lavées avec un tampon salin (PBS) et les cellules étaient exposées à une solution de X-galactose/DMF (40mg/ml) + K₃Fe(CN)₆ 30 mM, K₄Fe(CN)₆ 30 mM et MgCl₂ 2mM.

Lors de la transfection avec le plasmide pME18ShECE-1sol, au jour 1, les trois types cellulaires à l'étude ont été ensemencés dans des plat de Pétris de 100 mm² selon les paramètres optimaux pour chaque type cellulaire (Figure 11A). Un plat de Pétri témoin cellulaire non transfecté a été prévu pour chaque lignée cellulaire. Ces cultures ont été incubées pour une période de 24 heures pour qu'elles atteignent 70 à 80% de confluence. Au jour 2, le milieu de culture de chaque culture a été remplacé par du milieu frais et 3 heures après ce changement, le mélange de transfection ADN-CaHPO₄ (40µL) (dans ce cas-ci pME18ShECE-1sol) a été ajouté aux cultures. Les cultures ont alors été incubées à 37°C / 5% CO₂ pour une période de 24 heures et le milieu de culture a été remplacé par du nouveau milieu de culture et ré-incubées pour une période de 48 heures avant de prélever le surnageant de chaque culture pour analyse.

1.5.2 Transfection cellulaire stable par lipofection avec la LipofectAMINE™ 2000

Le plasmide pCI-neohECE-1sol a servi à développer une lignée cellulaire recombinante exprimant hECE-1sol. L'optimisation de la transfection utilisant la lipofectamine 2000 de la compagnie Invitrogen a également été effectuée avec le plasmide pβgal, selon les mêmes paramètres et le même protocole que ceux mentionnés dans la section précédente. De plus, chaque lignée cellulaire a été vérifiée quant à son potentiel de mortalité en présence de concentrations variables de G418 (géniticine) de façon à déterminer la concentration optimale en G418 pour la sélection des cellules résistantes.

La technique de transfection par lipofection a été relativement similaire à celle faisant appel à la précipitation au phosphate de calcium, mis à part la nature des réactifs utilisés. En effet, dans le cas de la lipofection, une solution ADN-eau ultrapure (200 µL) (0,8 µg d'ADN) a été mélangée avec le réactif lipofectAMINE™ 2000 (préalablement dilué et préincubé 5 minutes dans le milieu de culture DMEM sans SVF et sans antibiotiques) dans un rapport 1 : 1. Le réactif a pu alors former des vésicules lipidiques enrobant l'ADN pendant une période d'incubation de 30 minutes. Ces vésicules de lipides ont alors été ajoutées au milieu de culture des cellules ensemencées la veille sur plats de Pétri selon la quantité de cellules permettant une confluence de 50 à 70% (Figure

11B). Un témoin négatif de cellules non transfectées a également été préparé. Durant cet épisode de transfection, le milieu de culture des cellules n'était pas additionné de sérum de veau fœtal et ni des antibiotiques pénicilline et streptomycine. Après 24h d'incubation à 37°C, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM avec 10% SVF et 1% pénicilline et streptomycine. Après 48h, l'antibiotique G418 a été ajouté à une concentration finale allant de 600 à 800 µg/mL, dépendamment du type cellulaire utilisé. La sélection des cellules transfectées avec le G418 est effectuée sur une semaine, soit environ 3 passages cellulaires (1 passage aux deux jours). La sélection était terminée au moment où les cellules du plat de Pétri témoin (cultures non transfectées) sont toutes mortes. Ensuite, une partie des cellules transfectées ont été congelées dans le milieu de congélation (95% DMEM / 5% DMSO) et conservées dans un réservoir à azote liquide, selon le protocole de congélation décrit plus haut. L'autre partie des cellules positives à la transfection ont été maintenues en culture jusqu'à l'obtention de quatre flacons de 175 cm², équivalent à environ 2 x 10⁹ cellules. Après l'atteinte d'une confluence maximale, celles-ci ont été privées en sérum pour 48 heures et le milieu de culture de chacun des flacons a été prélevé pour l'analyse de la présence de l'enzyme.

1.6 Cotransfection stable de pCIneoHCE-1sol avec le vecteur pAdVantage

Pour permettre de maximiser l'expression de hECE-1sol, une cotransfection impliquant le vecteur pCIneoHCE-1sol et le vecteur pAdVantage de la compagnie Promega (USA) a également été effectuée. En effet, l'utilisation de pAdVantage permet d'augmenter l'expression d'une protéine recombinante d'intérêt en évitant un mécanisme de défense cellulaire souvent observé lors d'infection virale ou lors du processus de transfection d'un vecteur d'expression. Lorsque le vecteur est transfecté seul, sans pAdVantage, il peut se produire une surexpression de l'ARNm de la protéine d'intérêt engendrant par le fait même, la phosphorylation du facteur de traduction eIF-2. Ceci a pour effet d'arrêter le mécanisme de traduction de l'ARNm en protéine. Or, pAdVantage agit à ce niveau en évitant la phosphorylation d'eIF-2 et en permettant une traduction continue de l'ARNm (Appendice D). La production de la protéine recombinante se fait alors en grande quantité et de façon continue. Ce plasmide a donc été utilisé en cotransfection avec la construction pCI-neoHCE-1sol dans un rapport 1 : 4 pour permettre un meilleur rendement d'expression de l'enzyme.

Section 2 Méthodes de détection et de quantification de hECE-1sol

2.1 Préparation de l'échantillon

Le milieu de culture prélevé des différentes lignées cellulaires ayant subi la transfection (80 mL) a été centrifugé immédiatement après son prélèvement à une vitesse de 1200 RPM, pour une période de 10 minutes et ce, dans le but d'enlever les débris cellulaires. Par la suite, ce dernier a été centrifugé sur Centriplus (Millipore) 50 000 Da à 2900g par cycle de 30 minutes, pour concentrer l'échantillon jusqu'à l'obtention d'un volume final se situant aux alentours de 2 mL. Ceci constituait alors la fraction F1.

2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Chaque fraction protéique obtenue au cours de chaque expérience était dosée pour son contenu en protéine selon la méthode de Lowry à l'aide de la trousse « DC protein assay » obtenu de la compagnie BioRad, CA (USA) (Lowry *et al.* 1951). Les directives du fabricant ont été appliquées sans modification via l'utilisation de deux réactifs, soit une solution alcaline de tartrate de cuivre ainsi que le réactif de Folin prédilué. La réaction, en duplicata, a été accomplie à l'intérieur de 15 minutes.

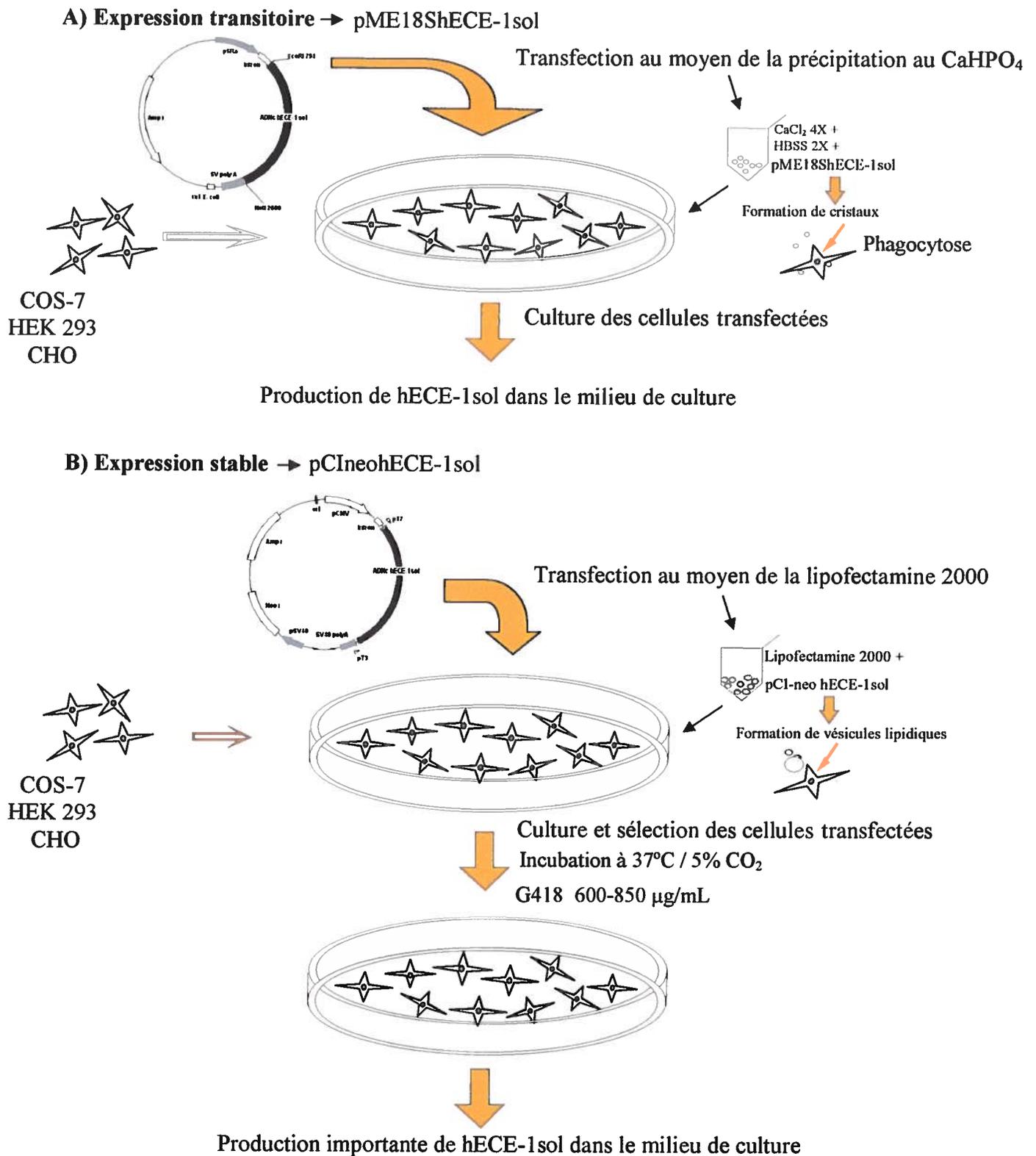


Figure 11 Schéma illustrant les différentes étapes de transfection cellulaire
 A) Expression transitoire au moyen de la précipitation au CaHPO_4 ;
 B) Expression stable au moyen de la lipofectAMINE™ 2000.

2.3 Immunobuvardage de type Western

2.3.1 Production de l'anticorps Anti-hECE-1sol

2.3.1.1 Identification et synthèse d'un fragment antigénique de hECE-1sol

Pour permettre la détection et l'identification de l'enzyme à l'intérieur des fractions, la technique d'immunobuvardage s'est avérée essentielle. Cependant, aucun anticorps dirigé contre hECE-1sol n'est disponible commercialement. Nous avons donc repéré une séquence potentiellement intéressante pour la synthèse d'un fragment antigénique en analysant la séquence par la méthode de Kyte-Doolittle.

La séquence peptidique choisie a été synthétisée par la technique de synthèse sur phase solide. Le principe de cette technique consiste à assembler, un à la suite de l'autre, les acides aminés d'un peptide après le retrait du groupement protégeant leur fonction amine en alpha, et ce, pendant que l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique est attachée par un lien covalent à un support insoluble. À la fin de la synthèse, la fonction N-terminale du dernier acide aminé de la chaîne est débarrassée de son groupement protecteur et le peptide est clivé du support solide (Merrifield, 1986). Cette méthode permet alors de synthétiser des peptides avec les extrémités N- et C-terminales libres. L'amine alpha des acides aminés utilisés lors de la synthèse peptidique peut être protégé soit par le groupement Boc (t-butyloxycarbonyl) ou Fmoc (fluorénylméthyl-oxycarbonyl). Ces deux groupements protecteurs nécessitent alors un traitement différent du peptide-résine lors de la synthèse. La chimie Fmoc a été utilisée pour développer ce fragment, tel que décrit précédemment par les membres de notre équipe (Brkovic *et al.* 2003). La séquence du fragment était constituée des résidus 735-752 de hECE-1a (Figure 12). Ce fragment était retrouvé également chez hECE-1sol.

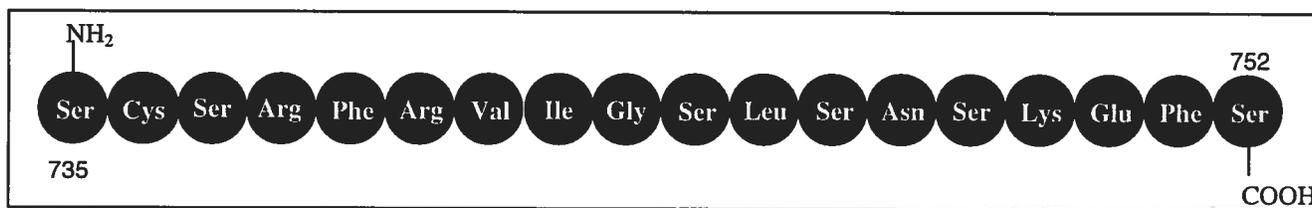


Figure 12 Séquence du fragment antigénique hECE-1sol (735-752) utilisé pour la synthèse de l'anticorps

La résine utilisée pour cette synthèse a été la résine Rink amide de la compagnie Chem-Impex, IL (USA). Deux grammes de cette dernière ont été déposés dans un réacteur de synthèse préalablement silanisé avec une solution 10 % v/v dichlorodiméthylsilane/toluène. La fixation de chaque acide aminé s'est effectuée selon le cycle de synthèse décrit au tableau III.

Tableau III Protocole employé pour le couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc

ÉTAPE	RÉACTIFS ^a	TEMPS DE RÉACTION (minutes)
Déprotection	20% PIP/DMF	1 x 2
Déprotection	20% PIP/DMF	1 x 15
Lavage	DMF	2 x 2
Lavage	CH ₃ CH ₂ OH	1 x 2
Lavage	DMF	2 x 2
Couplage	3 éq de Fmoc-AA-COOH 3 éq de BOP 3 éq de DIEA	1 x 45 ^b
Lavage	DMF	2 x 2
Lavage ^c	DCM	2 x 2
Vérification du couplage	Ninhydrine (Test Kaiser)	1 x 5

^a Les volumes de solvant utilisés à chaque étape d'un couplage sont d'environ 10 mL/g de résine.

^b Le temps de couplage d'un acide aminé peut dépasser 45 minutes si le test Kaiser confirme la présence d'amines libres.

^c Entre les couplages, les peptides-résines sont conservés dans le DCM.

2.3.1.2 Clivage, purification et analyse du fragment antigénique hECE-1sol (735-752)

Après la synthèse de ce fragment, le clivage du peptide-résine a été effectué à l'aide du TFA selon le protocole établi précédemment (Brkovic *et al.* 2003).

Une caractérisation par CLHP analytique au moyen d'un système automatisé Beckman System Gold 507E couplé à un contrôleur de gradient modèle 128 et à un détecteur d'absorbance de modèle 168 a été effectuée. Le fragment peptidique a été injecté sur une colonne Vydac C₁₈ de phase inverse (5µm; 300 Å) de 25 x 0,45 cm. Il a été élué en 30 minutes avec un débit de 1mL/min au moyen d'un gradient 20-60% de

(B), (A) étant de l'eau contenant 0,06% TFA et (B) de l'acétonitrile. La détection s'est effectuée à 230 nm. De plus, le peptide a été caractérisé par spectrométrie de masse utilisant la technologie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) avec un spectromètre Voyager-DE de PE Biosystem. Le voltage a été ajusté à 20kV ; le laser à 337nm et le balayage a été effectué à une vitesse de 20 pulses/sec. La matrice utilisée pour l'analyse a été l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique. L'appareil a été calibré avec l'angiotensine I, l'ACTH et l'insuline bovine.

Par la suite, le peptide brut a été purifié par la technique de chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) préparative sur phase inverse. Nous avons utilisé un système Waters Prep LC500A comprenant un module Waters 1000 PrepPak couplé à un détecteur d'absorbance de modèle 441. Une portion du matériel brut (400 mg) a été dissoute dans un litre d'H₂O dégazée contenant de l'acide trifluoroacétique (0,06%, pH 2). Le peptide en solution a été injecté sur une colonne Jupiter C₁₈ (15 μ m; 300 Å) de 25 x 2,1cm. Le matériel a ensuite été élué au moyen d'un gradient linéaire de 0-100% de (B) en trois heures, (A) étant une solution d'acide trifluoroacétique 0,06% dans l'eau et (B) étant une solution 30% ACN/(A). Le débit a été maintenu à 20 mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 230 nm. Les fractions recueillies (5 mL) ont été analysées par CLHP analytique selon le même protocole décrit précédemment. Les fractions correspondant au produit majoritaire ont été regroupées, évaporées et lyophilisées. Le matériel a finalement été conservé à -20°C. L'analyse par CLHP a fourni une évaluation de la pureté du peptide obtenu et une confirmation de la masse attendue a été possible grâce à la spectrométrie de masse décrite plus haut.

Une deuxième purification a été nécessaire pour obtenir un maximum de pureté. En effet, cette deuxième purification a été effectuée sous les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus. Le peptide pur a finalement été envoyé au service de production d'anticorps de la compagnie ZYMED, San Francisco, CA (USA).

2.3.1.3 Réception et purification du sérum polyclonal obtenu de ZYMED

La compagnie ZYMED a utilisé le fragment antigénique hECE-1sol (735-752) pour immuniser deux lapins selon leur protocole de production d'anticorps. Ils nous ont alors retourné 250 mL de sérum de chaque lapin immunisé comportant alors des anticorps dirigés contre le peptide immunogène. Le sérum a été aliquoté en fractions de 500 µL et conservé à -20°C.

Ensuite, 7 mL de ce sérum a été décongelé dans le but de le purifier. La trousse « MabTrap » de Amersham Bioscience, Baie d'Urfée QC (CA) a été utilisée pour purifier le sérum suivant le protocole établi par le fabricant. Une colonne constituée d'une résine de sépharose couplée à la protéine G a permis l'isolement des immunoglobulines. Les fractions d'élutions obtenues ont été testées sur microplaque à une densité optique de 260 nm au moyen du spectrophotomètre PowerWaveX. Les fractions positives pour la présence de protéines ont été regroupées, aliquotées et conservées à -20°C pour un usage ultérieur. Cette fraction constituait alors l'anticorps anti-hECE-1sol utilisée pour l'étape d'immunobuvardage et de purification sur colonne d'affinité.

2.3.2 **Électrophorèse, transfert et immunobuvardage de type Western**

La technique de Western blot a été nécessaire pour l'identification de l'enzyme dans les différentes fractions à l'étude. Pour ce faire, un mini gel dénaturant de polyacrylamide 7,5% a été nécessaire pour effectuer une électrophorèse des protéines retrouvées dans les fractions étudiées. Cette technique de séparation sur gel des protéines a été effectuée selon le protocole de Laemmli *et al.* (1970). Les échantillons de chaque fraction ont été préparés dans un tampon réducteur à base de SDS en s'assurant que chaque puits contenait une quantité identique en protéine et ce, grâce à un dosage protéique effectué préalablement (section 2.2). Un milieu de culture de cellules non transfectées servait alors de témoin négatif. Le témoin positif était quant à lui composé de protéines provenant de cellules aortiques endothéliales porcines (PAEC) obtenues du laboratoire du Dr Eric Thorin, de l'Institut de Cardiologie de Montréal. La migration électrophorétique s'est déroulée pendant 45 minutes à un voltage constant de 185 V

grâce au système MiniProtean III développé par la compagnie BioRad. Par la suite, un transfert à 100V pour une période d'une heure sur une membrane de PVDF a été possible grâce à un système de transfert obtenu également de la compagnie BioRad.

Les protéines transférées sur la membrane ont alors été incubées 1 heure, sous agitation, avec une solution de blocage composée d'un tampon Tris-NaCl, Tween 20 (TBS-Tw) et 5% de lait en poudre. Des lavages successifs de 5 minutes ont permis de nettoyer la membrane avant que celle-ci ne soit soumise au premier anticorps. Le premier anticorps utilisé pour l'immunodétection était celui dirigé contre hECE-1sol (fraction obtenue de ZYMED et purifiée selon le protocole précédent) dilué 1/500 avec la solution de blocage TBS-Tw 5% lait. La membrane a été incubée toute la nuit sous agitation avec cet anticorps. Des lavages ont également été effectués après cette étape et le deuxième anticorps, un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Sigma-Aldrich, Oakville ON (CA)), dilué 1/3000 avec la solution de blocage, a été incubé avec la membrane pour une période d'une heure avec agitation continue. Après les derniers lavages de cette dernière, la révélation avec le système ECL+ (Amersham Biosciences) a été accomplie selon les directives du fabricant, soit le mélange des réactif A et B dans un ratio 40 : 1 et une période d'incubation de 5 minutes avec la membrane. Ensuite, l'exposition d'un film autoradiographique (La cie universelle du rayon X du Canada, Ltée), pour une période allant de 1 seconde à 1 minute, et le développement de ce dernier par un développeur automatique de marque Kodak (X-OMAT 1000A processor, *fournisseur* : Maranda Lauzon, Laval QC (CA)) a permis de révéler les fractions positives pour la présence de l'enzyme.

Section 3 Purification partielle de hECE-1sol

3.1 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie sur Concanavoline A (ConA)

La concanavoline A est une protéine hémagglutinante isolée à partir des haricots rouges qui, dans ce cas précis, est liée à une matrice de sépharose dans le but de former une colonne de chromatographie d'affinité. La concanavoline A ainsi associée de

manière covalente à la sépharose permet l'isolement de différents polysaccharides et glycoprotéines, tel l'ECE-1.

Dans un tel contexte, 15 mL de la matrice de sépharose ConA (Amersham Pharmacia) ont été prélevés et lavés plusieurs fois à l'aide d'un tampon qui était constitué de Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 NaCl 0,5M, CaCl₂ 1mM et MnCl₂ 1 mM. Après le lavage de la résine, celle-ci était resuspendue dans ce même tampon dans un ratio 75% résine et 25% tampon. La suspension a été dégazée pendant 1 minute à l'aide d'un bain sonicateur de marque Branson et versée dans une colonne de 30 cm x 2 cm. Une pompe péristaltique (MasterFlex C/L, *fournisseur* : Barnant Cie, Barrington IL (USA)) a été branchée à la colonne de chromatographie et le débit a été fixé à une goutte aux 5 secondes pour permettre l'entassement de la résine dans la colonne. Ce montage a été effectué à 4°C ainsi que le reste des manipulations. L'échantillon de milieu de culture concentré sur Centricon (section 2.1) a été dilué 10 fois avec le tampon Tris décrit ci-haut auquel était ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (fluorure de 4-(2-aminoéthylbenzènesulfonyl) (AEBSF), pepstatine A, trans-époxy succinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64), bestatine, leupeptine et aprotinine obtenu de Sigma-Aldrich, 1µL/10 mL de tampon). L'échantillon dilué a été injecté sur la colonne en circuit fermé où l'éluat était recirculé dans la colonne pendant 16 heures à l'aide de la pompe péristaltique. Le lavage de la colonne a ensuite été réalisé avec 100 mL du même tampon Tris. La présence de protéines dans l'éluat était détectée en mesurant la densité optique à 280 nm de chacune des fractions collectées par un collecteur de fraction automatique SC-100 de marque Beckmann. La colonne a ensuite éluee avec une solution constituée du même tampon auquel était ajouté 0,25M de α-D-méthylglucopyranoside qui compétitionne avec la résine ConA pour libérer les glycoprotéines. Finalement, nous avons effectué un lavage de la colonne avec un tampon acide borique 0,1 M. Les fractions positives pour la présence de glycoprotéines ont été analysées par un immunobuvardage de type Western (section 2.3.2).

3.2 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant l'anticorps anti-hECE-1sol

Cette technique de purification est basée sur l'utilisation d'une résine de type Affi-Gel Hydrazide de la compagnie BioRad à laquelle est couplée une immunoglobuline (anticorps) à une matrice d'agarose servant à purifier par affinité. La trousse permet de fixer l'anticorps à la colonne en orientant la portion immunoglobuline vers l'extérieur de la matrice.

3.2.1 Préparation de la matrice Affi-Gel Hydrazide (Figure 13)

La préparation de la résine a nécessité quatre étapes, soit le changement de tampon dans lequel l'anticorps baignait, l'oxydation de la portion glucidique de l'anticorps (région Fc), le dessalage de cette dernière réaction et finalement le couplage de l'anticorps à la résine d'agarose, Affi-Gel.

