

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier

A LA RECHERCHE DE SEQUENCES LIANT L'ENDOTHELIN-1

Par  
Alexandra Louimair  
Bachelière en Biochimie

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 et  
examineur interne  
Examineur externe  
Directeur de recherche

Dr Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier  
Dr Sami Haddad, Université du Québec à Montréal  
Dr Alain Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier

## Résumé

L'endothéline (ET) est un peptide de 21 acides aminés caractérisé par une vasoconstriction puissante et soutenue. Il possède également un pouvoir mitogène et inotrope en plus d'influencer l'homéostasie rénale et altérer l'activité centrale et sympathique du système nerveux périphérique. Ces diverses actions sont médiées par le biais de récepteurs vasculaires présents dans les des muscles lisses et les cellules endothéliales nommés ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Malgré les progrès notables dans le développement de traitements thérapeutiques tels la découverte de bloqueurs des récepteurs ou de sa biosynthèse, cette étude propose une nouvelle stratégie qui cible le blocage de l'ET à ses récepteurs par la liaison d'un intermédiaire spécifique à l'ET. Dans la perspective d'identifier de nouveaux inhibiteurs de l'ET-1, la technique de banque de phage (*phage display*), qui encadre les principes de chimie combinatoire et de biologie, a été utilisée.

La technique de *phage display* ou présentation sur phage, est une méthode révolutionnaire utilisée dans plusieurs laboratoires pour l'identification de ligands nécessaires dans la recherche de nouveaux médicaments. À partir des librairies peptidiques construites et exposées à la surface du bactériophage, une panoplie de ligands est disponible pour l'isolation de molécules spécifiques sans études laborieuses sur la caractérisation antigénique ou structurelle du ligand. Les séquences ainsi sélectionnées contre l'ET-1 seront en mesure de déstabiliser la liaison du peptide envers ses récepteurs.

Le criblage *in vitro* a été effectué via une librairie aléatoire de 20 acides aminés fusionnée à la partie C-terminale du gène codant pour la protéine 10B de la capsid du phage T7. La sélection de cette librairie face à l'ET immobilisé sur support a permis d'obtenir 36 clones dont les séquences variaient de 4 à 31 acides aminés. Trois motifs : LXXFXVSISXFXXA, ALXSXXXSIS, PWQLXEXXSIS ce sont distingués suite à un alignement multiple des séquences. La fréquence de certaines séquences répétées ainsi que les motifs identifiés ont permis la synthèse de cinq peptides nommés *endothelin binding peptides*. Afin de déterminer si la contribution des acides aminés identifiés sont importants à la liaison des peptides sélectionnées, des études d'affinité et d'inhibition de l'activité biologique de l'ET ont été entreprises. Une IC<sub>50</sub> moyenne de 50 μM a été

calculée pour les cinq peptides. Toutefois, les analyses par résonance plasmonique de surface se sont révélées contradictoires car aucune liaison spécifique n'a été enregistrée. En ce qui a trait aux études d'inhibition de liaison de l'ET à ses récepteurs, une légère perte a été enregistrée sous l'action d'une forte concentration de peptides. Cependant aucune inhibition de l'activité de l'ET n'a été observée suite à des essais pharmacologiques effectués sur des préparations tissulaires d'aorte de rat. En prenant compte de certains paramètres qui peuvent avoir influencé les résultats observés, des ajustements peuvent être effectués afin d'optimiser les séquences et favoriser une meilleure affinité.

---

Alexandra Louimaine  
Étudiante

## Remerciements

Ma gratitude la plus profonde revient à mon directeur de recherche, Dr Alain Fournier, pour m'avoir permis de parfaire mes connaissances scientifiques au sein de son excellente équipe et de m'avoir fait confiance tout au long de mon cheminement. Je suis également reconnaissante pour tout l'encadrement scientifique que tu m'as offert.

Un remerciement particulier à Myriam Létourneau, pour sa patience et son soutien technique incontestable. Également un gros merci à toute l'équipe du LEMPP d'hier et d'aujourd'hui : Sophie Tessier, Chantal Langlois, Stéphane Boivin, Steve Bourgault, Jacinthe Aubin, Kathy Turcotte, Yan Fu, sans oublier Philippe Lampron pour m'avoir légué son savoir en biologie moléculaire en plus de m'avoir offert des *lifts* Montréal-Pointe-Claire/ Pointe-Claire-Montréal et Olivier Guinard pour son appui et ses discussions politiques ! Je n'oublierai jamais les précieux moments du LEMPP notamment les dîners communautaires, les cours de ballet, l'initiation au karaté, les Fournier *Award* et j'en passe!

Merci également à l'équipe du Dr Sylvestre pour leurs précieux conseils techniques.

Je tiens à remercier toute ma famille pour leurs mots d'encouragement, particulièrement mes parents Butold et Marie-Ange, mes frères Dave et Thierry, mes cousines Claudyne, Suzanne, Phoébee ainsi que Lyne. De plus, je tiens à souligner la présence continue de mes ami(e)s spécialement celle de Sandra, Claudja et Mindy.

Finalement, je souhaite remercier l'Institut National de la Recherche Scientifique pour son support financier.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des figures .....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction.....	1
Chapitre 1 – L’endothéline .....	1
1.1 Découverte de l’endothéline .....	1
1.2 Voies de synthèse de l’endothéline.....	2
1.3 L’endothéline et ses récepteurs.....	6
1.4 Actions biologiques de l’endothéline.....	8
1.5 Les pathophysiologies associées à l’endothéline.....	8
1.6 Objectif de recherche .....	11
2. Chapitre 2 – La technique de présentation sur phage .....	13
2.1 L’origine de la présentation sur phage.....	13
2.2 Les vecteurs .....	14
2.3 Le bactériophage T7 .....	14
2.4 Les banques de peptides .....	15
2.5 Les méthodes de criblage.....	17
2.6 Les applications générales de la technique.....	19
3. Matériels et méthodes .....	21
3.1 Construction de la librairie .....	21
3.2Vérification de l’insert.....	22
3.2.1 Construction du plasmide pUC18-ET-1 et pUC18-librairie.....	23
3.3 La présentation sur phage: méthode de sélection .....	24
3.3.1 Ligation de l’insert avec le vecteur T7Select 10-3B.....	24
3.3.2 Amplification .....	25
3.3.3 Précipitation des phages.....	26
3.3.4 Tours de sélection .....	26

3.4 Séquençage des clones.....	28
3.5 Synthèse des peptides .....	28
3.6 Évaluation de la liaison des peptides EBPs .....	32
3.6.1 Marquage radioactif de l'ET-1 .....	32
3.6.2 Évaluation de l'affinité des peptides EBPs.....	33
3.7 Évaluation de l'activité inhibitrice des peptides EBPs .....	35
3.7.1 Essais de liaison : Études sur l'inhibition de l'ET-1 à ses récepteurs .....	35
3.7.2 Tests Pharmacologiques : Études sur l'activité biologique de l'ET-1 .....	37
4. Résultats.....	38
Section I : Développement de séquences peptidiques	
4.1 Construction de la librairie .....	38
4.2 Criblage des phages-peptides contre l'ET-1 .....	38
4.3 Séquençage .....	40
4.4 Synthèse des peptides EBPs .....	41
Section II : Évaluation de l'affinité des peptides EBPs.....	44
4.5 Études de compétition.....	43
5. Discussion .....	53
5.1 Section I: Développement de la librairie .....	53
5.2 Section II : Études de liaison .....	56
5.3 Section III : Analyses des séquences .....	58
5.4 Section IV : Perspectives .....	60
6. Conclusion .....	62
Appendice .....	64
Site de clonage du vecteur T7 Select 10-3b .....	64
Abréviations des acides aminés .....	65
Références.....	66

## Liste des Figures

Figure 1 :	Structure primaire des trois isoformes de l'ET retrouvées dans le génome humain. Les acides aminés en gras de ET-2 et ET-3 sont ceux qui diffèrent de ET-1.....	4
Figure 2 :	Biosynthèse et mécanisme d'action de l'ET-1 .....	5
Figure 3 :	A) Carte génétique du vecteur phagique T7. B) Schéma représentant les structures des particules du phage T7 .....	16
Figure 4 :	Méthode de criblage par la technique de présentation sur phage: étapes de sélection.....	18
Figure 5 :	Exemple d'un sensogramme représentant les 5 étapes d'une analyse par résonance plasmonique de surface : immobilisation, association, équilibre, dissociation, régénération.....	36
Figure 6 :	Histogramme illustrant le nombre de phages liant l'ET-1 via le peptide exprimé à leur surface versus des phages nus (contrôle négatif) après 4 tours de sélection.....	39
Figure 7 :	Courbes de compétition de liaison de [Tyr( <sup>125</sup> I) <sup>13</sup> ] ET-1 versus différentes concentrations croissantes de ET-1 par rapport aux EBPs. ....	45
Figure 8 :	Sensogramme représentant la liaison de l'ET-1 biotinylée à la plaque Sensor Chip (Biacore). ....	46
Figure 9 :	Sensogrammes représentant la liaison des peptides a) EBP-4, b) EBP-6, c) EBP-12, d) EBP-29 et e) EBP-31 à l'ET-1.....	47
Figure 10 :	Courbes d'inhibition de la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs ET <sub>A</sub> ou ET <sub>B</sub> par l'action des EBPs.....	49-50
Figure 11 :	Courbes concentration-réponse de l'ET-1 seule ou en présence de 10 <sup>-4</sup> M des EBPs, sur des anneaux d'aorte de rat. ....	52

## Liste des Tableaux

Tableau I :	Actions biologiques de l'ET (Doherty, 1992). .....	7
Tableau II :	Liste de certaines pathologies associées à l'ET (Doherty, 1992). .....	9
Tableau III :	Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc.....	31
Tableau IV :	Séquences des peptides obtenus après criblage. ....	42
Tableau V :	Séquences du vecteur T7 Select 10-3b à partir de la Méthionine -346.....	42
Tableau VI :	Analyses des séquences ADN provenant des clones sélectionnés .....	43
Tableau VII :	Résultats des analyses par spectrométrie de masse des peptides EBPs .....	43
Tableau VIII :	Affinité de la liaison de [Tyr( <sup>125</sup> I) <sup>13</sup> ] ET-1 sur les EBPs .....	44



## Liste des abréviations

a.a.	acide aminé
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BigET	Big-endothéline
Boc	t-butyloxycarbonyle
CAT	chloramine-T
CHO	cellules d'ovaires d'hamster chinois
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
Da	Dalton
DAG	diacylglycérol
DCM	dichlorométhane
DIEA	diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide
DTT	dithiothreitol
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDCF	<i>endothelium derived constricting factors</i>
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factors</i>
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
ET	endothéline
Fmoc	9-fluorénylméthoxyloxycarbonyle
G418	généticine, antibiotique eucaryote
INRS	Institut National de la Recherche Scientifique
IC <sub>50</sub>	<i>inhibitory concentration 50%</i>
IP <sub>3</sub>	inositol triphosphate
K <sub>d</sub>	constante de dissociation
LB	<i>Luria Bertani</i> (milieu de culture)
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization- time-of-flight</i>
NO	oxyde nitrique
PCR	<i>polymerization chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PGI <sub>2</sub>	prostacyclines
PIP	pipéridine
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PM	poids moléculaire
rET	récepteur de l'endothéline
RMN	résonance magnétique nucléaire
RSP	résonance plasmonique de surface
SDS	dodécylsulfate de sodium

TBS-Tw  
TFA  
UV

Tampon Tris-NaCl avec Tween 20  
acide trifluoroacétique  
ultraviolet

## Introduction

### Chapitre 1 : l'endothéline

#### 1.1 Découverte de l'endothéline

Depuis plus d'une vingtaine d'années, plusieurs études ont mis l'emphase sur les propriétés paracrines et endocrines des molécules issues de l'endothélium vasculaire. Cette monocouche cellulaire, jadis considérée comme une simple barrière semi-perméable entre la paroi vasculaire et le sang, participe grandement à de multiples fonctions du corps humain, notamment dans l'homéostasie du système cardiovasculaire. En effet, plusieurs substances vasodilatatrices telles que la prostacycline (un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire) et l'EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) qui s'est révélé être le monoxyde d'azote (NO) sont sécrétées par l'endothélium (Furchgott et Zawadzky, 1980 ; D'Orléans-Juste et al., 1996). En 1984, l'équipe de O'Brien et McMurtry ont démontré que les cellules endothéliales pouvaient produire également un facteur extrêmement labile et contractile qui fut alors nommé EDCF (*Endothelium Derived Constricting Factor*). Une étude menée par Hickey et ses collègues, a permis de clarifier que cette substance vasoconstrictrice a pour propriété d'induire une action intense, de longue durée et dépendante de la présence extracellulaire de calcium (Hickey et al. 1985). Deux années se sont écoulées depuis la découverte de ce facteur lorsqu'en 1986, Gillepsie et collaborateurs démontrent que le facteur en question est de nature protéique, puisqu'un traitement à la trypsine inhibait son activité. La caractérisation de ce facteur a été réalisée en 1988 par Yanagisawa et son équipe, à partir d'un surnageant de cellules endothéliales d'aorte porcine. Ce peptide vasoconstricteur qui n'appartenait à aucune famille connue a été nommé endothéline (ET).

L'endothéline a été caractérisée comme étant un peptide de 21 acides aminés doté de propriétés vasoconstrictrices extrêmement efficaces. Il possède une masse moléculaire de 2492 daltons et des domaines amino- et carboxy-terminal libres. L'ET contient quatre résidus de cystéine et celles-ci forment deux ponts disulfures intramoléculaires aux

positions 1-15 et 3-11, ce qui confère à la molécule une structure rigide caractéristique des peptides appartenant à une famille de dérivés homologues. En effet, l'analyse subséquente du génome humain par Inoue et al. (1989) a démontré la présence de gènes distincts codant pour des isomères de l'endothéline. Ceux-ci ont été respectivement nommés ET-1, ET-2 et ET-3. De légères variations sont observées entre ET-2 et ET-1, aux positions 6 et 7, tandis que ET-3 possède 6 acides aminés distincts de ET-1 (figure 1).

Les trois ETs possèdent également de grandes similitudes, tant structurelles que fonctionnelles, avec les sarafotoxines (STXs). Les STXs (STXa, STXb, STXc et STXd) font partie d'une famille d'isopeptides isolés à partir du venin de *Atractaspis engaddensis*. Ceux-ci sont également capables d'interagir avec les récepteurs des ETs (rETs) (Ortega Mateo et De Artinano, 1997). Ces similitudes entre les ETs et les STXs suggèrent la possibilité d'une même origine évolutive. Les ETs sont, par ailleurs, également présentes dans le génome d'autres mammifères tels la souris, le rat, le chien et le porc (Doherty et al., 1992). Au niveau de la littérature sur le système des ETs, des trois isopeptides découverts le plus étudié et le plus connu demeure toutefois l'ET-1.

L'ET-1 est produite majoritairement par les cellules endothéliales. Ce peptide est retrouvé au niveau du cœur, des reins, du système nerveux central et de l'hypophyse. Les cellules vasculaires aortiques chez l'humain expriment, en faible quantité, l'ARNm de ET-1. En ce qui a trait à ET-2, de faibles quantités sont produites par les cellules endothéliales, par le cœur et les reins. On retrouve plus spécifiquement ET-3 dans les systèmes endocrinien, gastro-intestinal et nerveux (Haynes et Webb, 1998).

## **1.2 Voies de synthèse de l'endothéline**

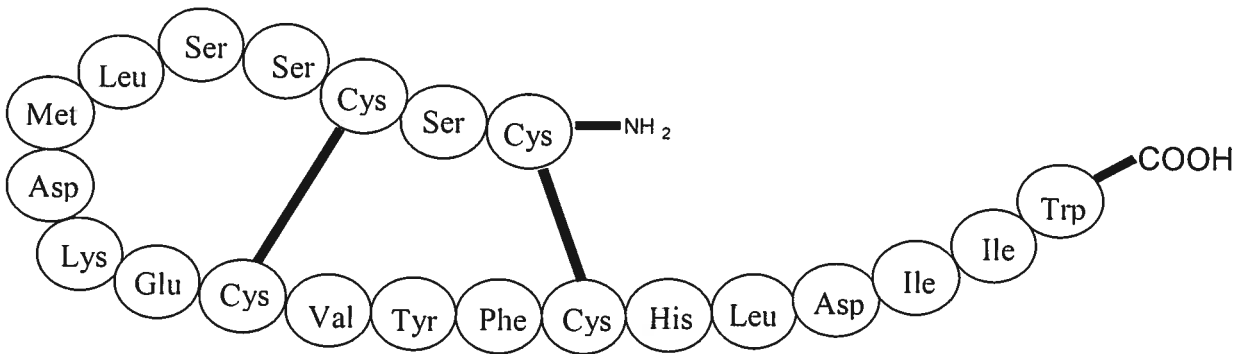
Chaque membre de la famille des endothélines est représenté par un gène distinct. Il n'en demeure pas moins que le processus de biosynthèse reste similaire pour les trois isopeptides. L'expression des gènes peut être induite par plusieurs facteurs incluant l'adrénaline, la thrombine, la vasopressine, l'angiotensine II, l'insuline, les cytokines,

certaines facteurs de croissance en plus de certains stimuli physico-chimiques (Ortega Mateo et De Artinano, 1997). Par contre, la production de l'ET peut être inhibée par des facteurs qui augmentent la concentration intracellulaire de la guanosine monophosphate cyclique tels que l'oxide nitrique (NO) (Boulanger et al., 1990), la prostacycline, l'héparine et certains peptides natriurétiques (Ortega Mateo et De Artinano, 1997; Haynes et Webb, 1998).

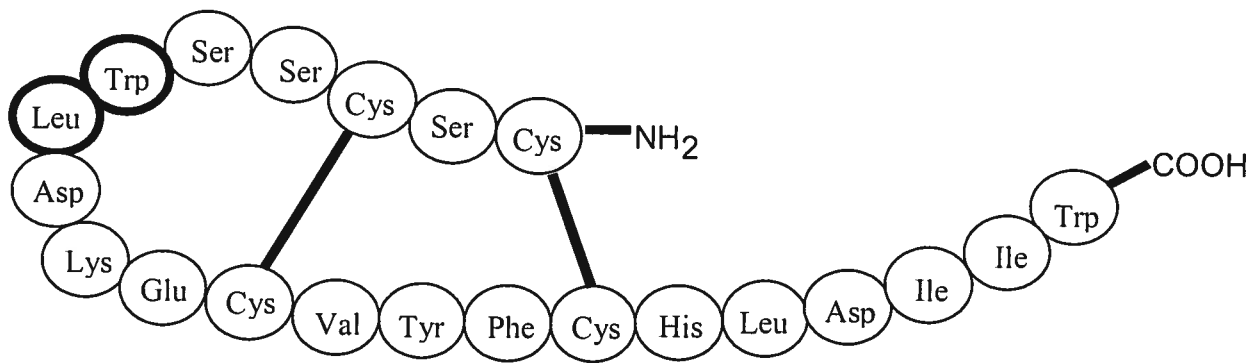
Tout d'abord, le peptide initial généré est la préproendothéline, une protéine qui selon les espèces contient de 160 à 238 acides aminés. Ce précurseur subit une première transformation par l'action d'une peptidase signal qui retire une courte séquence pour former la proendothéline. Par le biais d'une enzyme, provenant de la famille des subtilisines, nommée furine, la pro ET est convertie en big-ET. La big ET-1 humaine est composée de 38 acides aminés tandis que les big ET-2 et big ET-3 sont composées respectivement de 37 et 41 acides aminés. Les peptides matures de la famille des ET proviennent du clivage protéolytique du précurseur par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE).

L'identité de l'ECE a été révélée en 1994 simultanément par Xu et al., et Shimada et al. L'ECE est une métalloendopeptidase zinc-dépendante et il en existe 3 isoformes nommées ECE-1, ECE-2 et ECE-3. L'ECE-1 est la forme la plus physiologiquement impliquée à cause de son expression et de son action vaste. Les hormones de croissance telles que le facteur de croissance endothélial vasculaire, peuvent augmenter l'expression de l'ECE dans les cellules endothéliales (Matsuura et al. 1997). L'ECE est principalement retrouvée au niveau des cellules endothéliales, mais également dans les cellules exocrines, les cellules du muscle lisse et les cellules neuronales. La spécificité de l'ECE-1 pour les différents isoformes de la big-ET est décrite comme suit : big ET-1 > big ET-2 > big ET-3. L'ECE-1 a également la possibilité d'hydrolyser d'autres peptides biologiques tels que la bradykinine, la substance P, l'angiotensine I et l'insuline avec toutefois une efficacité plus faible (Hoang et Turner, 1997; Johnson et al. 1999).

