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

MARQUAGE RÉGIO-SPÉCIFIQUE DES RÉCEPTEURS ET_A ET ET_B DE L'ENDOTHÉLINE À L'AIDE DE SONDES PEPTIDIQUES PHOTOSENSIBLES

Par
Sophie Tessier
Bachelière en Biochimie
Maître en Sciences Expérimentales de la Santé

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury	Dr Jacques Bernier
et examinateur interne	INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Dr Martin Sirois
	Institut de Recherche Clinique de Montréal
Examinateur externe	Pedro D'Orléans-Juste
	Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	Dr Alain Fournier
	INRS-Institut Armand-Frappier

©droits réservés de Sophie Tessier, 2005

Résumé

L'endothéline (ET) est identifiée comme l'un des plus puissants agents vasoconstricteurs connus chez les mammifères. Ce peptide de vingt-et-un acides aminés agit par l'intermédiaire de deux types de récepteurs couplés aux protéines G, soit ET_A et ET_B. Il participe à la régulation des fonctions d'une multitude d'organes, entre autres par l'induction de la constriction des vaisseaux sanguins et des muscles lisses et par la production d'hormones. Étant donné ses nombreuses actions physiologiques, l'ET est impliquée dans diverses pathophysiologies dont l'hypertension, l'infarctus du myocarde et l'asthme. Pour établir des thérapies mieux ciblées, il est donc important de comprendre l'interaction entre l'ET et ses récepteurs.

Afin d'en connaître davantage sur les sites de liaison des récepteurs de l'ET, nous avons opté pour l'utilisation d'analogues photosensibles de ce peptide dans des essais de marquage par photoaffinité. Pour ce faire, nous avons divisé cette étude en deux volets, soit la synthèse et la caractérisation de nouvelles sondes photosensibles dérivées d'analogues de l'ET et finalement le photomarquage des récepteurs ET_A et ET_B. Pour débuter, deux peptides possédant une sélectivité pour l'un ou l'autre des récepteurs de l'ET ont été identifiés comme sondes photosensibles potentielles soit l'antagoniste peptidique TTA-386 (hexaméthylèneiminocarbonyle-Leu-trp-ala-βAla-Tyr-phe) (Kitada, et al., J. Cardiov. Pharmacol., vol. 22, S128, 1993) qui est sélectif pour le récepteur ET_A et l'agoniste IRL-1620 (N-succinyl-[Glu^9, $Ala^{11,15}$] ET-1 (8-21)) (Takai et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 184, p.953-959, 1992) sélectif pour ET_B. Lors de la synthèse chimique de ces peptides, leur séquence en acides aminés a été modifiée par l'ajout du p-benzoyl-phénylalanine (pBpa), un acide aminé photosensible à l'origine du marquage des récepteurs. La phénylalanine en position 6 du TTA-386 a ainsi été substituée par le D- ou le L-pBpa. Quant au récepteur ET_B, c'est la sonde [Bpa^5]IRL-1620 qui a été produite par le remplacement de la valine. Pour vérifier l'importance des modifications structurales apportées par le Bpa sur l'activité et la sélectivité de chacun des peptides photosensibles, l'activité biologique des peptides synthétisés a ensuite été vérifiée sur deux préparations tissulaires exprimant majoritairement soit le récepteur ET_A (aorte thoracique de rat) ou le récepteur ET_B (parenchyme pulmonaire de cobaye). Des tests de liaison ont aussi été réalisés sur des cellules CHO-K1 transfectées avec le récepteur hET_B ou hET_A afin de

caractériser leur force de liaison avec les récepteurs. Il a alors été démontré que les ligands photosensibles possèdent les caractéristiques pharmacologiques et biochimiques requises pour le photomarquage des récepteurs ET_A et ET_B, soit une bonne affinité et une sélectivité pour leur récepteur respectif.

Ces outils pharmacologiques ont donc été utilisés pour photomarquer les récepteurs de l'ET. L'irradiation des sondes photosensibles [^{125}I-Tyr^5, D-pBpa^6]-TTA-386 et [^{125}I-Tyr^{5}L-pBpa^6]-TTA-386 en présence de ET_A ou de [Bpa^5,^{125}I-Tyr^6]IRL-1620 en présence de ET_B a permis la formation de complexes ligand-récepteur. Puisque le photomarquage de ces récepteurs est impossible en présence d'ET, alors ces résultats nous suggèrent que les sondes photosensibles sont non seulement capables de photomarquer les récepteurs de l'ET, mais elles partagent aussi le même site de liaison que l'ET sur ses récepteurs. Pour mieux définir ces domaines de liaison, les récepteurs photomarqués ont finalement été digérés par deux enzymes différentes soit l'Endoprotéinase Lys-C et la V8 et par un traitement chimique au bromure de cyanogène. Ces clivages ont alors produit des fragments dont au moins un était lié à l'une des sondes photosensibles radiomarquées. Une migration sur gel SDS-PAGE de ces fragments a permis d'identifier la masse des fragments liés aux sondes. L'analyse de ces masses avec la séquence connue de chaque récepteur a alors permis d'identifier l'endroit exact où chaque sonde s'est liée sur les récepteurs de l'ET. En combinant tous les produits de clivage, les résultats suggèrent que [Bpa^5,^{125}I-Tyr]^6]IRL-1620 se lierait au cinquième domaine transmembranaire du récepteur ET_B entre les résidus Trp^{275}-Leu^{295}. Pour ce qui est du récepteur ET_A, ce sont les résidus Trp^{257}-Met^{278} qui ont été ciblés par les deux sondes photosensibles utilisées.