Tout d'abord, le changement de tampon de l'anticorps préalablement purifié (section 2.3.1.3) a été effectué à l'aide d'une colonne Econo-Pac 10DG fournie avec la trousse selon les directives de la compagnie. De plus, l'utilisation du periodate de sodium (NaIO_4) a permis d'oxyder les fonctions diol vicinales cis des sucres présents sur la portion Fc de l'anticorps. Cette réaction a été effectuée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation mécanique (rotation). La procédure de dessalage a nécessité une deuxième utilisation des colonnes Econo-Pac 10DG pour permettre d'éliminer toutes traces de NaIO_4 pouvant nuire à la réaction de couplage avec la résine. Finalement, la réaction de couplage a eu lieu entre l'anticorps oxydé et la matrice d'agarose Affi-Gel pendant 24 heures en agitant la solution anticorps-résine à la température de la pièce (Figure 13). Par la suite, la résine a été entassée dans une colonne (incluse dans la trousse) de 1 x 10 cm, le surnageant a été éliminé et conservé pour analyse et la résine a été nettoyée avec un volume de tampon phosphate-NaCl 500mM pH 7,0 (PBS). La densité optique à 280 nm de ces deux fractions (surnageant et volume de lavage) a permis d'évaluer le rendement de cette réaction de couplage selon la formule suivante :

$$\frac{\text{D.O. à } 280\text{nm}}{1,4} \times \text{facteur de dilution} \times \text{volume de l'échantillon} = \text{IgG totales}$$

Donc,

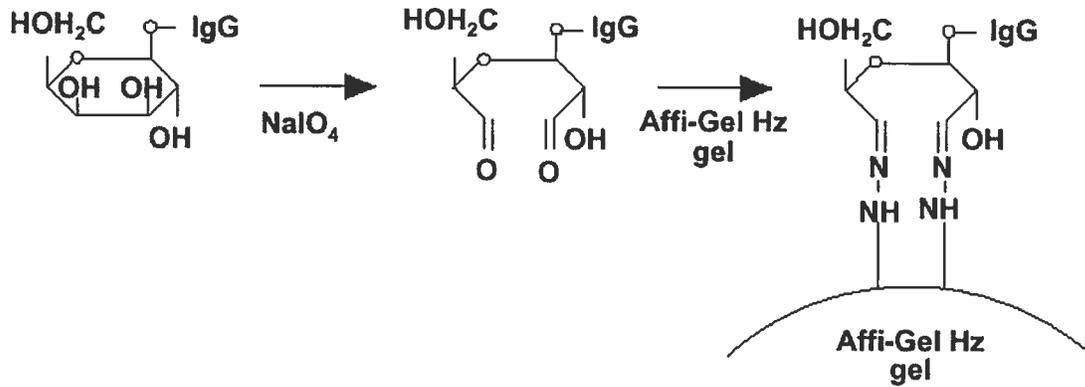
Qté IgG totale avant le couplage – Qté IgG totale non couplée (IgG de l'éluant + IgG du lavage) = Qté totale IgG couplées

$$\text{Rendement de couplage (\%)} = \frac{\text{Qté totale de protéines couplées}}{\text{Qté totale de protéines avant le couplage}} \times 100$$

3.2.2 Purification de hECE-1sol avec la colonne d'affinité anti-hECE-1sol

La procédure de purification de la fraction brute (F1) a été similaire à celle adoptée lors de l'essai de purification sur ConA. Une première étape a consisté à activer la colonne avec 2 à 4 volumes du tampon utilisé pour l'élution, soit un tampon glycine-HCl 0,2 M pH 2,5, puis un lavage avec 3 volumes de tampon PBS a été effectué. Le milieu de culture concentré a été dilué 3 fois avec le tampon PBS (pH 7,0) et est injecté sur la colonne. Deux lavages avec 3 volumes de tampon PBS-NaCl 0,5 M ont été réalisés et l'élution a été effectuée avec 4 volumes de tampon glycine-HCl 0,2M pH 2,5. Les fractions du lavage et de l'élution ont été récoltées dans des tubes de 1,5 mL et l'absorbance à 280 nm de chaque fraction a été mesurée. La colonne a finalement été lavée et conservée dans un tampon PBS-NaCl 0,5M, 0,02% azide de sodium (NaN₃).

RÉACTION D'OXYDATION DE ANTI-hECE-1sol AU NaIO_4



ORIENTATION DES ANTICORPS OXYDÉS

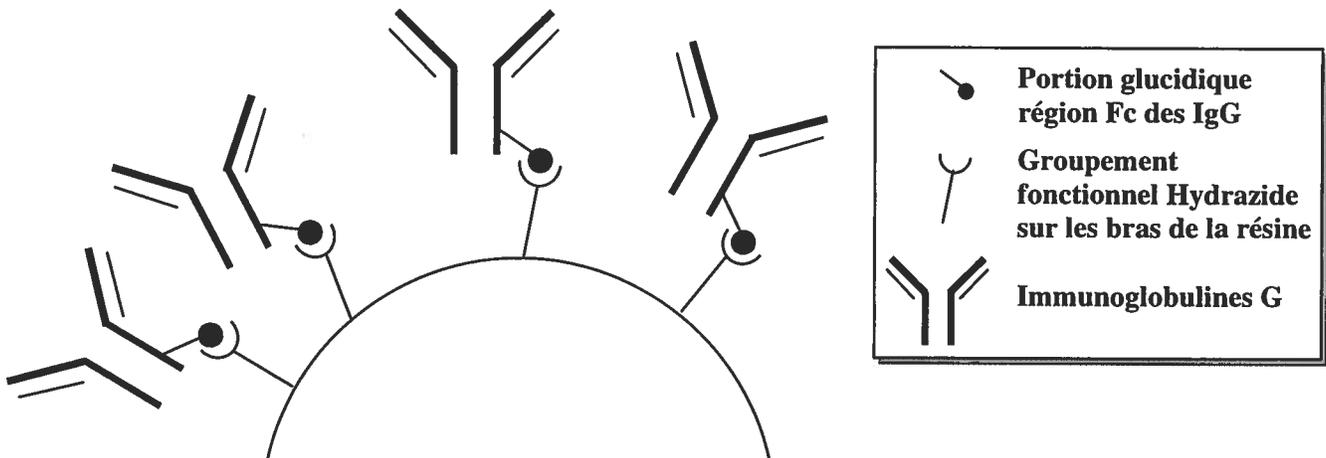


Figure 13 Réaction chimique impliquée dans l'oxydation au NaIO_4 de l'anticorps anti-hECE-1sol et orientation sur la matrice Affi Gel Hydrazide

3.3 Purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant le Zn

Cette méthode de purification était basée sur le fait que hECE-1sol présente dans sa structure un domaine de liaison au zinc (motif HEXXH) qui en fait une caractéristique particulière pour son isolement. hECE-1sol a été purifiée avec une résine d'affinité couplé au cofacteur Zn provenant de la compagnie Amersham Bioscience, Baie d'Urfée QC (CA). Une solution de $ZnSO_4$ a été nécessaire pour charger la résine d'affinité. Les étapes de purification utilisées pour cette technique étaient les mêmes que celles utilisées lors de la chromatographie sur ConA (section 3.1). Les tampons utilisés ont été un tampon de liaison : Na_2HPO_4 0,02M, NaCl 1M pH 7,2. L'élution des protéines liées à la résine a été effectuée au moyen d'un gradient par étape à l'aide du tampon de liaison (pH 7,2) additionné en NH_4Cl pour des concentrations allant de 0,5 à 1,5M. Les fractions recueillies ont été dosées pour leur contenu protéique (densité optique à 280nm) et migrées sur gel 7,5% polyacrylamide pour effectuer l'immunobuvardage de type Western. Les fractions positives pour la présence de hECE-1sol ont été rassemblées et concentrées sur filtre Centricon® jusqu'à l'obtention d'une concentration d'environ 2,5 mg/ml (dosage protéique par la méthode de Lowry). Cette fraction constituait alors la fraction F2.

3.4 Purification de hECE-1sol sur une résine de haute affinité pour l'albumine (Affi-Gel Blue)

La résine d'affinité pour l'ovalbumine a été utilisée pour enlever l'albumine sérique bovine retrouvée dans la fraction F2. La résine AffiGel Blue de la compagnie BioRad a permis de réaliser cette extraction. Un tampon phosphate a été utilisé pour la liaison des protéines à la résine. Cette dernière a été lavée trois fois avec ce tampon pour ensuite être mis en présence de la moitié de l'échantillon F2, soit environ 1mL, dans un tube de 15 mL. Le mélange résine-F2 a été agité trois fois par inversion et incubée sur glace pendant 5 minutes. Par la suite, celui-ci a été centrifugé à 2000g pour 10 minutes. Une filtration sur laine de nylon a permis de récolter un filtrat d'environ 1 mL qui constituait alors la fraction F3. Les protéines de cette fraction ont été dosées par la méthode de Lowry et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western dirigé utilisant l'anticorps contre hECE-1sol.

Section 4 Caractérisation de hECE-1sol

Pour la réussite de la caractérisation il importe de mentionner que le substrat de l'enzyme, soit la BigET-1 humaine, a été synthétisée dans notre laboratoire par la technique de synthèse peptidique sur phase solide faisant appel à la chimie Fmoc, et ce, suivant le même protocole que celui établi pour la production du fragment antigénique hECE-1sol (735-752) décrit à la section 2.3.1.1. Les paramètres pour la purification ainsi que pour l'analyse de ce peptide ont été quelque peu modifiés pour permettre un rendement optimal en fonction des propriétés spécifiques à cette molécule. La résine de synthèse utilisée a été une résine Wang couplée au premier acide aminé, la sérine, avec un taux de substitution de 0,2 mmole/g. De plus, une étape de cyclisation au ferricyanate a dû être ajoutée entre les deux étapes de purification de ce peptide pour permettre de former les deux ponts disulfures présents dans la forme native de la BigET-1. Par conséquent, trois étapes de purification ont été nécessaires pour générer la fraction BigET-1 pure utilisée pour la caractérisation enzymatique.

4.1 Dosage de l'activité enzymatique par ELISA

L'activité enzymatique de hECE-1sol a été déterminé en évaluant la concentration en ET-1 produite à partir de la BigET-1 au moyen d'un test ELISA de type sandwich spécifique à ET-1. Le test ELISA a été effectué avec une trousse diagnostique dirigée contre ET-1, obtenue de la compagnie Biomedica, Qc, CA. Cette trousse comprenait une microplaque à 96 puits dont le fond des puits est recouvert d'un anticorps polyclonal dirigé contre la portion C-terminale de ET-1. L'ajout d'un deuxième anticorps monoclonal (anticorps de détection) également spécifique à ET-1 et d'un troisième anticorps (conjugué) dirigé contre le deuxième et couplé à une peroxydase a permis de quantifier la concentration en ET-1 dans les milieux réactionnels enzymatiques (Figure 14).

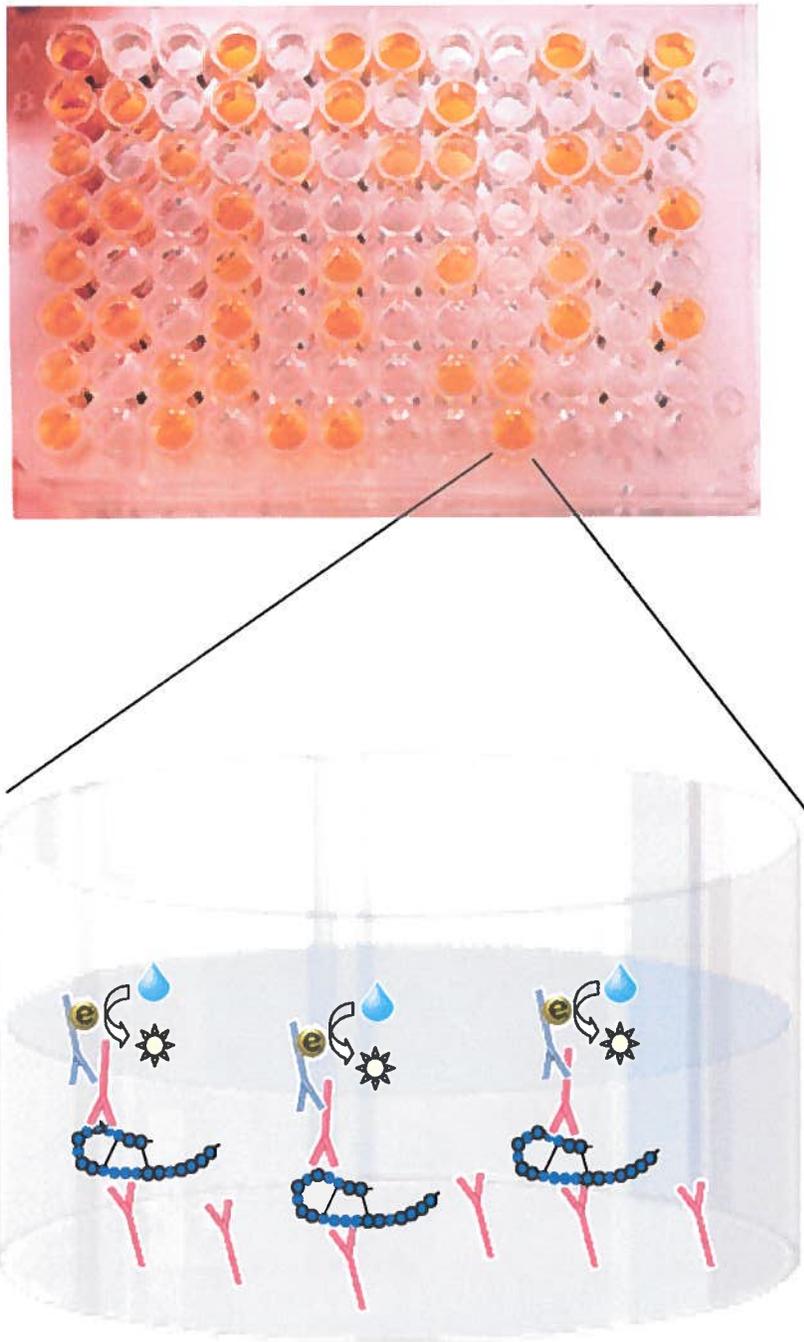


Figure 14 Principe du test ELISA utilisé pour le dosage de la production d'ET-1

4.1.1 Détermination du temps d'incubation optimal

Pour ce faire, les milieux réactionnels étaient composés d'un tampon Tris-HCl 500 mM pH 6,4, NaCl 500 mM, 1mM ZnCl₂, 0,0005% Triton X-100, enrichi avec le cocktail d'inhibiteurs de protéases (fluorure de 4-(2-aminoéthylbenzènesulfonyle (AEBSF), pepstatine A, trans-époxy succinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64), bestatine, leupeptine et aprotinine obtenu de Sigma-Aldrich, 1µL/10 mL de tampon), de 30 ng d'enzyme recombinante (fraction F1) et de 0,1µM de BigET-1. Une série de fractions en duplicata a été incubée à 37°C pour une période de 2 ou de 4 heures et le volume de réaction final pour chacune de ces fractions était de 500 µL. La réaction était arrêtée par chauffage à 100°C pour 7 minutes et 200 µL de cette réaction étaient déposés dans les puits de la microplaque ELISA.. Après addition de l'anticorps de détection (le deuxième) dans chacun des puits contenant les milieux enzymatiques, ces échantillons étaient incubés à la température ambiante pour une période allant de 16 à 20 heures. Les puits ont été vidangés et cinq lavages, avec un tampon fourni dans la trousse, ont été effectués après ce temps d'incubation. Le conjugué a été ajouté et laissé dans les puits pendant 3 heures à 37°C. Finalement, après cinq autres lavages, le substrat de la peroxydase a été ajouté. Après 25 minutes, une solution d'arrêt constituée d'acide sulfurique 1% a été ajoutée. La coloration jaune obtenue a été quantifiée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 450 nm.

4.1.2 Cinétique enzymatique : Variation de la concentration en BigET-1

Les conditions d'essai enzymatique (milieu réactionnel, méthode de quantification) décrites à la section 4.1.1 ont servi à évaluer l'effet de variation de la concentration en BigET-1 sur l'activité enzymatique. Dans ce cas, la réaction enzymatique a été incubée pendant 4h et les fractions F1 et F3 ont été utilisées. Des concentrations croissantes en BigET-1, allant de 0 à 5000 pM (F1) et de 0 à 1000 pM (F3), ont été mises en présence de l'enzyme afin de déterminer certains paramètres cinétiques dont le K_m et la V_{max}. Une concentration enzymatique a été prédéterminé (pour la F1 et la F3) dans le but d'utiliser une échelle de concentration de substrat raisonnable. Des quantités d'enzymes variant de 0,17 µg à 17 µg ont été testées.

4.1.3 Inhibition de hECE-1sol par différents inhibiteurs non peptidiques

L'inhibition causée par deux inhibiteurs potentiels, le phosphoramidon et le CGS 26303 a été évaluée. Pour ce faire, l'enzyme a été préincubée pendant 30 minutes à 37°C avec des concentrations variables en inhibiteurs, soit de 0 à 150 µM. La concentration de substrat a été fixée à 250 pM et le temps d'incubation à 4 heures. Le dosage de la production d'ET-1 a été effectué au moyen du test ELISA expliqué à la section 4.1.1.

4.2 Test d'inhibition avec les analogues de la BigET-1

Plusieurs analogues de la BigET-1 (voir Tableau IV) ont été synthétisés au laboratoire du Pr Alain Fournier par la méthode décrite pour la synthèse de la BigET-1 (section 4). Parmi ceux-ci, trois ont été testés avec la fraction enzymatique F1, soit BigET-1 (16-29), BigET-1 (16-32) et [val²²]BigET-1 (17-27). Ce test a été utilisé dans le but de vérifier le potentiel d'inhibition de ces composés. Pour ce faire, les mêmes milieux enzymatiques que ceux utilisés pour les tests d'inhibition avec les inhibiteurs non peptidiques ont été utilisés. L'ajout des analogues en remplacement des inhibiteurs précédents s'est effectué à une concentration 100 fois supérieure à celle de la BigET-1, soit 25 nM. Le dosage d'ET-1 produite a également été effectué par ELISA.

Tableau IV Tableau de la séquence des analogues de la BigET-1 synthétisés pour les tests de compétition avec la BigET-1

Analogues de la BigET-1	Séquence en acides aminés
<i>BigET-1 (16-29)</i>	<i>H-L-I-I-W-V-N-T-P-E-H-I-V</i>
<i>BigET-1 (16-32)</i>	<i>H-L-I-I-W-V-N-T-P-E-H-I-V-P-Y-G</i>
<i>[val²²]BigET-1 (17-27)</i>	<i>L-I-I-W-v-N-T-P-E-H</i>

RÉSULTATS

Section 1 Développement de la lignée cellulaire

1.1 à 1.4 Matériel génétique de départ et construction de pCIneoHCE-1sol

Le plasmide pME18ShECE-1sol a été transformé dans *E. coli* XL1-blue et purifié à partir de cultures de la souche transformée. Le protocole de purification MidiPrep de QIAGEN nous a permis d'obtenir environ 150 µg de plasmide purifié à partir de 250 mL de culture bactérienne. L'ADN plasmidique purifié était conservé en solution contenant environ 0,25 µg/µL. La pureté de ces préparations tel que déterminé par spectrophotométrie était excellente (résultats non montrés).

Lors de la construction du plasmide d'expression pCIneoHCE-1sol, la digestion des plasmides pME18ShECE-1sol et pCI-neo par les endonucléases, EcoRI et Not I, a généré les bandes attendues, aux dimensions attendues (Figure 15). Les puits 2 à 7 font référence au plasmide pME18ShECE-1sol. Le puits #2 correspond au plasmide non digéré, les puits #3 et #4 constituent le plasmide après une digestion par l'enzyme EcoRI et les puits #5 à 7 représentent les produits d'une double digestion de ce plasmide par les enzymes EcoRI et Not I. Le puits #2 illustre deux conformations possibles chez un plasmide non digéré, soit, du haut vers le bas, relâchée et superenroulée. Après la simple digestion par EcoRI, un fragment évalué à 6943 pb est obtenu (puits # 3-4). Deux fragments de 4116 pb et 2663 pb sont observés dans le cas de la double digestion du plasmide pME18ShECE-1sol (puits # 5 à 7). D'autre part, les puits #8 à 13 sont ceux relatifs au plasmide pCIneo seul. Les trois conformations de ce plasmide non digéré sont retrouvées dans le puits #8 et un seul fragment de 6031 pb est obtenu lors de la simple et de la double digestion du pCIneo seul (puits # 9 à 13). Les valeurs de paire de bases ont été calculées à partir des deux échelles de paire de bases retrouvées dans les puits #1 et #15. La bande A correspondant à l'insert de pME18ShECE-1sol et B correspondant au plasmide pCI-neo linéarisé ont servi à la ligation (Figure 15).

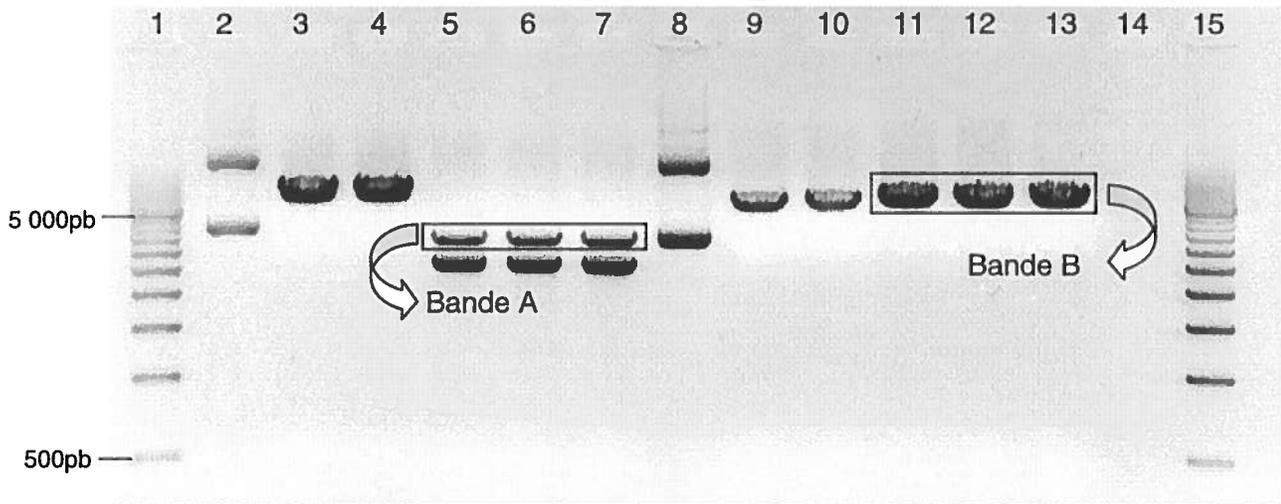


Figure 15 Fragments digérés du pME18ShECE-1sol et du pCIneo ayant servi à la construction du plasmide pCIneoECE-1sol

Le puits #2 correspond au plasmide pME18ShECE-1sol non digéré, les puits #3 et #4 constituent le plasmide après une digestion par l'enzyme EcoRI et les puits #5 à 7 représentent les produits d'une double digestion de ce plasmide par les enzymes EcoRI et Not I. Le puits #8 correspond au plasmide pCIneo non digéré. Les puits #9 et #10 sont les produits de la digestion de pCIneo par EcoRI et les puits #11 à 13 représentent la double digestion de ce dernier par EcoRI et Not I. Finalement, les puits #1 et #15 correspondent à l'échelle de paire de bases.

La transformation de *E. coli* XL1-blue avec le produit de ligation a permis d'obtenir 3 clones bactériens, qui portaient le plasmide. Le patron de digestion avec les mêmes enzymes de restriction a permis de ressortir l'insert cloné des plasmides isolés de ces 3 clones (Figure 16). Les clones 2 et 3 présentent des patrons semblables (insert d'environ 3211 pb) tandis que le clone 1 a un insert plus petit en terme de paire de bases (2561 pb). En parallèle à cette expérience, les plasmides provenant de ces 3 clones ont été séquencés pour permettre d'identifier un clone comportant la bonne séquence de l'insert hECE-1sol. Cependant, la première approche de séquençage avec les amorces pT7 et pT3 n'a pas donné de résultats concluants. De ce fait, une deuxième approche de séquençage a été envisagée et c'est grâce à cette 2^e approche, que les résultats du séquençage à l'aide des amorces hECE-1 FWD et hECE-1 REV ont identifié le clone #1 comme étant celui présentant l'insert hECE-1sol avec la bonne séquence (Figure 16). L'analyse des séquences par alignement avec la séquence publiée (Ahn *et al.* 1998)

indique que l'ADN de l'insert du clone #1 présente 99% d'homologie avec la séquence théorique. Le nombre de paire de bases séquencées en direction 5' 3' a été de 981 et de 876 pour la direction 3' 5'. Ceci représente environ 62 % du gène de hECE-1sol. Le plasmide du clone #1 a alors été nommé pCIneohECE-1sol et fut celui utilisé ultérieurement pour le développement de la lignée cellulaire stable, grâce à la présence de son marqueur de sélection. Les plasmides des clones 2 et 3 ont présenté des homologies de 80% et 83% respectivement avec la séquence d'origine de hECE-1sol.