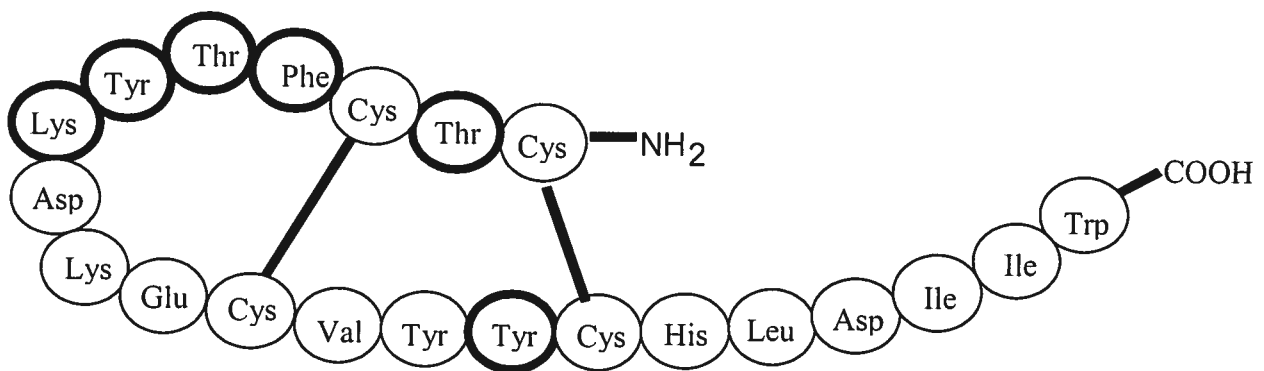
ET-1



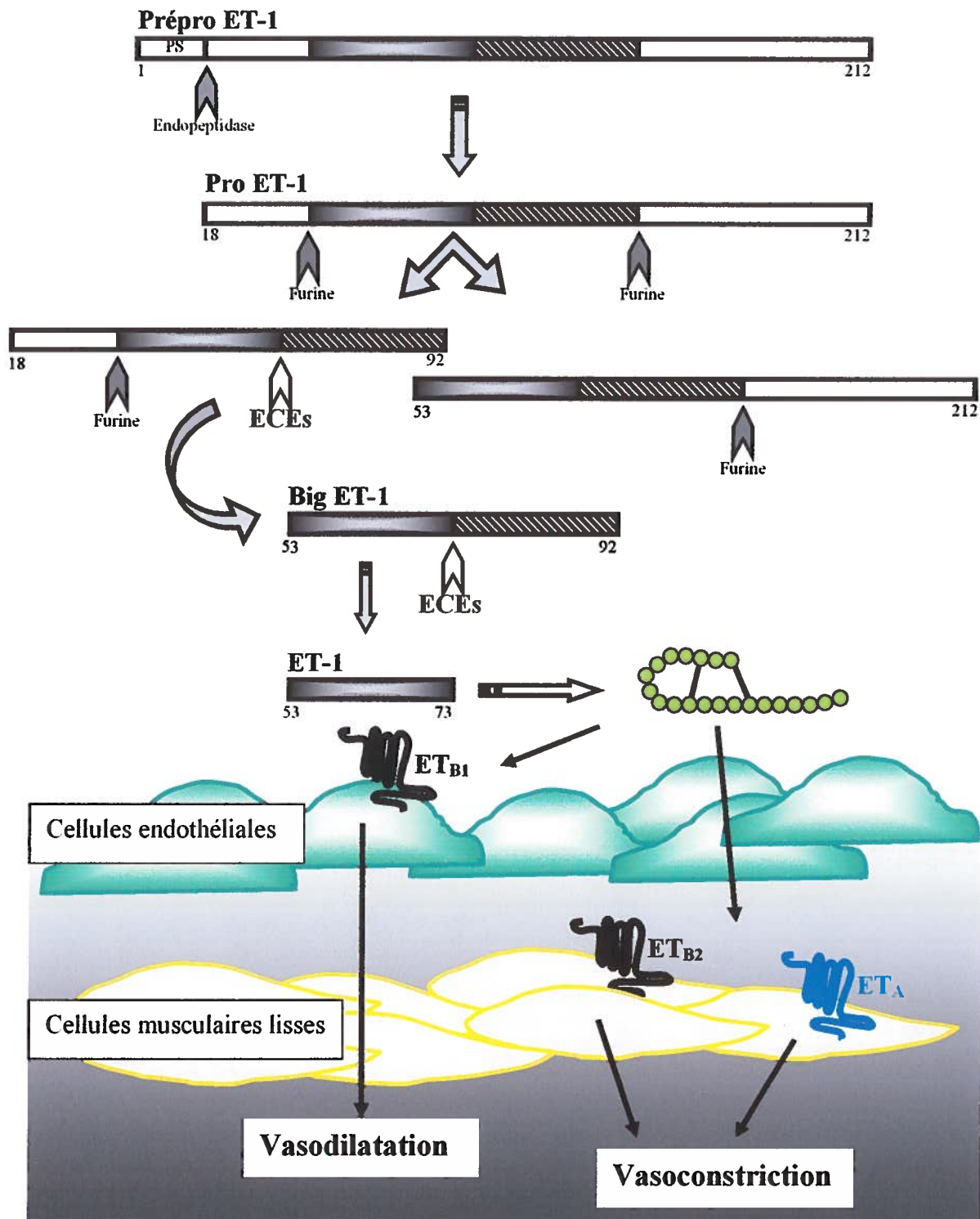
ET-2



ET-3



**Figure 1 : Structure primaire des trois isoformes de l'ET retrouvées dans le génome humain. Les acides aminés en gras sont ceux qui diffèrent de l'ET-1.**



**Figure 2 : Biosynthèse de l'ET-1 humaine à partir de ses précurseurs.**  
(PS : Peptide signal)

### 1.3 L'endothéline et ses récepteurs

La multitude d'effets générés par l'action de l'ET s'effectue via deux récepteurs soit les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  ( $rET_A$ ,  $rET_B$ ). En 1990, les deux récepteurs ont été isolés par des techniques de clonage chez les mammifères (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Les gènes des  $rET_A$  et  $rET_B$  possèdent près de 85% d'homologie avec ceux identifiés dans d'autres espèces telles que le rat, le porc et le bœuf (D'Orléans-Juste et al., 1996). Appartenant à la famille des récepteurs de la rhodopsine, les rETs sont couplés aux protéines G, plus spécifiquement  $G_{q/11}$  (Becker, 1996). Ils ont pour caractéristiques, sept passages transmembranaires et chaque segment est constitué de 20 à 27 acides aminés (Ortega Mateo et De Artinano, 1997).

Le  $rET_A$ , composé de 427 acides aminés chez l'humain, est localisé en grande majorité à la surface des cellules musculaires du système vasculaire. Une fois stimulé, ce récepteur peut engendrer une forte vasoconstriction. Il possède une affinité différente aux endothélines et celle-ci est exprimée selon l'ordre de puissance suivant :  $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$ . En ce qui concerne le récepteur de type  $ET_B$ , il a été initialement retrouvé à la surface des cellules endothéliales vasculaires de même que dans d'autres tissus incluant le cerveau, le muscle vasculaire lisse, les poumons, les reins et le cœur. Chez l'humain, ce récepteur est composé de 442 acides aminés et selon sa localisation, le  $rET_B$  produira une activité biologique distincte. Ainsi, les récepteurs nommés  $rET_{B1}$  localisés à la surface de l'endothélium provoquent une vasodilatation rapide par le biais de facteurs relaxants (NO et  $PGI_2$  : prostacyclines) et les récepteurs de type  $rET_{B2}$  retrouvés au niveau des muscles lisses, sont responsables d'une activité vasoconstrictrice. De plus, les  $rET_B$  ne présentent aucune sélectivité pour les trois isoformes de l'endothéline (Masaki et Yanagisawa 1992; D'Orléans-Juste et al., 1996). Il existerait un troisième récepteur soit  $ET_C$ . Ce récepteur semble présenter une plus grande sélectivité pour ET-3 et sa stimulation causerait la libération de NO. Cependant, il n'a été identifié et cloné que chez la grenouille africaine *Xenopus laevis* et non chez les mammifères (Ortega Mateo et De Artinano, 1997).



**Tableau I : Actions biologiques de l'ET.** (Source : Doherty, 1992)

Tissus ou organes cibles	Effets biologiques
Muscles vasculaires lisses	Constriction prolongée et soutenue Action mitogène Libération d'oxyde nitrique Diminution de l'agrégation plaquettaire
Coeur	Augmentation de la contractilité et du rythme cardiaque Stimulation de la libération d'ANP
Poumons/Utérus/Intestins	Constriction des muscles lisses
Reins	Inhibition de la libération de la rénine Diminution du flux sanguin rénal Diminution de la vitesse de filtration glomérulaire Diminution de l'excrétion urinaire de Na <sup>+</sup> et de K <sup>+</sup>
Foie	Activation de la glycogénolyse Stimulation de la production de PGE <sub>2</sub> par les cellules de Kupffer Augmentation de la pression portale Régulation du flux biliaire
Tissu nerveux	Augmentation de la libération des neurotransmetteurs
Glandes surrénales	Stimulation de la biosynthèse de l'aldostérone Libération des catécholamines

#### **1.4 Actions biologiques de l'endothéline**

Il a été démontré qu'une faible dose d'ET administrée par intraveineuse pouvait stimuler les cellules endothéliales (au niveau des récepteurs  $ET_{B1}$ ) et libérer du NO ce qui engendre une vasodilatation. Une plus forte dose permettrait au peptide de passer à travers les cellules endothéliales pour atteindre les muscles lisses et causer alors une vasoconstriction. Certaines actions biologiques engendrées par ET sont présentées dans le tableau I.

Classiquement, la vasoconstriction enregistrée par l'action de ET résulte de la stimulation des récepteurs  $ET_A$  et  $ET_{B2}$ . Lorsque les récepteurs sont activés par la liaison de ET, ceux-ci activent la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ( $PIP_2$ ). Ceci permet de libérer deux messagers soit l'inositide-triphosphate ( $IP_3$ ) et le diacylglycérol (DAG). Il s'ensuit une mobilisation rapide du calcium cytoplasmique par le biais de l' $IP_3$  et de l'activation de la protéine kinase C par DAG. Cette suite d'évènements intracellulaires aboutit aux mécanismes de contraction des muscles lisses ou de sécrétions au niveau des cellules endothéliales (D'Orléans-Juste et al., 1996).

#### **1.5 Les pathophysiologies associées à l'endothéline**

Initialement, les ETs ont piqué la curiosité de nombreux chercheurs en cardiologie suite à la démonstration de leur action unique sur le système cardio-vasculaire. En ce sens, comme décrit précédemment, l'endothéline est un puissant vasoconstricteur qui a été identifié dans plusieurs désordres touchant ce système. Par contre, l'implication physiologique et physiopathologique de ce peptide demeure encore obscure sous certaines conditions, et ce, non seulement dans le système cardio-vasculaire mais également au niveau de tous les systèmes de l'organisme (tableau II).

**Tableau II : Liste de certaines pathologies associées à l'ET (Doherty, 1992)**

<b>Pathologies associées aux endothélines</b>
Système cardiovasculaire: Ischémie Arythmie Hypertension Insuffisance cardiaque
Système pulmonaire: (Bronchoconstriction) Hypertension pulmonaire Asthme
Système rénal: Insuffisance rénale chronique/aiguë
Désordres vasculaires: Athérosclérose Complications chez les diabétiques Phénomène de Raynaud
Système nerveux : Hémorragie subarachnoïde Vasospasme cérébral

De nombreuses études démontrent une augmentation des concentrations plasmatiques de l'ET dans plusieurs pathologies. Plusieurs chercheurs se sont alors penchés sur la synthèse d'antagonistes : mixtes, sélectifs pour les  $rET_A$  et sélectifs pour les  $rET_B$ . Ceci a par ailleurs, grandement contribué à élucider les diverses implications physiopathologiques des ETs. De plus, ces composés se sont plus d'une fois révélés très bénéfiques dans le traitement de pathologies variées comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale et l'hypertension pulmonaire (Spieker et al., 2001).

Par exemple, en ce qui a trait à l'hypertension artérielle, un traitement par des antagonistes du système ET fait l'objet de plusieurs recherches exhaustives. Ainsi, Cardillo et al., (1999) ont montré que l'utilisation d'antagonistes des  $rET_A$  et des  $rET_B$  bloquent les effets de l'ET chez les hypertendus. En effet, l'antagoniste sélectif de  $ET_A$ , le BQ-123 améliore également la condition de patients hypertendus, alors que le BQ-788 (antagoniste sélectif de  $ET_B$ ) exerce un effet vasoconstricteur chez des sujets normotensifs (Touyz et Schiffrin, 2003). De plus, lorsque des patients souffrant d'hypertension artérielle primaire sont traités au bosentan (antagoniste non sélectif des  $rETs$ ) pour une durée de quatre semaines, une diminution significative de la pression artérielle est observée (Krum et al., 1998; Spieker et al., 2001). La variabilité dans la distribution des récepteurs de l'ET pourrait également contribuer à l'apparition d'hypertension. En effet, on observe une densité de récepteurs plus grande chez les patients caucasiens que dans la population afro-américaine (Hasegawa et al., 1994). De plus, une étude effectuée chez les hypertendus Noirs (sujets présentant une prévalence accrue pour l'hypertension) a démontré une variation dans la distribution des  $rET_B$  entre l'endothélium et le muscle lisse vasculaire, ce qui pourrait conduire à un effet vasoconstricteur global induit par les  $rET_B$  (Touyz et Schiffrin, 2003).

Parallèlement à ces études, une deuxième approche envisagée, consiste en la suppression de la biosynthèse de l'ET-1 en utilisant des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'endothéline. Étant une métalloprotéase, l'ECE peut être inhibée par des chélateurs de métaux (EDTA) et le phosphoramidon. Toutefois, peu ou pas d'inhibition est observée

en présence du thiorphan, du kélatorphan, du captopril, de l'énapril, du E-64 ou de la leupeptine, d'autres inhibiteurs de métalloprotéases (Opgenorth, 1995). De plus, l'efficacité du phosphoramidon semble contradictoire dans certaines études faites sur les animaux (Opgenorth, 1995). Ainsi, plusieurs études ont focalisé sur le développement d'agents sélectifs pouvant bloquer la synthèse de l'endothéline et ceci dans le but d'obtenir des molécules à potentiel thérapeutique pour le traitement de pathologies reliées à l'endothéline (Jeng et al., 2002).

### **1.6 Objectif de recherche**

Des outils diagnostiques et/ou thérapeutiques mieux adaptés aux traitements des différentes maladies associées à l'ET, lesquelles touchent une vaste proportion de la population nord-américaine, sont indispensables pour comprendre le mode d'action de l'ET au niveau moléculaire. L'apport de données supplémentaires contribuera à une meilleure connaissance du mode de fonctionnement de l'ET en plus de contrecarrer ses effets néfastes touchant le système cardiovasculaire, lors d'un déséquilibre. De ce fait, l'expérimentation entreprise consiste à apporter une approche alternative dans le développement de stratégies thérapeutiques. Cette nouvelle approche consiste donc à identifier, à partir d'une séquence aléatoire, un agent pouvant lier spécifiquement l'ET-1 de telle sorte que celui-ci inhiberait sa liaison à ses récepteurs.

Dans le même cadre d'idées, les éléments essentiels à la liaison et à l'activation des récepteurs de l'endothéline, nommés pharmacophores, peuvent être des cibles de choix quant à la déstabilisation du peptide par la liaison d'une molécule étrangère. Les études de structure-activité de l'ET, c'est-à-dire les analyses faites sur la contribution de chaque acide aminé ou sur les caractéristiques physico-chimiques du peptide telles que l'aromaticité, l'hydrophobicité, l'encombrement stérique et les charges électriques, ont démontré l'importance de ces éléments dans l'interaction de l'endothéline à ses récepteurs. Brièvement, l'évaluation de différents segments a entre autres montré que l'extrémité N-terminale de l'endothéline doit être libre. De plus, la portion variable entre les différentes isoformes de l'endothéline, soit les résidus 2 à 7, semble être responsable

de la distinction entre les deux types de récepteurs. Le segment chargé négativement, composé des résidus 8 à 10, et conservé chez les isopeptides démontre également un rôle important puisqu'en bloquant cette section par des fonctions amides, on diminue l'activité biologique de l'endothéline (Nakajima et al., 1989; Opgenorth, 1995). Quant aux deux ponts disulfures, ils seraient importants pour l'activation du récepteur ET<sub>A</sub> mais non pour le récepteur ET<sub>B</sub>. En effet, des analogues linéaires, constitués d'alanines à la place des cystéines, présentent un effet vasoconstricteur équivalent à celui de l'ET-1 sur des préparations tissulaires d'aorte de lapin riche en récepteurs ET<sub>B</sub> (Pelton et Miller, 1991). Ces mêmes analogues sur le récepteur ET<sub>A</sub> se sont révélés inactifs (Pelton et Miller, 1991). Donc, de façon générale, les extrémités amino et carboxy terminales libres, le segment N-terminal ainsi que la section hydrophobe 16-21 sont essentiels à la liaison et à l'activation des deux types de récepteur. Néanmoins, l'affinité de l'endothéline à ses récepteurs dépend également de la géométrie moléculaire des pharmacophores donc des structures secondaire et tertiaire du peptide.

Aucune étude n'a encore fait l'objet d'une thérapie anti-endothéline faisant appel à un agent peptidique capable de bloquer un ou plusieurs pharmacophores essentiels à la liaison de l'ET à ses récepteurs. Il semble donc intéressant d'exploiter cette nouvelle avenue afin d'obtenir une ou plusieurs séquences ayant un pouvoir déstabilisateur et sélectif à l'endothéline. En fait ce dérivé correspondrait en quelque sorte à un mimétique du site de reconnaissance d'un récepteur ou d'un anticorps.

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons exploité la chimie combinatoire ainsi que la biologie moléculaire, deux stratégies populaires pour l'identification de molécules actives dans le domaine thérapeutique. En particulier, nous avons fait appel à une technologie souvent efficace pour identifier les composés peptidiques témoins (*lead compounds*) soit le criblage de banque de phages (*phage display*).

## Chapitre 2 : La technique de présentation sur phage

### 2.1 L'origine de la présentation sur phage

L'expression de peptides ou de protéines à la surface de bactériophages représente une avenue très intéressante pour l'analyse d'interactions entre diverses molécules. L'origine du phage display provient des travaux de George Smith (1985). Il a été en mesure d'exprimer un segment d'une protéine à la surface du bactériophage filamenteux M13. Ainsi, il a fusionné le gène codant pour l'endonucléase EcoRI à la protéine pIII (protéine mineure nécessaire à la formation de la capsid) (Smith, 1985). Une fois la transfection effectuée dans *Escherichia coli* et en utilisant un anticorps polyclonal spécifique à l'endonucléase, Smith a démontré que le phage contenant le gène fusion EcoRI-gIII peut être enrichi de plus de 1000 fois à partir d'un mélange composé de phages de types sauvages (non-liants). Cwirla *et al.* (1990) ont participé au développement de la technologie en créant une librairie d'oligonucléotides utilisant des inserts composés de résidus aléatoires. Dans cette étude, les phages ont été sélectionnés à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique à la région N-terminale de la  $\beta$ -endorphine (YGGF). La plupart des clones sélectionnés exprimaient le motif YG en N-terminal du peptide.

De ces expérimentations émergent deux concepts importants. Premièrement, l'insertion d'une mutation à l'intérieur d'un gène structural d'un virus (si cela ne détruit aucune fonction essentielle conférée par le produit du gène) va entraîner l'expression du peptide mutant à la surface de la particule virale. De ce fait, l'incorporation d'inserts composés d'oligonucléotides aléatoires va engendrer l'expression d'une vaste librairie de peptides (*i.e.*,  $10^8$ ). Deuxièmement, cette technologie produit un lien physique direct entre le phénotype (le peptide exprimé à la surface) et le génotype (ADN codant). C'est-à-dire que chaque molécule exprimée possède une *étiquette* directement liée au segment d'ADN codant cette molécule. (Rowley *et al.*, 2004). Un autre point important associé à cette technique est basé sur le principe de sélection qui ne requiert aucune donnée structurale de la molécule cible.

## 2.2 Les vecteurs

Divers polypeptides ont été exprimés à la surface de virus, de cellules eucaryotes, de bactéries, de même que sur les bactériophages  $\lambda$ , T4, T7, P4 et M13. Les bactériophages (également nommé phages) sont des virus infectant les cellules bactériennes. La plupart des vecteurs utilisés en recherche sont ceux qui infectent la bactérie hôte standard : *Escherichia coli* (*E. coli*) (Smith et Petrenko, 1997).

Les vecteurs d'expression viraux ont la particularité d'exprimer l'ADN étranger en protéine. Ceci en programmant la machinerie de *E.coli* à la synthèse du peptide étranger. La technique de *phage display* diffère des systèmes d'expression conventionnels du fait que la séquence du gène étranger est introduite à l'intérieur du gène codant pour une des protéines de la capsid. Ainsi, la séquence étrangère d'acides aminés est génétiquement fusionnée aux acides aminés endogènes de la protéine de la capsid en formant une protéine hybride. Cet hybride est incorporé dans les particules du phage (virions) avant d'être libéré. Le peptide étranger ou le domaine protéique se retrouve alors exprimé à la surface externe du phage (Smith et Petrenko, 1997).

## 2.3 Le bactériophage T7

Le bactériophage T7 est un membre de la famille des *Podoviridae* de structure icosaédrique formé de particules hexamériques de 60 nm de diamètre. C'est un phage lytique, c'est-à-dire qu'après sa multiplication, il provoque l'éclatement de la cellule hôte pour la libération des virions. Le phage T7 a été isolé comme étant un virus qui infecte particulièrement *E.coli*. Après adsorption, le cycle de croissance est initié par la translocation de l'ADN linéaire dans la cellule hôte. L'ADN du phage T7 est double brin et son génome (39 937pb) contient 56 gènes qui codent pour 59 protéines connues. Ces gènes sont regroupés en trois classes dépendamment de leur nature et du moment de leur expression. Les gènes de classe I sont les premiers qui pénètrent la cellule et par surcroît les premiers transcrits. Ceux-ci dirigent la synthèse des protéines et des enzymes

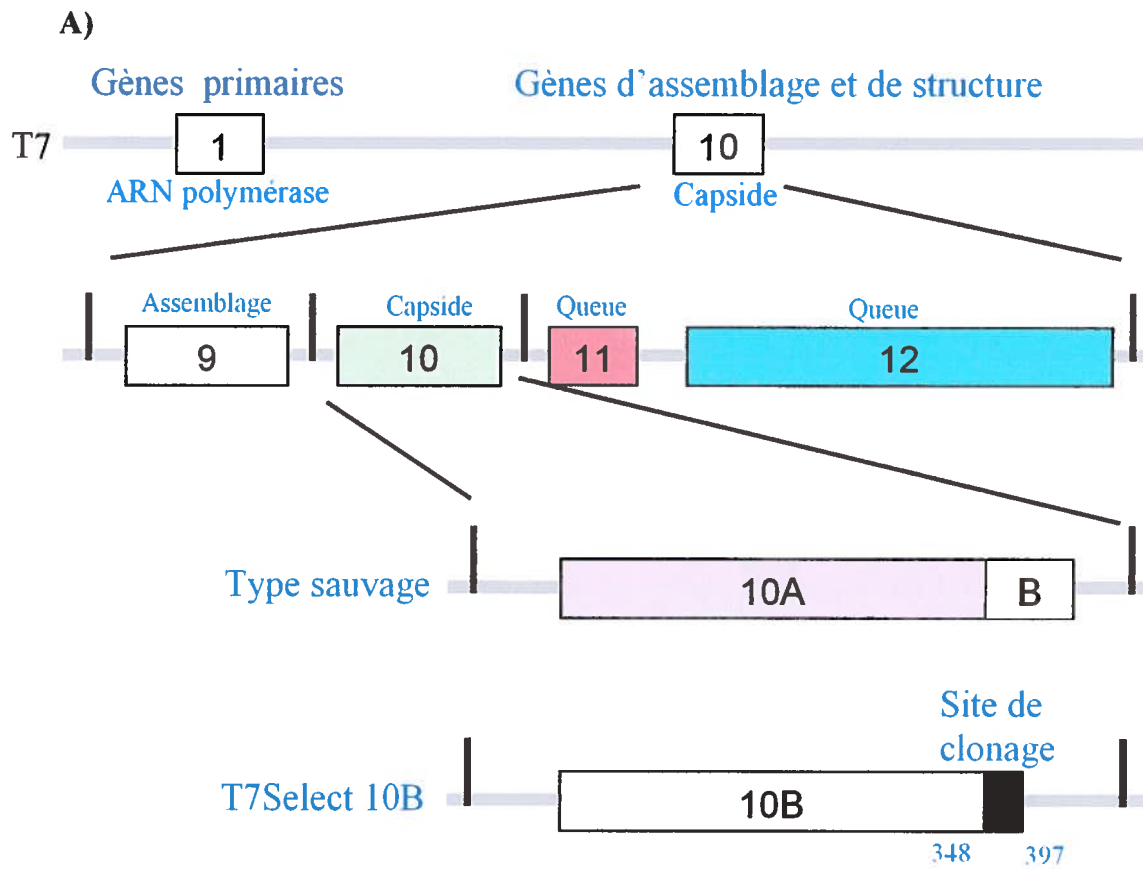


nécessaires à détourner le métabolisme de la cellule hôte et à construire les acides nucléiques viraux. Les gènes de classe II sont responsables de la réplication de l'ADN du phage. Les gènes de la classe III codent pour les particules, leur assemblage et leur maturation. Le système de sélection utilisé, le *T7Select Phage Display System* de Novagen, utilise la capsid du phage T7 pour exprimer les peptides ou protéines à sa surface. La capsid est normalement composée de deux protéines : la protéine 10A (344 a.a.) et la protéine 10B (397 a.a.). Cependant, une capsid fonctionnelle peut être constituée entièrement de la protéine 10A ou de 10B ou une variation dans les ratios des deux protéines (Rosenberg et al., 1996). Ceci suggérerait donc que la capsid du phage T7 s'accommoderait à diverses variations et que la région de la capsid unique à la protéine 10B serait à la surface du phage et pourrait être utilisée pour l'expression de peptides ou protéines (figure 3).

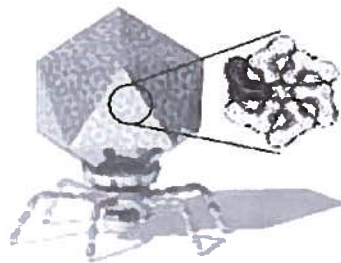
Le vecteur T7, contrairement aux bactériophages filamenteux et  $\lambda$ , possède comme avantages une croissance et une réplication plus rapides. Les plages de lyse (éclaircissement au niveau du tapis bactérien formé après l'éclatement des bactéries) sont formées après 3 heures à 37°C et on obtient une culture de lyse de 1 à 2 heures seulement après l'infection; ce qui diminue grandement le temps requis pour effectuer les tours de croissance nécessaire à la sélection (Rosenberg et al., 1996). De plus, les particules de T7 sont extrêmement robustes en plus d'être stables dans des conditions difficiles qui normalement inactiveraient d'autres phages.

## 2.4 Banque de peptides

Par définition, une banque ou une librairie utilisée en *phage display* est un mélange hétérogène de clones transportant chacun un insert d'ADN étranger. En général, l'insert d'ADN est constitué d'un oligonucléotide dégénéré synthétisé chimiquement par l'ajout de nucléotides provenant d'un mélange (Koscielska, et al., 1998; Smith et Petrenko, 1997). La possibilité de sélectionner des ligands à partir d'une librairie de peptides a créé un intérêt immédiat. Devant cet engouement, il existe maintenant plusieurs librairies peptidiques aléatoires disponibles commercialement.



B)



**Figure 3 : A) Carte génétique du vecteur phagique T7 B) Schéma représentant les structures des particules du phage T7 (tiré de inNovations, 1996)**

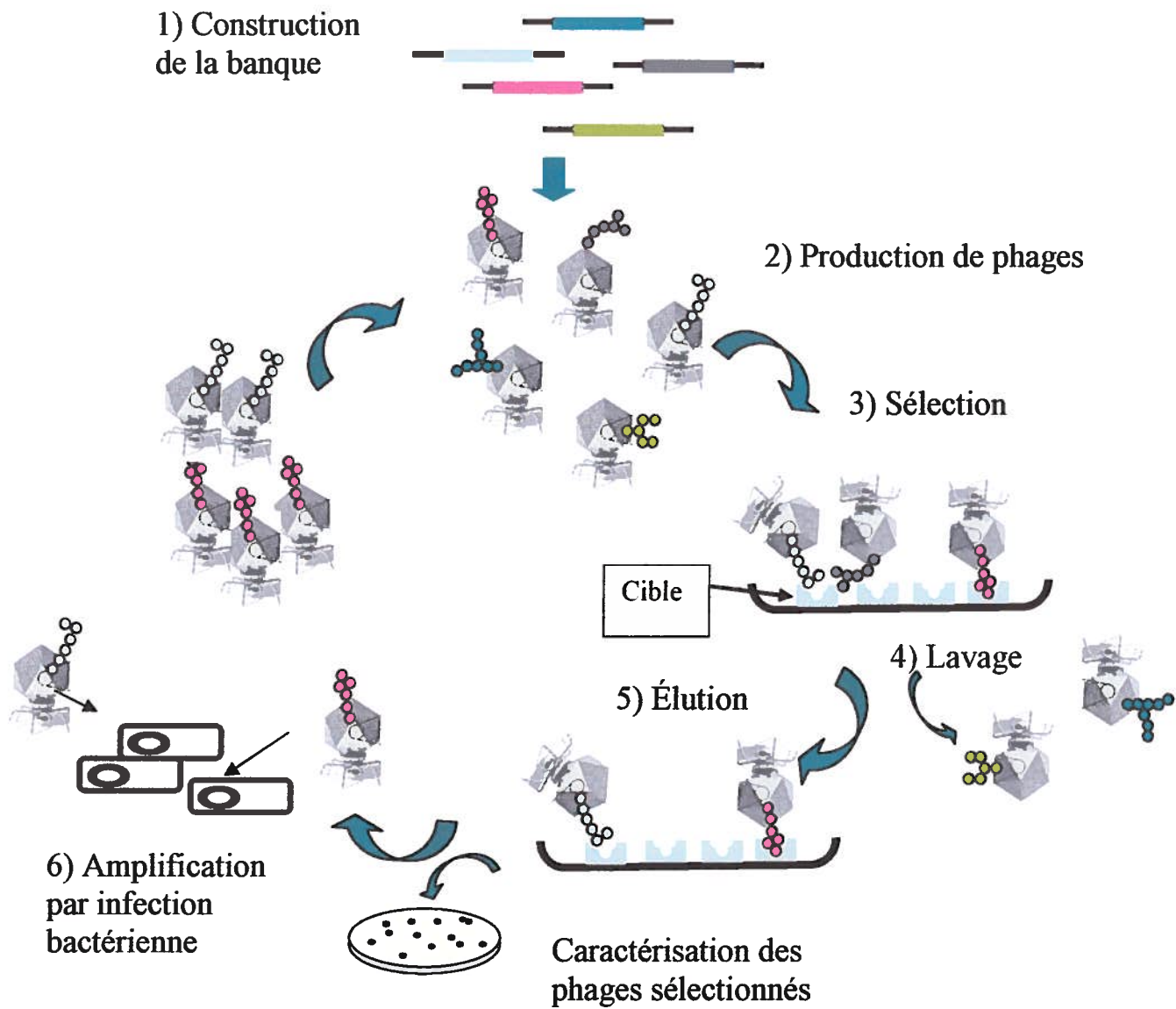
Plusieurs études sont effectuées avec ce type de bibliothèques. Par contre, la maintenance des bibliothèques excédant  $10^8$  clones est problématique pour des raisons de statistiques. De plus, les croissances répétées des phages peuvent biaiser les séquences présentées (Szardenings 2003). Les bibliothèques possédant des cystéines sont généralement préférées parce que les ligands formés sont plus susceptibles à former une structure en solution que les ligands linéaires.

## 2.5 Méthode de criblage

L'obtention d'un peptide cible s'effectue en général par des tours de sélection répétés, appelés méthode de criblage, qui peuvent être décrits par les étapes suivantes : 1) l'isolement des phages via le peptide exprimé sur la capsidie selon une cible déterminée (récepteur, protéine, tissus, organe etc.); 2) l'élimination des clones non spécifiques ou de faible affinité à la cible choisie; 3) la récupération des clones liés et ; 4) l'amplification de ceux-ci avant le prochain tour. Ces étapes sont représentées dans la figure 4.

Le premier tour de sélection est considéré comme étant le plus important puisqu'à partir de cette étape l'élimination de la majorité des clones est effectuée et seuls les clones sélectionnés seront présentés à nouveau à la cible.

Dans cette étude, le ou les peptides désirés vont être obtenus par criblage *in vitro*. La cible d'intérêt peut être une protéine purifiée immobilisée par une interaction chimique ou une liaison non-covalente à la surface d'un support solide (plaque de polystyrène (Smith, 1985), billes de plastique (D'Mello et Howard, 2001) ou paramagnétiques (Fowlkes et al., 1992), membranes de nitrocellulose (Dyson et al., 1995)). Il existe des procédures qui permettent d'attacher une molécule de façon indirecte à un support. Par exemple, par l'ajout d'une molécule de biotine à la protéine cible, celle-ci sera en mesure d'être immobilisée sur un support recouvert de streptavidine ou d'avidine préalablement immobilisée sur support (Smith et Petrenko, 1997).



**Figure 4 : Méthode de criblage par la technique de présentation sur phage: étapes de sélection**

Suite à l'incubation de la librairie avec la molécule cible, une série de lavages est effectuée avant la récupération des phages capturés. Cette dernière étape est généralement réalisée par une élution.

Selon la cible utilisée ou la méthode de sélection employée, la récupération des phages par élution peut varier. Toutefois, par criblage *in vitro*, l'élution peut être non spécifique c'est-à-dire que l'on déstabilise la liaison peptide-cible sans tenir compte de leur spécificité et ceci en exploitant la résistance des phages aux tampons acides, alcalins, aux détergents ou même aux protéases (Smith et Petrenko, 1997).

Une élution dite spécifique vise à capturer les phages qui lient la cible à son site de liaison sans libérer les autres phages qui lient cette même cible pour d'autres raisons telles qu'une interaction au moyen de contaminants ou à l'aide d'une protéine utilisée pour bloquer les sites d'absorption non spécifiques. D'une certaine manière, il n'est pas nécessaire d'éluer les phages pour les récupérer. Il est possible d'ajouter des cellules bactériennes hôtes fraîches au support solide pour permettre l'infection cellulaire et la propagation des phages. Par contre le rendement obtenu par cette procédure est relativement faible. Ensuite, les phages capturés sont amplifiés en infectant une culture bactérienne fraîche et en la maintenant pour obtenir une progéniture phagique plus grande. Éventuellement, les phages isolés sont étudiés pour déterminer les peptides responsables de la liaison.

## 2.6 Applications générales

Initialement, les librairies peptidiques de phages ont été conçues comme outil lors d'identification rapide d'épitopes en les présentant à des anticorps monoclonaux ou polyclonaux (par exemple ceux d'un patient). Ainsi, une caractérisation rapide des déterminants antigéniques pour une maladie quelconque permettrait de simplifier le choix de peptides dans l'étude de nouveaux agents thérapeutiques ou de vaccins (dela Cruz et al., 1988). Maintenant, ces outils sont utilisés comme sources de ligands

spécifiques pour des applications biotechnologiques telles que la recherche d'antagonistes de récepteurs (Doobar et Winter, 1994). L'utilisation de ces banques peptidiques permet non seulement l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques, mais également peut être utilisée dans la caractérisation d'un site de liaison spécifique (Chen et al., 1996). Il sera possible de comparer la séquence obtenue avec celle du ligand naturel, ce qui pourrait être bénéfique pour l'identification des acides aminés importants à la liaison. Cet outil peut également être employé à l'identification de ligand naturel inconnu pour un récepteur donné (Katz, 1997).

### 3 Matériels et méthodes

Le système de *phage display* T7Select, incluant le vecteur T7Select 10-3b, la culture bactérienne hôte E.coli BLT5403 ainsi que les extraits pour l'encapsulation ont été achetés chez Novagen (Madison, WI).

Les réactifs constituant le milieu de culture LB (Luria Bertani) soit le bacto-tryptone, l'extrait de levure et le NaCl provenaient de la compagnie Fisher Scientifique (Montréal, QC). Les bouteilles de culture cellulaire ainsi que les plats de Pétri provenaient de la compagnie Sarsted (Montréal, QC).

#### 3.1 Construction de la librairie

Le vecteur d'expression T7Select 10-3b (Novagen, Madison, WI) a été utilisé pour exprimer les peptides aléatoires à l'extrémité carboxy-terminale des protéines 10B de la capsid du phage. Ce vecteur permet l'expression de 5 à 15 copies du peptide. L'insert a été généré à partir de l'oligonucléotide suivant (produit par Sheldon Biotech, Université McGill,  $x_9GAATTCtggaggagg(NNG/T)_5(NNN)_{15}tagaAAGCTT_{x_{13}}$  où N est une représentation équimolaire des quatre nucléotides et x, les nucléotides rajoutés aux extrémités 3' et 5' pour augmenter l'efficacité de la digestion de restriction. La séquence aléatoire est constituée de 20 acides aminés. Pour limiter la synthèse de trop courtes séquences, 5 copies du triplet NNG/T ont été ajoutées pour minimiser dans la séquence l'apparition de codons stop. Cette procédure utilise 32 triplets de nucléotides pouvant former les 20 acides aminés augmentant ainsi la fréquence relative des résidus avec un seul codon stop au lieu de trois. Ceci permet de favoriser la formation de clones à séquences complètes et productifs (Pini et al., 2004). L'oligonucléotide est également constitué des sites de restriction de EcoRI à l'extrémité 5' et HindIII du côté 3'. Ces sites sont nécessaires pour l'incorporation de l'insert dans le vecteur.

Dans le but d'obtenir un insert double brin, la réaction a été réalisée par la technique de PCR en utilisant l'amorce *sens* 5'-tatgtaaggGAATTCtggtggaggt-3' et l'amorce *anti-sens* 5'-gtcaacgctcccagcAAGCTTcta-3'. La réaction a été effectuée en incorporant les éléments suivants soit : l'insert, les amorces, les dNTPs et 2,5 unités de l'enzyme Taq 2000 DNA polymerase de Stratagene (Texas, E-U). Parallèlement à tout cela, un oligonucléotide correspondant à la séquence de ET-1 a été synthétisé afin de valider la méthode. Les 35 cycles ont été effectués avec le four PCR System 2400 de Perkin Elmer (Midland, ON). Pour chaque cycle, la dénaturation de 30 secondes a été réalisée à 94°C, l'appariement des amorces d'une minute s'est effectué à 62°C et l'élongation d'une durée d'une minute a été effectuée à 72°C. Les produits de la réaction ont été purifiés selon le guide de purification de réactions de PCR de QIAGEN (Mississauga, ON). L'élution est réalisée en incorporant de l'eau ultrapure (Invitogen, Burlington, ON) au centre de la colonne. Ainsi, un volume d'élution de 30  $\mu$ l a été récolté pour chaque échantillon. Ces échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% après une migration de 1h 30 à 80V à l'aide d'un appareil *System Sub-cell GT agarose gel* de BioRad (Hercules, CA). L'évaluation de la longueur du fragment a été réalisée avec une échelle de paires de bases allant de 100 à 1000 pb de BioRAD. La visualisation des bandes d'ADN a été faite à l'aide du Fluor-S MultiImager (BioRAD) en colorant préalablement le gel au bromure d'éthidium (0,5  $\mu$ g/mL de TBE).

### 3.2 Vérification de l'insert

Pour s'assurer de l'expression des peptides à la surface des phages T7, il faut vérifier que l'insert contient les sites de restriction EcoRI et HindIII nécessaires à leur incorporation dans le vecteur. Pour ce faire, nous avons procédé à l'intégration de l'insert (correspondant à ET-1 et à la librairie) dans un vecteur bactérien soit le plasmide pUC18 (Invitrogen; Burlington, ON) Il a été possible de procéder séparément à la digestion enzymatique de l'insert et conformément aux directives du fabricant Promega. Environ 1  $\mu$ g d'ADN a été digéré avec 5 unités d'enzyme. Cette réaction a été effectuée à 37°C pendant 1h. Le plasmide pUC18 a également subi une digestion. Les produits de



digestion ont été purifiés sur mini colonne selon les directives contenues dans la trousse de purification des réactions de PCR de QIAGEN. Par la suite, les produits ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose tel que décrit précédemment.

### 3.2.1 Construction du plasmide pUC18/ET-1 et pUC18/librairie

Les bandes d'ADN correspondant à l'insert et au vecteur doublement digéré, ont été découpées du gel. Cette procédure a nécessité l'aide du transilluminateur Foto/Prep I de Bio/Can Scientific (Nepean ON). Le protocole fourni par la trousse de QIAGEN (QIAquick gel extraction kit) a permis l'extraction de l'ADN de l'agarose.