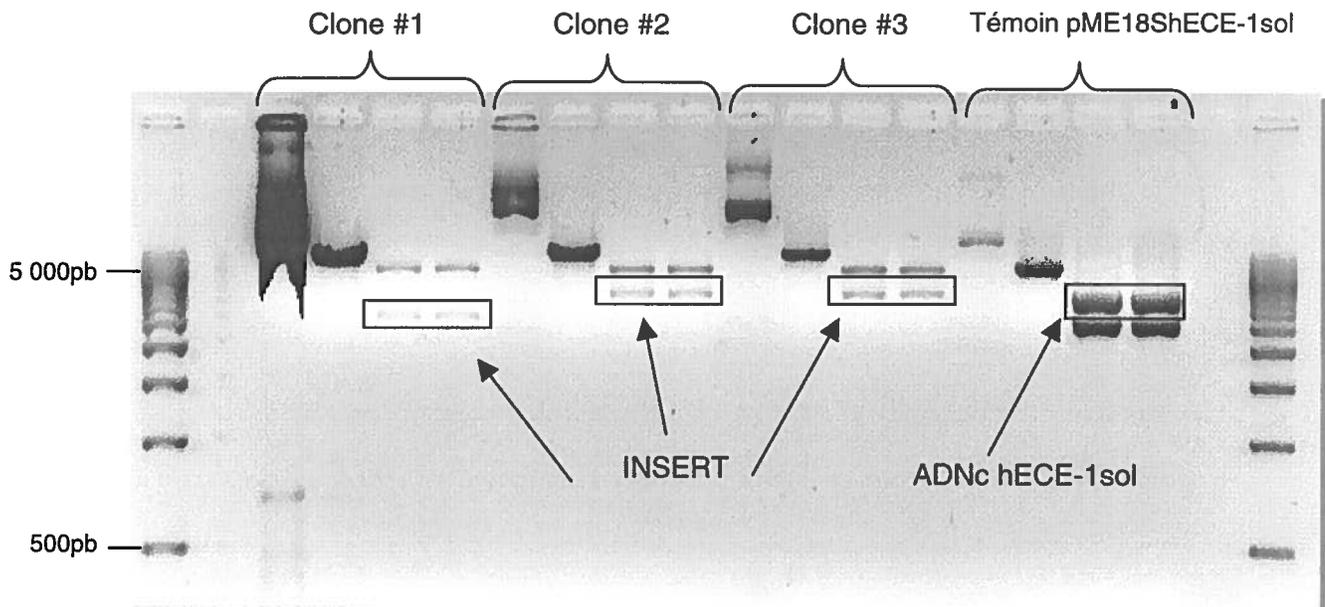


Figure 16 Photographie du gel d'agarose 1% correspondant au profil de digestion de 3 clones bactériens obtenus pour la construction pCIneohECE-1sol

Les puits #1 et #15 correspondent aux échelles de paire de bases utilisées pour le calcul de la taille des fragments digérés des différents clones. Chaque clone est associé à 5 puits. Le premier puits correspond au plasmide de ce clone non digéré. Le deuxième puits représente le produit d'une simple digestion avec EcoRI et les deux suivants (le 3^e et le 4^e) sont les fragments obtenus après une double digestion du plasmide par les enzymes EcoRI et Not I.

1.5 Techniques de transfection cellulaire transitoire et stable avec pME18ShECE-1sol et pCIneoECE-1sol

Les cellules en culture ont servi d'outils pour l'expression de hECE-1sol. La technique de transfection cellulaire a servi à évaluer le potentiel de trois lignées cellulaires à synthétiser hECE-1sol. Tout d'abord, pour permettre d'obtenir un rendement maximal d'expression, certains paramètres ont été déterminés, dont le nombre de cellules en culture et la quantité d'ADN utilisée. Les résultats obtenus pour permettre cette optimisation ont été déterminés avec le plasmide p β gal et ce, pour les trois lignées cellulaires. La coloration au X-galactose a permis d'identifier les cellules transfectées et de déterminer le rendement de la transfection, qui correspond au pourcentage des cellules ayant exprimé la protéine cible, dans ce cas-ci, la β -galactosidase. De ce fait, les cellules colorées en bleu sont celles ayant été transfectées puisqu'elles possèdent la capacité de dégradation du X-galactose en un chromophore bleu. La figure 17 illustre le suivi photographique du processus de transfection transitoire utilisé pour l'optimisation avec p β Gal. Les cellules colorées de la troisième photo sont des cellules positives pour la transfection.

Pour l'expression de hECE-1sol, deux types de transfection ont été tentés, soit une transfection transitoire avec précipitation d'ADN au CaHPO₄ et une transfection stable au moyen de la lipofectAMINE™ 2000. Dans un premier temps, le plasmide de départ pME18ShECE-1sol a été celui utilisé dans le cas de la transfection transitoire. Après un rendement insuffisant de cette première technique, une transfection stable a été envisagée, nécessitant la construction pCIneoECE-1sol. A partir des résultats de l'optimisation avec p β gal, il a été possible d'extrapoler les paramètres optimaux pour la transfection transitoire avec le pME18ShECE-1sol. Par contre, les conditions optimales pour la transfection stable avec pCIneoECE-1sol ont été déterminées par essais et erreurs à l'aide d'une référence donnée par la compagnie Invitrogen lors de l'achat du réactif de lipofection. De plus, dans ce type de transfection, la concentration optimale en G418, un antibiotique eucaryote, a été déterminée pour permettre une sélection rigoureuse des cellules transfectées. La dose létale du G418 a été obtenue en soumettant des cellules non transfectées à cet agent de sélection. De ce fait, lors de la transfection stable avec le pCIneoECE-1sol, la résistance au G418 étant présente dans ce vecteur, les

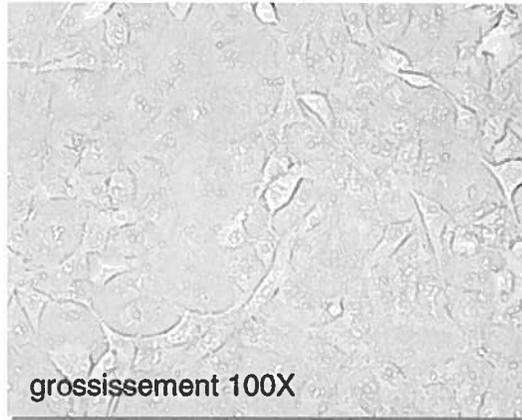
cellules résistantes à cette sélection étaient alors considérées comme des cellules transfectées. Ce processus de sélection a duré environ deux semaines et ce, jusqu'à ce que les cellules de la culture témoin (non transfectée) soient toutes mortes. Un résumé des conditions optimales de transfection est donné par le tableau IV.

Le rendement de transfection par précipitation au CaHPO₄ pour les cellules COS-7 et HEK 293 s'est situé aux alentours de 5 à 10%. Dans le cas des cellules CHO, il s'est avéré quelque peu inférieur, soit entre 2 et 5%. D'autre part, l'utilisation de la lipofection avec la lipofectamine a permis des rendements de 20 à 30% pour les cellules COS-7 et HEK 293. Toutefois, les cellules CHO ont conservé un rendement d'environ 5%. De plus, étant donné une trop grande difficulté de sélection pour cette lignée cellulaire, elles ont été abandonnées. De ce fait, seulement les cellules HEK 293 et COS-7 ont été utilisées pour l'expression de la protéine.

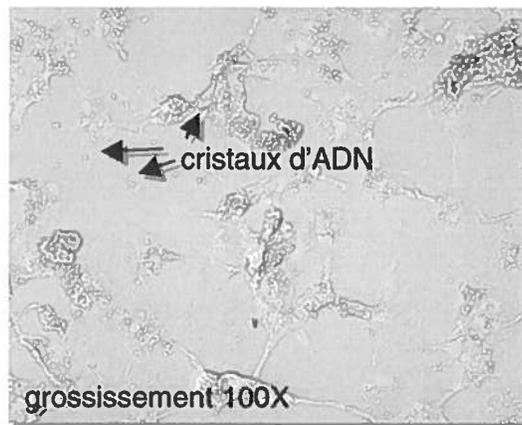
Tableau V Tableau résumé des conditions optimales pour la transfection transitoire (au CaHPO₄) et stable (Lipofectamine 2000) des trois différents types cellulaires

	<u>Transfection transitoire</u>		<u>Transfection stable</u>		
	# de cellules initial/plat de Pétri	Quantité ADN (µg)	# de cellules initial/puits	Quantité ADN (µg)	Concentration G418 (µg/mL)
COS-7	375 000	7,5 – 12	150 000	0,8	600
HEK 293	400 000	10	200 000	0,8	800
CHO	900 000	10	400 000	1,0	---

Cellules COS-7
Avant la transfection
Jour 1



Cellules COS-7
Pendant la transfection
Jour 2



Cellules COS-7
Après la transfection
Jour 4

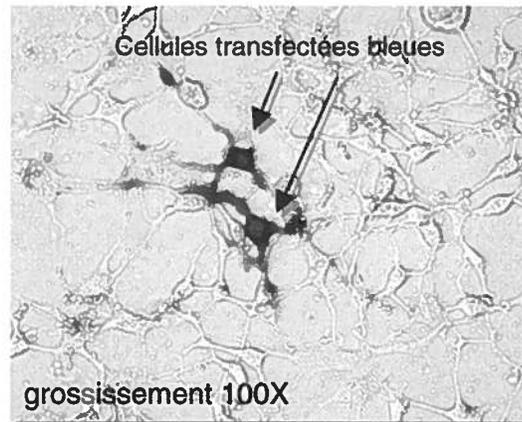


Figure 17 Photographie des cellules COS-7 durant le processus d'optimisation de la transfection cellulaire par précipitation au CaHPO₄ à l'aide du plasmide pβgal

Section 2 Méthodes de détection et de quantification de hECE-1sol

2.1 – 2.2 Préparation et dosage des protéines de l'échantillon par la méthode de Lowry

Les différentes concentrations protéiques obtenues pour les fractions à l'étude ont été calculées à partir d'une courbe standard de BSA (Figure 18).

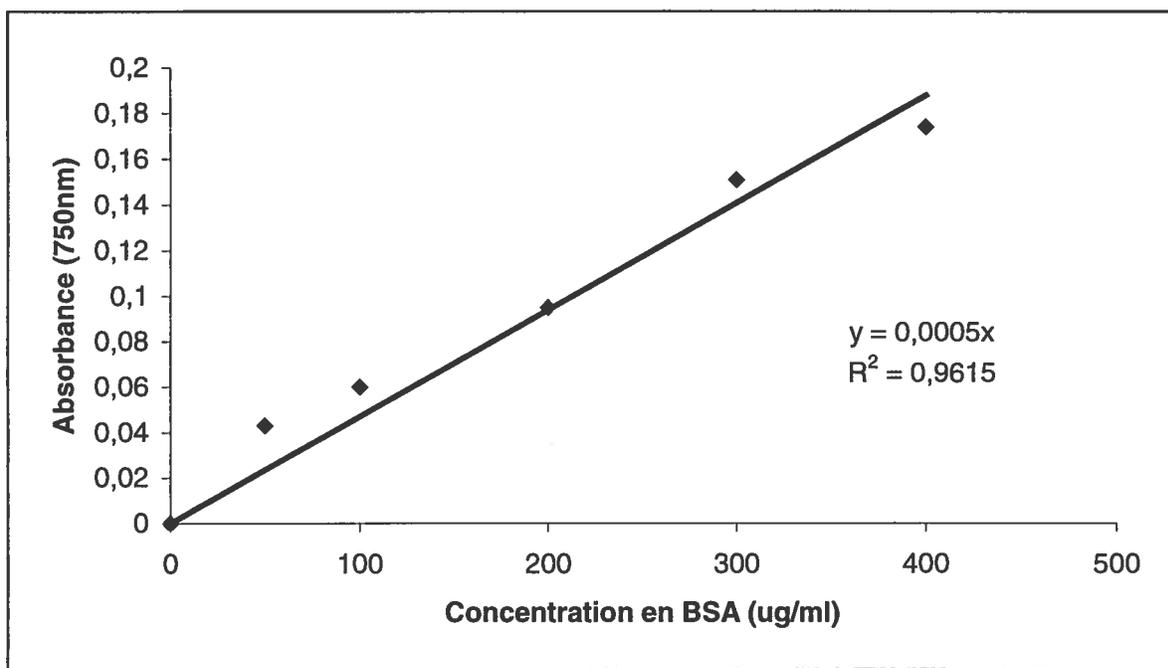


Figure 18 Courbe standard du dosage des protéines par la méthode de Lowry

Les résultats des dosages protéiques calculés à partir de la figure précédente sont indiqués dans le tableau VI. Ces données ont été utilisées pour calculer l'activité spécifique de l'enzyme en fonction de la quantité de protéine présente dans les différentes fractions durant les étapes de purification. La concentration protéique en $\mu\text{g/mL}$ est donnée dans la 2^e colonne de ce tableau et la concentration finale mentionnée correspond à la valeur modifiée en tenant compte du facteur de dilution. Cette valeur a alors été transposée en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ afin de simplifier le calcul de l'activité spécifique.

Tableau VI **Tableau des résultats de dosage protéique des différentes fractions étudiées**

La concentration finale en protéine pour chacune des fractions a été calculée à partir de la concentration en mg/mL déterminée au moyen de la courbe standard (Figure 18) et l'ajout du facteur de dilution et la conversion en mg/mL permettent le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme indiquée dans le tableau VIII.

Fraction	Densité optique à 750nm	Concentration protéines (µg/mL)	X facteur de dilution	Concentration finale (µg/µL)
F1 (brute)	0,118	236,7	2360	2,36
F2 (ConA)	0,391	139,6	698,2	0,70
F2 (AffiGel)	0,220	78,6	78,6	0,08
F2 (AffiZn)	0,090	180,0	1800	1,80
F3 (AffiGel Blue)	0,060	120,0	120,0	0,12

2.3 Immunobuvardage de type Western et purification de hECE-1sol

2.3.1 Production de l'anticorps Anti-hECE-1sol

L'analyse d'hydrophilicité par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) a mis en évidence les résidus 735 à 752 de la protéine hECE-1sol comme étant une séquence favorable pour créer un épitope linéaire reconnu par un anticorps de type IgG. Le taux de substitution de la résine Rink-amide-AM au départ étant de 0,8 mmole/g, l'échelle de synthèse du peptide antigénique utilisée a été de 1,6 mmole. À la fin des cycles de synthèse peptidique, le poids du peptide-résine était de 2,5 g. Des analyses par spectrométrie de masse utilisant la technologie MALDI-TOF ont permis d'évaluer le poids moléculaire du fragment peptidique afin de vérifier si celui-ci correspondait au produit désiré. Le peptide après clivage de la résine et également après les deux purifications sur CLHP préparative avait une masse de 1918 Da, soit la masse attendue (Figure 19C et D ; Tableau VII). Le temps de rétention pour un gradient 20-60% de (B), (A) étant de l'eau contenant 0,06% TFA et (B) de l'acétonitrile échelonné sur 30 minutes, a été de 8 minutes (Figure 19A et B). La pureté de l'échantillon brute était de 67% et après les deux purifications, celle-ci a atteint 91%. Il est d'ailleurs probable que le pic secondaire observé sur les profils provient de la dimérisation spontanée du peptide due à la présence d'une cystéine libre (Figure 19).

Tableau VII Résultats des analyses en spectrométrie de masse du fragment antigénique hECE-1sol (735-752)

Poids moléculaire attendu (Da)	Poids moléculaire obtenu (Da)
1918,47	1918,65

La compagnie ZYMED a produit l'anticorps en immunisant deux lapins avec cet antigène et nous a fait parvenir le sérum de ces lapins. Le test de validation de l'anticorps s'est avéré positif. En effet, en utilisant le protocole de ZYMED pour la détection de l'anticorps par ELISA, les mêmes données que celles soumises par le laboratoire de cette compagnie ont été obtenues. Donc, à partir du sérum polyclonal reçu de cette compagnie, la purification de l'anticorps anti-hECE-1sol a été possible au moyen d'une chromatographie d'affinité avec une matrice Sépharose-Protéine G possédant une grande affinité pour les immunoglobulines de type IgG. Le profil de la purification est illustré à la figure 20. Les fractions d'élution présentant une densité optique à 280 nm hors limite,

soit les fractions #19 à 23, ont été rassemblées et utilisées comme anticorps pour l'immunobuvardage et la chromatographie d'affinité des échantillons de culture.

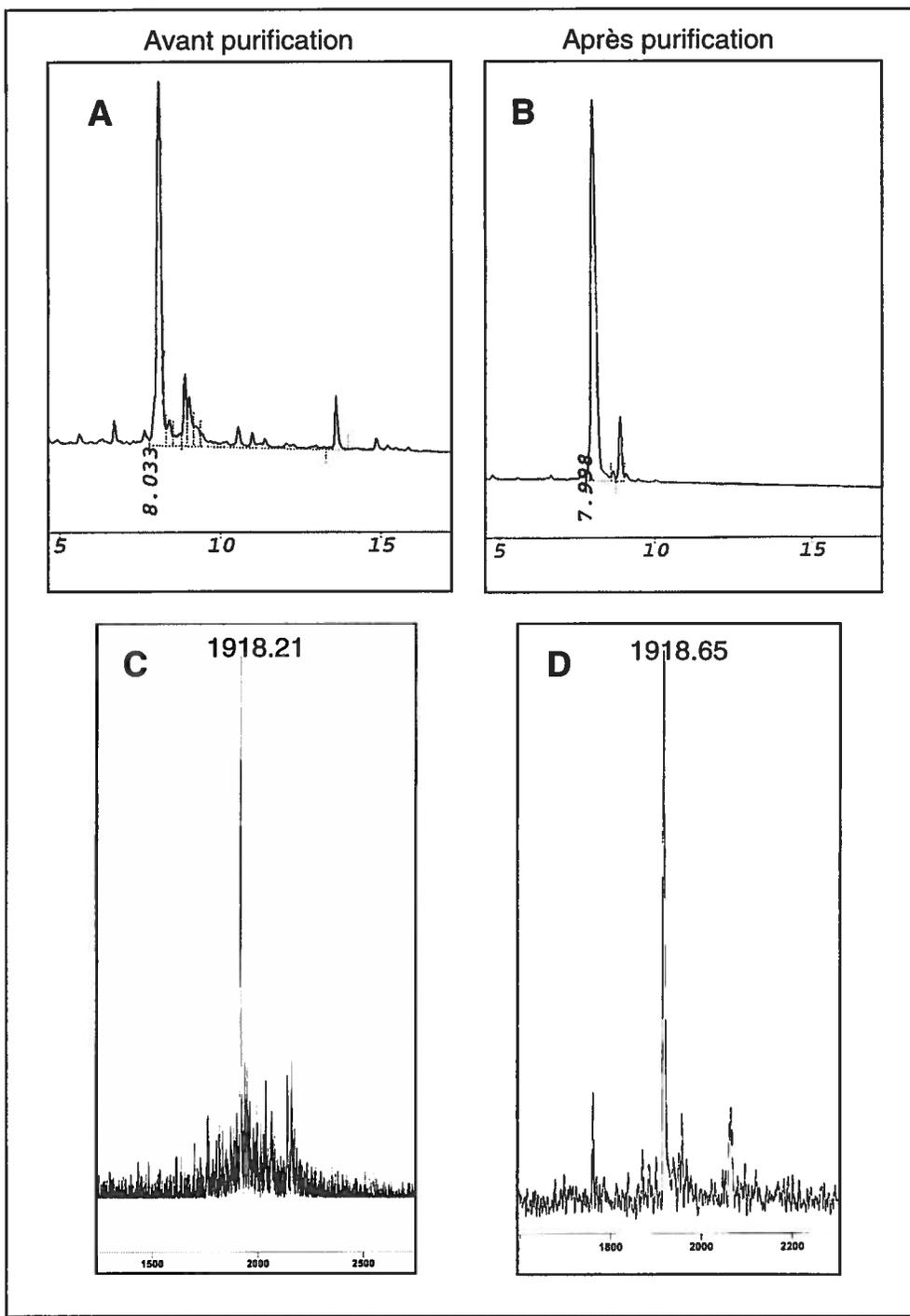


Figure 19 Profils CLHP analytiques (A et B) et spectres de masses (C et D) du fragment antigénique hECE-1sol (735-752) utilisé pour la synthèse de l'anticorps

A et C avant purification ; B et D après purification

Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 20-60% ACN/H₂O 0,06% TFA en 30 min pour le profil A et B

Débit : 1,5mL/min. ; Détection : 230nm

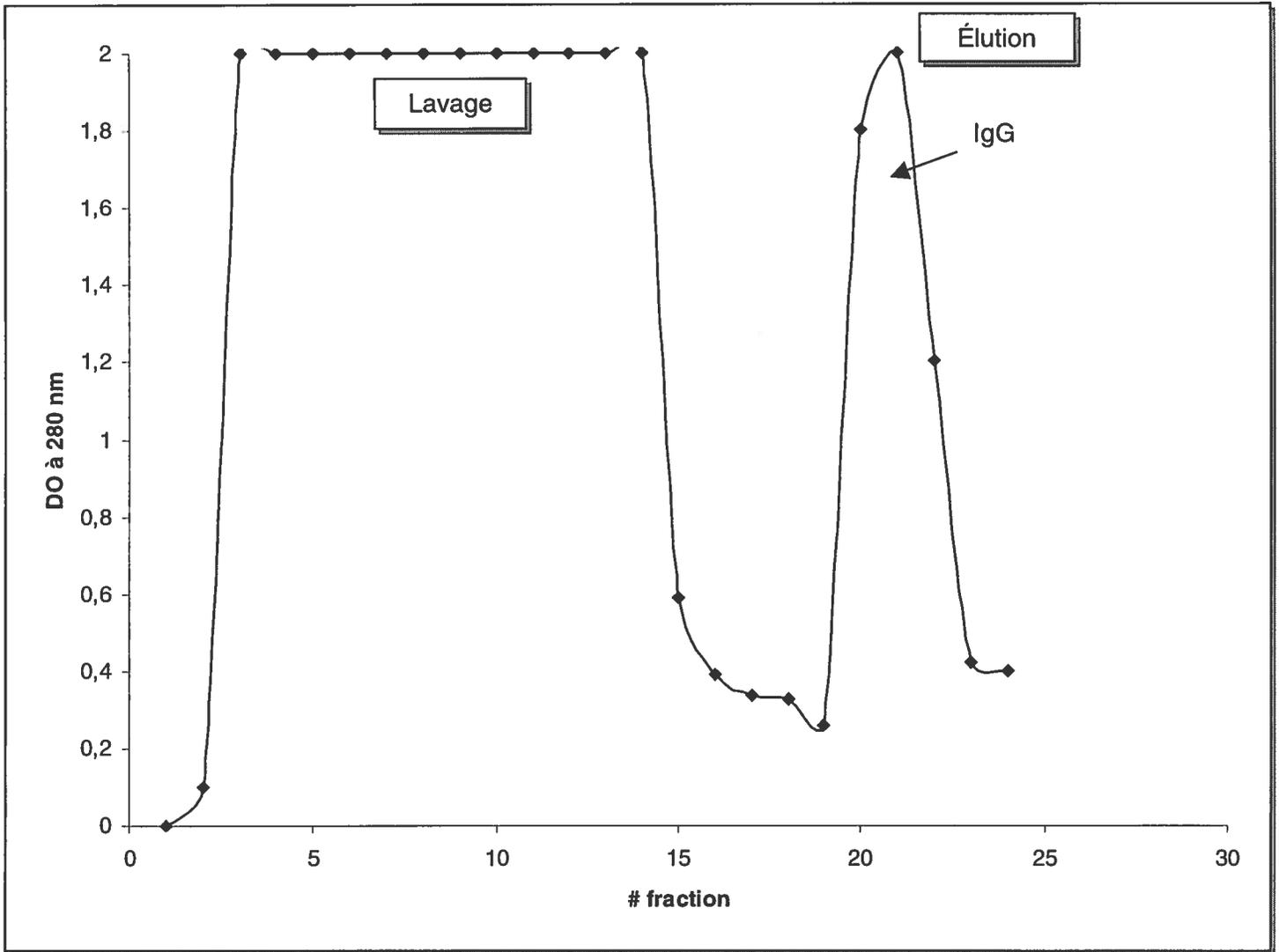


Figure 20 Profil de purification de l'anticorps anti-hECE-1sol à l'aide de la colonne d'affinité Sépharose-Protéine G (« Mab Trap Kit » d'Amersham)

Section 3 Purification partielle de hECE-1sol et immunobuvardage

Tout d'abord, la fraction brute F1 a été soumise à un immunobuvardage de type Western pour vérifier la présence de hECE-1sol dans le milieu de culture des COS-7 transfectées. L'utilisation de l'anticorps dirigé contre hECE-1sol a permis de révéler la présence de l'enzyme dans les préparations brutes. La figure 21B démontre la présence de l'enzyme dans la F1 des cellules COS-7 cotransfectées avec le pCIneo hECE-1sol et pAdVantage de façon stable révélant en fait un poids moléculaire d'environ 120 kDa (puits #1 à 4). En effet, seulement les résultats de la cotransfection PCIneo hECE-1sol – pAdVantage sont illustrés ici puisque il s'agit de ceux ayant généré une meilleure production de hECE-1sol. L'objectif du présent projet étant d'obtenir une quantité maximale de l'enzyme, la cotransfection a alors été l'étape d'expression officielle et idéale pour rencontrer cet objectif. Les puits #5 et #6 sont le témoin positif de ECE-1a provenant des cellules endothéliales d'aorte de porc (PAEC). Une protéine d'environ 120 kDa est retrouvée ainsi que 3 fragments avec des poids moléculaires de 55, 66 et 95 kDa respectivement. Finalement, une protéine de 66 kDa est observée dans le témoin négatif, composé de milieu de culture de cellules COS-7 non transfectées (puits #7). La figure 21A illustre la coloration au bleu de Coomassie de cette même membrane révélant la présence de l'ensemble des protéines. Dans le cas du surnageant de cultures des cellules transfectées de façon transitoire, aucune bande spécifique à hECE-1sol n'a pu être identifiée (résultats non montrés). De plus, les cellules HEK 293 transfectées avec pCIneo hECE-1 n'ont pas permis l'expression de hECE-1sol. Aucune protéine n' a été révéler par immunobuvardage du milieu de culture brut. De ce fait, seulement le type COS-7 a été utilisé pour les étapes subséquentes, soit la purification et la caractérisation de l'enzyme.

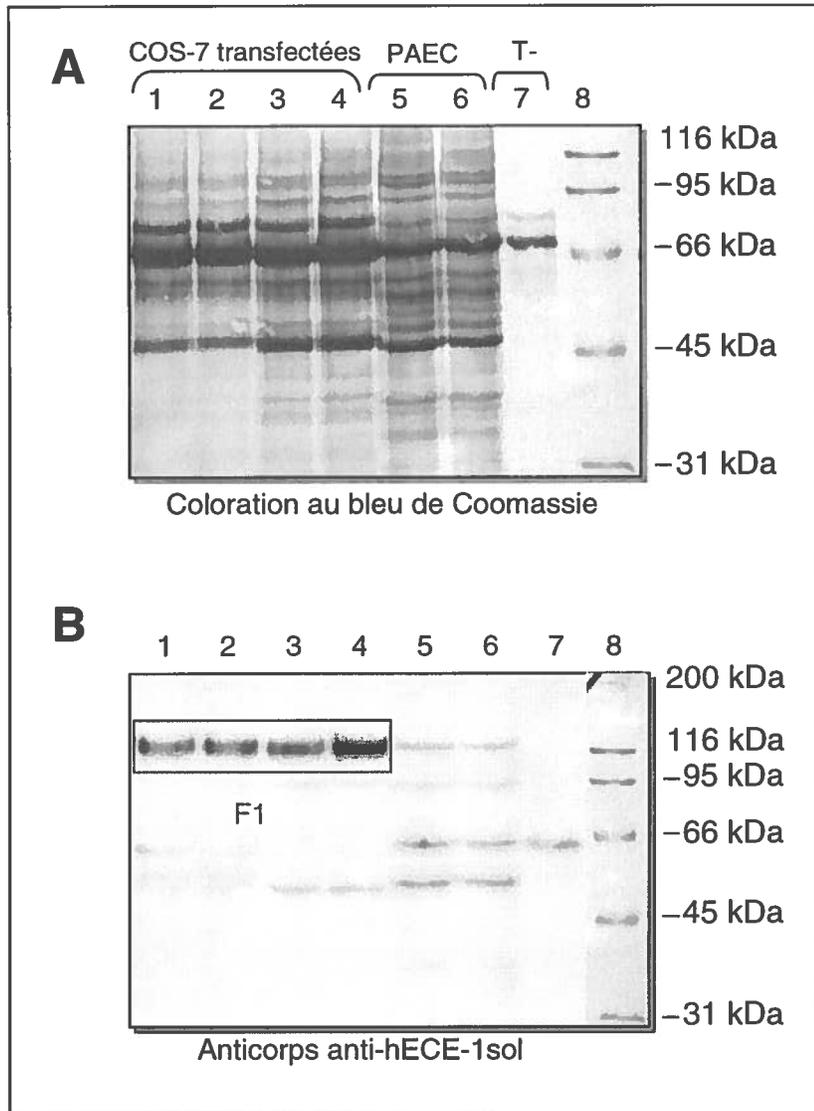


Figure 21 Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneoHCE-1sol (Fraction F1)

A) Membrane de PVDF colorée au bleu de Coomassie

B) Autoradiographie de la membrane après une révélation au ECL

Le puits #1 à 4 correspondent à la fraction F1, soit 4 mL de milieu de culture de cellules COS-7 cotransfectées avec pCIneoHCE-1sol et pAdVantage et concentrées (40X). Les puits #5 et 6 représentent les protéines présentes dans la portion membranaire des cellules endothéliales aortiques de porc (témoin positif pour cet expérience). Le puits #7 constitue le témoin négatif composé de 16 mL de milieu de culture de cellules COS-7 non transfectées.

3.1 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie sur ConA

Cette étape de purification permet d'isoler les glycoprotéines du milieu de culture des cellules exprimant hECE-1sol. Étant donné un fort taux de glycosylation chez hECE-1, ce type de purification se prêtait bien à la forme soluble de l'enzyme. Toutefois, les fractions d'élution obtenues après cette purification n'ont démontré aucune présence de l'enzyme. Les résultats de l'immunobuvardage et des essais enzymatiques n'ont pas non plus indiqué la présence de l'enzyme. Cette technique a été optimisée le mieux possible mais sans aucun résultat pertinent. Parmi les paramètres tentés, on note des modifications des conditions d'injections (circuit fermé, injection prolongée pendant 16 heures), une élution impliquant différents sucres (glucopyranoside et mannopyranoside) avec des concentrations allant de 1M à 3M, une élution avec l'acide borique 0,5M et la collection de fractions avec des volumes inférieures (500 µl par fractions). Le chromatogramme de la figure 22 illustre un exemple de profil d'essai de purification sur ConA. Après cette étape de purification ainsi qu'après chacune des modifications au protocole énumérées précédemment, aucune bande correspondant à hECE-1sol n'est identifiée dans les fractions d'élution et également de lavage. Cette technique a donc été abandonnée pour la purification de hECE-1sol.

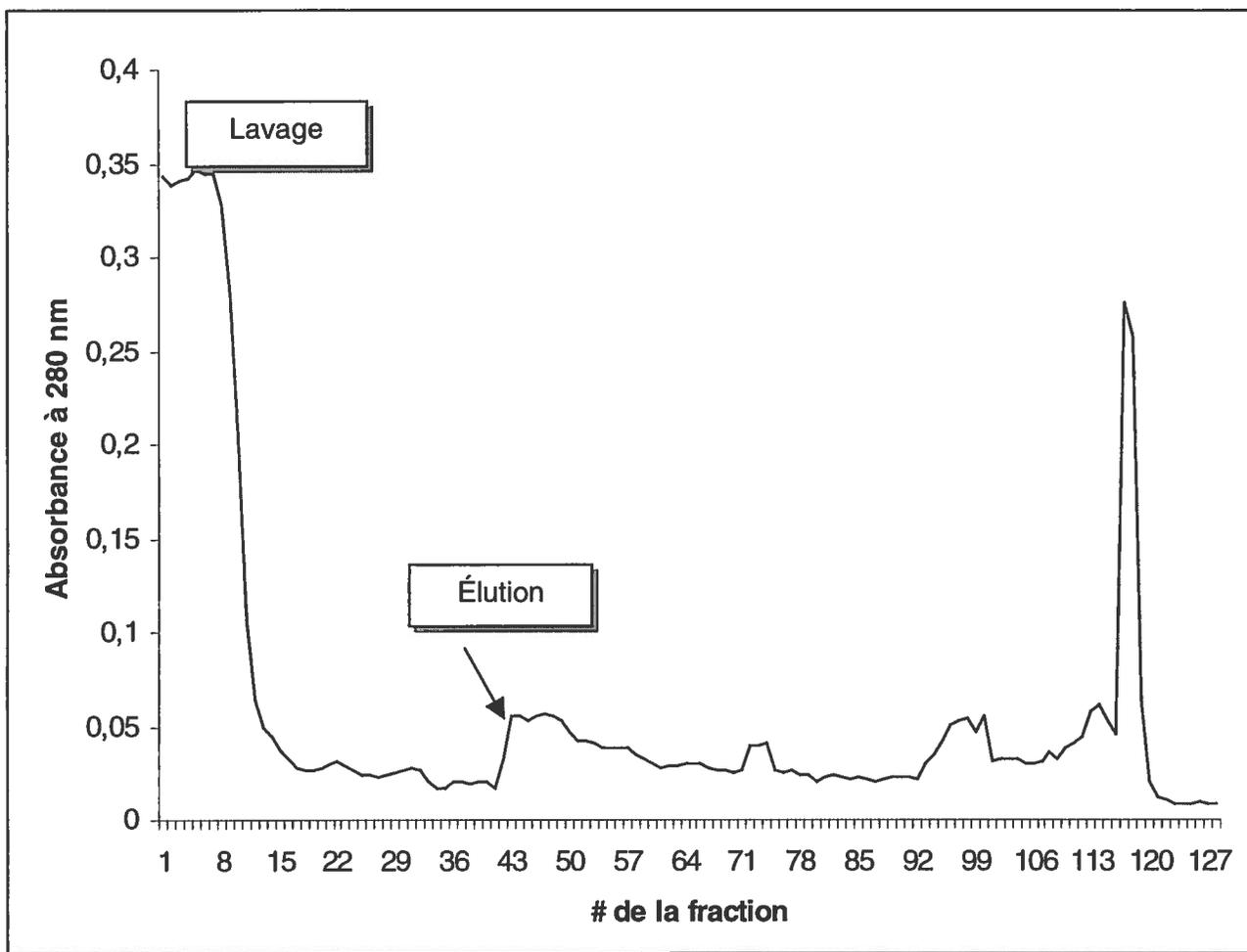


Figure 22 Profil de purification de hECE-1sol par chromatographie sur ConA de la fraction F1 provenant du milieu de culture des cellules COS-7

3.2 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité

Le rendement de fixation de l'anticorps à la résine a été déterminé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280 nm. Il s'agit de comparer la teneur en protéine de l'échantillon d'anticorps avant et après le couplage avec la résine d'agarose. Un lavage de cette dernière a permis d'éliminer toutes traces d'anticorps non fixés et celui-ci a été intégré au calcul du rendement. Le calcul du rendement de la réaction basé sur la quantité d'anticorps fixé à la résine a révélé un rendement de couplage de 73%. La purification s'est effectuée avec 5 mL de milieu de culture des cellules transfectées préalablement concentré (facteur de concentration 40X). Un profil de purification impliquant le tampon glycine-HCl pH 2,5 pour l'élution est donné par la figure 23. Malgré une faible quantité de protéines dans les fractions d'élution, hECE-1sol a pu être identifiée. Les résultats de l'immunobuvardage ont permis de révéler la présence de l'enzyme dans les fractions d'élution, après le dépôt de 16 μ L de ces fractions dans les puits #2 et #3. Les fractions de lavages ont révélées également la présence de l'enzyme (16 μ L dans les puits #4 et #5) (Figure 24B). Toutefois, la présence d'un signal important aux alentours de 50 kDa révèle la présence d'une protéine contaminant ces fractions. Le témoin négatif (milieu de culture non purifié de cellules COS-7 non transfectées) ne présente pas la protéine (puits #6). La portion A de la figure 24 correspond à la coloration au bleu de Coomassie de la membrane utilisée pour l'immunobuvardage. Elle représente l'ensemble des protéines retrouvées dans chacun des échantillons. Toutefois, la présence de l'enzyme dans les fractions de lavage dénote un rendement de purification plutôt faible. Malgré plusieurs ajustements des conditions de purification, soit l'utilisation d'un tampon urée 6M ou d'un tampon d'acide acétique 0,1 M, aucun de ceux-ci n'a pu conduire à un meilleur rendement, le rendement maximum étant de 15%. Les fractions d'élution grâce au tampon glycine-HCl pH 2,5 ont tout de même été testées pour leur activité enzymatique avec la BigET-1 mais sans pour autant démontrer d'activité.

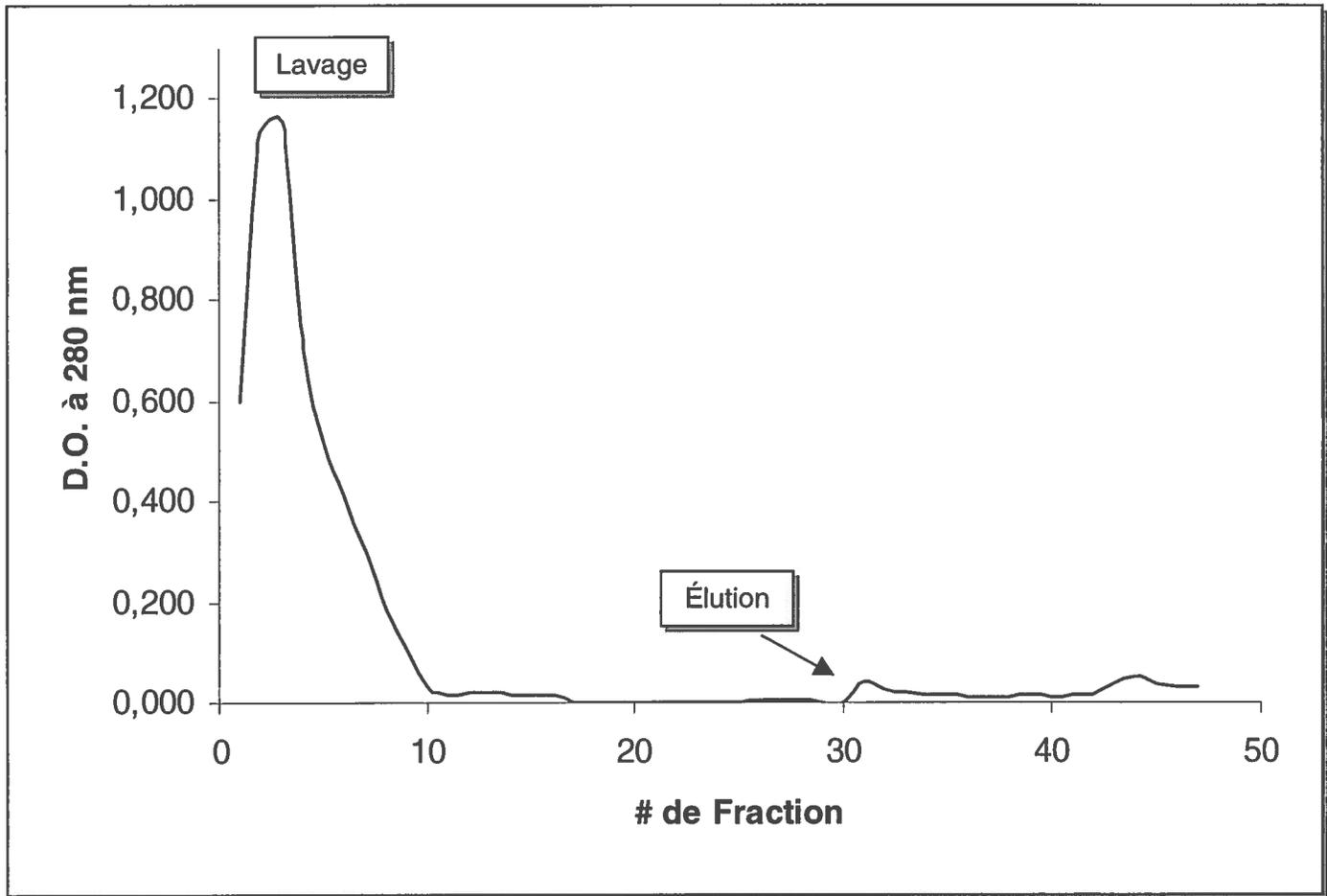


Figure 23 Profil de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant l'anticorps anti-hECE-1sol de la fraction F1 provenant du milieu de culture des cellules COS-7 transfectées

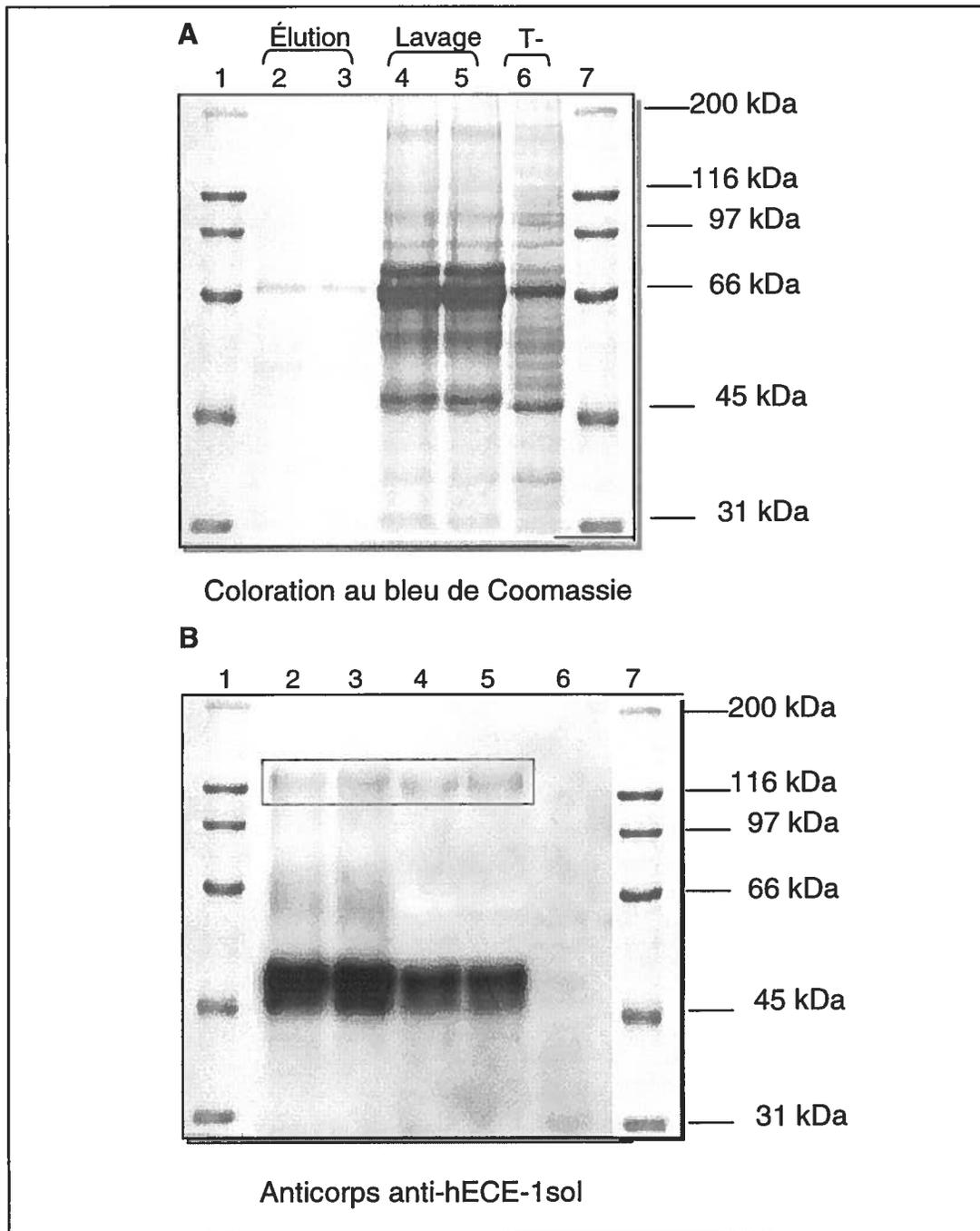


Figure 24 Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneoHCE-1sol après purification par chromatographie d'affinité avec anti-hECE-1sol (Fraction F2 Affinité)

A) Membrane de PVDF colorée au bleu de Coomassie
B) Autoradiographie de la membrane après une révélation au ECL

Les puits #1 et #7 correspondent aux marqueurs de poids moléculaires utilisés pour calculer la masse de chacune des protéines présentes sur la membrane. Les puits #2 et #3 représentent le contenu en protéine des fractions d'éluion après leur rassemblement (16mL/puits). Les fractions de lavage (rassemblées) correspondent aux puits #4 et #5 (16mL/puits). Le puits #6 est le contenu en protéine du témoin négatif issu du milieu de culture des cellules COS-7 non-transfectées.

3.3 Purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité à l'aide du cofacteur

Zn

L'analyse du profil de purification au moyen de la chromatographie d'affinité pour le cofacteur Zn démontre la présence de deux pics de protéines lors de l'étape d'élution (Figure 25). Le premier pic d'élution est celui dans lequel hECE-1sol est retrouvée puisque lors de l'immunobuvardage des fractions représentant ce pic de protéines, celles-ci se sont avérées positives pour la présence de l'enzyme. Par conséquent, cette technique de purification a permis l'isolement de hECE-1sol dans les fractions d'élution (17 à 24) (puits # 4 et 5) (Figure 26B). Plusieurs protéines ont été éliminées de la fraction brute initiale conduisant à une fraction semi-purifiée appelée alors F2. La présence d'une faible quantité de hECE-1sol est également constatée dans les fractions de lavage (puits #6-7) (Figure 26B). Le puits #8 permet l'identification de la protéine puisque ce dernier correspond à la migration de la fraction brute F1 à partir de laquelle la purification a été effectuée (Figure 26B). La portion A de la figure 26 illustre les protéines totales contenues dans chacune des fractions de cette étape de purification.

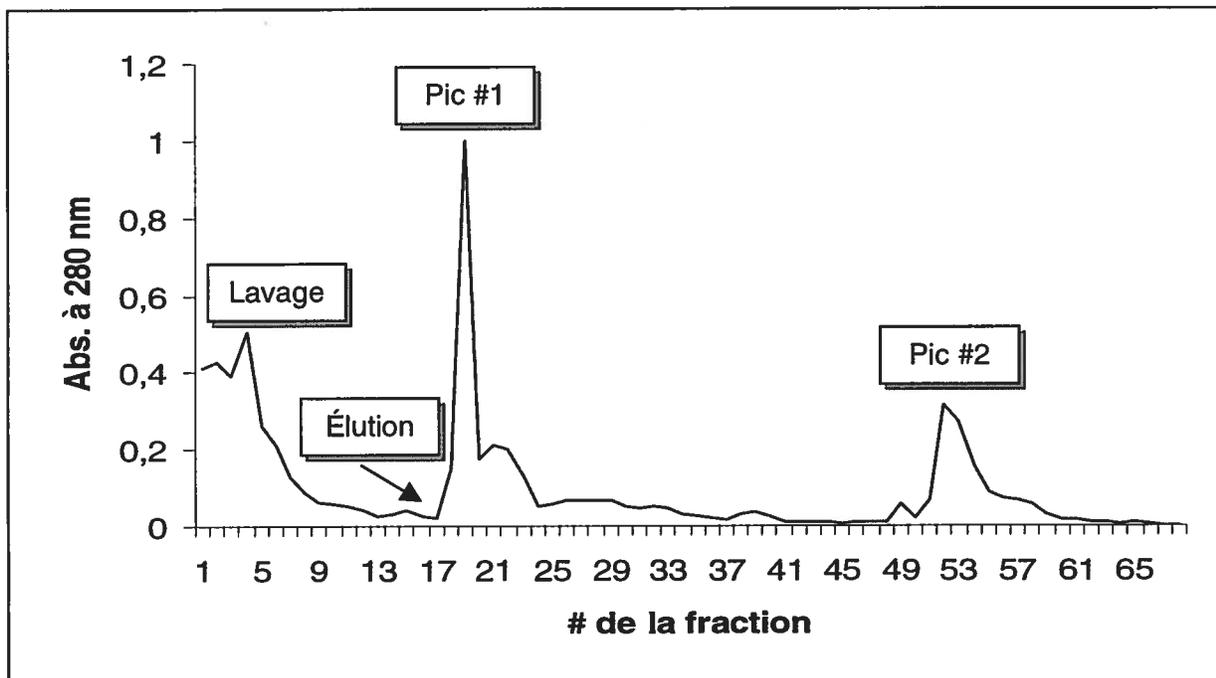


Figure 25 Profil de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant le cofacteur Zn de la fraction F1 provenant du milieu de culture des cellules COS-7

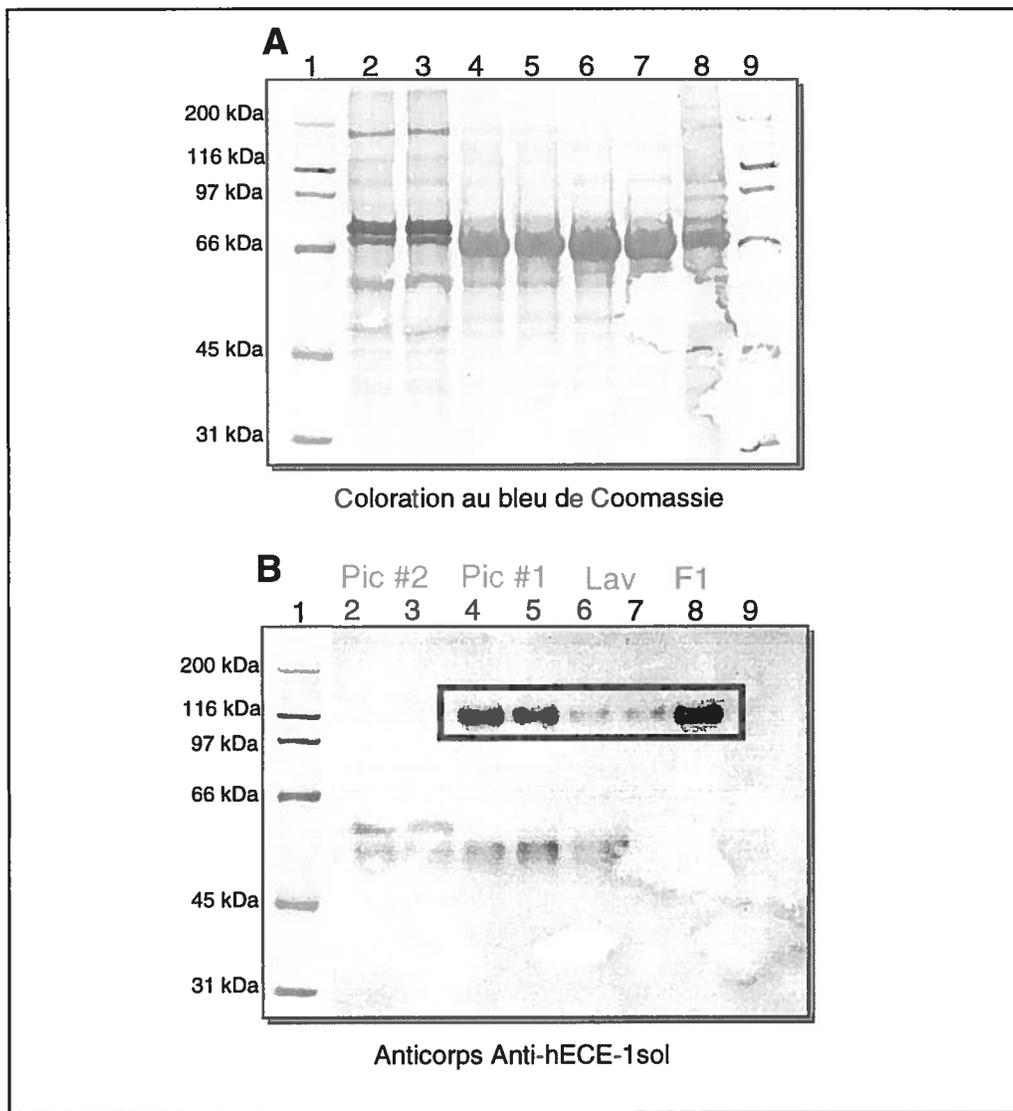


Figure 26 Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneo hECE-1sol après purification par chromatographie d'affinité avec le cofacteur Zn (Fraction F2 Zn)

A) Membrane de PVDF colorée au bleu de Coomassie

B) Autoradiographie de la membrane après une révélation au ECL

Les puits # 1 et #9 correspondent aux marqueurs de poids moléculaires. Les puits #2 et #3 correspondent à 16 μ L des fractions du pic #2 rassemblées et concentrées 5X par centricon 50 000Da. Les puits #4 et #5 correspondent à 16 μ L des fractions du pic #1 (17 à 24) rassemblées et concentrées 5X. Les puits #6 et #7 représentent les fractions de lavage rassemblées et concentrées 5X. Le puits #8 représente quant à lui la fraction brute F1 (4 mL) correspondant au milieu de culture (40X) des cellules COS-7 transfectées.