La quantité d'insert pour permettre la réaction de ligation a été calculée selon la formule retrouvée dans le manuel d'instruction de Novagen:

$$\text{ng d'insert} = \frac{\text{ng vecteur} \times \text{taille en kilobases de l'insert} \times 3}{\text{taille en kilobases du vecteur hôte}}$$

La quantité de vecteur a été fixée à 70 ng. La réaction de ligation, composée du vecteur pUC18 linéarisé, de l'insert /librairie aléatoire (13 ng), d'eau et de tampon, a été effectuée avec une unité de l'ADN ligase du phage T4 (Promega; Nepean ON). La réaction s'est déroulée à la température de la pièce pour une durée de 3 heures. Par la suite, cette réaction a été arrêtée en chauffant les échantillons à 70°C pendant 10 minutes. Ensuite, nous avons procédé à la transformation bactérienne avec les cellules TurcoCells, soit les cellules de *Escherichia coli* chimiquement compétentes de Gene Therapy Systems Inc (San Diego, CA). Une fois les cellules bactériennes dégelées, elles ont été transformées avec le plasmide pUC18/librairie (50 µg) pour une période de 30 minutes, tout en étant conservé sur glace. Un choc thermique a été effectué à une température de 42°C pour 45 secondes. Du milieu de culture Luria Bertani (LB) composé de bacto-tryptone, d'extraits de levure et de NaCl a été rajouté au mélange et celui-ci a été incubé 1 h à 37°C. Cette étape est nécessaire pour la sélection des bactéries transformées par le plasmide en permettant l'expression de leur résistance à l'ampicilline. Un volume de 100

$\mu\text{L}$  a été inoculé sur des plats de Pétri d'agar/milieu LB additionné d'ampicilline (Sigma, Mississauga, ON) à 0,5 mg/mL. Le plasmide pUC19 (Novagen; Madison, WI) a été utilisé comme contrôle positif afin de vérifier l'efficacité de la transformation bactérienne. Pour s'assurer de l'intégralité des inserts, il est nécessaire de les séquencer. La construction plasmidique pUC/ET-1 a été utilisée à type d'exemple. Ainsi, une colonie bactérienne blanche ayant poussée sur une gélose supplémentée d'ampicilline et correspondant à une bactérie possédant le plasmide pUC/ET-1 a été purifiée par la trousse de purification d'ADN plasmidique de QIAGEN (Hispeed plasmid Midiprep; Mississauga, On). À l'aide d'un spectrophotomètre UV (PowerWaveX de Biotek Instruments, inc. Winooski, VT) Il a été possible de mesurer la densité optique à 260, 280 et 320 nm de l'échantillon afin de quantifier l'ADN plasmidique purifié. Ensuite l'échantillon a été envoyé au laboratoire Sheldon Biotech (CA), pour y être séquencé.

### 3.3 La présentation sur phage: méthode de sélection

#### 3.3.1 Ligation de l'insert avec le vecteur phagique T7

Le fragment d'ADN correspondant à la librairie (0,06 pmole) a été inséré par ligation (3h à la température pièce) au vecteur T7Select (0,02 pmole; 0,5  $\mu\text{g}$ ) en plus des composants suivants : 10 mM d'adénosine triphosphate (ATP; de la compagnie Sigma), 100 mM de dithiothréitol (DTT; de la compagnie Fisher scientifique) et une unité de l'ADN ligase du phage T4 (Promega; Nepean ON ) pour un volume final de 5  $\mu\text{L}$ . En se fiant aux recommandations du manufacturier, l'encapsulation *in vitro* de la construction T7Select-librairie a été réalisée en l'incubant avec 25  $\mu\text{L}$  de l'extrait d'encapsulation (T7 Packaging Extracts de Novagen) pour une durée de 2 h à 22°C. La réaction a été arrêtée avec du milieu LB. La complexité de la librairie, c'est-à-dire le nombre de phages, a été déterminé en calculant le titre de celle-ci par la technique de *plaque assay*. Ainsi, suite à la préparation d'une série de dilutions des phages recombinants (allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-6}$  dans du milieu LB), il a été possible de mettre dans un tube 100  $\mu\text{L}$  de chacune des dilutions

en plus de 250  $\mu\text{L}$  de bactérie E.coli BLT5403 ( $\text{D.O.}_{600}=1.0$ ). Le tube a été complété à 3 mL avec de l'agarose de surface (top agarose) préalablement fondu (45-50°C). Le contenu est versé sur un plat de Pétri d'agar/milieu LB additionné d'ampicilline (0,5 mg/mL). Les plages de lyse formées ont été comptées. Le titre décrit comme étant le nombre en unité de plaque formée (pfu : plaque forming unit) par unité de volume a été calculé selon la formule suivante : le nombre de plages de lyse  $\times$  par le facteur de dilution  $\times 10$  (en considérant la dilution de départ, soit le 100  $\mu\text{L}$  versé sur le plat de Pétri).

### 3.3.2 Amplification

Avant de procéder au premier tour de sélection, une première étape d'amplification de la librairie est nécessaire. Cette amplification s'effectue par infection bactérienne en utilisant un rapport de 100-1000 cellules pour chaque pfu. Le nombre de cellules est déterminé par la formule suivante (tirée du guide d'instruction de Novagen):

$$\text{nb de cellules} = \frac{\text{D.O.}_{600} \times (2 \times 10^8 \text{ cellules/mL}) \times \text{volume de la culture}}{0,5 \text{ D.O.}_{600}}$$

La culture bactérienne E.coli BLT5403 ( $\text{D.O.}_{600}=0,5-1,0$ ) infectée avec le nombre de pfu approprié, est incubée à 37°C pendant 1-3 h jusqu'à ce que la lyse soit observée. La clarification du lysat s'effectue par centrifugation à 8000 $\times$ g pour 10 min. Une fois le surnageant récupéré, les phages sont précipités afin de déterminer le titre.

### 3.3.3 Précipitation des phages

Suite à l'amplification par infection bactérienne, les débris cellulaires sont éliminés par la méthode de précipitation des phages au polyéthylène glycol (PEG). Ainsi, après la clarification du lysat, succédant l'étape d'amplification, le surnageant ajouté de 10 mL de PEG (PM 8000) est incubé sur glace pour un minimum de 2h. Par la suite le mélange est

centrifugé et le culot est solubilisé dans 1 mL d'une solution tampon STE : 1 M Tris (pH 8), 0,5 M EDTA (pH 8), 5 M NaCl (Kay et al.,1996).

### 3.3.4 Tours de sélection

L'enrichissement des phages exposant des peptides pouvant lier l'ET-1 a été accompli par la méthode de *biopanning*. Au premier tour de sélection, le fond d'une plaque de 96 puits (Nunc, MaxiSorp surface) a été couvert avec 1  $\mu\text{g}$  de ET-1 solubilisée dans du tampon Tris salin (0,05M Tris.NaCl; pH 7,5) pour une période de 24 h à 4°C. Suite à plusieurs lavages avec du tampon Tris salin incluant 0,5 % de Tween-20 (TBST 1X), la plaque a été bloquée avec une solution de 2% BSA. Après une incubation minimum de 1h à la température pièce, la plaque a été de nouveau lavée à 5 reprises avec de l'eau déionisée.

Un total de  $1 \times 10^{10}$  pfu de la librairie amplifiée (100  $\mu\text{L}$ ) a été déposé sur l'ET-1 fixée puis, incubé à la température de la pièce pour 30 min. Plusieurs lavages (5) ont été effectués afin d'éliminer les phages qui ne se sont pas liés. Les phages fixés ont été élués en incubant pendant 20 min, 200  $\mu\text{L}$  d'une solution 1% dodécylsulfate de sodium (SDS) dans du tampon TBS-Tween 1X. Une fois l'éluion terminée, les phages ont été récupérés et amplifiés à partir d'une culture BLT5403 en phase mi-log pour une durée de 1-3 h. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation, comme décrit précédemment. Les phages amplifiés ont été sélectionnés une nouvelle fois sur la même cible.

Après le 4<sup>ième</sup> tour de sélection-amplification, les plages de lyses ont été récupérées individuellement à l'aide d'un embout de pipette stérile et déposées dans un tube contenant 100  $\mu\text{L}$  de 10 mM EDTA pH 8,0. Le mélange a été vortexé puis chauffé à 65°C pour 10 min. Une fois à la température de la pièce le tout a été centrifugé à 14 000  $\times\text{g}$  pour 3 min à l'aide d'une centrifugeuse de type Centrifuge MC2 (Sarsted; Mtl, QC). Par la suite, le surnageant a été récupéré. Pour l'analyse de la séquence exprimée à la

surface des phages, un segment d'ADN a été amplifié par la technique de PCR selon le protocole du manufacturier (Novagen).

Brièvement, la réaction de PCR a été effectuée en incorporant dans le mélange : 2  $\mu\text{L}$  du lysat phagique, 10  $\mu\text{L}$  du tampon de ligation 10X, 1  $\mu\text{L}$  de chaque amorce (amorce *sens* T7select: 5'-GGAGCTGTCGTATTCCAGTC-3' et amorce *anti-sens* : 5'-AACCCCTCAAGACCCGTTTTA-3') à 5 pmole/  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  de chaque dNTP (10 mM) et 2,5 unités de l'enzyme Taq 2000 DNA polymerase de Stratagene. Le mélange a été complété à 50  $\mu\text{L}$  avec de l'eau déionisée. Un démarrage à chaud de 5 min à 94° a été établi avant de procéder aux 35 cycles de dénaturation, d'élongation et d'appariement selon le patron suivant : 94°C pour 50 sec, 50°C pour 1 min et 72°C pour 1 min. Une extension finale à 72°C a été effectuée pendant 6 min.

Les produits de la réaction ont été purifiés selon les directives du guide de purification de réactions de PCR de QIAGEN. L'analyse confirmant leur poids moléculaire a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose comme décrit auparavant

### **3.4 Séquençage des clones**

Un total de 36 clones choisis de façon aléatoire a été envoyé à la compagnie DNA Landmarks (St-Jean-sur-Richelieu, QC) pour permettre leur séquençage. La réaction a été effectuée avec les mêmes amorces que celles utilisées lors de la réaction de PCR.

### **3.5 Synthèse des peptides**

#### *Réactifs et solvants utilisés pour la synthèse*

Tous les acides aminés ont été achetés de la compagnie Chem Impex International (Wood Dale, IL) ou de la compagnie Albatross Chem inc. (Montréal, QC).

La résine de Wang (1,2 méq/g) (Chem Impex International; Wood Dale, IL) a été utilisée comme phase solide. L'agent de couplage, hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino)-phosphonium (BOP) a été obtenu de la compagnie Matrix Innovation, (Montréal, QC). Les solvants de qualité ACS, soit le dichlorométhane (DCM), le diméthylformamide (DMF), l'éther éthylique et l'acétonitrile (ACN) provenaient de Fisher Scientific, (Montréal, QC). L'acide trifluoroacétique (TFA) a été acheté de la compagnie Halocarbon Products Corporation (River Edge, NJ) et la diisopropyléthylamine (DIEA) de la compagnie Albatross (Montréal, QC).

#### *Principe et protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc*

Le principe de la synthèse sur phase solide repose sur l'addition successive d'acides aminés lorsque liés à une matrice réticulée insoluble. Ainsi, chaque incorporation comprend dans l'ordre les étapes suivantes : la déprotection de l'amine terminale, le couplage, les lavages et la vérification du couplage. À cet effet, la synthèse a été effectuée selon la méthodologie de chimie Fmoc à l'aide d'un synthétiseur manuel à réacteurs multiples. Ces réacteurs confectionnés de façon artisanale sont formés de verre et permettent la filtration des solvants grâce à un disque de verre fritté. La résine de Wang a été utilisée comme support solide. Celle-ci permet de produire, suite au clivage du peptide, une extrémité C-terminale acide libre. Un gramme de cette résine a été déposé dans un réacteur préalablement silanisé avec une solution à 10% v/v dichlorodiméthylsilane/toluène. L'addition de chaque acide aminé a été réalisée selon les étapes décrites dans le tableau III.

Suite au retrait du groupement protecteur Fmoc (fluorénylméthoxycarbonyle) de l'amine alpha de l'acide aminé fixé par un lien covalent à la résine, plusieurs lavages sont effectués afin d'éliminer les excès de réactifs. Par la suite, l'insertion d'un nouvel acide aminé (Fmoc-AA) est réalisée et après des lavages multiples, la vérification de la réaction

de couplage est réalisée avec un test colorimétrique à la ninhydrine, nommé test de Kaiser. En effet, la ninhydrine réagit avec les amines libres pour former un complexe de Rutherford de couleur bleu foncé (Kaiser et al., 1970).

#### *Clivage du peptide à la résine*

Le clivage des peptides attachés à la résine Wang s'effectue sous condition acide à l'aide du TFA. Ceci permet également le retrait des groupements protecteurs portés sur les chaînes latérales de certains résidus. Ainsi, le mélange réactionnel suivant a permis le clivage : 92% TFA, 2,5% d'éthanedithiol, 2,5% H<sub>2</sub>O et 3% de phénol. Suite à une période de 2h avec agitation et sous atmosphère d'argon, la solution de clivage est filtrée et le TFA évaporé sous vide. Le peptide est finalement précipité à l'éther éthylique, séché et conservé à -20°C.

#### *Purification et caractérisation des peptides*

La purification des nouveaux peptides synthétiques nommés *endothelin binding peptides* (EBP), soit les peptides liant l'endothéline, a été réalisée sur un système préparatif de chromatographie liquide à haute performance (CLHP), sur phase inverse, comme décrit par Brkovic et al. (2003). Le modèle Waters Prep LC500A couplé à un détecteur d'absorbance modèle 441 (230 nm) a été utilisé. Le matériel (environ 150 mg) a d'une part été dissous dans environ 200 mL d'eau puis injecté sur une colonne Jupiter C<sub>18</sub> (15 µm; 300 Å) de 250 mm x 21,20 mm de Phenomenex (Torrance, CA). Un débit de 40 mL/min a été maintenu et l'élution a été effectuée au moyen d'un gradient linéaire de 0 à 40% ACN, 0,06% TFA dans l'eau, pour une période de 2 heures.

Les fractions recueillies ont été analysées par un système CLHP analytique Beckman (Fullerton, CA), au moyen d'une colonne en phase inverse Jupiter C<sub>18</sub> (4 µm; 90 Å) de

250 mm x 4,6 mm de la compagnie Phenomenex. L'élution, sous un débit de 1 mL/min, a été effectuée à l'aide d'un gradient linéaire de 0 à 30%ACN, 0,06% TFA aqueux, en 30 minutes. Les fractions pures ont été regroupées puis évaporées et lyophilisées pour être ensuite conservées à -20°C.

La caractérisation des peptides a été finalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time-of-Flight) au moyen d'un spectromètre Voyager-DE de Applied Biosystem (Foster City, CA). Les conditions d'analyse ont été ajustées pour le laser à 337 nm et à 25 kV pour le voltage. L'acquisition a été effectuée à 20 pulses/sec. L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque a été utilisé comme matrice pour l'analyse des peptides EBP-4, EBP-6 et EBP-12. Tandis que l'inclusion des peptides EBP-29 et EBP-31 a été effectuée avec l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique comme matrice.



**Tableau III : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc**

ÉTAPES	RÉACTIFS <sup>a</sup>	TEMPS DE RÉACTION
Déprotection <sup>b</sup>	20% PIP/DMF	1×2 min
	20% PIP/DMF	1×15 min
Lavages	DMF	2×2 min
	Éthanol	1×2 min
	DCM	2×2 min
Couplage	3 éq. de Fmoc-AA-COOH	1×45 min <sup>c</sup>
	3 éq. de BOP	
	3éq. de DIEA	
Lavage	DMF	2×2 min
	DCM <sup>d</sup>	2×2 min
Vérification du couplage	Test de Kaiser	1×5 min

<sup>a</sup> Les volumes de solvant utilisés à chaque étape sont d'environ 10 mL/g de résine.

<sup>b</sup> La déprotection de Glu est effectuée en une seule étape de 10 min.

<sup>c</sup> Le temps de couplage d'un acide aminé peut varier selon le test de Kaiser confirmant la présence d'amines libres.

<sup>d</sup> Entre les couplages, les peptides-résines sont conservés dans du DCM.

### 3.6 Évaluation de la liaison des EBPs

#### 3.6.1 Marquage radioactif de l'ET-1

L'ET-1 a été marquée à l'aide de la chloramine-T (CAT) (Fisher scientifique, Montréal, QC) et de l'iode-125 ( $\text{Na}^{125}\text{I}$ ) acheté chez GE Biosciences, par fraction de 1 mCi (10  $\mu\text{L}$ ).

L'évaluation de la liaison des différents EBPs a été déterminée d'une part grâce à des analyses utilisant la radioactivité. L'incorporation de  $^{125}\text{I}$  s'est faite de façon directe sur le résidu tyrosine de l'ET-1. La méthode utilisée s'inspire des études de Hussain et al., (1995) et de Tessier et al. (2005). Tout d'abord, l'ET-1 humaine a été dissoute dans du tampon phosphate (0,05 M; pH 7,4) à raison de 2 mg/mL, puis 50  $\mu\text{L}$  de cette solution ont été mis en présence de 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (GE Biosciences, Montréal, QC). La réaction a débuté par l'addition de 15  $\mu\text{L}$  de CAT (1 mg/mL) dans le tampon phosphate (0,05 M; pH 7,4) et après 60 secondes de forte agitation, celle-ci a été arrêtée par l'ajout de 150  $\mu\text{L}$  de bisulfite de sodium (Sigma, Mississauga, ON) (2 mg/mL dans du tampon phosphate; 0,05 M; pH 7,4).

Le peptide monoiodé a été séparé du diiodé et du non marqué par CLHP analytique sur phase inverse en utilisant un appareil Waters 600E System et une colonne Jupiter  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ , 300 Å; 250 mm×4 mm). Le matériel radioactif a été élué à partir d'un gradient linéaire de 20% ACN dans 0,06% TFA aqueux à 60% ACN dans 0,06% TFA aqueux. Tout en conservant un débit constant à 1 mL/min, des fractions de 500  $\mu\text{L}$  ont été recueillies et la radioactivité de celles-ci a été mesurée au moyen d'un compteur gamma de Packard (Downers Grove, IL). La fraction correspondant à la plus haute lecture a été diluée 1 :10 avec du tampon phosphate et conservée à -20°C. L'activité spécifique du traceur a été évaluée à 2200 Ci/m mole.

diluée 1 :10 avec du tampon phosphate et conservée à -20°C. L'activité spécifique du traceur a été évaluée à 2200 Ci/m mole.

### 3.6.2 Évaluation de l'affinité des EBPs

#### *Courbes de compétition peptide versus peptide*

D'une part, 1 µg de chaque EBPs a été déposé dans chaque puits d'une plaque de polystyrène Nunc (96 puits/Immunoabsorbent Nunc de Nalgene) dans un volume final de 100 µL de tampon TBS 1X. Suite à une période d'incubation de 24 h à 4°C, les plaques ont été lavées 3 fois avec du tampon TBS 1X puis bloquées avec une solution de 2%BSA (bovin serum albumin) pour au moins 60 min. Ensuite, les plaques ont été lavées 5 fois à l'eau déionisée et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

L'évaluation de l'affinité des différents EBPs envers l'ET-1 a été déterminée par compétition en évaluant la liaison de l'ET-1 radiomarqué (1 nM) en présence d'une concentration croissante de ET-1 froide allant de  $10^{-7}$  à  $10^{-4}$  M (dissous dans du tampon de liaison) sur les EBPs fixés sur la plaque. Le mélange a été incubé 1h à la température de la pièce. L'incubation terminée, les plaques ont été lavées au TBS 1X et 100 µL de NaOH ont été ajoutés dans chaque puits afin de faire décoller les cellules. Après une période de 10 min, le tout a été récolté et la radioactivité mesurée au compteur gamma. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 3.02.

#### *Résonance plasmonique de surface*

La technique de résonance plasmonique de surface (RPS) permet de mesurer les interactions biomoléculaires à un moment précis et ceci lorsqu'une molécule est fixée sur une surface dite sensorielle et que l'autre, libre en solution, circule autour. Cette technique détecte les changements de masse *i.e.* liaison = augmentation de masse. Ainsi, les cinq étapes suivantes sont entreprises pour effectuer les diverses analyses (figure 5):

- a) l'immobilisation: la liaison de l'ET-1 biotinylée aux molécules de streptavidine immobilisées sur la plaque;
- b) l'association: liaison de la molécule au ligand: liaison des EBPs à l'ET-1
- c) l'équilibre: le taux d'association et de dissociation est le même;
- d) la dissociation: la molécule se libère du ligand sous la pression exercée par le débit;
- e) la régénération: le retour à la ligne de base.