3.4 Purification de hECE-1sol sur la résine AffiGel Blue : élimination de l'albumine

L'utilisation de cette résine d'affinité pour l'albumine a permis d'éliminer en grande partie l'albumine sérique bovine présente dans la fraction F2. Cette nouvelle fraction a alors été appelée F3. La figure 27 correspond à l'immunobuvardage des protéines de la fraction F2 sans traitement avec la résine AffiGel Blue (puits # 4-5) et après un traitement de 10 minutes avec cette dernière (Fraction F3) (puits # 2-3) (Figure 27B). La fraction brute F1 est présente dans le puits #8 pour confirmer l'identification de hECE-1sol (Figure 27B). La portion A de cette figure correspond aux protéines totales de chacune de ces fractions tel que mentionné pour les autres résultats d'immunobuvardage. Le rendement de purification de cette étape est calculé à 70%. Une perte de hECE-1sol est alors noté.

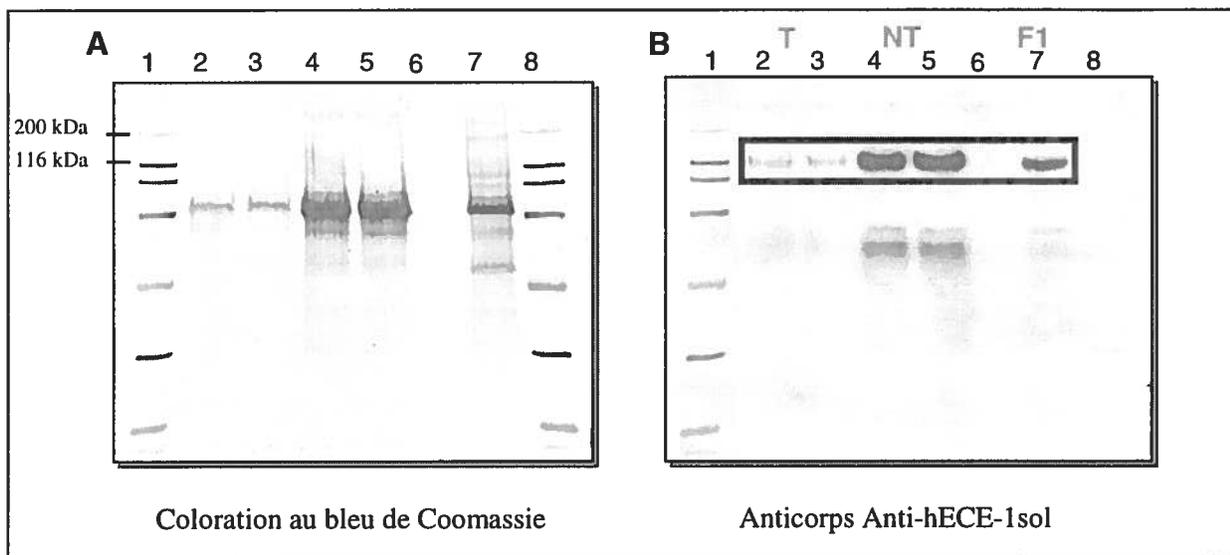


Figure 27 Immunobuvardage de type Western du surnageant de culture des cellules COS-7 transfectées de façon stable avec le pCIneo-hECE-1sol après purification sur une résine d'affinité pour l'albumine (Fraction F3)

A) Membrane de PVDF colorée au bleu de Coomassie

B) Autoradiographie de la membrane après une révélation au ECL

Les puits #1 et #8 correspondent au marqueur de poids moléculaire. Les puits #2 et #3 correspondent à 12 μ L de la fraction F2 après traitement de 1 mL de cette dernière avec la résine AffiGel Blue pendant 10 minutes. Les puits #4 et #5 correspondent à 12 μ L de la fraction F2 avant le traitement avec la résine AffiGel Blue et le puits #8 constitue le matériel de départ, soit 4 μ L de la fraction brute F1 (40X) représentant le milieu de culture des cellules COS-7 transfectées.

Section 4 Caractérisation de hECE-1sol

Comme mentionné dans la section Matériels et Méthodes, à propos des différents tests enzymatiques propres à la caractérisation de hECE-1sol, le substrat de cette dernière, la BigEt-1 humaine, a été synthétisé au sein de notre laboratoire. La figure 25 met en relief les différents paramètres obtenus lors de l'analyse par CLHP analytique et spectrométrie de masse MALDI-TOF avant et après la purification de ce peptide. Il est donc possible de confirmer que le peptide obtenu correspond bien à la BigET-1 de par sa masse et son profil de purification.

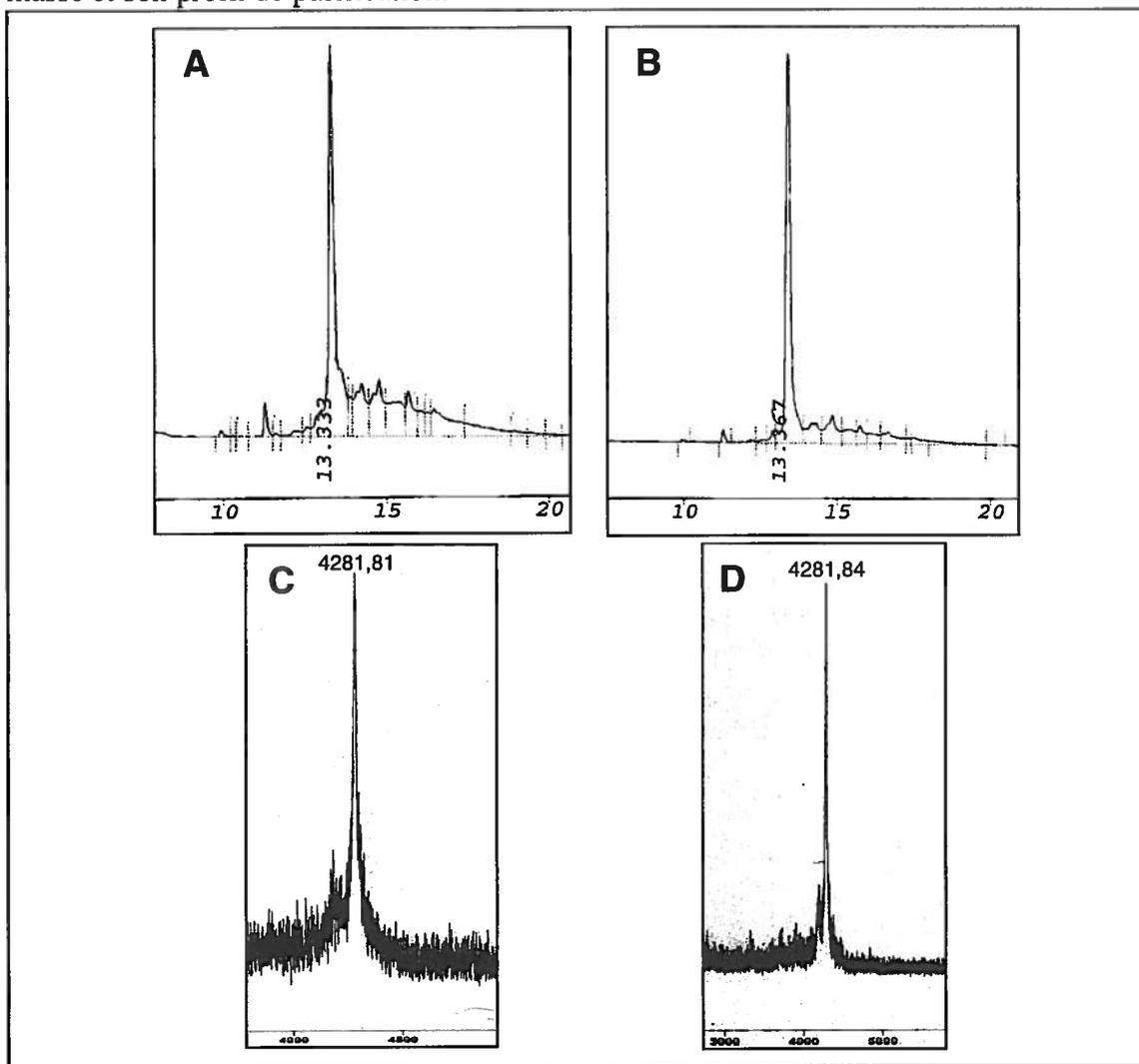


Figure 28 Profils CLHP analytiques (A et B) et spectres de masse (C et D) de la BigET-1 humaine (1-38) utilisée pour la caractérisation enzymatique
A et C avant purification ; B et D après purification
Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm
Gradient : linéaire, 20-60% ACN/H₂O 0,06% TFA en 30 min pour le profil A et B
Débit : 1,5mL/min. ; Détection : 230nm

4.1 Dosage de l'activité enzymatique par ELISA

La courbe standard illustrée à la figure 29 a servi au calcul de la quantité d'ET-1 produite dans les échantillons d'essai enzymatique avec la fraction soluble de hECE-1sol. La quantité en ET-1 produite dans le milieu réactionnel a servi au calcul de l'activité enzymatique.

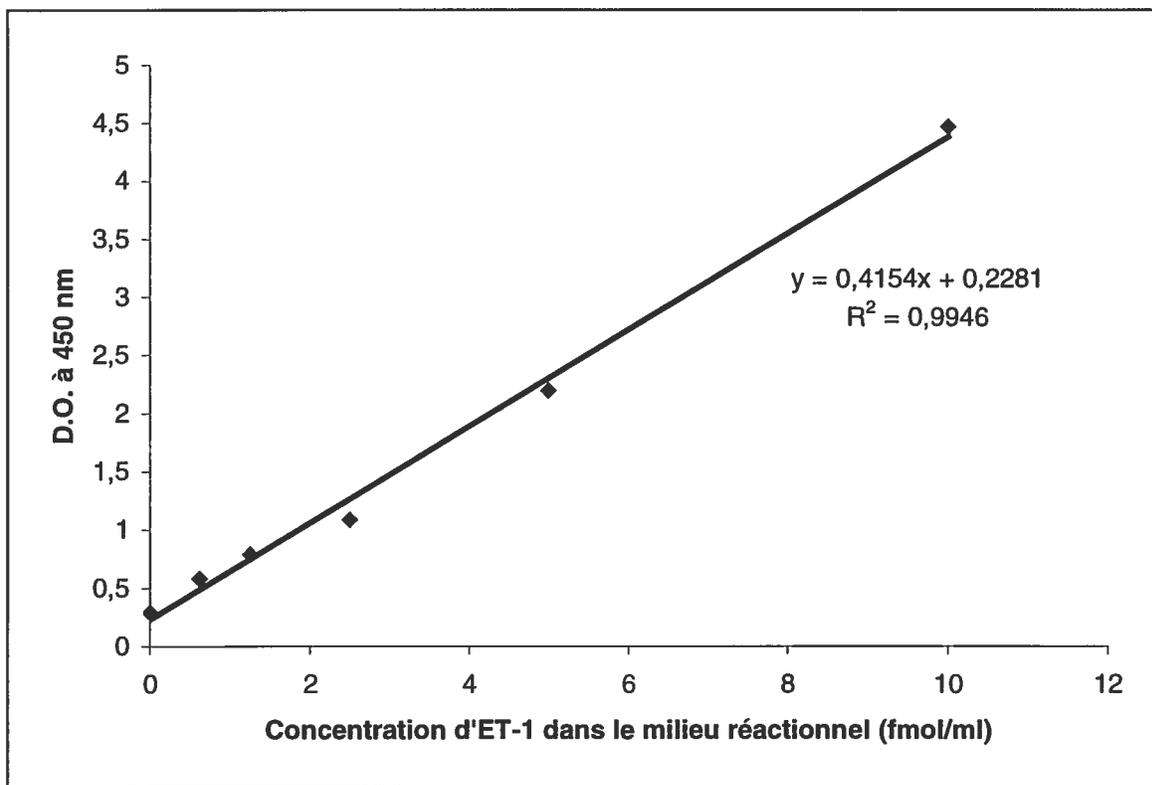


Figure 29 Courbe standard de la concentration en ET-1 déterminée avec un test ELISA utilisant la trousse diagnostique de BioMedica

Cette courbe a servi pour le calcul de l'activité enzymatique des différents tests de caractérisation de hECE-1sol.

4.1.1 Détermination d'un temps d'incubation optimal pour un signal convenable lors des tests d'activités enzymatiques avec hECE-1sol

Pour permettre de caractériser l'enzyme, la réponse de cette dernière en fonction du facteur temps d'incubation a été mesurée. Pour ce faire, l'incubation pour une période de 1h, 2h et 4h semble révéler l'importance d'un temps d'incubation de 4 heures pour l'obtention d'un meilleur signal au test de détection de l'activité enzymatique. Ce phénomène est illustré à la figure 30 pour la fraction F1. A chacun de ces échantillons de milieu réactionnel a été ajouté 1 μ L d'une dilution 1/10) de la fraction F1, soit environ 30 ng de protéines. Cette expérience a été réalisée à trois reprises et les résultats pour 1h, 2h et 4h sont significativement différents et ce, pour un seuil de tolérance $\alpha = 0,05$.

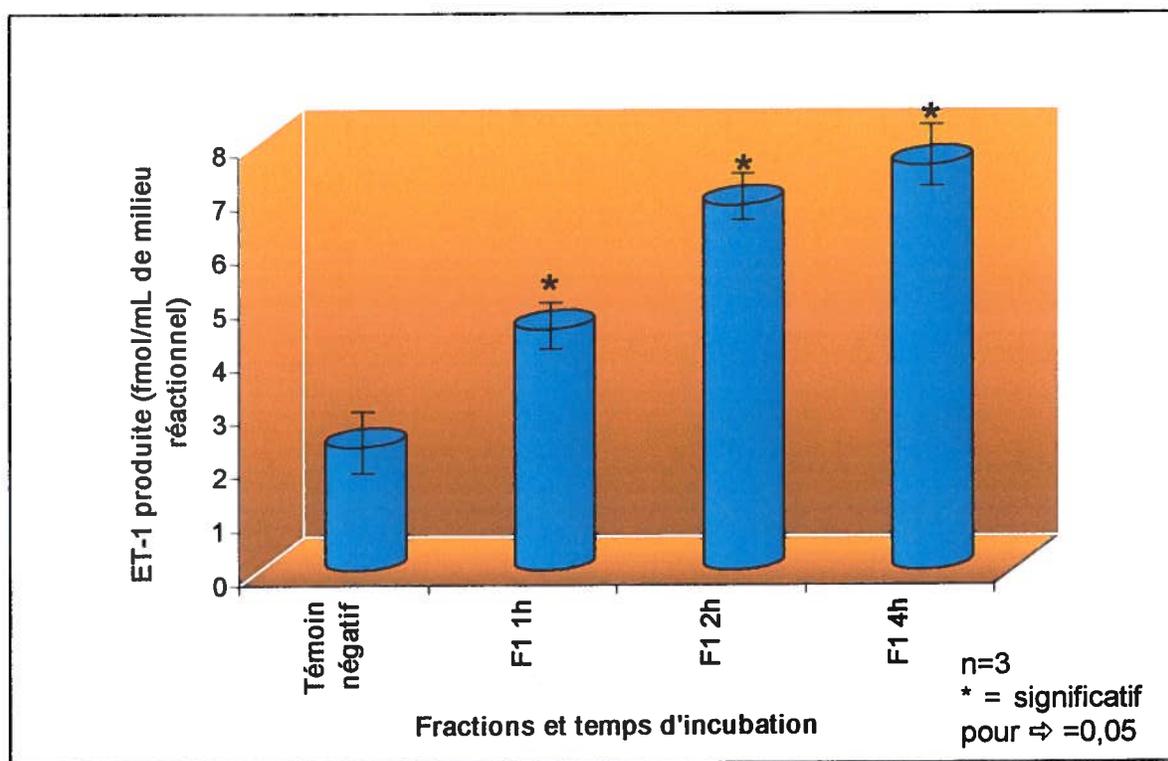


Figure 30 Graphique de la production d'ET-1 en fonction du temps d'incubation de BigET-1 avec hECE-1sol (F1)

Le témoin négatif correspond à 1 μ L de milieu de culture concentré (40X) de cellules non transfectées ajouté au milieu réactionnel. Pour les autres échantillons, l'ajout de 1 μ L de milieu de culture concentré (40X) (F1) en provenance de cellules transfectées a été préconisé.

4.1.2 Activité spécifique de l'enzyme hECE-1sol en fonction des différentes étapes de purification

Le tableau VIII illustre l'activité enzymatique et spécifique de hECE-1sol lors des différentes étapes de purification. Plus les étapes de purification progressent, une augmentation de l'activité spécifique est observée. L'activité enzymatique (2^e colonne) est celle obtenue pour les concentrations optimales déterminées lors de la cinétique enzymatique (section 4.1.3) et c'est à partir de cette valeur que le calcul de l'activité enzymatique spécifique a été effectué.

Tableau VIII Tableau de l'activité enzymatique spécifique pour chacune des fractions de hECE-1sol au cours de la purification

<i>Fraction</i>	<i>Activité enzymatique</i> fmol d'ET-1 produite/mL de milieu réactionnel/h	<i>Activité spécifique</i> Unités /mg de protéines Unités = fmol d'ET-1/mL/h
F1	8,5	3,6
F2	25,7	14,3
F3	10,5	87,5

4.1.3 Cinétique enzymatique (Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk)

La concentration optimale pour obtenir une saturation à un taux raisonnable de substrat a été déterminée à 5 µg/mL pour la F1, 4 µg/mL pour la F2 et 0,3 µg/mL pour la F3. Ces concentrations ont donc été utilisées pour effectuer la cinétique enzymatique en fonction d'une variation de la concentration en substrat. Les différents essais pour cette partie n'ont pas conduit à la saturation du système enzymatique.

Une variation de l'échelle de la quantité de substrat (BigET-1) dans le milieu réactionnel (de 1 à 10 pM, de 100 à 1000 pM, de 1000 pM à 100 000pM), n'a pas permis d'amener

une saturation adéquate pour la détermination de la constante d'affinité de l'enzyme, soit le K_m et sa vitesse maximale, V_{max} . La figure 31 illustre un essai de cinétique enzymatique avec la fraction semi-purifiée F3 pour des concentrations de substrat variant de 0 à 1000 pM. Les constantes K_m et V_{max} ne peuvent être déterminées et ce, même si un début de saturation est constaté (Figure 31). Ce dernier n'est pas observé lors de l'augmentation des concentrations en BigET-1 (résultats non montrés).

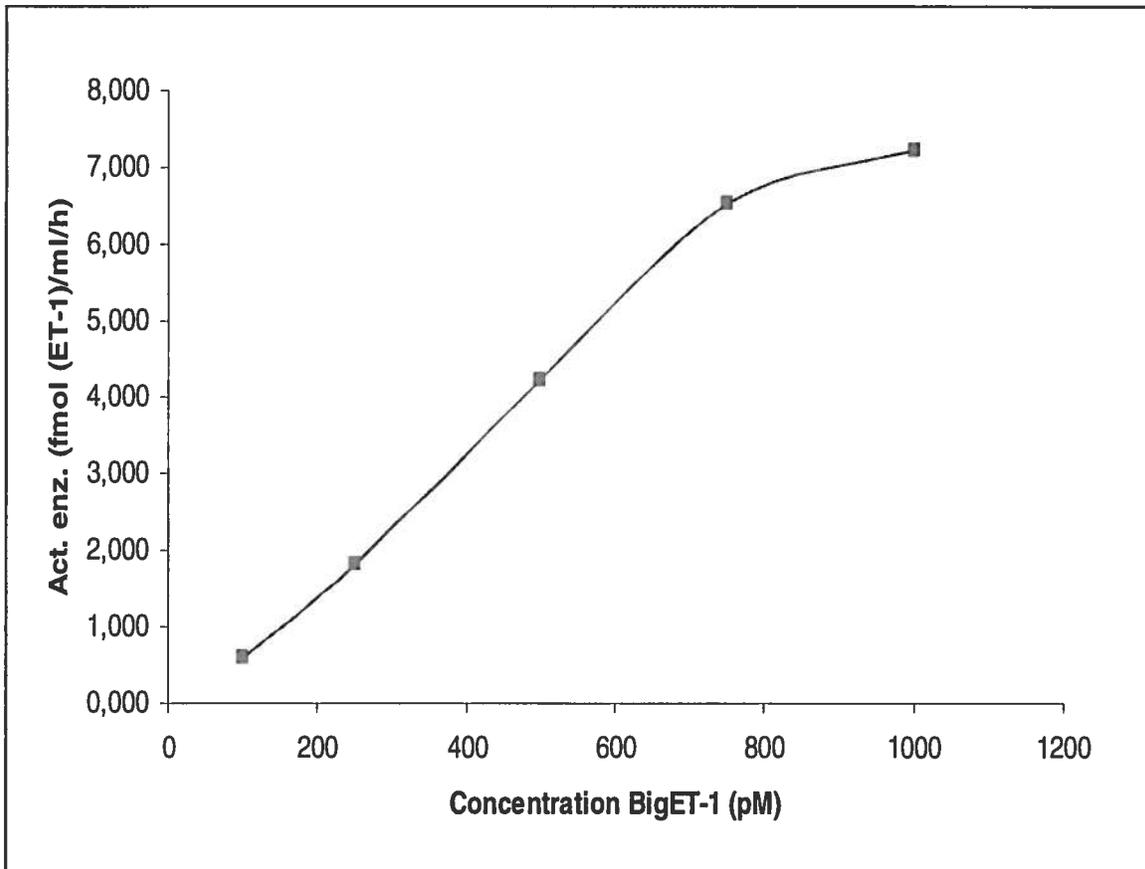


Figure 31 Activité enzymatique de hECE-1sol (Fraction F3) en fonction de la concentration en substrat (BigET-1)

4.1.4 Inhibition de hECE-1sol par différents inhibiteurs non peptidiques

Le choix d'inhibiteurs non peptidiques de hECE-1a a permis de mieux cibler l'origine de l'activité enzymatique à partir de la fraction brute (F1). Pour ce faire, le phosphoramidon a été mis en présence de l'enzyme ainsi que de son substrat (BigET-1 250pM) pour des concentrations variant de 10 à 150 μM . La préparation enzymatique a été traitée avec le CGS 26303 (mêmes concentrations) de la même façon qu'avec le phosphoramidon. L'analyse des figures 32 et 33 met en relief un effet d'inhibition croissant de l'activité catalytique de hECE-1sol avec l'augmentation de la concentration en inhibiteurs. En effet, une diminution d'activité de 95% est observée pour ces deux inhibiteurs. De plus, une inhibition plus marquée est observée dans le cas de l'inhibiteur spécifique à l'ECE.

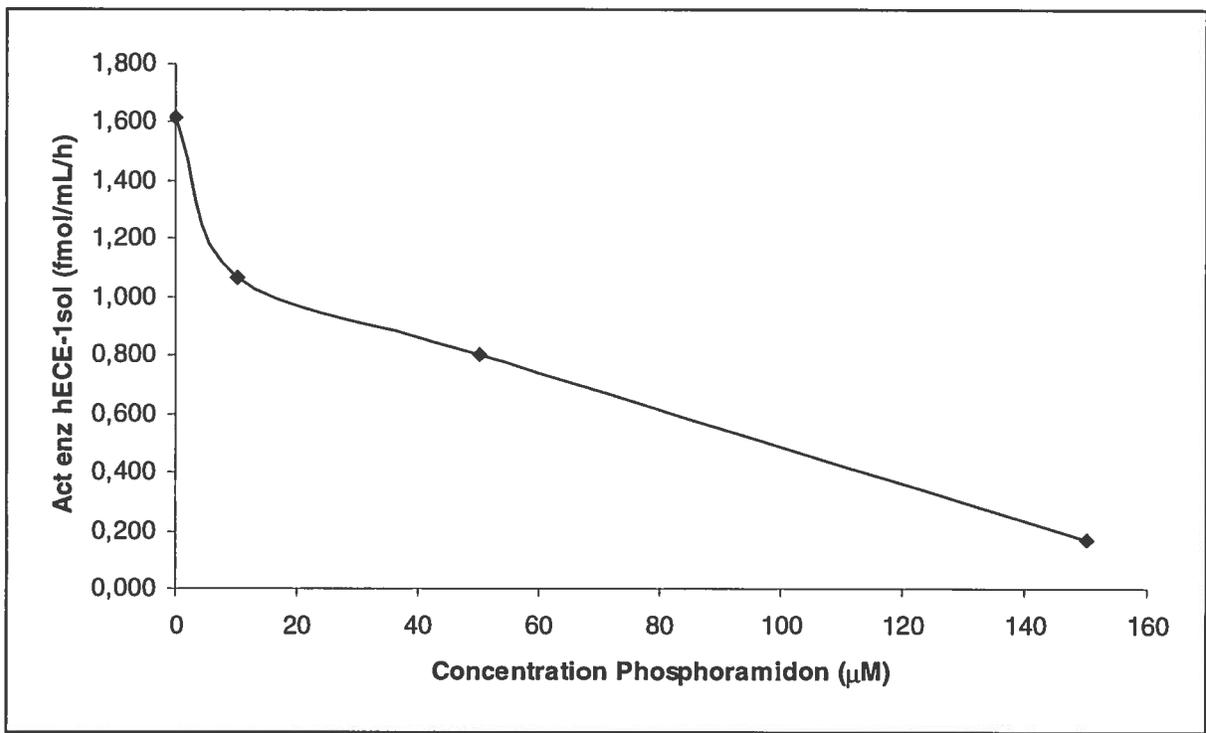


Figure 32 Courbe illustrant l'inhibition de l'activité enzymatique de hECE-1sol en fonction de la concentration en phosphoramidon

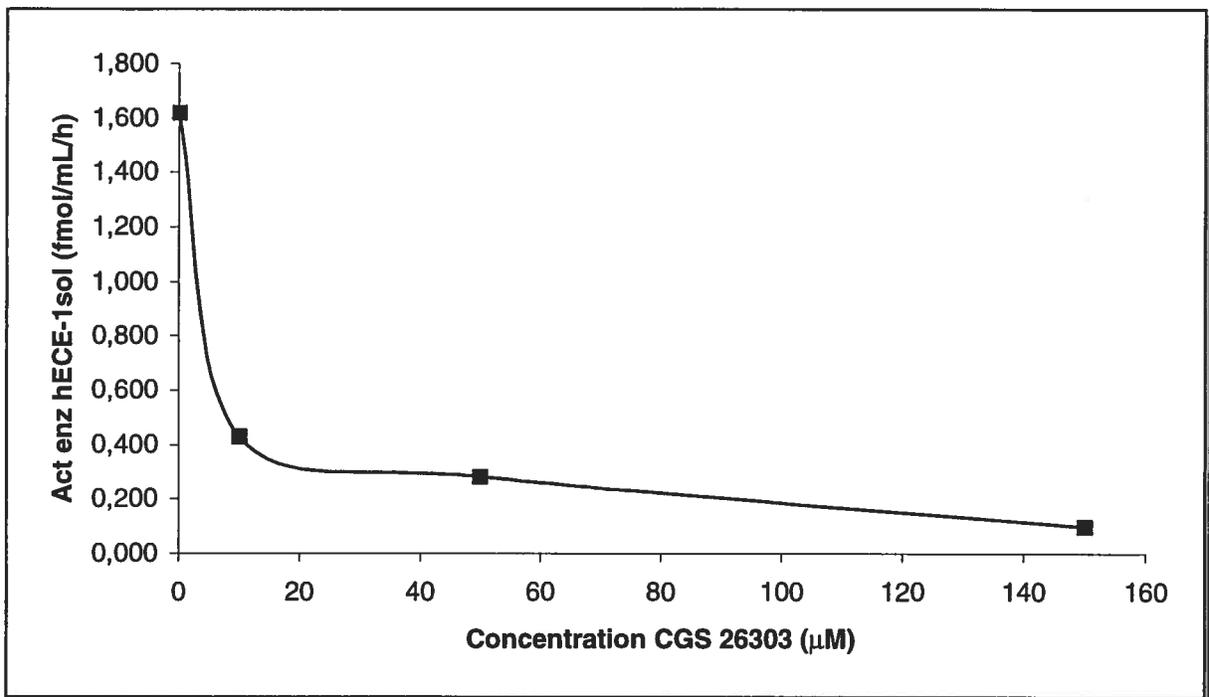


Figure 33 Courbe illustrant l'inhibition de l'activité enzymatique de hECE-1sol en fonction de la concentration en CGS 26303

4.2 Test d'inhibition avec les analogues de la BigET-1

Dans le cadre de ce projet, quelques analogues synthétisés par notre équipe ont fait l'objet d'analyse d'inhibition dans le but de vérifier leur potentiel d'inhibition de la réaction enzymatique entre la BigET-1 et hECE-1sol et d'évaluer la séquence minimale reconnue par la forme soluble de hECE-1. Les résultats obtenus pour trois de ces analogues (n=2) sont illustrés à la figure 34. Aucune inhibition n'a pu être observée avec la fraction non purifiée de hECE-1sol. Par contre, une légère augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme est constatée en présence de ces analogues.

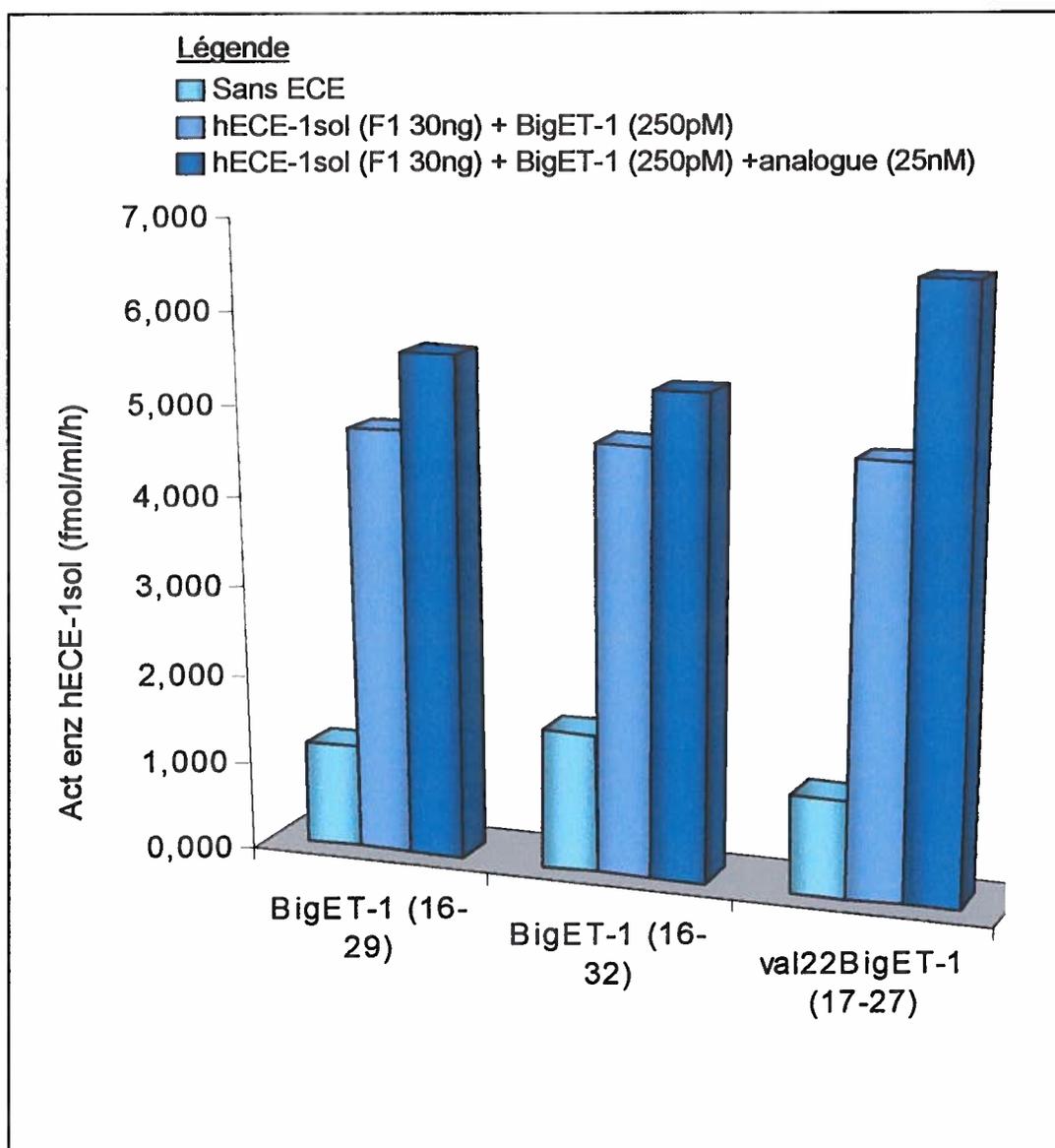


Figure 34 Activité enzymatique de hECE-1sol en fonction d'une inhibition par trois analogues de son substrat, la BigET-1

DISCUSSION

Section 1 Développement de la lignée cellulaire

L'endothéline représente l'un des plus puissants vasoconstricteurs connus jusqu'à maintenant. Son implication dans diverses pathologies vasculaires font de cette molécule une cible thérapeutique intéressante. De ce fait, une meilleure compréhension de sa biosynthèse via l'enzyme de conversion de l'endothéline permettra alors de produire des molécules inhibitrices à caractère thérapeutique dirigées vers l'ECE. Pour faciliter l'étude de cette enzyme, il demeure important de pouvoir l'isoler et la purifier. Or, cette étape ne permet pas l'obtention de quantité appréciable de cette dernière. Le développement d'une lignée cellulaire capable d'une surexpression de cette protéine pourrait alors résoudre le problème quantitatif lié à la production de l'ECE. Donc, à partir d'une quantité suffisante de l'ECE, une meilleure compréhension de la cinétique de transformation de l'ET via l'ECE permettra le développement d'outils à potentiels thérapeutiques nécessaires pour le contrôle des pathologies associées au système ET.

Une étude sur le fragment minimal de la BigET a été effectuée dans le laboratoire à partir d'une préparation pulmonaire bovine semi-purifiée d'ECE. Afin de vérifier et de poursuivre ces travaux, une plus grande quantité d'enzyme est nécessaire et permettrait une caractérisation plus rigoureuse de cette dernière. L'expression de cette protéine par des techniques de biologie moléculaire a donc été envisagée. L'expression par clonage et transfection d'ADN étranger dans un système eucaryote a ainsi mené à la production d'une forme soluble de hECE-1a.

Pour réaliser cette étude, nous avons transfecté un gène codant pour une forme soluble de hECE-1sol dans trois lignées cellulaires CHO, HEK 293 et COS-7. Ce gène nous a été fourni par le Dr Yanagisawa (Texas). Le gène était originalement cloné sur le plasmide pME18ShECE-1sol (Ahn *et al.* 1998). Des essais de transfection avec le plasmide ont révélés que les cellules COS-7 représentaient la lignée cellulaire la mieux adaptée pour l'expression de hECE-1sol. En effet, les cellules COS-7 ont permis un rendement de transfection appréciable. De plus, l'utilisation de ces cellules avec le

plasmide pME18ShECE-1sol est justifiée par la présence d'une région promotrice de haute efficacité composé de deux parties soit le promoteur du virus SV40 avec sa région amplificatrice et l'élément R/U5 du LTR du HTLV-1 (human T lymphocyte viruses) (Kappes *et al.* 1993). A la suite de ce promoteur, une séquence génétique correspondant à l'origine de répllication du virus SV40 est retrouvée. Or, en présence de l'antigène T, ce plasmide peut se répliquer en plusieurs copies à l'intérieur d'une même cellule. Les cellules COS-7 possèdent dans leur génome le gène responsable de la production de l'antigène T. Ceci permet alors la répllication du plasmide en plusieurs copies et une expression accrue des gènes qu'il porte. De plus, le gène avait été manipulé par Ahn *et al.* (1998) pour modifier la structure de l'enzyme de façon qu'il soit soluble plutôt que transmembranaire. Ainsi, la portion d'ancrage à la membrane et la portion transmembranaire de l'enzyme situées en N-terminale ont été tronquées et remplacées par le peptide signal de la phosphatase alcaline. L'enzyme a conservé son activité catalytique en C-terminale ainsi que son domaine de liaison au zinc mais peut être sécrétée à l'extérieur des cellules productrices (Ahn *et al.* 1998).

Dans un premier temps, nous avons tenté d'exprimer le gène codant pour hECE-1sol au moyen de la technique de transfection transitoire faisant appel à la précipitation de l'ADN par le phosphate de calcium (CaHPO_4). Les types cellulaires CHO et HEK 293 ont été utilisés dans le cadre de la transfection transitoire mais n'ont pas démontré de rendement appréciable. En effet, l'enzyme n'a pu être détectée dans aucun des surnageants de culture de ces types cellulaires transfectés. Les rendements de transfection optimisés avec le p β Gal n'ont pas permis de dépasser 10% de cellules transfectées, ce qui semble donc insuffisant pour la détection de l'enzyme dans le milieu de culture. De plus, l'utilisation de ce type de transfection permettait d'induire l'appel de lysosomes à l'intérieur de la cellule engendrant par le fait même une dégradation par les nucléases contenues dans ces organelles. En effet, lors de la phagocytose de l'ADN par la cellule, un mécanisme de digestion est engendré via l'activation des lysosomes, diminuant par le fait même le rendement de la transfection (Lodish *et al.* 1997). En ce qui concerne les cellules COS-7, ces dernières ont permis un rendement trop faible de production de hECE-1sol pouvant être expliqué par les raisons précédentes. À cause de ces résultats, nous avons plutôt opté pour l'expression au moyen d'une transfection stable.

Étant donné l'absence de marqueur de sélection à l'intérieur du plasmide de départ, une construction a dû être effectuée afin de permettre l'établissement d'une lignée cellulaire exprimant l'enzyme. Seulement les cellules COS-7 et HEK 293 ont été retenues puisqu'elles donnaient la meilleure réponse à la sélection avec la néomycine, un antibiotique pour les eucaryotes. Pour ce faire, l'ADNc de hECE-1sol a été cloné dans un nouveau vecteur, le pCIneo qui porte le gène de résistance à la néomycine (NeoR), qui peut servir de marqueur de sélection. Il était important de s'assurer que la séquence de l'ADNc cloné dans ce nouveau plasmide reproduisait exactement celle de hECE-1sol. Seulement un clone bactérien après transformation et amplification a démontré une séquence présentant une homologie de 99% avec celle du gène de hECE-1sol (Ahn *et al.* 1998). Les amorces utilisées pour le séquençage ont été issues de l'analyse de l'insert et de leur synthèse par le Centre Sheldon de l'Université McGill étant donné que l'utilisation des amorces à l'intérieur du plasmide pCIneo (pT7 et pT3) n'a pas donné de résultats concluants, c'est-à-dire que le séquençage a été trop partiel (seulement 15% du gène séquencé) pour conclure sur l'homologie avec la séquence attendue de hECE-1sol. Les amorces pT7 et pT3 étant situées à chaque extrémité du gène de hECE-1sol et étant donné que la séquence de l'ADNc est longue, les erreurs au niveau du séquençage sont plus fréquentes donc le pourcentage d'homologie et la longueur de la séquence obtenue se trouve diminué. D'autre part, les modifications génétiques observées (1%) engendrées probablement par une mutation de la polymérase lors du processus de réplication au niveau du vecteur n'ont pas engendré de modifications au point de vue de la séquence en acides aminés, raison pour laquelle ce plasmide a pu être utilisé pour l'expression stable de hECE-1sol. Donc, dans le cadre d'une transfection stable utilisant cette nouvelle construction et la lipofectAMINE 2000 comme réactif de transfection, les chances ont alors été meilleures pour exprimer hECE-1sol. La présence sur le plasmide d'expression d'un gène de résistance à la néomycine a permis d'enrichir la population de cellules transfectées qui portaient le plasmide et d'augmenter ainsi le rendement d'expression. De plus, la lipofectAMINE 2000 a permis un meilleur rendement de transfection (de 3 à 10 fois supérieur que lors de l'utilisation du CaHPO_4) du à la pénétration de l'ADN étranger à l'intérieur de la cellule par fusion des vésicules lipidiques formées par le réactif avec la

membrane plasmique de la cellule. Ceci évite le signal de digestion observé lors de la transfection par précipitation au CaHPO_4 .

D'autre part, dans le but de s'assurer que la production de l'enzyme soit maximale, l'utilisation du plasmide pAdVantage a été requise. Effectivement, comme mentionné précédemment, ce plasmide joue un rôle au niveau de la traduction de l'ARNm en protéine en s'assurant qu'aucun mécanisme de défense (possiblement induit dans les cas de transfection) ne soit activé par la cellule et ne vienne empêcher la traduction de l'ARNm de hECE-1sol (Farrell *et al.* 1977). Effectivement, une accumulation importante d'ARNm étranger au niveau de la cellule peut induire la phosphorylation du facteur de traduction eIF-2 le rendant non fonctionnel et engendrant l'arrêt de traduction de l'ARNm (Appendice C). Cette méthode de défense cellulaire permet à la cellule de se défendre contre une infection virale et de ce fait, la protéine étrangère n'est donc pas produite. L'utilisation en co-transfection du pAdVantage avec la construction pCIneo hECE-1sol a permis une meilleure expression de l'enzyme au niveau du surnageant des cellules en culture. C'est au moyen de cette co-transfection que hECE-1sol a pu être identifiée dans le surnageant de cultures des cellules COS-7.

Section 2 Méthode de quantification et de détection de hECE-1sol

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford a été nécessaire pour avoir une approche quantitative de la production de l'enzyme. Les différents résultats obtenus sont pertinents à l'effet que plus les étapes de purification progressent, plus la quantité de protéine diminue, ceci étant dû à l'élimination de protéines autres que hECE-1sol. De plus, lors de l'électrophorèse en conditions dénaturantes, la quantité de protéines déposée dans chacun des puits a été la même et ce, grâce au dosage protéique des différentes fractions.

La technique de détection de l'enzyme par immunobuvardage de type Western à l'intérieur du surnageant de culture a nécessité un anticorps dirigé contre cette dernière. Après l'étude du potentiel immunogénique d'un fragment de hECE-1sol au moyen de la méthode de Kyte-Doolittle, le segment correspondant aux acides aminés 735 à 752 a été

identifié comme prometteur. En effet, selon cette étude d'hydrophilicité vs hydrophobicité, les segments avec un potentiel hydrophiles sont des fragments retrouvés, généralement, en surface de la protéine donc facilement accessible par les anticorps. Ceci permet alors aux anticorps de reconnaître facilement cette séquence et donc d'avoir une meilleure spécificité pour l'antigène. La synthèse sur support solide de ce fragment peptidique a été effectuée au moyen de la chimie Fmoc et a généré le fragment avec la masse moléculaire attendue (1918,21Da). L'avantage de l'utilisation de la chimie Fmoc réside dans le fait que ce mode de synthèse, contrairement à celui utilisant la chimie Boc, permet d'éviter de soumettre la chaîne peptidique à des traitements répétitifs à l'acide trifluoroacétique, une condition favorisant des réactions secondaires catalysées par le milieu acide. Toutefois, d'autres réactions secondaires peuvent être observées avec cette chimie, mais lors de la synthèse du fragment hECE-1sol (735-752), aucune réaction secondaire n'a été observée comme démontrée par la CLHP analytique. Les étapes de purification subséquentes ont été nécessaires pour produire l'anticorps polyclonal, anti-hECE-1sol. Une pureté de 91% a été observée après analyse par CLHP analytique, ce qui a été amplement suffisant pour la production de l'anticorps par le service de la compagnie ZYMED. Après réception du sérum des deux lapins immunisés avec le fragment antigénique, une purification des IgG s'est avérée nécessaire étant donné la présence de plusieurs autres protéines pouvant interagir dans le cadre de l'immunobuvardage. Pour ce faire, une chromatographie d'affinité au moyen d'une résine sépharose-protéine G a permis d'isoler les immunoglobulines de type IgG de ce sérum. Lors du lavage de la colonne, plusieurs protéines sériques ont été isolées et l'élution a permis de recueillir l'ensemble des IgG contenu dans le sérum de lapin. Ces fractions d'élution purifiées ont constitué le pool d'anticorps polyclonaux utilisé pour l'immunobuvardage de type Western et la purification par chromatographie d'affinité de hECE-1sol.

Seules les cellules COS-7 ont montré une réponse positive pour la production de hECE-1sol au niveau de leur milieu de culture. Cependant, pour assurer la détection de l'enzyme au niveau du surnageant de culture, il a été nécessaire de produire 2 litres de milieu de culture. Par la suite, la présence d'une protéine possédant un poids moléculaire aux environs de 120 kDa lors de l'immunobuvardage de type Western des surnageants de

milieux de culture non purifiées a permis de présumer la présence de hECE-1sol. Par conséquent, la production de l'enzyme a été assurée par ces cellules. Pour permettre de valider la présence de l'enzyme, un témoin positif est utilisé. Nous avons par conséquent utilisé des cellules endothéliales de l'aorte de porc comme source d'un témoin positif pour confirmer la présence de l'enzyme dans les milieux de culture des cellules transfectées. Ces cellules de l'endothélium sont une source riche en ECE (Yanagisawa *et al.* 1988). Une protéine de poids moléculaire d'environ 120 kDa a également été identifiée pour ce témoin. Ses caractéristiques suggèrent fortement que cette protéine est l'ECE. De plus, même si la présence de protéines de faible poids moléculaire dans ces mêmes puits a aussi été constatée, nous croyons que ces contaminants mineurs sont vraisemblablement des fragments de l'ECE étant donné que la préparation du témoin positif ne s'est pas effectuée en présence d'EDTA, un inhibiteur connu de certaines protéases (Corder *et al.* 1995). L'utilisation d'un témoin négatif a aussi servi à valider la nature exacte de l'enzyme. Pour ce faire, nous avons utilisé le milieu de culture des cellules COS-7 n'ayant pas subi la transfection. L'absence de protéines dans les environs de 120 kDa suggère la réussite de l'expression du gène étranger dans le cas des cellules transfectées.

Section 3 Purification de hECE-1sol

3.1 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie sur Concanavale A (ConA)

Sa capacité de liaison aux glycoprotéines fait de la matrice sépharose-ConA un outil de choix pour la purification de hECE-1sol. En effet, étant une protéine fortement glycosylée, l'utilisation de la ConA aurait dû permettre de l'isoler et de la purifier partiellement. Toutefois, des difficultés ont été rencontrées lors de l'utilisation de cette matrice de purification. Tout d'abord, dans le but de maximiser la fixation de hECE-1sol à la matrice de la colonne, le milieu de culture, préalablement dilué avec le tampon de liaison, a été injecté sur la colonne en circuit fermé. De ce fait, le milieu de culture a traversé la colonne plusieurs fois pendant le cycle de nuit, permettant ainsi une meilleure fixation de l'enzyme. Lors de l'élution, une protéine majoritaire a été isolée mais celle-ci ne correspondait pas à hECE-1sol. Le poids moléculaire de cette dernière a été évalué à

60 kDa, ce qui correspondait probablement à l'albumine sérique bovine (BSA). Malgré de nombreuses tentatives de purification impliquant une augmentation considérable de la concentration en sucre du tampon d'éluion et le changement du type de sucre (α -D-méthylglucopyranoside et α -D-méthylmannopyranoside), il n'a pas été possible d'obtenir des fractions contenant hECE-1sol. Un faible rendement d'éluion causé par une très forte glycosylation de la protéine pourrait expliquer la faible efficacité de cette méthode de purification. Puisque cette technique a déjà servi à purifier l'enzyme dans plusieurs études (Ahn *et al.* 1998 ; Kulathila *et al.* 2002), il est possible que le taux de glycosylation qui dépend du système d'expression utilisé soit plus élevé pour les cellules COS-7 que pour les cellules utilisées par les autres équipes (cellules d'insectes SF9 et CHO) (Ahn *et al.* 1998). Ces résultats insatisfaisants nous ont alors orientés vers l'usage d'une chromatographie d'affinité faisant appel à un anticorps spécifique dirigé contre hECE-1sol.