La technique de RPS permet d'avoir des informations sur la spécificité de la liaison, la concentration (soit la quantité de molécules présentes et actives), la cinétique (taux d'association et dissociation) et l'affinité. L'association et la dissociation de la molécule est mesurée en unités et représentées sous forme d'un graphique appelé sensogramme.

La surface sensorielle utilisée, nommée *Sensor chip SA* (de la compagnie BIACORE; Uppsala, Suède) possède déjà les molécules de streptavidine immobilisées. Ceci permet de capturer les ligands biotinylés. Plusieurs applications peuvent être entreprises grâce à cette technologie par le fait qu'elle combine une forte capacité de liaison et d'affinité ( $K_D \gg 10^{-15}$  M), elle est reproductible en plus d'être sensible aux agents chimiques.

L'ET-1 a été biotinylée en N-terminal par l'ajout d'un groupement de biotine ONp (ester de biotine p-nitrophényle) lors de sa synthèse en phase solide. Trois équivalents de biotine ONp dissous dans du DMF, ont servi pour le couplage.

Les analyses de liaison ont été mesurées au moyen d'un appareil Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suède).

L'ET-1 a été immobilisée *in situ* par une liaison avec les molécules de streptavidine liées de façon covalente à une matrice de dextran hydrophile carboxyméthylée recouvrant les plaques sensorielles (Sensor Chip SA). L'ET-1 biotinylée a été diluée dans un tampon acétate 10mM (pH 5,0) à une concentration finale de 0,5 mg/mL. La saturation de la plaque ainsi que la stabilité de l'ET-1 biotinylée ont été vérifiées par des injections de NaOH. La ligne de base a été établie à un débit continu de tampon HBS (10 mM

HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v) de surfactant P20, pH 7,4) sur la plaque pour 1-2h. Les échantillons (volume total de 20  $\mu\text{L}$ ) ont été automatiquement injectés dans l'appareil à différentes concentrations (100, 200 et 400  $\mu\text{M}$ ) sous un débit de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Toutes les données ont été collectées à 25°C, avec un débit constant de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  de tampon HBS.

### 3.7 Évaluation de l'activité inhibitrice des EBPs

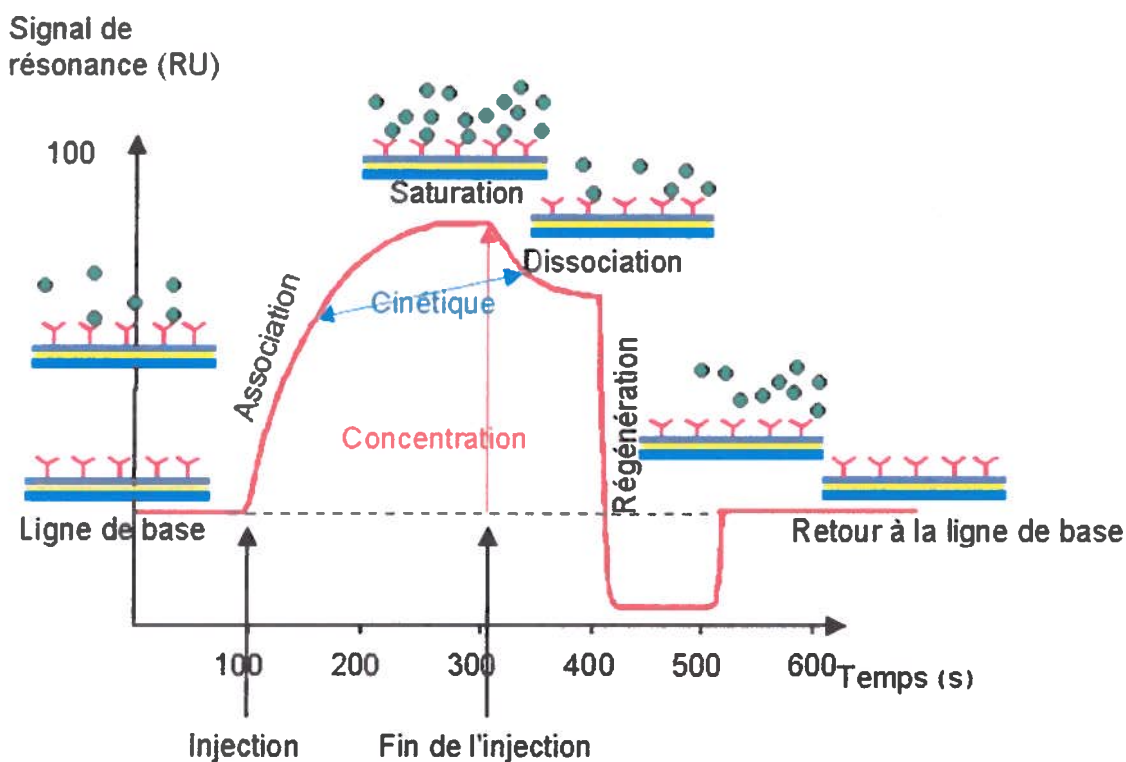
#### 3.7.1 Essais de liaison : Études sur l'inhibition de l'ET-1 à ses récepteurs

Les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO : Chinese Hamster Ovary) surexprimant de façon stable le récepteur hET<sub>A</sub> ou hET<sub>B</sub>, suite à un clonage du gène de chaque récepteur, ont été fournies par Euroscreen (Bruxelles, Belgique). Celles-ci ont été mises en incubation à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> dans un milieu de culture HAM-F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418 (généticine), 100 U/mL de pénicilline, 100  $\mu\text{g}$  de streptomycine et 5  $\mu\text{L}$  d'amphotéricine B. Ces produits proviennent de la compagnie Aldrich (Mississauga, ON).

Il est important de déterminer l'activité inhibitrice des EBPs envers l'ET-1. Premièrement, des tests de liaison ont été effectués afin de déterminer la capacité des différents EBPs à empêcher la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs. Sommairement, le jour précédent, les cellules CHO-K1 surexprimant le récepteur hET<sub>A</sub> ou hET<sub>B</sub>, ont été déposées sur une plaque de 24 puits en polystyrène à raison de 150 000 cellules par puits. Les cellules ont été incubées à 37°C dans un volume final de 500  $\mu\text{L}$  de milieu de culture HAM-F12. Par la suite, les plaques ont subi deux lavages successifs avec du tampon de lavage composé de 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> et 100 mM NaCl.

Préalablement, une concentration fixe de 10<sup>-11</sup> M ET-1 radiomarquée a été incubée en présence de concentrations croissantes de EBP ou du neuropeptide Y (à titre de contrôle) allant de 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-4</sup> M, pendant 1 h à température de la pièce. Les mélanges peptidiques ont été déposés sur les cellules puis incubés à 4°C pour 16 h dans un volume final de 500

$\mu\text{L}$  de tampon de liaison (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  et 100 mM NaCl, 0,01% BSA, 0,01% d'inhibiteurs de protéases). Suite à l'incubation, les cellules ont été lavées et subséquemment solubilisées avec une solution de NaOH 1N avant de mesurer la liaison au moyen d'un compteur gamma.



**Figure 5 : Exemple d'un sensogramme représentant les 5 étapes d'une analyse par la technique de résonance plasmonique de surface : l'immobilisation, l'association, l'équilibre, la dissociation et la régénération.**

### 3.7.2 Tests Pharmacologiques : Études sur l'activité biologique de l'ET-1

La liaison d'un EBP entraînerait probablement une modification au niveau de l'activité biologique de l'ET-1. Par conséquent, la contraction induite par l'ET-1 préalablement incubée 1h avec les différents EBPs a été mesurée sur des préparations d'anneaux d'aorte thoracique de rat. Ainsi, des rats Sprague-Dawley mâles d'environ 250-300g de la compagnie Charles Rivers (St-Constant, QC) ont été anesthésiés au Somnotol (0,1 mg/g) (CDMV, St-Hyacinthe, QC). Une fois les rats saignés par rupture de la veine cave, l'aorte thoracique a été prélevée et placée dans un tampon de Krebs (NaCl 120 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, glucose 5 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 2,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM). L'aorte est par la suite nettoyée délicatement de son tissu conjonctif de même que l'endothélium tapissant l'intérieur. Des anneaux de 4 mm ont été coupés et installés dans un bain à organe de 5 mL sous une tension de 1g. Les bains sont remplis de tampon oxygéné avec un mélange gazeux de 5% CO<sub>2</sub> et de 95% O<sub>2</sub> et maintenus à 37°C. L'enregistrement des contractions a été effectué à l'aide de transducteurs de force de modèle FT03 provenant de Grass (Quincy, MA) reliés à un polygraphe Grass 7E. Avant la prise des mesures, une étape d'équilibrage de 1h est nécessaire. La contractilité des anneaux a été évaluée par l'ajout de 80 mM de KCl (Fisher Scientifique; Nepean, ON).

Ensuite, l'activité inhibitrice de chaque peptide a été mesurée en effectuant des courbes concentration-réponse de l'ET-1 seule ou en présence d'une forte concentration de chaque EBP (10<sup>-4</sup> M). Ces courbes de concentration-réponse ont été réalisées pour chaque peptide par l'addition cumulative du peptide à des concentrations variant de 3x10<sup>-9</sup> à 10<sup>-6</sup> M. Avant l'injection, l'ET-1 a été incubée pendant 1 h avec chaque EBP.

## 4 Résultats

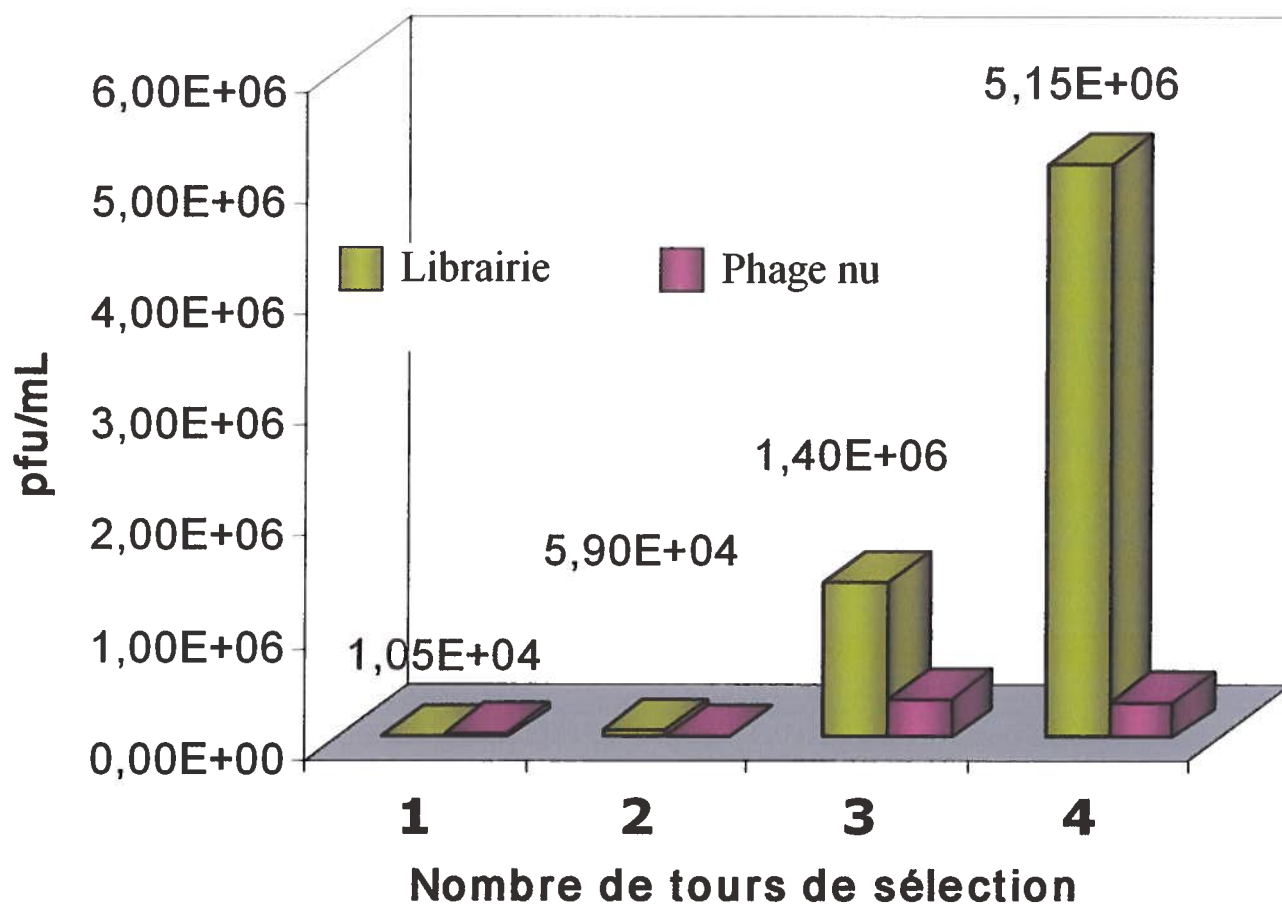
### 4.1 Construction de la librairie

Le deuxième brin de l'oligonucléotide codant pour la librairie aléatoire a été synthétisé par PCR, ce qui a donné un fragment de 110 pb. Par la suite, ce fragment a été digéré par les endonucléases EcoRI et HindIII. La vérification de ces procédés a été réalisée par électrophorèse. À partir de cet insert, il a été possible de construire des phages T7 recombinants exprimant une séquence peptidique fusionnée à une protéine 10B de leur capsid. La technique de *plaque assay* a permis de déterminer le nombre de recombinants primaires générés après la réaction d'encapsulation soit  $3 \times 10^7$  pfu/mL. L'infection des phages T7 a été initiée par l'attachement des fibres de leur queue à la surface des cellules bactériennes de E.coli BLT 5403. Par la suite, cette librairie a été sujette à une première étape d'amplification ce qui a permis d'obtenir le titre de  $1 \times 10^{11}$  pfu/mL.

### 4.2 Criblage des phages-peptides contre l'ET-1

Suite à l'exposition de la banque peptidique à l'ET-1, les phages capturés ont été élués avec du tampon TBST 1%SDS puis amplifiés par infection bactérienne. Cette population de phages a été de nouveau sélectionnée pour être enrichie pendant trois autres tours, à l'occurrence de  $10^{10}$  pfu de librairie amplifiée/ tour. À chaque tour de sélection, un échantillon a servi à la détermination du rendement. Ainsi, le nombre de phages pouvant lier l'ET-1 (avant son amplification) est représenté dans la figure 6. Ces données démontrent une augmentation des phages liés à chaque tour allant de  $1,05 \times 10^4$  pfu/mL à  $5,15 \times 10^6$  pfu/mL.





**Figure 6 : Représentation des phages liant l'ET-1 via le peptide exprimé à leur surface versus des phages nus (contrôle) après 4 tours de sélection.** L'incubation des phages (nus et ceux exprimant des peptides) sur la plaque contenant l'ET-1 immobilisée a été effectuée à la température de la pièce pour un minimum de 1h. Par la suite, les phages ont été élués et purifiés par une précipitation au PEG. La détermination du nombre de pfu a été réalisée par la technique de *plaque assay*.

### 4.3 Séquençage

À la fin de la sélection, 36 clones ont été isolés aléatoirement à partir de la méthode de criblage effectuée. Le séquençage a permis de dévoiler 12 séquences de peptides (Tableau IV). Visiblement, certaines homologues de séquences sont observées parmi les clones. Ainsi, deux segments distincts ressortent des clones choisis c'est-à-dire, la portion FASMWSLGA partagée par les peptides P1, P2 et P3 et la portion PWQ, retrouvée dans les séquences des peptides P4, P5 et P6. Le tableau V représente une infime partie de la séquence du vecteur T1 Select 10b sans l'insert selon les différents cadre de lecture et ceci à partir de la méthionine 346. Ainsi, les peptides comprenant les segments suivant : S L R P H S S N et A C G R T R V T S retrouvés à la fin des peptides P1, P2 ainsi que P6, P7, P9 et P10 respectivement, semblent être formés à la suite de biais rencontrés lors des étapes de criblage et d'amplification.

Afin de vérifier si les séquences obtenues correspondent à un peptide, un segment d'une protéine déjà connue ou à une partie des rETs, une recherche a été effectuée par BLAST. Parmi ces séquences présentées dans le tableau IV, aucune ne possède d'homologie avec des peptides ou protéines connues.

Quant à la détermination des résidus pouvant être responsables de l'affinité des peptides envers l'ET-1, une analyse d'alignement multiple a été réalisée. Le tableau VI présente trois groupes consensus identifiés par les résidus soulignés. Le groupe A est composé de 5 clones et est caractérisé par le motif SIS. Deux peptides de ce groupe, P7 et P10 partagent entre eux 3 autres résidus pour former le motif LXXFXXSISXXXA. De même, entre les peptides P9 et P10, un autre motif est identifié et représenté par VSISXF. Ainsi, l'apport des clones P7, P9 et P10 suggère plutôt un motif plus long soit, LXXFXVSISXFXXA. Quant au groupe B, celui-ci est caractérisé par le motif ALXS. Ce motif provient de l'alignement du peptide P11 avec P7 qui est également présent dans le groupe A. Le motif PWQLXE, du groupe C, provient du rapprochement de la séquence PWQ des peptides P4, P5 et P6 (également retrouvée dans le groupe A) et de la séquence LXE des peptides P6 et P12. En regard des motifs et de la fréquence des différentes séquences, 5 clones nommés *endothelin binding peptide* (EBP) ont été choisis : LECF (4

aa : EBP-4), TVALHS (6 aa : EBP-6), PWQWTKAVPSPI (12 aa : EBP-12),  
FASMWSLGGANPCIASISTFPRSLRPHSSN (29 aa : EBP-29) et  
SGWAALVSVFKDSISPTRPARLEACGRTRVTS (31 aa : EBP-31).

#### 4.4 Synthèse des EBPs

La synthèse des peptides liant l'ET (EBP) a été effectuée sur phase solide selon la chimie Fmoc. Le taux de substitution du premier acide aminé avec la résine Wang a été évalué à 1 mmole/g. Un total de 1g de résine pour chaque peptide a été utilisé, l'échelle de synthèse a donc été établie à 1 mmole.

Suite au clivage des peptides de la résine, ceux-ci ont subi une étape de purification sur CLHP préparative. Chaque produit majoritaire a été caractérisé par CLHP analytique. La pureté des produits purifiés a été évaluée à >90%. Au moyen d'analyses de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF il a été possible d'obtenir le poids moléculaire des peptides EBP. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII.