3.2 Essai de purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant l'anticorps (anti-hECE-1sol)

Le couplage des immunoglobulines à la matrice AffiGel Hydrazide a permis d'utiliser cette matrice comme technique de purification de hECE-1sol. L'utilisation d'un anticorps purifié a été essentiel pour assurer le succès du couplage anticorps-résine. Donc, à partir de la fraction d'anticorps purifiée, la réaction au periodate de sodium (NaIO_4) a causé l'oxydation de la portion glucidique de la région Fc des immunoglobulines. Les fonctions aldéhydes résultantes ont pu alors former des bases de Schiff stables avec les amines libres présentes sur l'AffiGel. La matrice était alors fonctionnelle pour l'étape de purification. Le rendement de fixation de l'anticorps a été de 73%, signifiant que sur les 5 mg d'anticorps disponibles pour le couplage, environ 3,5 mg se sont liés à la résine. Ceci est relativement appréciable pour un tel protocole selon les normes du fabricant de la trousse de la compagnie BioRad.

La chromatographie d'affinité sur résine couplée à un anticorps, a permis d'obtenir une petite quantité de protéines lorsque la colonne était éluée avec le tampon glycine-HCl 0,2M pH 2,5. Plusieurs autres tampons d'éluion faisant appel soit à des sels chaotropiques (urée 6M) ou à un acide organique (acide acétique 0,1M) ont aussi été

explorés. Toutefois, seul le tampon glycine-HCl a permis d'éluer la protéine. Les résultats obtenus ont permis la détection par Western blot de hECE-1sol à l'intérieur des fractions d'élution. Cependant, la quantité d'enzyme purifiée obtenue par cette méthode était trop faible pour permettre sa caractérisation. De plus, une certaine quantité de hECE-1sol (rendement de purification d'environ 15%) a été observée au niveau des fractions de lavage, laissant soupçonner un accrochage limité de l'enzyme sur la résine. Ceci peut être expliqué par le fait que l'anticorps utilisé est d'origine polyclonale et qu'il est dirigé vers un épitope linéaire, soit le fragment composé des acides aminés 735 à 752. Conséquemment, la reconnaissance de l'enzyme par l'anticorps est possiblement moins efficace et cette liaison est plutôt instable, car l'enzyme est alors sous sa conformation native et non dénaturée.

D'autre part, dans chacune des fractions recueillies, autant au niveau du lavage que de l'élution, une contamination en anticorps a été observée. En effet, la chaîne lourde (50 kDa) des immunoglobulines a été révélée par immunobuvardage de type Western. Effectivement, la migration de 0,5 µg de la fraction d'anticorps polyclonal a été soumise au processus d'électrophorèse ainsi qu'aux étapes d'immunobuvardage révélant ainsi la même bande aux environs de 50 kDa correspondant à la chaîne lourde des IgG dénaturés (résultats non montrés). À chaque utilisation, la résine perdait l'anticorps fixé diminuant ainsi son efficacité. Pour éviter cette perte d'affinité, une nouvelle résine a été utilisée à chaque tentative de purification avec cette colonne. Une optimisation du protocole de liaison aurait pu probablement augmenter le rendement de purification, mais cette colonne demeure toutefois limitée par le fait que l'anticorps était d'origine polyclonale et reconnaissait un épitope linéaire et difficilement un épitope conformationnel.

3.3 Purification de hECE-1sol par chromatographie d'affinité utilisant le cofacteur Zn et au moyen de la résine AffiGel Blue (affinité pour l'albumine)

Cette méthode de purification a permis d'obtenir avec un rendement appréciable, une fraction semi-purifiée à partir du milieu de culture de cellules exprimant hECE-1sol. En effet, il a été possible de mettre à profit la propriété particulière de hECE-1sol, soit sa

capacité de liaison au Zn de par son motif HEXXH, pour la purifier. L'analyse des différents pics de protéines obtenus après l'élution de la colonne de chromatographie a révélé la présence de l'enzyme dans les premières fractions qui ont été combinées et concentrées. Cette fraction étant cependant contaminée avec une importante quantité d'albumine sérique bovine, une purification sur une résine à haute affinité pour l'albumine a été nécessaire. Toutefois, l'immunobuvardage de la fraction traitée avec cette résine a révélé une perte de hECE-1sol lors de cette étape de purification. Il est donc possible qu'une certaine quantité de hECE-1sol ait pu être liée avec l'albumine et ainsi avoir été éliminée lors de l'utilisation de la résine AffiGel Blue. Malgré cette perte de hECE-1sol on a quand même noté une augmentation de l'activité enzymatique spécifique suivant cette étape de purification. puisque L'augmentation de cette activité spécifique après les différentes étapes de purification constitue un phénomène normal puisqu'il se produit un enrichissement en enzyme dans la préparation purifiée.

En réalité, les difficultés encourues pour purifier la protéine, dans le cas des deux premières techniques, sont en grande partie attribuées à la faible de hECE-1sol par les cellules COS-7 transfectées. D'autres méthodes ont été décrites dans la littérature pour permettre l'obtention de grandes quantités d'ECE. Ces méthodes ont fait appel à l'utilisation d'un baculovirus comme vecteur pour l'introduction du gène de hECE-1sol dans le génome de cellules d'insectes. Les rendements d'expression de l'enzyme ont été supérieurs à ceux obtenus dans le cadre de la présente étude, soit d'environ 11mg de hECE-1sol produit par litre de milieu de culture (Kulathila *et al.* 2002). Cette méthode s'était avérée alors très efficace pour la production de l'enzyme, mais, au niveau structural, cette hECE-1sol recombinante ne possédait pas de sites de glycosylation modifiant ainsi sa structure. Toutefois, cette méthode n'affecte probablement pas son activité catalytique puisque la glycosylation de l'enzyme n'est pas essentielle à son activité (Kulathila *et al.* 2002). Cependant, l'infection virale chez l'insecte présente quelques désavantages. Les équipements pour la culture de cellules d'insectes sont très spécialisés et très coûteux. Une autre étude faite avec les cellules CHO a permis à l'équipe de Ahn et collaborateurs en 1998 de produire la forme soluble de l'enzyme. Or, cette étude a fait appel à des techniques de transfection simples, semblables à celles utilisées dans le présent projet de recherche et les multiples étapes de purification ont

amenées peu d'enzyme en bout de ligne. Les rendements d'expression maximums observés dans ces études n'ont pas dépassés l'ordre du μg de protéine purifiée.

Section 4 Caractérisation de hECE-1sol

Malgré les faibles rendement de production, l'activité enzymatique de hECE-1sol a été effectuée en utilisant la fraction brute et la fraction semi-purifiée. L'utilisation du substrat de hECE-1sol, soit la BigET-1 humaine comportant 38 acides aminés, a mis en évidence le potentiel catalytique de l'enzyme pour générer la forme active de la molécule soit l'ET-1 (21 aa). La synthèse du substrat a été accomplie avec la chimie Fmoc. Dans le cas de la préparation du fragment antigénique, les résultats après clivage n'ont pas révélé de réactions secondaires avec cette chimie, puisqu'un seul produit, dont la masse correspond à celle de la BigET-1, soit 4281 Da a été obtenu. Le produit a ensuite été purifié par CLHP et les rendements de purification ont été évalués à 95%. La cyclisation au ferricyanure a permis de former les deux ponts disulfures observés dans la molécule d'origine. De ce fait, le contenu peptidique des fractions purifiées a été utilisé comme substrat pour les réactions enzymatiques nécessaires à la caractérisation de l'enzyme.

L'utilisation d'un test ELISA d'une sensibilité de l'ordre des femtomoles a permis la caractérisation de l'activité enzymatique. Le dosage de l'ET-1 produite après l'incubation du substrat avec hECE-1sol a été réalisé grâce à ce test ELISA de type sandwich développée par la compagnie BioMedica. La courbe standard d'ET-1 a confirmé la précision et la reproductibilité de la trousse ELISA.

Des études antérieures avec la forme soluble de l'ECE-1 ont mis en lumière plusieurs paramètres optimaux pour l'activité enzymatique. En effet, l'équipe de Ahn et collaborateurs (1998) a déterminé un pH optimal de 6,4 et une température optimale de 37°C pour hECE-1sol exprimée dans des cellules CHO transfectées. À la lumière de ces résultats, ces données ont été appliquées à la présente expérimentation pour déterminer d'autres paramètres pertinents à cette étude. Par conséquent, il a été possible de déterminer la concentration enzymatique qui est la plus susceptible de donner une réaction qui suit la cinétique de Michaelis-Menten, c'est-à-dire qui se sature à des

concentrations acceptables de substrat aux environs de 0,3 µg de protéines/mL et ce, pour une fraction de hECE-1sol semi-purifiée. L'utilisation de concentrations croissantes en BigET-1 a conduit à une saturation partielle du système enzymatique ne permettant toutefois pas la détermination des différents paramètres cinétiques de hECE-1sol. De ce fait, la méthode de Michaelis-Menten et l'interprétation par Lineweaver-Burk n'ont pu être appliqués pour déterminer la constante d'affinité (Km) et la Vmax.

L'utilisation d'inhibiteurs non peptidiques, soit le phosphoramidon et le CGS 26303 a permis d'associer l'activité enzymatique observée dans la fraction brute du milieu de cultures de cellules COS-7 transfectées à celle de hECE-1sol. En effet, lors de l'utilisation du CGS 26303, un inhibiteur spécifique à l'ECE, l'activité de cette dernière s'est trouvée inhibée de façon presque totale. Le même phénomène a été observé dans le cas du phosphoramidon, ce qui vient alors confirmer que la molécule responsable du clivage catalytique de la BigET-1 est bel et bien hECE-1sol en provenance des cellules transfectées. Pour permettre de valider ce résultat, l'utilisation à une même concentration de milieu de culture de cellules COS-7 non transfectées a fait l'objet d'analyse pour le clivage de la BigET-1. Les résultats obtenus ne révèlent pas de clivage pour ce témoin négatif. Par conséquent, la production d'ET-1 observée lors de la présence de hECE-1sol est donc associée à cette enzyme.

En ce qui a trait aux résultats concernant les analogues tronqués de la BigET-1, ceux-ci ne permettent pas de conclure quant au fragment minimal du peptide pour une reconnaissance par l'enzyme. Le choix des trois peptides a été basé sur des résultats antérieurs obtenus dans le laboratoire (résultats non publiés) à l'effet que ces derniers démontraient un potentiel d'inhibition pour l'ECE obtenue d'un extrait pulmonaire d'origine bovine. En effet, les fragments BigET-1 (16-32), BigET-1 (16-29) et [val²²]BigET-1 (17-27) ont démontré une activité inhibitrice pour la forme bovine de ECE-1. Toutefois, ces mêmes fragments n'ont pas inhibés les préparations de hECE-1sol de la présente étude. Une différence au niveau de la spécificité du test ELISA utilisé dans ces deux études peut expliquer cette variation. De plus, l'extrait enzymatique obtenu de la fraction bovine a généré plusieurs questions quant à la possibilité que cette fraction pouvait contenir la NEP et certaines autres endopeptidases pouvant agir comme acteur

principal lors de l'étude du clivage de ces fragments. L'utilisation du HPLC pour l'étude du clivage enzymatique ne permettait pas de discriminer ce paramètre possiblement envisageable. D'autre part, des études antérieures ont suggéré l'importance du fragment C-terminal (soit les acides aminés 19 à 34) ainsi que du site P1-P1' de la BigET-1 pour un permettre un clivage spécifique par l'enzyme (Okada *et al.* 1993). De ce fait, les analogues synthétisés n'ont pas servi de substrat ni d'inhibiteurs de hECE-1sol obtenue par expression stable chez les cellules COS-7. Toutefois, une légère augmentation de la production d'ET-1 était observée dans les essais où les fragments synthétiques étaient présents. Il y aurait peut être un effet de synergie lorsque l'analogue occupe le site P1' pour permettre une meilleure orientation de la BigET-1 au site P1 et favoriser un clivage plus efficace. Ces résultats devront être vérifiés de façon plus approfondie à l'aide de résultats statistiquement significatifs et de d'autres fragments permettant de confirmer cette hypothèse. De nombreux autres analogues ont été synthétisés, mais étant donné l'utilisation d'une préparation enzymatique semi purifiée, ces derniers n'ont pas fait l'objet d'analyse pour le moment.

Les derniers résultats obtenus au cours de notre étude pourrait être comparés à ceux de Okada *et al.* (1993) qui suggèrent que l'ECE-1 possède au moins deux sites de liaison pour la BigET-1. Le premier de ces sites serait responsable de la liaison du phosphoramidon de la même façon que le fragment 18-23 de la BigET-1 alors que le second site s'accommoderait d'un segment peptidique beaucoup plus large allant jusqu'à l'acide aminé en position 34. Les deux sites de liaisons seraient complémentaires à chacun, mais chacun de ceux-ci semblerait suffisant pour permettre une orientation adéquate de la molécule au niveau du site catalytique de l'enzyme.

Par ailleurs, il est important de mentionner que l'ensemble des résultats de la caractérisation de hECE-1sol proviennent d'une fraction semi-purifiée n'étant pas isolé de l'ensemble des protéines de la fraction brute. De ce fait, il demeure normal que ceux-ci ne soient pas totalement représentatifs de ce qui est suggéré dans la littérature pour cette enzyme. C'est la raison pour laquelle les résultats de caractérisation deviendront plus précis et significatifs lors de l'utilisation de la fraction purifiée, les rendant ainsi plus représentatifs de l'activité de l'enzyme hECE-1 sous sa forme soluble.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'endothéline, l'un des plus puissants vasoconstricteurs connus, fait l'objet de plusieurs études étant donné son lien avec certaines pathologies cardiovasculaires. Sa biosynthèse, assurée en partie par l'ECE, peut être une étape critique dans l'apparition de ces pathologies. De ce fait, le présent projet propose le développement d'une lignée cellulaire exprimant une forme soluble de l'ECE-1 humaine permettant une production importante de cette dernière. Cet outil permettra de mieux caractériser cette enzyme et son interaction et sa sélectivité avec son ligand, la BigET-1.

Les résultats de l'expression de la protéine hECE-1sol par la technique de transfection cellulaire dans un système eucaryote ont été positifs lors de l'utilisation de la lignée cellulaire COS-7. Cette expression a été confirmée par un immunobuvardage de type Western faisant appel à un anticorps dirigé contre l'enzyme. Cependant, un faible rendement de production a amené les étapes de purification et de caractérisation de l'enzyme difficilement réalisables. Toutefois, une purification partielle de cette enzyme a été possible grâce à l'utilisation d'une chromatographie d'affinité utilisant le cofacteur Zn et une résine d'affinité pour l'albumine. Il demeure important d'optimiser cette étape pour améliorer la pureté de hECE-1sol.

D'autre part, les résultats de la caractérisation enzymatique ont permis d'associer cette activité catalytique à hECE-1sol et élucider le temps d'incubation optimal et la concentration enzymatique optimale. Toutefois, les différents paramètres cinétiques, K_m et V_{max} n'ont pu être déterminés suite à l'absence de saturation du système enzymatique. L'utilisation d'inhibiteurs non peptidiques (phosphoramidon et, CGS 26303) a permis de relier la production d'ET-1 à hECE-1sol produite chez les cellules COS-7 transfectées. Il pourrait être intéressant d'étudier également d'autres inhibiteurs non peptidiques dérivés du CGS 26303 qui sont également spécifiques à l'ECE. Les résultats partiels quant à l'utilisation des analogues tronqués de la BigET-1 permettent de croire que la présence de ces fragments au site P1' de l'enzyme permettrait l'adoption d'une meilleure orientation de la BigEt-1 qui pourrait alors être sujette à un clivage spécifique. Ainsi, cette préparation enzymatique devra être purifiée davantage afin

d'établir les caractéristiques de son substrat (longueur minimale et résidus-clés) pour un clivage spécifique de ce dernier et avoir une meilleure compréhension des éléments essentiels pour l'élaboration d'inhibiteurs peptidiques de l'enzyme.

APPENDICES

Appendice A

Abréviations des acides aminés

Acide Aminé	Abréviation / trois lettres	Abréviation / 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

Appendice B

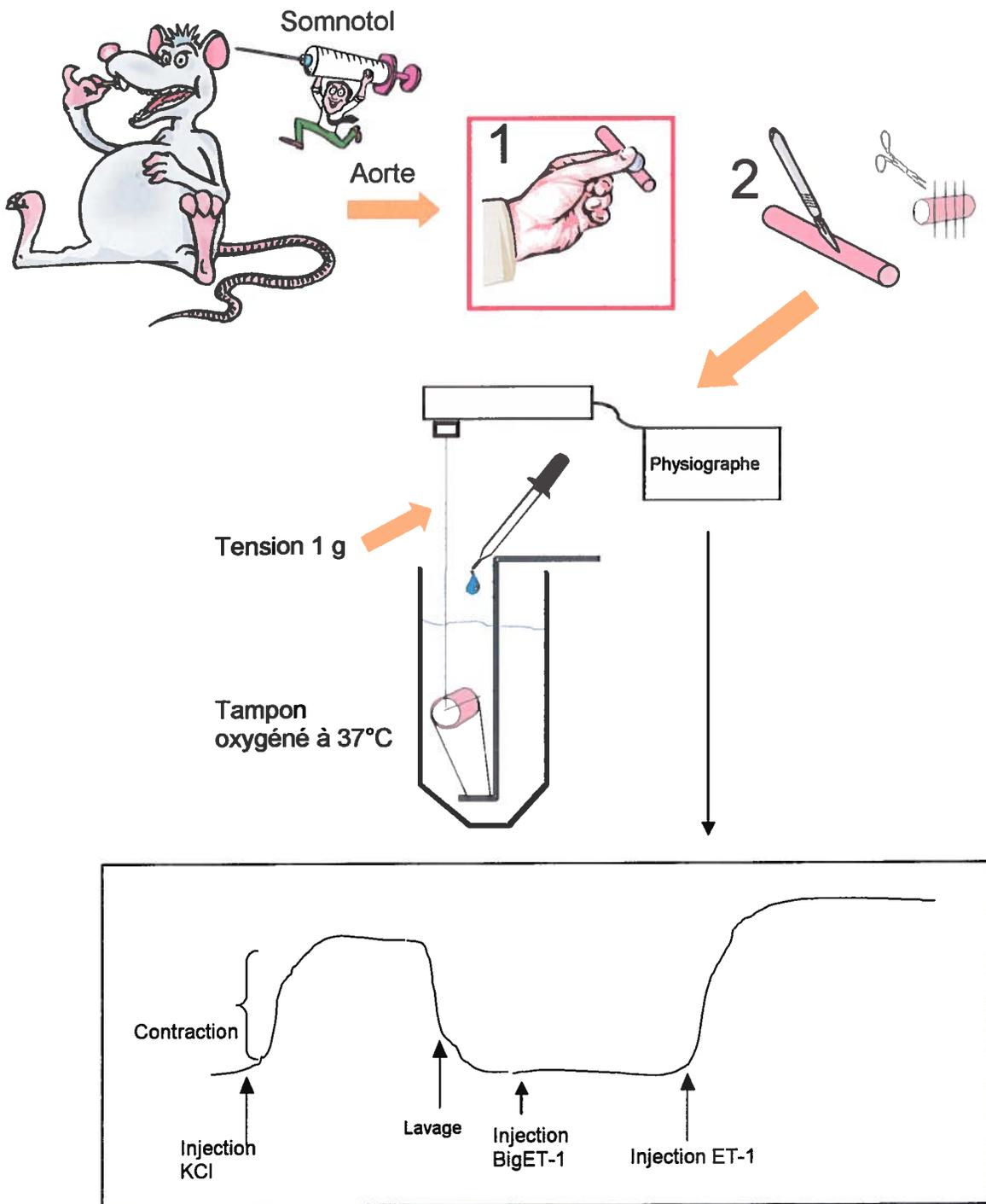
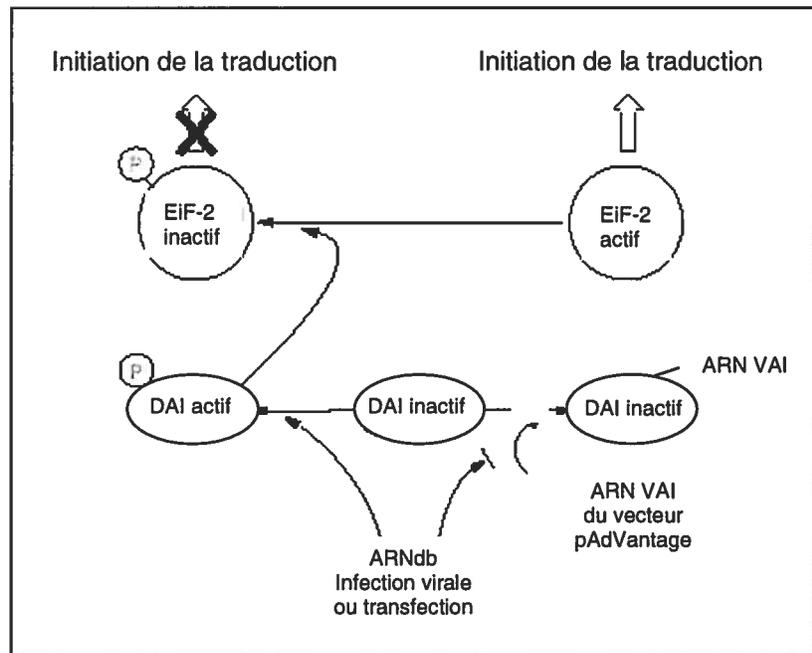
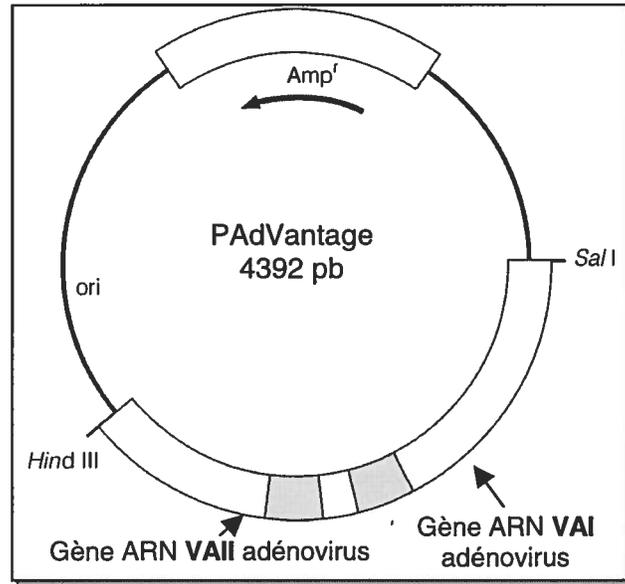


Figure 35 Protocole des bioessais sur l'aorte de rat pour valider la faible réactivité de la BigET-1

Appendice C

Caractéristiques particulières du vecteur pAdVantage et fonctions lors de la transfection



RÉFÉRENCES

AHN, K., K. Beningo, G. Olds, and D. Hupe. 1992. «The Endothelin-Converting Enzyme From Human Umbilical Vein Is a Membrane-Bound Metalloprotease Similar to That From Bovine Aortic Endothelial Cells». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 89, no. 18, p. 8606-10.

AHN, K., S. B. Herman, and D. C. Fahnoe. 1998. «Soluble Human Endothelin-Converting Enzyme-1: Expression, Purification, and Demonstration of Pronounced PH Sensitivity». Arch Biochem Biophys, vol. 359, no. 2, p. 258-68.

ARAI, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo, and S. Nakanishi. 1990. «Cloning and Expression of a cDNA Encoding an Endothelin Receptor». Nature, vol. 348, no. 6303, p. 730-2.

ASAI, Y., N. Nonaka, S. Suzuki, M. Nishio, K. Takahashi, H. Shima, K. Ohmori, T. Ohnuki, and S. Komatsubara. 1999. «TMC-66, a New Endothelin Converting Enzyme Inhibitor Produced by Streptomyces Sp. A5008». J Antibiot (Tokyo), vol. 52, no. 7, p. 607-12.

ASHIZAWA, N., H. Okumura, F. Kobayashi, T. Aotsuka, R. Asakura, K. Arai, N. Ashikawa, and A. Matsuura. 1994. «Inhibitory Activities of Metal Chelators on Endothelin-Converting Enzyme. II. In Vivo Studies». Biol Pharm Bull, vol. 17, no. 2, p. 212-6.

AWANO, S., T. Ansai, H. Mochizuki, W. Yu, K. Tanzawa, A. J. Turner, and T. Takehara. 1999. «Sequencing, Expression and Biochemical Characterization of the Porphyromonas Gingivalis PepO Gene Encoding a Protein Homologous to Human Endothelin-Converting Enzyme». FEBS Lett, vol. 460, no. 1, p. 139-44.