**Tableau IV : Séquences des peptides obtenues après criblage.**

	<b>Séquence des peptides</b>	<b>Fréquence</b>	<b>Nom</b>
P1	FASMWSLGANPCIASI IFFPR <b>SLRPHSSN</b>	2/36	
P2	FASMWSLGANPCIASISTFPR <b>SLRPHSSN</b>	7/36	EBP-29
P3	FASMWSLGAILASLP	1/36	
P4	PWQWT	1/36	
P5	PWQWTKAVPSPI	5/36	EBP-12
P6	PWQLDEGGSISHLIYSYIGTLE <b>ACGRTRVTS</b>	1/36	
P7	SGWAALVSFKDSISPTRPARLE <b>ACGRTRVTS</b>	4/36	EBP-31
P8	SGWAALVSFKDSISPTRPAR	1/36	
P9	DGVSFSQFLPGLIVCCPPANLE <b>ACGRTRVTS</b>	1/36	
P10	LLRCFEVVSILGFVRAVVSrvLE <b>ACGRTRVTS</b>	1/36	
P11	TVALHS	8/36	EBP-6
P12	LCEF	4/36	EBP-4

**Tableau V : Séquences du vecteur T7Select 10-3B à partir de la méthionine -346.**


---

*Séquences déterminées selon les trois cadres de lecture*

---

**1er cadre de lecture: 5' > 3'**

**MLGDPNSPAGISRELVDKLA A ALE Stop**

**2e cadre de lecture : 5' > 3'**

**C SGIRILLQGYPGSSST**SLRPHSSN** Stop**

**3e cadre de lecture: 5' > 3'**

**ARGSEFSCRDIPGARRQ**ACGRTRVTS** Stop**

---

**Tableau VI: Analyses des séquences d'acides aminés provenant des clones sélectionnés**

---

*Alignements des clones sélectionnés*

---

	P3	FASMWSLGAILASLP
A)	P1	FASMWSL <span style="color: green;">GANPCIASIIFFPRSLRPHSSN</span>
	P2	FASMWSL <span style="color: green;">GANPCIASISTFPRSLRPHSSN</span>
	P6	<span style="color: green;">PWQLDEGG</span> SISHLIYSYIGTLEACGRTRVTS
	P7	SGWAAL <span style="color: green;">V</span> SFKD <span style="color: green;">S</span> ISPTRPARLEACGRTRVTS
	P10	LLRCFEV <span style="color: green;">S</span> ILGFVRAVVS <span style="color: green;">R</span> VLEACGRTRVTS
	P9	DGVSFSQFLPGLIVCCPPANLEACGRTRVTS
	Motif	<span style="color: blue;">LXXFXV</span> <span style="color: green; text-decoration: underline;">SIS</span> <span style="color: blue;">XFXXA</span>
B)	P7	SGWAAL <span style="color: green;">V</span> SFKD <span style="color: green;">S</span> ISPTRPARLEACGRTRVTS
	P11	TVALHS
	Motif	<span style="color: blue;">ALX</span> <span style="color: green; text-decoration: underline;">SXXX</span> <span style="color: blue;">SIS</span>
C)	P4	<span style="color: green; text-decoration: underline;">PWQWT</span>
	P5	<span style="color: green; text-decoration: underline;">PWQWT</span> KAVPSPI
	P6	<span style="color: green; text-decoration: underline;">PWQLDEGG</span> SISHLIYSYIGTLEACGRTRVTS
	P12	L <span style="color: green; text-decoration: underline;">C</span> EF
	Motif	<span style="color: blue;">PWQLX</span> <span style="color: green; text-decoration: underline;">EXXS</span> <span style="color: blue;">SIS</span>

---

**Tableau VII Résultats des analyses par spectrométrie de masse des peptides EBPs**

Peptide	Spectrométrie de masse MALDI -TOF	
	Poids moléculaire (Da)	
	expérimental	théorique
EBP-4	511	510
EBP-6	627	627
EBP-12	1410	1410
EBP-29	3135	3135
EBP-31	3322	3320

## Section II : Évaluation de la liaison des EBPs

### *Évaluation de l'affinité des EBPs*

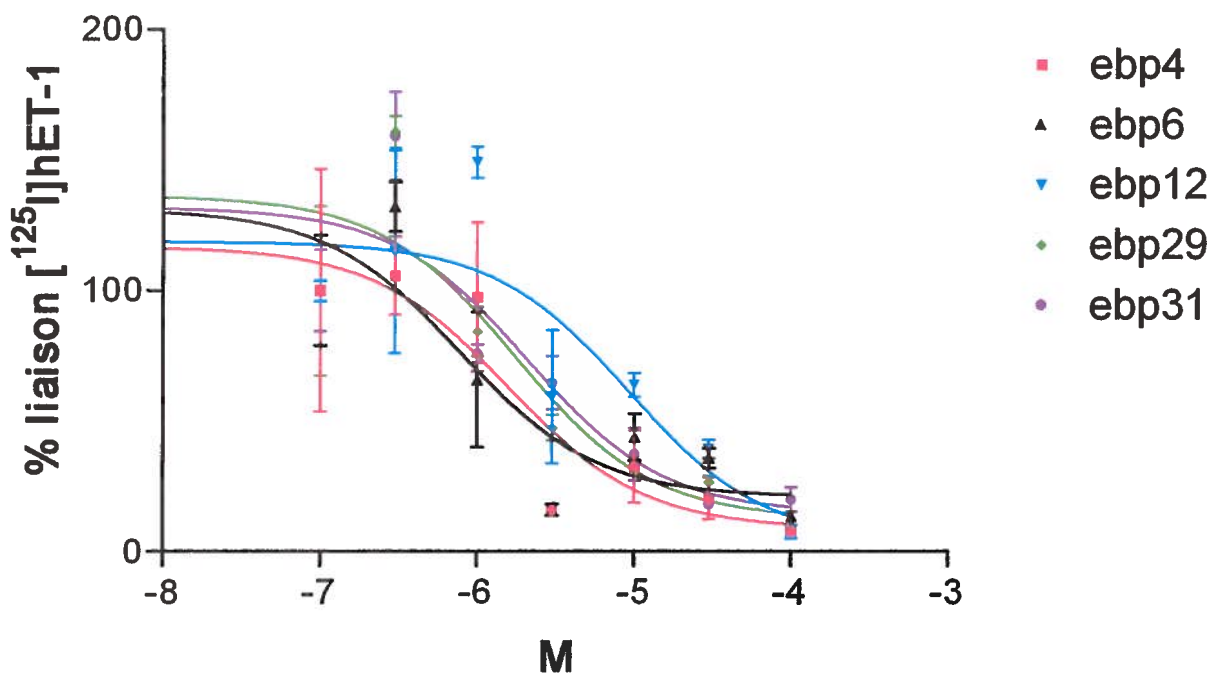
#### 4.5 Études de compétition

Pour tester l'interaction des séquences peptidiques identifiées, des analyses de liaison par compétition ont été réalisées. Cette procédure impliquait l'iodation de l'ET-1 à l'iode-125 à l'aide de la chloramine-T.

L'affinité des EBPs envers l'ET-1 a été évaluée par l'addition d'une quantité fixe de [Tyr(<sup>125</sup>I)<sup>13</sup>] ET-1 (10<sup>-9</sup> M) incubée avec des quantités croissantes de ET-1 froide (allant de 10<sup>-7</sup> à 10<sup>-4</sup>M). Les IC<sub>50</sub> des ligands, c'est-à-dire la concentration de ligands requise pour inhiber 50% de la liaison de l'ET-1 aux EBPs, sont présentées dans le tableau VIII. Les résultats proviennent d'une moyenne de trois essais effectués indépendamment. Une IC<sub>50</sub> allant de 10<sup>-7</sup> à 10<sup>-6</sup> M a été calculée pour les différents EBPs.

**Tableau VIII : Affinité de liaison de [Tyr(<sup>125</sup>I)<sup>13</sup>] ET-1 sur les EBPs**

Peptide	IC <sub>50</sub> ET-1 (M)
EBP-4	1,59 x 10 <sup>-6</sup>
EBP-6	7,88 x 10 <sup>-7</sup>
EBP-12	9,30 x 10 <sup>-6</sup>
EBP-29	1,76 x 10 <sup>-6</sup>
EBP-31	2,11 x 10 <sup>-6</sup>

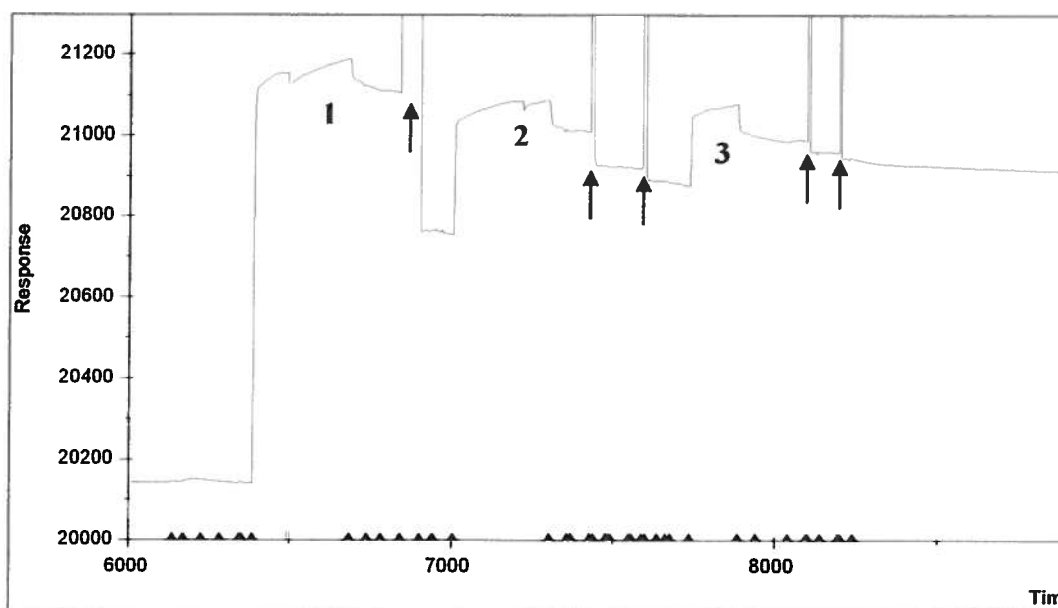


**Figure 7 : Courbes de compétition de liaison de  $[\text{Tyr}(^{125}\text{I})^{13}]\text{ET-1}$  versus différentes concentrations croissantes de ET-1 par rapport aux EBPs. L'incubation des concentrations croissantes d'ET-1 a été effectuée à 4°C pour 24 heures en présence de 1 nM d'ET-1 radiomarquée, sur une plaque de 96 puits contenant les EBPs immobilisés.**

## Évaluation de l'affinité des EBPs par résonance plasmonique de surface

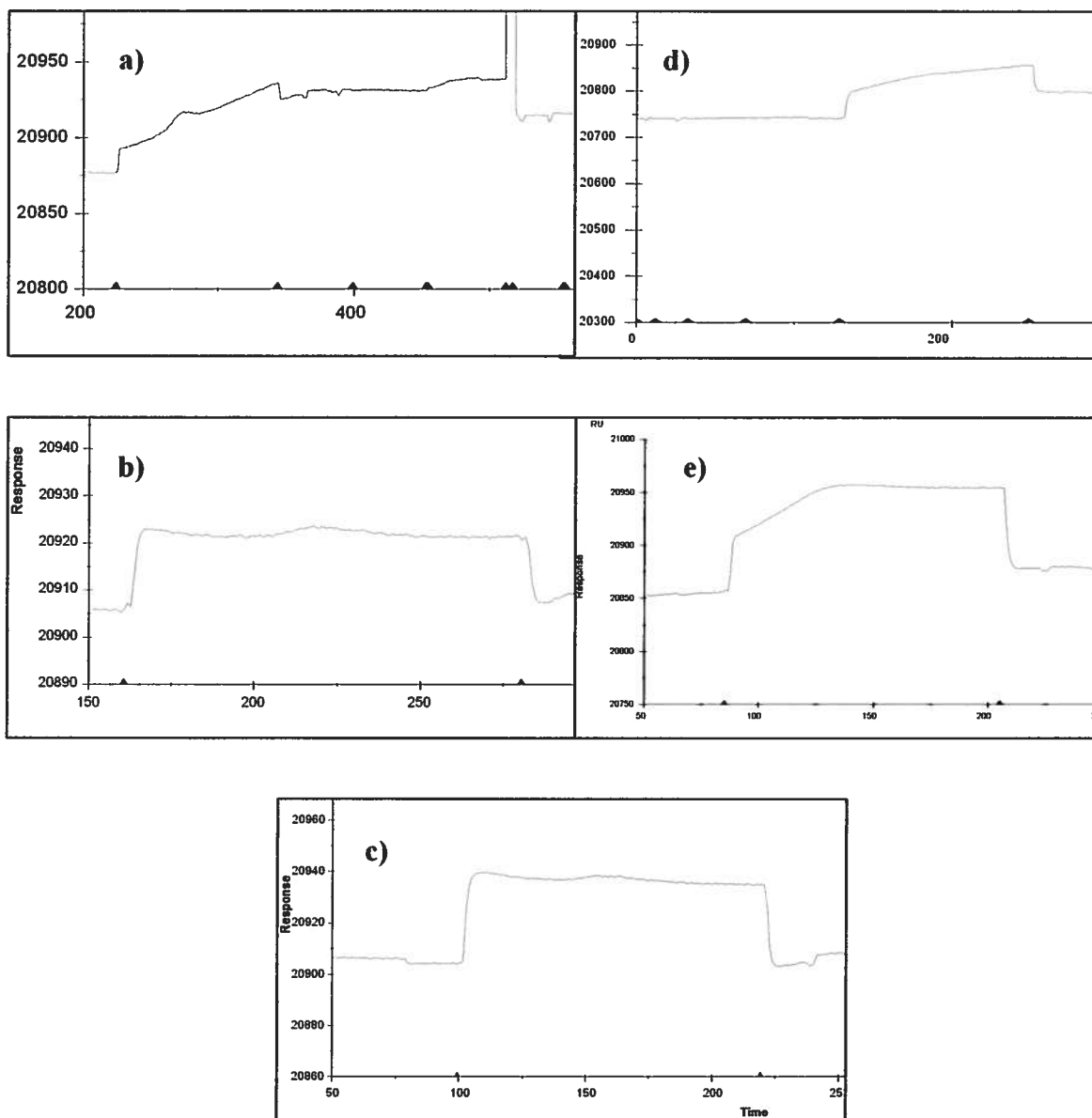
La liaison de l'ET-1 biotinylée aux molécules de streptavidine lors des analyses par résonance plasmonique de surface est représentée par le sensogramme de la figure 8. Des injections de NaOH ont permis de vérifier la saturation de la plaque et la stabilité de l'ET-1 biotinylée liée à la plaque.

L'interaction des peptides EBPs avec l'ET-1 a été testée en utilisant un biosenseur basé sur la résonance plasmonique de surface. Les sensogrammes de chaque peptide n'ont présenté aucune liaison spécifique que cela soit à 100 ou 400  $\mu\text{M}$ . En effet, aucune courbe d'association et de dissociation n'a été enregistrée.



**Figure 8 :** Sensogramme représentant la liaison de l'ET-1 biotinylée à la plaque Sensor Chip. La saturation de la plaque s'est effectuée par trois injections de ET-1 biotinylée (représentées par les numéros 1, 2 et 3). Les flèches indiquent les injections de NaOH.





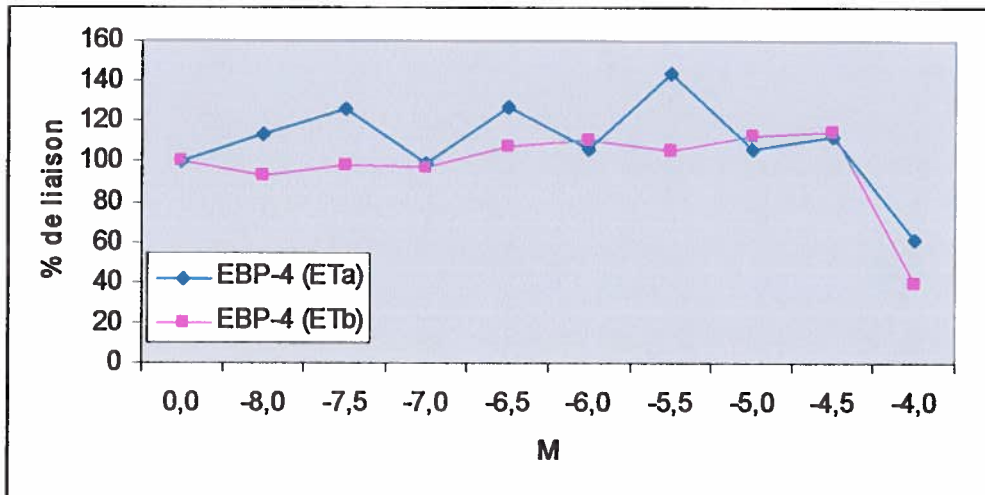
**Figure 9 : Sensogrammes représentant la liaison des peptides a) EBP-4, b) EBP-6, c) EBP-12, d) EBP-29 et e) EBP-31 à l'ET-1. Les analyses obtenues correspondent à une concentration de 100  $\mu$ M, à partir d'une injection de 20  $\mu$ L à 10  $\mu$ L /min.**

## *Évaluation de l'activité inhibitrice des EBP*

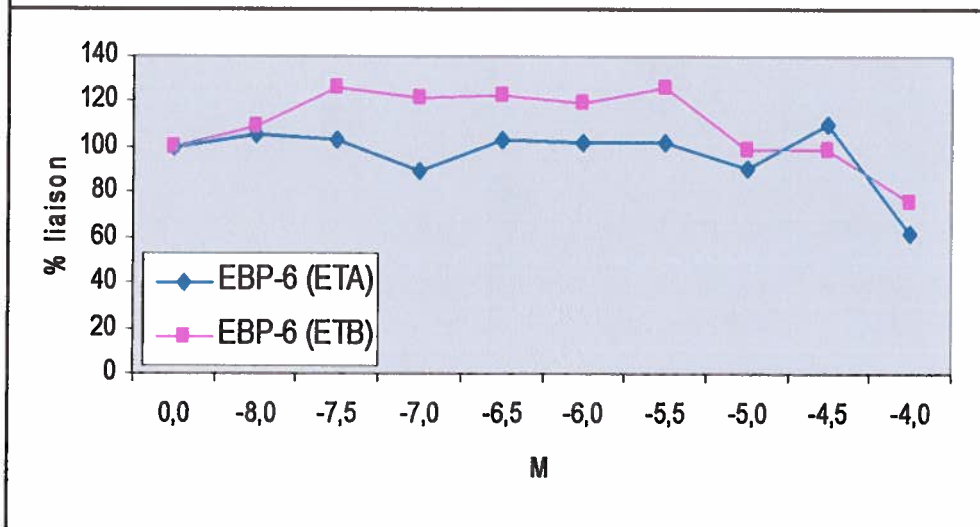
### **Évaluation de l'inhibition de la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs**

Le pouvoir inhibiteur des EBP face à la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs a été étudié par l'évaluation de l'affinité de l'ET-1 iodée, en présence de concentrations croissantes de EBP pour les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Ainsi, une incubation préalable d'une heure entre les EBP et l'ET-1 radiomarquée a été effectuée avant de présenter ce complexe à une plaque de 12 puits contenant des cellules CHO adhérentes surexprimant les récepteurs ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>. Les courbes d'inhibition sont représentées à la figure 10. Une faible action inhibitrice est observée à de fortes concentrations soit à 10<sup>-4</sup>M pour les peptides EBP-4, EBP-6 et EBP-12. Aucun effet significatif n'a été observé pour les peptides EBP-29 et EBP-31. Comme prévu, aucune inhibition n'a été décelée avec le peptide contrôle, le neuropeptide Y.

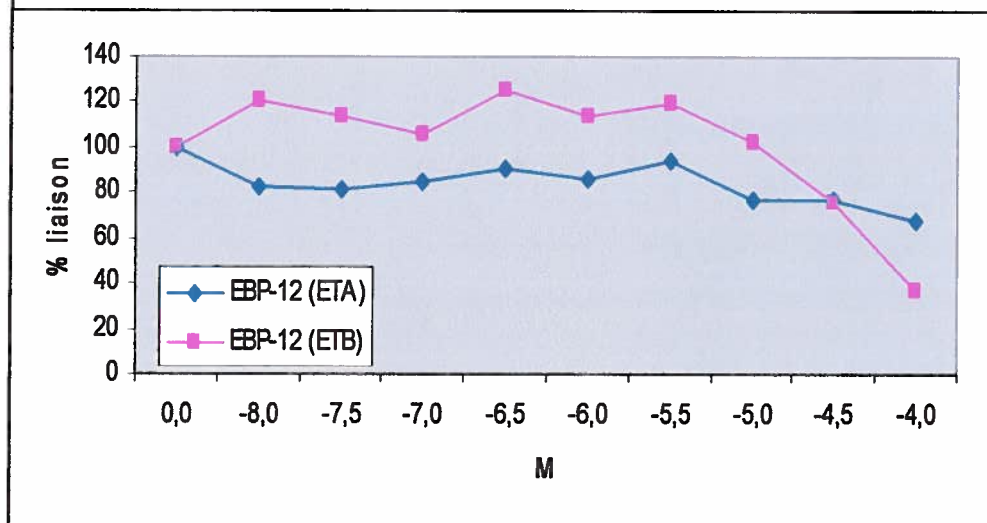
a)

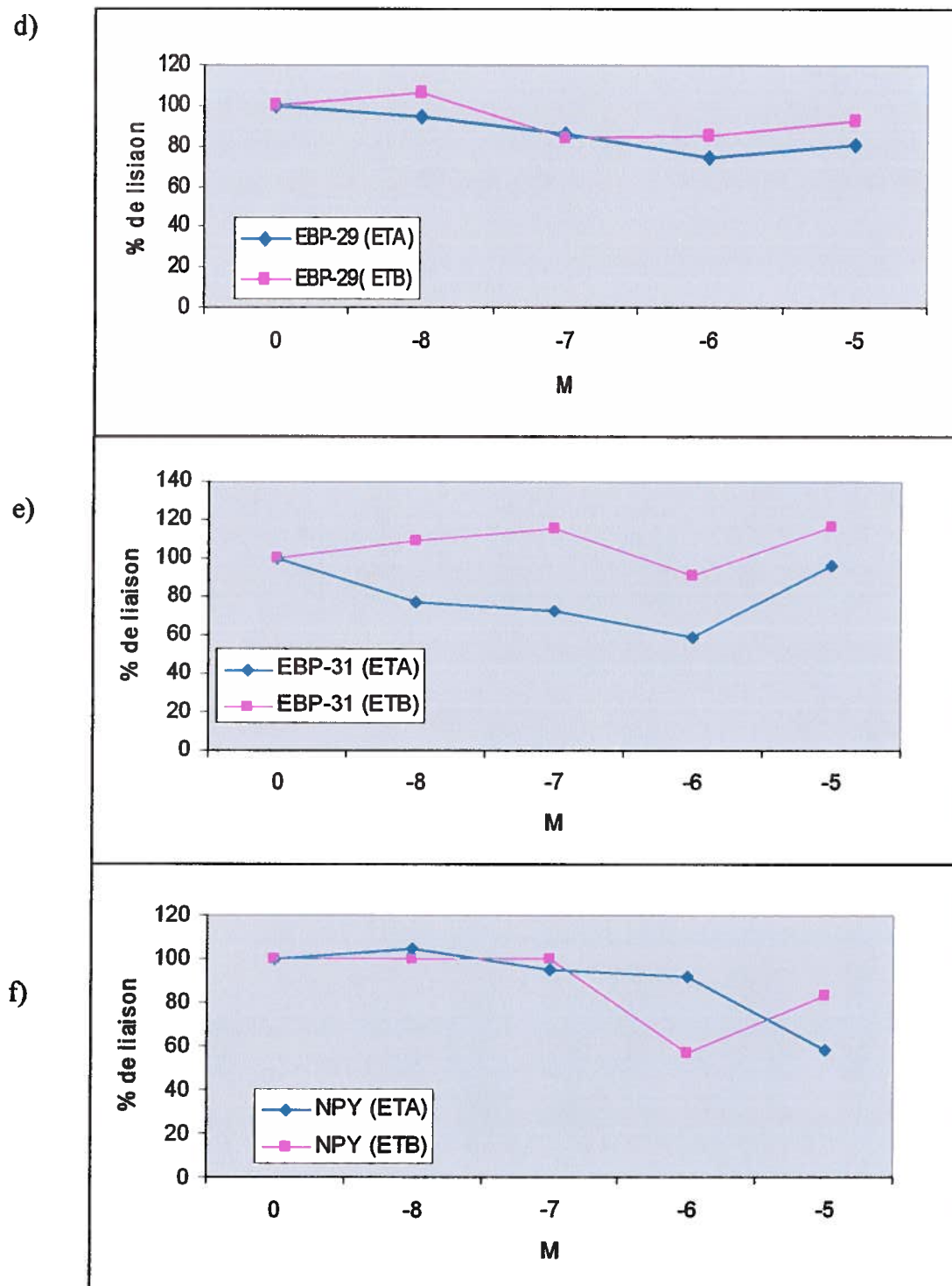


b)



c)

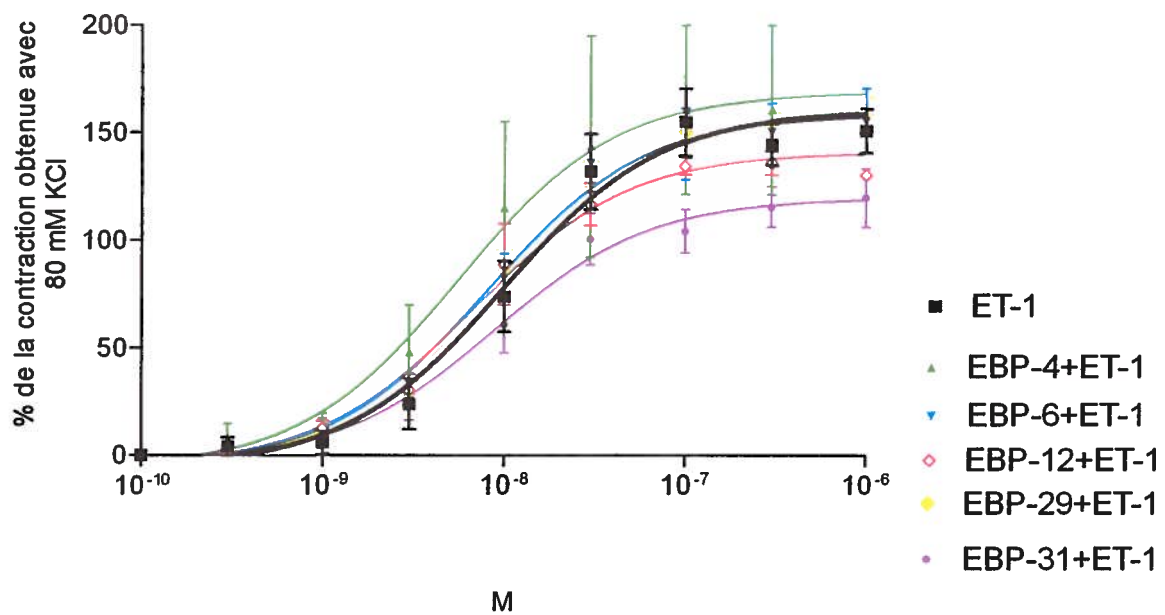




**Figure 10: Courbes d'inhibition de la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs  $ET_A$  ou  $ET_B$  par l'action des EBPs. a) Inhibition par EBP-4, b) Inhibition par EBP-6, c) Inhibition par EBP-12, d) Inhibition par EBP-29, e) Inhibition par EBP-31, f) contrôle : Inhibition par NPY. (n = 3)**

**Tests pharmacologiques : Inhibition de l'activité biologique de l'ET-1**

L'obtention des courbes de concentration-réponse de l'activité biologique de l'ET-1, suite à l'ajout d'une forte concentration ( $10^{-4}$  M) des EBPs, a été réalisée par des tests de contractilité sur des préparations d'aorte de rat (figure 11). Dans l'ensemble, aucune différence significative n'a été observée entre la courbe de l'ET-1 seule ou en présence de l'un ou l'autre des EBPs. Toutefois, le peptide EBP-31 semble diminuer l'efficacité de constriction de l'ET-1.



**Figure 11 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 seule ou en présence de  $10^{-4}$  M des EBPs, sur des anneaux d'aorte de rat. Les EBPs ont été incubés en présence de l'ET-1, 1 h avant l'injection dans les bains à bioessais. (n=3)**

## 5 Discussion

Par son implication dans plusieurs pathologies vasculaires, l'endothéline considérée comme étant l'un des plus puissants vasoconstricteurs connus jusqu'à ce jour, constitue une cible intéressante pour le domaine thérapeutique. Certaines approches telles que le développement d'antagonistes des récepteurs ont déjà été entamées pour contrer certains effets de l'endothéline. Cette stratégie, bien qu'à maints égards très efficaces n'est toutefois pas sans effets secondaires. Or, la découverte ou la contribution au développement d'un inhibiteur de l'endothéline-1 demeure prometteuse pour une meilleure compréhension au niveau de ses actions biologiques en plus de fournir de l'information supplémentaire aux études de structure-fonction de l'ET.

Afin de réaliser cette étude, la recherche de peptides pouvant lier ET-1 a été effectuée en présentant, à des molécules d'ET-1 immobilisées, une librairie de peptides aléatoire fusionnée à la surface du bactériophage T7 à l'aide d'un espaceur de 4 glycines; ceci grâce au système d'expression de Novagen, le vecteur T7Select10-3b. Chaque phage T7 a été en mesure de présenter en moyenne 10 copies de peptides à l'extrémité C-terminale de la protéine de la capsid 10B (Rosenberg et al., 1996).

### Section 1 : Développement de la librairie

Le maintien d'une librairie de plus de  $10^7$  clones est problématique pour des raisons de statistiques c'est-à-dire que la plupart des librairies peptidiques ne seront pas en mesure d'adopter entièrement toutes les séquences théoriques possibles pour une librairie ayant plus de 7 acides aminés (Rodi et al., 2002; Szardenings, 2003). En plus, la croissance répétée des phages peut entraîner des biais au niveau de la séquence présentée (Iannolo et al., 1997). En effet, l'exposition d'une combinaison de 7 acides aminés à la surface de phage, requiert un agencement de  $20^7$  autrement dit  $10^9$  clones, ce qui représente pour cette technique de clonage la limite maximale. Les librairies présentant plus de 7 acides aminés sont dites incomplètes ou partielles (Yip et Ward, 1999).

Toutefois, une librairie possédant une séquence plus longue (30 acides aminés et plus) permet d'augmenter la diversité structurale des peptides puisqu'il sera possible d'obtenir différents repliements par certains acides aminés adjacents (Rowley et al., 2004). De plus, une structure repliée peut être bénéfique pour la liaison à une cible. Afin de consolider les avantages d'une librairie courte et longue, la construction d'une librairie de taille moyenne a été choisie pour la sélection de peptides liant l'endothéline-1. Ainsi, de façon arbitraire une librairie de 20 acides aminés a été synthétisée.

Le titre obtenu après ligation de la librairie avec le vecteur T7 Select-10B a été de  $3 \times 10^7$  clones. Ce titre quoique légèrement faible, peut être comparé à ceux présentés par Pini et ses collègues (2004). En effet, des titres de  $1,5 \times 10^8$  clones,  $1 \times 10^9$  clones et  $2,5 \times 10^8$  clones ont été respectivement obtenus par eux pour une librairie linéaire ou cyclique de 20 acides aminés et une librairie linéaire de 30 acides aminés. Ces librairies ont été présentées à la surface du bactériophage M13.

L'étape subséquente d'amplification des clones permettait d'assurer qu'au moins 1000 copies de chaque clone original étaient représentées. Afin de récupérer tous les phages pouvant lier l'ET-1 via les peptides exposés, une élution non spécifique a été effectuée après les 4 tours de sélection. Dans la plupart des cas, les tours sont répétés jusqu'à ce que le nombre de phages liés augmente significativement. L'augmentation du titre après chaque élution laisse entrevoir que des phages spécifiques sont retenus à chaque étape, indiquant une très bonne sélection (Mourez et Collier, 2004). C'est ce qui a été observé et présenté par l'histogramme de la figure 6. En effet, le premier tour de sélection a permis d'isoler  $1,05 \times 10^4$  pfu/mL. Par la suite, l'augmentation du titre a été poursuivie jusqu'au 4<sup>e</sup> tour pour atteindre  $5,15 \times 10^6$  pfu/mL. Ces résultats ont donc suggéré que des clones spécifiques ont été isolés suite à la sélection effectuée envers l'ET-1.

La procédure de sélection, quoique simple théoriquement, est en fait un procédé assez complexe influencé par divers facteurs. Levitan (1998) a publié un modèle de sélection stochastique dont les résultats ont été influencés par les paramètres suivants : 1) la qualité et la taille de la librairie car, à partir d'une librairie aléatoire, la majorité de celle-ci



contient une fraction des peptides possibles (Rodi et al., 2002) ; 2) le format de la librairie, selon de la multiplicité des protéines fusion présentées, l'efficacité de la liaison va déterminer le taux de dissociation des phages liés durant l'étape de lavage; 3) les temps d'incubation et; 4) la compétition potentielle entre différentes particules du phage puisqu'à un certain niveau de réplication, des ligands à plus faible affinité peuvent compétitionner avec des ligands de forte affinité moins bien répliqués.

De plus, le premier tour de sélection étant le plus important, les résultats dépendent de l'accessibilité et de la stabilité du ligand. Il faut également prendre en considération que lors des étapes de lavage, la survie des clones est parfois précaire. La multitude de facteurs entourant la technique de *phage display* fait en sorte qu'il est très difficile de reproduire la même expérimentation. Ainsi, l'identification des séquences identiques pour une même cible ne sera probablement pas retrouvée par différents groupes de chercheurs même s'ils utilisent une librairie similaire (Szardenings, 2003).

En ce qui a trait aux séquences obtenues, la longueur des séquences exprimées à la surface des phages variait selon la position des codons stop (voir Tableau IV). Il n'a pas été possible d'obtenir des séquences de 20 acides aminés. Des peptides de longueur variable ont été identifiés par Sokoloff et al (2000). Pour leur part, ils ont utilisé le vecteur T7 Select 415-1 (de Novagen) puis ils ont inséré une librairie aléatoire de 20 acides aminés. Seuls des peptides tronqués de 1 à 14 résidus ont été produits. Selon eux, tous les peptides de pleine longueur ont été perdus lors des étapes d'amplification. Par ailleurs, ceci n'a pas empêché d'identifier des peptides possédant une forte affinité pour leur cible.

Généralement, lorsqu'une sélection est réussie, un motif consensus est repéré parmi les séquences analysées ce qui suggère l'importance de certains acides aminés pour une liaison sélective envers la cible. L'hypothèse que plusieurs séquences différentes pourraient lier l'endothéline-1 à différents sites n'est pas écartée. De la sorte, les séquences les plus répétées, identifiées en gras dans le tableau IV, ont été synthétisées chimiquement pour effectuer des analyses d'affinité et de spécificité. Les 5

peptides identifiés ont été synthétisés sur phase solide en utilisant la chimie Fmoc. Aucune réaction secondaire dominante n'a été observée selon les analyses de CLHP analytique. Une seule étape de purification a été nécessaire pour obtenir les fragments avec un taux de pureté moyen de 90% nécessaire pour effectuer les divers tests de liaison. Le poids moléculaire attendu pour chaque fragment a été confirmé par spectrométrie de masse de type MALDI TOF.

## **Section II : Études de liaison**

En premier lieu, les tests de liaison par compétition ont montré une  $IC_{50}$  (moyenne) de l'ordre du micromolaire. Ces résultats suggèrent qu'une affinité entre les peptides et l'ET-1 est présente mais faible. Pareillement, ceci semble confirmer que la sélection des clones ait réussi. Afin de valider ces résultats, l'utilisation d'une technique plus sensible a été utilisée soit, la résonance plasmonique de surface.

La résonance plasmonique de surface (RPS) est un phénomène optique généré à l'aide d'une plaque recouverte d'un métal (soit un film d'or de 10 nm; plaque sensorielle de Biacore) installée entre deux milieux possédant des indices de réfraction (IR) différents et d'un faisceau monochromatique d'une lumière polarisée en plan (Beccati et al., 2005). Ainsi dans des conditions de réflexion interne totale, un faisceau pénètre le milieu ayant un faible IR causant l'oscillation de la couche de métal composée d'électrons libres. Ceci a pour effet de générer des vagues plasmoniques de surface. Ce système est très sensible aux variations d'indices de réfractons du milieu adjacent à la couche de métal. Pour un nombre de sites de liaison donné, la réponse augmente de façon linéaire lorsqu'il y a liaison de la molécule (la masse augmente) sur la plaque. De plus, on observe un plus grand changement au niveau de l'IR pour des molécules de plus hautes masses moléculaires.

Dans cette étude, la présence des EBPs face à l'endothéline-1 ne semble pas produire de signal significatif en RPS. Toutes les courbes présentées forment un plateau indiquant correspondant qu'il n'y a aucune liaison. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par le fait

que les peptides EBP-4, EBP-6 et EBP-12 ne possèdent qu'une petite masse moléculaire souvent associée à des propriétés de liaison plus faibles. Étant donné que les conditions expérimentales diffèrent de celles des tests par compétition, l'environnement dans lequel les peptides se retrouvent, pourrait également influencer leur affinité envers ET-1.

L'activité biologique de l'ET-1 suite aux modifications de structure (l'ajout d'une molécule d'iode au résidu tyrosine ou l'addition d'une molécule de biotine en position N-terminale) avait été testée en laboratoire au préalable. Aucune modification significative de son activité n'avait été enregistrée ce qui indiquait que la conformation de l'ET-1 n'était pas altérée. Dans le cas des analyses par résonance plasmonique de surface, il se pourrait néanmoins que la portion N-terminale de l'ET-1 constitue un des sites de liaison reconnu par les différents EBPs et ceci expliquerait pourquoi aucune liaison n'a été enregistrée.

Les résultats obtenus par ces différents tests, quoique contradictoires, suggèrent quand même une affinité faible entre les EBPs synthétiques et l'ET-1. Dans cette optique, cette liaison pourrait entraîner des modifications au niveau de l'affinité de l'ET-1 à ses récepteurs de même qu'au niveau de son activité biologique.

Les cellules CHO surexprimant les récepteurs  $ET_A$  ou  $ET_B$  ont permis de visualiser si une perte d'affinité par rapport à l'ET-1 est produite sous l'action de chaque peptide. Toutes les données recueillies semblent indiquer un léger effet à de fortes concentrations pour chaque EBPs. Autrement dit, à des concentrations de  $10^{-4}$  M, les peptides sélectionnés semblent altérer la liaison de l'ET-1 envers  $ET_A$  et  $ET_B$ . Afin de visualiser un effet au niveau de l'activité biologique de l'ET-1, une forte concentration, soit  $10^{-4}$  M, de chaque peptide a été incubée en présence de concentrations croissantes de ET-1 puis, son action a été vérifiée sur des préparations d'aorte de rat, riches en récepteurs  $ET_A$ .

Aucune perte significative d'activité vasoconstrictrice n'a été mesurée sur des anneaux d'aorte. Toutefois, selon nos observations, une perte d'efficacité semble se manifester après incubation avec le peptide EBP-31.

### Section III : Analyses des séquences

Une bonne affinité et sélectivité ne garantissent pas pour autant un effet antagoniste de la part du peptide. En effet, pour s'assurer du développement d'inhibiteurs potentiels à haute affinité et spécificité pour l'ET-1, l'agent devra soit couvrir les pharmacophores de la cible ou déstabiliser suffisamment celle-ci pour empêcher son activité usuelle. L'utilisation de librairie aléatoire augmente donc grandement la possibilité d'atteindre l'une et/ou l'autre de ces deux stratégies.

Dans cette étude peu d'affinité ni de sélectivité envers l'ET-1 n'ont été enregistrées de la part des peptides. Néanmoins, comme dans bien des cas, la détermination des résidus pouvant être responsables de l'affinité entre les peptides sélectionnés et l'ET-1 doit s'effectuer par une analyse d'alignement multiple des séquences malgré des affinités modestes. Les résultats obtenus, comme présentés dans le tableau VI, sont caractérisés par des groupes consensus : LXXFXVSISXFXXA, ALXSXXXSIS et PWQLXEXXSIS. Dans ces séquences, les résidus X varient considérablement ce qui suggère qu'ils ne sont définitivement pas importants dans la liaison avec l'ET-1. Fait toutefois important à noter, les séquences partagées par les peptides EBP-31 et EBP-6, correspondant au motif ALXSXXXSIS, présentent en amont un autre résidu aliphatique pour donner le motif suivant, (A/V)ALXSXXXSIS.

Afin de permettre une meilleure exposition du motif consensus SIS, se trouvant principalement en C-terminal des peptides sélectionnés, il a été suggéré d'ajouter une portion appartenant au vecteur. Ainsi, les segments SLRPHSSN et ACGRTRVTS retrouvés à la fin des séquences des peptides P2 (EBP-29), P3 et des peptides P6, P7 (EBP-31), P9, P10 respectivement, proviennent du vecteur T7 Select 10B utilisé. En positionnant le motif SIS au milieu du peptide, celui-ci se retrouverait plus accessible et, par conséquent, ceci faciliterait la liaison des peptides EBPs envers l'ET-1. L'importance du segment LXEX du peptide EBP-4 (partagé avec le peptide P6 non synthétisé) a été visualisée par la synthèse des 4 résidus LECF qui forment ce peptide. De même que pour

le peptide EBP-6, seule la synthèse des 6 acides aminés a été effectuée car le motif ALXS se retrouve également dans les peptides EBP-31 (P7).

Les expérimentations par la technique de *phage display* nécessitent que les peptides qui lient une protéine soient dans une conformation bien établie. Contrairement aux protéines naturelles, les peptides aléatoires ne se replient pas selon une structure tridimensionnelle bien définie. Ainsi, la forme soluble du ligand a pu contribuer à la faible affinité enregistrée lors des différentes méthodes d'analyse. En effet, un peptide linéaire, en plus de ne plus être accroché aux particules du phage peut s'orienter selon diverses conformations qui ne correspondent pas nécessairement à celle(s) qui est/sont sélective(s) pour la cible.

Toutefois, il est possible d'imposer à ces séquences des contraintes artificielles dans le but de réduire le degré de liberté structurelle. Les banques dites contraintes présentent majoritairement des peptides aléatoires dans une conformation qui accepte peu de degré de liberté par l'ajout de cystéines permettant un pont disulfure. Les peptides contraints présentent souvent une affinité et une spécificité de liaison supérieure aux peptides linéaires et sont plus informatifs sur les sites de liaison (Smith et Petrenko, 1997). Une deuxième approche permettant la réduction de conformation consiste à présenter les peptides dans un contexte qui permet un arrangement structurel. En effet ces peptides peuvent se replier en boucle, en hélice alpha, en feuillet bêta ou en tout autre arrangement spatial.