AZARANI, A., G. Boileau, and P. Crine. 1998. «Recombinant Human Endothelin-Converting Enzyme ECE-1b Is Located in an Intracellular Compartment When Expressed in Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells». Biochem J, vol. 333 (Pt 2), p. 439-48.

BACON, C. R., N. R. Cary, and A. P. Davenport. 1996. «Endothelin Peptide and Receptors in Human Atherosclerotic Coronary Artery and Aorta». Circ Res, vol. 79, no. 4, p. 794-801.

BALWIERCZAK, J. L., P. J. Kukkola, P. Savage, and A. Y. Jeng. 1995. «Effects of Metalloprotease Inhibitors on Smooth Muscle Endothelin- Converting Enzyme Activity». Biochem Pharmacol, vol. 49, no. 3, p. 291-6.

BARKER, S., N. Q. Khan, E. G. Wood, and R. Corder. 2001. «Effect of an Antisense Oligodeoxynucleotide to Endothelin-Converting Enzyme-1c (ECE-1c) on ECE-1c mRNA, ECE-1 Protein and Endothelin-1 Synthesis in Bovine Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells». Mol Pharmacol, vol. 59, no. 2, p. 163-9.

BATTISTINI, B., B. Ayach, S. Molez, A. Blouin, and A. Y. Jeng. 2002. «Effects of Benazepril, an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, Combined With CGS 35066, a Selective Endothelin-Converting Enzyme Inhibitor, on Arterial Blood Pressure in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats». Clin Sci (Lond), vol. 103 Suppl 48, p. 363S-6S.

BATTISTINI, B., M. Brown, and J. R. Vane. 1995. «Selective Proteolytic Activation and Degradation of ETs and Big ETs in Parenchymal Strips of the Guinea-Pig Lung». Biochem Biophys Res Commun, vol. 207, no. 2, p. 675-81.

BIHOVSKY, R., B. L. Levinson, R. C. Loewi, P. W. Erhardt, and M. A. Polokoff. 1995. «Hydroxamic Acids As Potent Inhibitors of Endothelin-Converting Enzyme From Human Bronchiolar Smooth Muscle». J Med Chem, vol. 38, no. 12, p. 2119-29.

BRKOVIC, A., A. Hattenberger, E. Kostenis, T. Klabunde, S. Flohr, M. Kurz, S. Bourgault, and A. Fournier. 2003. «Functionnal and Binding Characterizations of Urotensin-II Related Peptides in Human and Rat Urotensin-II Receptor Assay». The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 306, p. 1200-1209.

BUR, D., G. E. Dale, and C. Oefner. 2001. «A Three-Dimensional Model of Endothelin-Converting Enzyme (ECE) Based on the X-Ray Structure of Neutral Endopeptidase 24.11 (NEP)». Protein Eng, vol. 14, no. 5, p. 337-41.

CAILLER, F., J. P. Zappulla, G. Boileau, and P. Crine. 1999. «The N-Terminal Segment of Endothelin-Converting Enzyme (ECE)-1b Contains a Di-Leucine Motif That Can Redirect Neprilysin to an Intracellular Compartment in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells». Biochem J, vol. 341 (Pt 1), p. 119-26.

CARSON, J. A., T. Ansai, S. Awano, W. Yu, T. Takehara, and A. J. Turner. 2002. «Characterization of PgPepO, a Bacterial Homologue of Endothelin- Converting Enzyme-1». Clin Sci (Lond), vol. 103 Suppl 48, p. 90S-3S.

CLAING, A, W. Neugebauer, M. Yano, G.A. Rae, P. D'Orleans-Juste. 1995 « [Phe22]-big endothelin-1[19-37]: a new and potent inhibitor of the endothelin-converting enzyme». J Cardiovasc Pharmacol. vol. 26, Suppl 3, p.72S-4S.

CORDER, R., N. Khan, and V. J. Harrison. 1995. «A Simple Method for Isolating Human Endothelin Converting Enzyme Free From Contamination by Neutral Endopeptidase 24.11». Biochem Biophys Res Commun, vol. 207, no. 1, p. 355-62.

D'ORLEANS-JUSTE, P., A. Claing, D. Regoli, P. Sirois, and G. E. Plante. 1996. «Endothelial and Smooth Muscle Pharmacology of Pre- and Post-Capillary Microcirculation: Correlation With Plasma Extravasation». Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, vol. 54, no. 1, p. 31-7.

DE LOMBAERT, S., L. Blanchard, L. B. Stamford, J. Tan, E. M. Wallace, Y. Satoh, J. Fitt, D. Hoyer, D. Simonsbergen, J. Moliterni, N. Marcopoulos, P. Savage, M. Chou, A. J. Trapani, and A. Y. Jeng. 2000. «Potent and Selective Non-Peptidic Inhibitors of Endothelin-Converting Enzyme-1 With Sustained Duration of Action». J Med Chem,

vol. 43, no. 3, p. 488-504.

DE LOMBAERT, S., R. D. Ghai, A. Y. Jeng, A. J. Trapani, and R. L. Webb. 1994. «Pharmacological Profile of a Non-Peptidic Dual Inhibitor of Neutral Endopeptidase 24.11 and Endothelin-Converting Enzyme». Biochem Biophys Res Commun, vol. 204, no. 1, p. 407-12.

DENAULT, J. B., A. Claing, P. D'Orleans-Juste, T. Sawamura, T. Kido, T. Masaki, and R. Leduc. 1995. «Processing of Proendothelin-1 by Human Furin Convertase». FEBS Lett, vol. 362, no. 3, p. 276-80.

DENG, Y., P. Savage, S. S. Shetty, L. L. Martin, and A. Y. Jeng. 1992. «Identification and Partial Purification of a Thiol Endothelin- Converting Enzyme From Porcine Aortic Endothelial Cells». J Biochem (Tokyo), vol. 111, no. 3, p. 346-51.

DESCHEPPER, C. F., A. D. Houweling, and S. Picard. 1995. «The Membranes of Cultured Rat Brain Astrocytes Contain Endothelin- Converting Enzyme Activity». Eur J Pharmacol, vol. 275, no. 1, p. 61-6.

DOHERTY, A. M. 1992. «Endothelin: a New Challenge». J Med Chem, vol. 35, no. 9, p. 1493-508.

EMOTO, N. and M. Yanagisawa. 1995. «Endothelin-Converting Enzyme-2 Is a Membrane-Bound, Phosphoramidon- Sensitive Metalloprotease With Acidic PH Optimum». J Biol Chem, vol. 270, no. 25, p. 15262-8.

FERRO, C. J. and D. J. Webb. 1996. «The Clinical Potential of Endothelin Receptor Antagonists in Cardiovascular Medicine». Drugs, vol. 51, no. 1, p. 12-27.

FUNKE-KAISER, H., J. Bolbrinker, S. Theis, J. Lemmer, C. M. Richter, M. Paul, and H. D. Orzechowski. 2000. «Characterization of the C-Specific Promoter of the Gene Encoding Human Endothelin-Converting Enzyme-1 (ECE-1)». FEBS Lett, vol. 466, no. 2-3, p. 310-6.

FURCHGOTT, R. F. and J. V. Zawadzki. 1980. «The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine». Nature, vol. 288, no. 5789, p. 373-6.

GILLESPIE, M. N., J. O. Owasoyo, I. F. McMurtry, and R. F. O'Brien. 1986. «Sustained Coronary Vasoconstriction Provoked by a Peptidergic Substance Released From Endothelial Cells in Culture». J Pharmacol Exp Ther, vol. 236, no. 2, p. 339-43.

GOMAZKOV, O. A. 1998. «Endothelin-Converting Enzyme: Its Functional Aspect». Biochemistry (Mosc), vol. 63, no. 2, p. 125-32.

GUI, G., D. Xu, N. Emoto, and M. Yanagisawa. 1993. «Intracellular Localization of Membrane-Bound Endothelin-Converting Enzyme From Rat Lung». J Cardiovasc

Pharmacol, vol. 22 Suppl 8, p. S53-6.

HARRISON, V. J., R. Corder, E. E. Anggard, and J. R. Vane. 1993. «Evidence for Vesicles That Transport Endothelin-1 in Bovine Aortic Endothelial Cells». J Cardiovasc Pharmacol, vol. 22 Suppl 8, p. S57-60.

HASEGAWA, H., K. Hiki, T. Sawamura, T. Aoyama, Y. Okamoto, S. Miwa, S. Shimohama, J. Kimura, and T. Masaki. 1998. «Purification of a Novel Endothelin-Converting Enzyme Specific for Big Endothelin-3». FEBS Lett, vol. 428, no. 3, p. 304-8.

HOLDEN, W. E. and E. McCall. 1984. «Hypoxia-Induced Contractions of Porcine Pulmonary Artery Strips Depend on Intact Endothelium». Exp Lung Res, vol. 7, no. 2, p. 101-12.

HOLM, I. A., X. Huang, and L. M. Kunkel. 1997. «Mutational Analysis of the PEX Gene in Patients With X-Linked Hypophosphatemic Rickets». Am J Hum Genet, vol. 60, no. 4, p. 790-7.

IKURA, T., T. Sawamura, T. Shiraki, H. Hosokawa, T. Kido, H. Hoshikawa, K. Shimada, K. Tanzawa, S. Kobayashi, S. Miwa, and a. l. et. 1994. «CDNA Cloning and Expression of Bovine Endothelin Converting Enzyme». Biochem Biophys Res Commun, vol. 203, no. 3, p. 1417-22.

INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto, and T. Masaki. 1989. «The Human Endothelin Family: Three Structurally and Pharmacologically Distinct Isopeptides Predicted by Three Separate Genes». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 86, no. 8, p. 2863-7.

JENG, A. Y., P. Mulder, A. L. Kwan, and B. Battistini. 2002. «Nonpeptidic Endothelin-Converting Enzyme Inhibitors and Their Potential Therapeutic Applications». Can J Physiol Pharmacol, vol. 80, no. 5, p. 440-9.

JOHNSON, G. D., H. R. Swenson, R. Ramage, and K. Ahn. 2002. «Mapping the Active Site of Endothelin-Converting Enzyme-1 Through Subsite Specificity and Mutagenesis Studies: a Comparison With Neprilysin». Arch Biochem Biophys, vol. 398, no. 2, p. 240-8.

KAPPES, JC, J.S. Parkin, J.A. Conway, J. Kim, C.G. Brouillette, G.M. Shaw, B.H. Hahn. 1993. « Intracellular transport and virion incorporation of vpx requires interaction with other virus type-specific components.» Virology vol. 193, no. 1, p.222-33.

KARNE, S., C. K. Jayawickreme, and M. R. Lerner. 1993. «Cloning and Characterization of an Endothelin-3 Specific Receptor (ETC Receptor) From *Xenopus Laevis* Dermal Melanophores». J Biol Chem, vol. 268, no. 25, p. 19126-33.

KASHIWABARA, T., Y. Inagaki, H. Ohta, A. Iwamatsu, M. Nomizu, A. Morita, and K. Nishikori. 1989. «Putative Precursors of Endothelin Have Less Vasoconstrictor Activity in Vitro but a Potent Pressor Effect in Vivo». FEBS Lett, vol. 247, no. 1, p. 73-6.

KELLER, P. M., C. P. Lee, A. E. Fenwick, S. T. Atkinson, J. D. Elliott, and W. E. DeWolf Jr. 1996. «Endothelin-Converting Enzyme: Substrate Specificity and Inhibition by Novel Analogs of Phosphoramidon». Biochem Biophys Res Commun, vol. 223, no. 2, p. 372-8.

KIMURA, C., Y. Itoh, S. Ohkubo, K. Ogi, H. Onda, and M. Fujino. 1989. «Cloning and Sequencing of a Canine Gene Segment Encoding Mature Endothelin». Nucleic Acids Res, vol. 17, no. 8, p. 3290.

KORTH, P., G. Egidy, C. Parnot, J. M. LeMoullec, P. Corvol, and F. Pinet. 1997. «Construction, Expression and Characterization of a Soluble Form of Human Endothelin-Converting-Enzyme-1». FEBS Lett, vol. 417, no. 3, p. 365-70.

KUKKOLA, P. J., P. Savage, Y. Sakane, J. C. Berry, N. A. Bilci, R. D. Ghai, and A. Y. Jeng. 1995. «Differential Structure-Activity Relationships of Phosphoramidon Analogues for Inhibition of Three Metalloproteases: Endothelin- Converting Enzyme, Neutral Endopeptidase, and Angiotensin-Converting Enzyme». J Cardiovasc Pharmacol, vol. 26 Suppl 3, p. S65-8.

KULATHILA, R., K. Clark, P. Savage, B. R. Bowen, N. Emoto, M. Yanagisawa, and A. Y. Jeng. 2002. «Expression, Purification and Characterization of the Monomeric and Dimeric Forms of Soluble Bovine Endothelin Converting Enzyme-1a». Clin Sci (Lond), vol. 103 Suppl 48, p. 94S-7S.

KYTE, J. and R. F. Doolittle. 1982. «A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein.». Journal of Molecular Biology, vol. 157, p. 105-32.

LEE, S., E. D. Zambas, W. L. Marsh, and C. M. Redman. 1991. «Molecular Cloning and Primary Structure of Kell Blood Group Protein». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 88, no. 14, p. 6353-7.

LODISH, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, and J. Darnell. 2004. *Molecular Cell Biology*. 5th edition ed. W.H. Freeman.

LOWRY, O. H. R. N. J. F. A. L. a. R. R. J. 1951. «Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent». J Biol Chem, vol. 193, p. 265-75.

MACLEOD, K. J., R. S. Fuller, J. D. Scholten, and K. Ahn. 2001. «Conserved Cysteine and Tryptophan Residues of the Endothelin-Converting Enzyme-1 CXAW Motif Are Critical for Protein Maturation and Enzyme Activity». J Biol Chem, vol. 276, no. 33, p. 30608-14.

MAHMOUDIAN, M. 1996. «Computer-Aided Molecular Modeling of Cathepsin E, a Possible Endothelin- Converting Enzyme». J Mol Graph, vol. 14, no. 4, p. 213-6, 225-6.

MASAKI, T., M. Yanagisawa, and K. Goto. 1992. «Physiology and Pharmacology of Endothelins». Med Res Rev, vol. 12, no. 4, p. 391-421.

MERRIFIELD, B. 1986. «Solid Phase Synthesis». Science vol. 232, p.341-347.

MINAMINO, T., H. Kurihara, M. Takahashi, K. Shimada, K. Maemura, H. Oda, T. Ishikawa, T. Uchiyama, K. Tanzawa, and Y. Yazaki. 1997. «Endothelin-Converting Enzyme Expression in the Rat Vascular Injury Model and Human Coronary Atherosclerosis». Circulation, vol. 95, no. 1, p. 221-30.

MONCADA, S., R. Gryglewski, S. Bunting, and J. R. Vane. 1976. «An Enzyme Isolated From Arteries Transforms Prostaglandin Endoperoxides to an Unstable Substance That Inhibits Platelet Aggregation». Nature, vol. 263, no. 5579, p. 663-5.

MORITA, A., M. Nomizu, M. Okitsu, K. Horie, H. Yokogoshi, and P. P. Roller. 1994. «D-Val22 Containing Human Big Endothelin-1 Analog». FEBS Lett, vol. 353, no. 1, p. 84-8.

NIRANJAN, V., S. Telemaque, D. deWit, R. D. Gerard, and M. Yanagisawa. 1996. «Systemic Hypertension Induced by Hepatic Overexpression of Human Preproendothelin-1 in Rats». J Clin Invest, vol. 98, no. 10, p. 2364-72.

O'BRIEN, R. F. and I. F. McMurtry. 1984. «Endothelial Cell (EC) Supernates Contract Bovine Pulmonary Artery (PA) Rings». American Review of Respiratory Disease, vol. 129, p. A337.

OHNAKA, K., M. Nishikawa, R. Takayanagi, M. Haji, and H. Nawata. 1992. «Partial Purification of Phosphoramidon-Sensitive Endothelin Converting Enzyme in Porcine Aortic Endothelial Cells: High Affinity for Ricinus Communis Agglutinin». Biochem Biophys Res Commun, vol. 185, no. 2, p. 611-6.

OKADA, K., Y. Arai, M. Hata, K. Matsuyama, and M. Yano. 1993. «Big Endothelin-1 Structure Important for Specific Processing by Endothelin-Converting Enzyme of Bovine Endothelial Cells». Eur J Biochem, vol. 218, no. 2, p. 493-8.

ORTEGA MATEO, A. and A. A. de Artinano. 1997. «Highlights on Endothelins: a Review». Pharmacol Res, vol. 36, no. 5, p. 339-51.

ORZECZOWSKI, H. D., A. Gunther, S. Menzel, A. Zimmermann, H. Funke-Kaiser, R. Real, T. Subkowski, F. S. Zollmann, and M. Paul. 2001. «Transcriptional Mechanism of Protein Kinase C-Induced Isoform-Specific Expression of the Gene for Endothelin-Converting Enzyme-1 in Human Endothelial Cells». Mol Pharmacol, vol. 60, no. 6, p. 1332-42.

ORZECZOWSKI, H. D., C. M. Richter, H. Funke-Kaiser, B. Kroger, M. Schmidt, S. Menzel, H. Bohnemeier, and M. Paul. 1997. «Evidence of Alternative Promoters Directing Isoform-Specific Expression of Human Endothelin-Converting Enzyme-1 mRNA in Cultured Endothelial Cells». J Mol Med, vol. 75, no. 7, p. 512-21.

PALMER, R. M., A. G. Ferrige, and S. Moncada. 1987. «Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor». Nature, vol. 327, no. 6122, p. 524-6.

SAIDA, K., Y. Mitsui, and N. Ishida. 1989. «A Novel Peptide, Vasoactive Intestinal

Contractor, of a New (Endothelin) Peptide Family. Molecular Cloning, Expression, and Biological Activity». J Biol Chem, vol. 264, no. 25, p. 14613-6.

SAKURAI, T., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto, and T. Masaki. 1990. «Cloning of a cDNA Encoding a Non-Isopeptide-Selective Subtype of the Endothelin Receptor». Nature, vol. 348, no. 6303, p. 732-5.

SANSOM, C. E., M. V. Hoang, and A. J. Turner. 1998. «Molecular Modelling and Site-Directed Mutagenesis of the Active Site of Endothelin-Converting Enzyme». Protein Eng, vol. 11, no. 12, p. 1235-41.

SAWAMURA, T., O. Shinmi, N. Kishi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto, T. Masaki, and S. Kimura. 1990. «Analysis of Big Endothelin-1 Digestion by Cathepsin D». Biochem Biophys Res Commun, vol. 172, no. 2, p. 883-9.

SCHMIDT, M., B. Kroger, E. Jacob, H. Seulberger, T. Subkowski, R. Otter, T. Meyer, G. Schmalzing, and H. Hillen. 1994. «Molecular Characterization of Human and Bovine Endothelin Converting Enzyme (ECE-1)». FEBS Lett, vol. 356, no. 2-3, p. 238-43.

SCHWEIZER, A., O. Valdenaire, P. Nelbock, U. Deuschle, J. B. Dumas Milne Edwards, J. G. Stumpf, and B. M. Loffler. 1997. «Human Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1): Three Isoforms With Distinct Subcellular Localizations». Biochem J, vol. 328 (Pt 3), p. 871-7.

SHIMA, H., Y. Kawashima, K. Ohmori, M. Sugiura, and K. Kawashima. 1994. «Endothelin Converting Enzymes in Guinea-Pig Lung Membrane Fractions: Purifications and Characterizations». Biochem Mol Biol Int, vol. 34, no. 6, p. 1227-34.

SHIMADA, K., Y. Matsushita, K. Wakabayashi, M. Takahashi, A. Matsubara, Y. Iijima, and K. Tanzawa. 1995. «Cloning and Functional Expression of Human Endothelin-Converting Enzyme cDNA». Biochem Biophys Res Commun, vol. 207, no. 2, p. 807-12.

SHIMADA, K., M. Takahashi, M. Ikeda, and K. Tanzawa. 1995. «Identification and Characterization of Two Isoforms of an Endothelin- Converting Enzyme-1». FEBS Lett, vol. 371, no. 2, p. 140-4.

SHIMADA, K., M. Takahashi, and K. Tanzawa. 1994. «Cloning and Functional Expression of Endothelin-Converting Enzyme From Rat Endothelial Cells». J Biol Chem, vol. 269, no. 28, p. 18275-8.

STJERNQUIST, M. 1998. «Endothelins--Vasoactive Peptides and Growth Factors». Cell Tissue Res, vol. 292, no. 1, p. 1-9.

TAKAHASHI, M., K. Fukuda, K. Shimada, K. Barnes, A. J. Turner, M. Ikeda, H. Koike, Y. Yamamoto, and K. Tanzawa. 1995. «Localization of Rat Endothelin-Converting Enzyme to Vascular Endothelial Cells and Some Secretory Cells». Biochem J, vol. 311 (Pt 2), p. 657-65.

TAKAHASHI, M., Y. Matsushita, Y. Iijima, and K. Tanzawa. 1993. «Purification and

Characterization of Endothelin-Converting Enzyme From Rat Lung». J Biol Chem, vol. 268, no. 28, p. 21394-8.

TAKAOKA, M., Y. Miyata, Y. Takenobu, R. Ikegawa, Y. Matsumura, and S. Morimoto. 1990. «Mode of Cleavage of Pig Big Endothelin-1 by Chymotrypsin. Production and Degradation of Mature Endothelin-1». Biochem J, vol. 270, no. 2, p. 541-4.

TAKAOKA, M., Y. Takenobu, Y. Miyata, R. Ikegawa, Y. Matsumura, and S. Morimoto. 1990. «Pepsin, an Aspartic Protease, Converts Porcine Big Endothelin to 21- Residue Endothelin». Biochem Biophys Res Commun, vol. 166, no. 1, p. 436-42.

TRAPANI, A. J., S. De Lombaert, S. Kuzmich, and A. Y. Jeng. 1995. «Inhibition of Big ET-1-Induced Pressor Response by an Orally Active Dual Inhibitor of Endothelin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase 24.11». J Cardiovasc Pharmacol, vol. 26 Suppl 3, p. S69-71.

TURNER, A. J. and L. J. Murphy. 1996. «Molecular Pharmacology of Endothelin Converting Enzymes». Biochem Pharmacol, vol. 51, no. 2, p. 91-102.

UCHIDA, Y., T. Jun, H. Ninomiya, H. Ohse, S. Hasegawa, A. Nomura, T. Sakamoto, M. S. Sardesai, and F. Hirata. 1996. «Involvement of Endothelins in Immediate and Late Asthmatic Responses of Guinea Pigs». J Pharmacol Exp Ther, vol. 277, no. 3, p. 1622-9.

VALDENNAIRE, O., D. Lepaillieur-Enouf, G. Egidy, A. Thouard, A. Barret, R. Vranckx, C. Tougard, and J. B. Michel. 1999. «A Fourth Isoform of Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1) Is Generated From an Additional Promoter Molecular Cloning and Characterization». Eur J Biochem, vol. 264, no. 2, p. 341-9.

VALDENNAIRE, O., E. Rohrbacher, and M. G. Mattei. 1995. «Organization of the Gene Encoding the Human Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1)». J Biol Chem, vol. 270, no. 50, p. 29794-8.

WALLACE, E. M., J. A. Moliterni, M. A. Moskal, A. D. Neubert, N. Marcopulos, L. B. Stamford, A. J. Trapani, P. Savage, M. Chou, and A. Y. Jeng. 1998. «Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Endothelin- Converting Enzyme». J Med Chem, vol. 41, no. 9, p. 1513-23.

WAN, D. C., S. K. Luk, K. W. Tsim, and W. T. Cheung. 1997. «Expression and Localization of Endothelin Converting Enzyme in Rat Vas Deferens». Life Sci, vol. 60, no. 18, p. 1605-12.

XU, D., N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaw, D. deWit, and M. Yanagisawa. 1994. «ECE-1: a Membrane-Bound Metalloprotease That Catalyzes the Proteolytic Activation of Big Endothelin-1». Cell, vol. 78, no. 3, p. 473-85.

YANAGISAWA, H., M. Yanagisawa, R. P. Kapur, J. A. Richardson, S. C. Williams, D. E. Clouthier, D. de Wit, N. Emoto, and R. E. Hammer. 1998. «Dual Genetic Pathways of Endothelin-Mediated Intercellular Signaling Revealed by Targeted Disruption of Endothelin Converting Enzyme-1 Gene». Development, vol. 125, no. 5, p. 825-36.

YANAGISAWA, M., H. Kurihara, S. Kimura, K. Goto, and T. Masaki. 1988. «A Novel Peptide Vasoconstrictor, Endothelin, Is Produced by Vascular Endothelium and Modulates Smooth Muscle Ca²⁺ Channels». J Hypertens Suppl, vol. 6, no. 4, p. S188-91.

YANAGISAWA, M. and T. Masaki. 1989. «Endothelin, a Novel Endothelium-Derived Peptide. Pharmacological Activities, Regulation and Possible Roles in Cardiovascular Control». Biochem Pharmacol, vol. 38, no. 12, p. 1877-83.