Une autre difficulté rencontrée provient du fait qu'il est assez difficile de se débarrasser des clones non spécifiques. Les plaques sur lesquelles l'ET-1 avait été fixée, sont formées de polystyrène et il existe des phages pouvant lier ce plastique. Selon une étude effectuée par Adey et al. en 1995, les séquences peptidiques riches en acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) sont susceptibles de coller au plastique. Le mécanisme par lequel les protéines adhèrent au plastique n'est pas très bien défini. Toutefois, cet effet semble être dû aux interactions hydrophobes non spécifiques provenant de la dénaturation partielle des protéines (Cantarero et al., 1980). Il a été reporté que plusieurs peptides possédant les

séquences suivantes : FHTWYW, WHWWXW ou WXXWXXXW ont beaucoup d'affinité pour le polystyrène (Caparon et al, 1996; Gebhardt et al., 1996). Néanmoins, ce phénomène ne s'applique pas à toutes les séquences riches en résidus aromatiques.

En ce qui nous concerne toutefois, le peptide EBP-12 (P5) (ainsi que le peptide P4) est riche en résidus aromatiques et il possède le motif PWQWT. La possibilité que ce peptide adhère à la plaque en polystyrène utilisée comme support solide pourrait expliquer les résultats obtenus lors des analyses d'affinité et d'inhibition envers l'ET-1. Afin de minimiser l'apparition de ce type de peptides et de favoriser des séquences peptidiques ayant une meilleure affinité pour l'ET-1, il est possible d'augmenter l'astringence du tampon de lavage et/ou d'élution à chaque tour de sélection. À titre d'exemples, un gradient d'acidité (Roberts et al., 1992) ou l'utilisation d'un tampon avec des concentrations croissantes de KCl (Wang et al., 1995) ont déjà été utilisés pour éluer des phages à plus haute affinité. L'astringence a été définie par Smith et Petrenko (1997) comme étant le degré avec lequel des peptides ayant une forte affinité sont favorisés par rapport à ceux qui possèdent une affinité plus faible. Cependant, augmenter l'astringence du tampon de lavage peut entraîner une baisse de rendement. Finalement, la difficulté dans l'isolation de phages reconnaissant l'ET-1 avec une forte affinité peut être due à l'absence de telles séquences dans la librairie ou plus probablement au fait qu'il y a une perte des phages sélectifs durant la procédure de sélection.

#### **Section IV : Perspectives**

Face aux résultats obtenus, il serait intéressant, pour des études futures, d'optimiser ces séquences en les synthétisant premièrement sans la portion rajoutée correspondant au vecteur. D'autre part, en tenant compte des divers motifs identifiés suite aux alignements multiples, il serait pertinent de jumeler ces différentes informations afin d'optimiser les séquences identifiées. Autrement dit, à partir du motif LXXFXVSI SXFXXA, il serait possible de construire une nouvelle librairie et de sélectionner, par rapport à l'ET-1, de nouveaux clones.

Plusieurs études effectuées avec la technique de *phage display* démontrent des peptides

possédant de faibles affinités pour leur cible en question (Szardenings 2003). Certaines modifications sont alors apportées pour maximiser l'affinité et la stabilité des peptides. Ainsi, les modifications de structure telles le remplacement d'un résidu par un autre porteur d'une fonction différente, l'ajout de cystéines afin de cycliser la séquence et l'addition de groupements chimiques aux positions amino et/ou carboxy-terminales peuvent être envisagées. Tel a été le cas pour le peptide (MRYYESSLKSYPD) liant l' $\alpha$ -bungarotoxine ( $\alpha$ -BTX), un composé toxique présent dans le venin de certains serpents. Ce peptide préalablement identifiés par la technologie des banques de phages (Balass et al., 1997) empêche la liaison de l' $\alpha$ -BTX au récepteur nicotinique de l'acétylcholine (rACh) avec une  $IC_{50}$  de  $3 \times 10^{-7}$  M. Par des analyses de structure-fonction du site de liaison du rACh ainsi que des analyses par RMN du complexe peptide-  $\alpha$ -BTX, Kasher et ses collègues (2001) ont été en mesure d'identifier des peptides possédant un plus grand pouvoir inhibiteur avec une  $IC_{50} \sim 2nM$ .

Par ses actions, l'endothéline induit une augmentation du tonus vasculaire ainsi que de la pression sanguine. De ce fait, des antagonistes ou inhibiteurs peuvent être en mesure de jouer un rôle important dans le traitement de pathologies cardiovasculaires et rénales associées à une vasoconstriction régionale ou systémique telles que l'hypertension essentielle et pulmonaire ainsi que l'insuffisance cardiaque et rénale. Dans cette optique, les études à venir pourraient éventuellement fournir d'autres éléments constructifs pour le développement d'agents thérapeutiques contre les effets de l'endothéline. D'autres alternatives pourraient également être envisagées afin de fournir le même genre d'informations. Néanmoins, ce qui rend la technique de banque de phages intéressante par rapport à l'utilisation d'anticorps, provient du fait que 1) les coûts de fabrication sont plus faibles (production synthétique versus recombinante), 2) l'obtention d'une activité par masse est plus grande, 3) l'obtention d'une meilleure stabilité de l'agent (une conservation à la température pièce peut être acceptable), 4) contrairement aux anticorps, une interaction avec le système immunitaire est plus faible puisque les peptides ne contiennent généralement pas d'actions sur le système immunitaire et 5) les peptides en général ont une meilleure pénétration au niveau des organes et des tumeurs (Ladner et al., 2004).

## 6 Conclusion

Les effets engendrés par l'endothéline sont nombreux et sont majoritairement associés aux pathologies du système cardiovasculaire. Dès lors, certaines approches ont été élaborées pour contrer ces effets. Il n'en demeure pas moins que d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'actions de l'ET en plus de contribuer au développement de nouveaux agents thérapeutiques. La technique utilisée à cet effet, est rapide et par la construction de bibliothèques personnalisées celle-ci procure une approche très intéressante pour la découverte de nouveaux ligands spécifiques.

Notre étude décrit une approche pour l'identification de séquences peptidiques à haute affinité pour l'ET-1. Par la technique de banque de phages, les peptides que nous avons identifiés pourraient servir de composés-pilotes pour le développement de molécules capables de lier l'ET-1 et d'ainsi empêcher la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs. En premier lieu l'augmentation des clones contre l'ET-1 a suggéré une sélection réussie. Ensuite, le séquençage de certains segments a permis d'identifier des agencements d'acides aminés variables caractérisés par trois groupes de motif consensus. Cinq peptides choisis de par leur nombre de séquences répétées ont alors été synthétisés. Puis afin de déterminer si ces résidus sont importants dans la liaison avec l'ET-1, des analyses d'affinité ont été entreprises. Une  $IC_{50}$  moyenne de  $50\mu M$  a été calculée pour les cinq peptides. Toutefois ces résultats ne corroboraient pas avec ceux obtenus par analyses par résonance plasmonique de surface. L'évaluation d'une perte de liaison de l'ET-1 à ses récepteurs et les analyses évaluant l'inhibition de l'activité biologique de l'ET-1 via les peptides sélectionnés, se sont révélées dans l'ensemble négatif. Ces résultats n'excluent cependant pas le fait qu'une activité pourrait être observée suite à l'optimisation des séquences obtenues. L'influence de plusieurs facteurs tels que la qualité de la bibliothèque, sa longueur, les mutations générées, les conditions expérimentales lors de la sélection et la qualité de la cible, peuvent avoir joué un rôle important dans les données obtenues quant aux tests d'affinité et de sélectivité.

Plusieurs études réalisées au moyen de la technique de banque de phages ont mené au développement d'inhibiteurs peptidiques spécifiques. Par exemple, il a été montré qu'un



peptide, par sa liaison, permet de perturber l'assemblage du complexe toxique de la toxine d'anthrax (Mourez et al., 2001). Également, la littérature relève la découverte d'agonistes peptidiques de certains récepteurs d'hormones (Wrighton et al., 1996). Dans la plupart des cas, les peptides sélectionnés ont initialement une faible affinité pour leur cible et par conséquent, l'optimisation des séquences est souvent sujette à d'autres études. Par conséquent, différentes stratégies sont utilisées afin de maximiser ces recherches (Shrivastava et al., 2005) et ceci révèle que la technique de banque de phages demeure un outil attrayant pour l'identification de ligands dont l'action biologique et/ou pharmacologique peut être variée.



### Abréviations des acides aminés

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

## Références

- ADEY, N.B., Mataragnon, A.H., Rider, J.E., Carter, J.M., Kay, B.K. 1995. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries, Gene, vol. 156(1), p.27-31.
- ARAI, H., Nori S., Aramori I., Ohkubu H., Nakanishi S. 1990. Cloning and Expression of a cDNA Encoding an Endothelin Receptor. Nature, vol. 348, p. 730-732.
- BALASS, M, Katchalski-Katzir E, Fuchs S. 1997. The alpha-bungarotoxin binding site on the nicotinic acetylcholine receptor: analysis using a phage-epitope library. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, vol. 94(12), p.6054-6058.
- BECCATI, D., Halkes, K.M., Batema, G.D., Guillena, G., Carvalho de Souza, A., van Koten, G., Kamerling, J.P. 2005. SPR studies of carbohydrate-protein interactions: signal enhancement of low-molecular-mass analytes by organoplatinum(II)-labeling. ChemBiochem, vol. 6(7), p. 1196-1203.
- BECKER, K, Erdbrugger W, Heinroth-Hoffmann I, Michel MC, Brodde OE.1996. Endothelin-induced inositol phosphate formation in rat kidney. Studies on receptor subtypes, G-proteins and regulation during ontogenesis. Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology, vol. 354(5),p.572-578.
- BOULANGER, C., Luscher, T.F. 1990. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. The Journal of Clinical Investigation, vol. 85(2), p. 587-590.
- BRKOVIC, A, Hattenberger A, Kostenis E, Klabunde T, Flohr S, Kurz M, Bourgault S, Fournier A. 2003. Functional 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(3), p.1200-1209.
- CANTARERO, LA, Butler JE, Osborne JW. 1980. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. Analytical Biochemistry, vol. 105(2), p.375-382.
- CAPARON, MH., De Ciechi PA., Devine CS., Olins PO., Lee SC. 1996. Analysis of novel streptavidin-binding peptides, identified using phage display library, shows that amino acids external to a perfectly conserved consensus sequence and to the presented peptides contribute to binding. Molecular Diversity, vol. 1(4), p. 241-246.
- CARDILLO, C, Kilcoyne, CM, Waclawiw M, Cannon RO, Panza JA. 1999. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. Hypertension, vol.33 (2), p. 753-758.

CHEN, CL, Strop P, Lebl M, Lam KS. 1996. One bead-one compound combinatorial peptide library: different types of screening. Methods in Enzymology, vol. 267, p.211-219.

CWIRLA, SE, Peters EA, Barrett, RW, Dower WJ. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. Proceedings of the National of Sciences of the United States of America, vol. 87(16), p. 6378-6382.

De la CRUZ, VF, VF, Lal AA, McCutchan TF. 1988. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. The Journal of biological chemistry, vol. 263(9), p. 4318-4322.

D'MELLO, F, Howard CR. 2001. An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. Journal of immunology methods, vol.247, p. 191-203

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

DOORBAR, J, Winter G. 1994. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. Journal of molecular biology, vol. 244(4),p. :361-369.

D'ORLÉANS-JUSTE, P, Gratton JP, Leduc R, Bkaily G, Claing A. 1996. L'Endothéline : Pharmacologie cardio-vasculaire et considérations physio-pathologiques. Médecine/Sciences, vol.12, p. 563-574.

DYSON, M.R., Germaschewski, V., Murray, K. 1995. Direct measurement via phage titre of the dissociation constants in solution of fusion phage-substrate complexes. Nucleic Acids Research, vol.1;23(9), p.1531-1535.

FOWLKES, DM., Adams, M.D., Fowler, VA., Kay, BK. 1992. Multipurpose vectors for peptide expression on the M13 viral surface. Biotechniques, vol.13(3), p.422-428.

FURCHGOTT, RF, et Zawadski, JV. 1980. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. Nature, vol.288 p. 373-376.

GEBHARDT, K., Lauvrak V, Babaie E, Eijsink V, Lindqvist BH. 1996. Adhesive peptides selected by phage display: characterization, applications and similarities with fibrinogen. Peptide Research, vol. 9(6), p. 269-278.

GILLESPIE, M.N., J.O. Owasoyo, I.F. McMurtry, R.F. O'Brien. 1986. Sustained Coronary Vasoconstriction Provoked by a Peptidergic Substance Released from Endothelial Cells in Culture. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol.236, p.339-343.

HAYNES, W.G. et Webb D.J. 1998. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. Journal Hypertension, vol. 16(8), p.1081-1098.

- HASEGAWA, K, Fujiwara H, Doyama K, Inada T, Ohtani S, Fujiwara T, Hosoda K, Nakao K, Sasayama S. 1994. Endothelin-1-selective receptor in the arterial intima of patients with hypertension. Hypertension, vol.. 23(3), p.288-293
- HICKEY, KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. 1985. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. The American Journal of Physiology, vol. 248(5 Pt 1), p.C550-556.
- HOANG, M.G. et Turner, A.J. 1997. Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. Biochemical Journal. vol.1;327, p.23-26.
- HUSSAIN, AA., Jona JA., Yamada A., Dittert LW. 1995. Chloramine-T in radiolabeling techniques. Analytical Biochemistry, vol.224, p.221-226.
- IANNOLO, G., Minenkova, O., Gonfloni, S., Castagnoli, L., Cesareni, G. 1997. Construction, exploitation and evolution of a new peptide library displayed at high density by fusion to the major coat protein of filamentous phage. Biological Chemistry, vol. 378(6), p.517-521.
- INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuka, T. Miyauchi, K.Goto et T. Masaki. 1989. The Human Endothelin Family: Three Structurally and Pharmacologically Distinct Isopeptides Predicted by Three Separate Genes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 86, p. 2863-2867.
- JENG, A.Y., Mulder, P., Kwan, A.L., Battistini, B. 2002. Nonpeptidic endothelin-converting enzyme inhibitors and their potential therapeutic applications. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 80(5), p. 440-449.
- JOHNSON, G.D., Stevenson, T., Ahn, K. 1999. Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. The Journal of Biological Chemistry, vol. 12;274(7), p. 4053-4058.
- KAISER, E, Colesco R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in solid phase synthesis of peptides. Annals of biochemistry, vol. 34,p. 595-598.
- KASHER, R, Balass M, Scherf T, Fridkin M, Fuchs S, Katchalski-Katzir E. 2001. Design and synthesis of peptides that bind alpha-bungarotoxin with high affinity. Chemistry and biology, vol. 8(2):147-155.
- KAY, BK, Winter J, McCafferty J. 1996. Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual. Academic Press, p.62.

- KAZT, B.A. 1997. Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, vol.26, p.27-45.
- KOSCIELSKA, K., Kiczak, L., Kasztura, M., Wesolowska, O., Otlewski, J. 1998. Phage display of proteins. Acta Biochimica Polonica, vol. 45(3), p.705-720.
- KRUM, H., Viskoper, R.J., Lacourciere, Y., Budde, M., Charlon, V. 1998. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. The New England journal of medicine, vol. 338(12):784-790.
- LADNER, R.C., Sato A.K., Gorzelany, J., de Souza, M. 2004. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. Drug Discovery Today, vol. 9(12), p.525-529.
- LEVITAN, B. 1998. Stochastic modeling and optimization of phage display. Journal of Molecular Biology, vol. 277(4), p.893-916.
- MASAKI, T., Yanagisawa M., Goto K. 1992. Physiology and pharmacology of endothelins. Medicinal Research Reviews, vol.12, p.391-421.
- MATSUURA, A., Kawashima, S., Yamochi, W., Hirata, K., Yamaguchi, T., Emoto, N., Yokoyama, M. 1997. Vascular endothelial growth factor increases endothelin-converting enzyme expression in vascular endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 27; 235(3), p. 713-716.
- MOUREZ, M., Collier, RJ. 2004. Use of phage display and polyvalency to design inhibitors of protein-protein interactions. Methods in Molecular Biology, vol. 261, p. 213-228.
- MOUREZ, M., Kane RS, Mogridge J, Metallo S, Deschatelets P, Sellman BR, Whitesides GM, Collier RJ. 2001. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin, Nature Biotechnology. vol. 19(10), p.958-961.
- NAKAJIMA, K., Kumagaye S-I, Nishio H., Kuroda H., Watanabe T., Kobayashi Y., Tamaoki H., Kimura T. et Sakakibara S. 1989. Synthesis of Endothelin-1 Analogues, Endothelin-3, and Sarafotoxin S6b : Structure-Activity Relationships. Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol.13, p. S8-S12.
- O'BRIEN, RF, McMurtry IF. 1984. Endothelial cell (EC) supernates contract bovine pulmonary artery (PA) rings. American Review of Respiratory Disease, vol. 129, p.A337.
- OPGENORTH, TJ. 1995. Endothelin receptor antagonism. Advances in Pharmacology, vol. 33, p.1-65.

ORTEGA MATEO, A., de Artinano, AA. 1997. Highlights on endothelins: a review. Pharmacological Research, vol. 36(5), p.339-351.

PELTON, JT, Miller RC. 1991. The role of the disulphide bonds in endothelin-1. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 43(1):43-45.

PINI, A, Giuliani A, Ricci C, Runci Y, Bracci L.2004. Strategies for the construction and use of peptide and antibody libraries displayed on phages. Current Protein and Peptide Science, vol.,5(6), p.487-496.

ROBERTS, BL, Markland W, Siranosian K, Saxena MJ, Guterman SK, Ladner RC. 1992. Protease inhibitor display M13 phage: selection of high-affinity neutrophil elastase inhibitors. Gene, vol. 121(1), p.9-15.

RODI, DJ, Soares AS, Makowski L. 2002. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries. Journal of Molecular Biology, vol. 4;322(5), p.1039-1052.

ROSENBERG, A, Griffin K, Studier W, McCormink M, Berg J, Novy R, Mierendorf R. 1996. T7 Select phage display: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. inNovations, vol. 6, p.1-6

ROWLEY, MJ, O'connor K, Wijeyewickrema L. 2004. Phage display for epitope determination: A paradigm for identifying receptor-ligand interactions. Biotechnology annual review, vol.. 10, p.151-188.

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

SHIMADA, K, Takahashi M, Tanzawa K. 1994. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. The Journal of Biological Chemistry, vol.269, p. 18275-18278.

SHRIVASTAVA,A, von Wronski MA, Sato AK, Dransfield DT, Sexton D, Bogdan N, Pillai R, Nanjappan P, Song B, Marinelli E, Deoliveira D, Luneau C, Devlin M, Muruganandam A, Abujoub A, Connelly G, Wu QL, Conley G, Chang Q, Tweedle MF, Ladner RC, Swenson RE, Nunn AD. 2005. A distinct strategy to generate high-affinity peptide binders to receptor tyrosine kinases. Protein Engineering: Design and Selection, vol. 18, p.417-422.

SMITH, GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science, vol. 228 (4705), p.1315-1317.



- SMITH, GP et Petrenko VA. 1997. Phage display. Chemical reviews, vol. 97(2), p. 391-410.
- SPIEKER, LE, Noll G, Luscher TF. 2001. Therapeutic potential for endothelin receptor antagonists in cardiovascular disorders. American Journal of Cardiovascular Drugs, vol. 1(4) p.293-303.
- SOKOLOFF, AV, Bock I, Zhang G, Sebestyen MG, Wolff JA. 2000. The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display. Molecular Therapy, vol. 2(2), p.131-139
- SZARDENINGS, M. 2003. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. Journal of receptor and signal transduction research, vol. 23(4), p.307-349.
- TESSIER, S, Boivin S, Aubin J, Lampron P, Detheux M, Fournier A. 2005. Transmembrane domain V of the endothelin-A receptor is a binding domain of ET(A)-selective TTA-386-derived photoprobes. Biochemistry, vol. 31;44(21), p.7844-7854.
- TOUYZ, RM, Schiffrin EL. 2003. Role of endothelin in human hypertension. Canadian journal of physiology and pharmacology, vol.81(6) p.533-541.
- WANG, B, Dickinson LA, Koivunen E, Ruoslahti E, Kohwi-Shigematsu T. 1995. A novel matrix attachment region DNA binding motif identified using a random phage peptide library. The journal of biological chemistry, vol., 270(40), p.23239-23242.
- WRIGHTON, NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ. 1996. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. Science, vol. 273(5274), p. 458-464.
- XU, D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. 1994. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. Cell, vol. 78, no. 3, p. 473-485.
- YANAGISAWA, M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, vol. 332, p.411-415.
- YIP, YL, Ward RL. 1999. Epitope discovery using monoclonal antibodies and phage peptide libraries. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, vol. 2(3), p.125-138.