Il est donc intéressant de constater, que le cinquième domaine transmembranaire des récepteurs de l'ET ait été ciblé dans nos deux études de photomarquage. Ce domaine semble donc être d'une importance capitale pour l'interaction des récepteurs ET_A et ET_B et leurs ligands.

Sophie Tessier
Étudiante

Alain Fournier
Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Alain Fournier, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler avec une équipe fort dynamique. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour le soutien et l'encadrement qu'il a su me donner tout au long de mes travaux de recherche. Merci également pour ta patience et ta grande compréhension car sans elles, j'aurais sûrement dû abandonner mes études pour me consacrer entièrement à ma nouvelle passion, l'enseignement.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire, anciens et présents. Vous m'avez apporté un grand soutien scientifique et moral. Je remercie notamment Stéphane Boivin qui m'a tout appris du monde informatique. Merci à ma stagiaire préférée Jacinthe Aubin pour les nombreuses heures de travail et d'anecdotes que nous avons partagées. J'aimerais également remercier Philipe Lampron pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire... et à la danse ! Un gros merci à mes collègues manipulateurs de tubes radioactifs : Alexandra Louimaire et Steve Bourgault. Je remercie aussi Alexandre Brkovic pour ses relations avec le monde européen qui m'ont permis de faire des recherches sur des cellules transfectées. Finalement, je tiens à dire merci à mes deux plus anciennes collègues et amies Chantal Langlois et Myriam Létourneau. Nos longues discussions, pas toujours d'ordre scientifique, vont beaucoup me manquer.

Je désire également exprimer toute ma reconnaissance envers la compagnie Euroscreen de Belgique pour leur participation à mon projet de recherche.

Je désire également remercier mes parents Denise et Jean-Denis pour leur grande générosité. Vous avez toujours fait passer mon bonheur avant le vôtre et je vous en suis très reconnaissante. Merci pour l'aide que vous m'apportez depuis le début de mes études supérieures. Je vous aime !

Je souhaite aussi dire merci à mon mari. Merci Sébastien d'être venu avec moi au laboratoire le soir et les week-ends même quand tu aurais préféré rester tranquillement à la maison. Merci aussi d'avoir été si compréhensif pendant ces longues années d'études. Je t'aime !

Merci aussi à tous mes amis que j'ai réussi à garder même si j'ai souvent brillé par mon absence lors des rencontres prévues. Merci Caroline !

Je désire également remercier mes nouveaux collègues de travail, les enseignants du département de chimie du Collège de Valleyfield qui n'ont jamais cessé de m'encourager à terminer mes études.

Finalement, je tiens à remercier les organismes suivants : la Fondation des Maladies du Cœur du Canada, le Fonds de la Recherche en Santé du Québec et l'Institut National de la Recherche Scientifique pour leur support financier.

Table des matières

Résumé II
Remerciements IV
Liste des figures VIII
Liste des tableaux X
Liste des abréviations XI
Introduction 1
Revue de littérature 4
1. Chapitre 1 – L'endothéline 5
1.1 La découverte de l'endothéline 5
1.2 La biosynthèse de l'ET 6
1.3 L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) 9
1.4 Effets physiologiques de l'ET 10
1.5 Les récepteurs de l'ET 12
1.6 Voie de signalisation de l'ET 14
1.7 Les études de structure-activité de l'ET 16
1.8 Les analogues de l'ET 19
1.9 Domaine de liaison des récepteurs de l'ET 23
2. Chapitre 2 – Le photomarquage 25
2.1 Les usages du photomarquage 25
2.2 La méthodologie générale 26
2.3 Les groupes photoactivables 28
2.4 Les azides 30
2.5 Les diazirines (et les composés diazo) 32
2.6 Les benzophénones (BP) 33
2.7 Le développement des sondes photosensibles 35
2.8 Études basées sur le photomarquage 37
2.8.1 Identification des récepteurs 37
2.8.2 Caractérisation du site de liaison ligand-récepteur 38
2.8.3 Identification de site catalytique enzymatique 39

2.8.4 Étude de l'ADN....40
2.8.5 Aspect thérapeutique....41
2.9 L'endothéline et le photomarquage....41
Articles scientifiques....43
3. Chapitre 3....44
3.1 Mise en contexte de l'Article 1....44
3.2 Contribution de l'étudiant à l'Article 1....45
3.3 Article 1 Transmembrane domain V of the endothelin-A receptor is a binding domain of ETA-selective TTA-386–derived photoprobes....46
4. Chapitre 4....58
4.1 Mise en contexte de l'Article 2....58
4.2 Contribution de l'étudiant à l'Article 2....58
4.3 Article 2 Identification of a binding domain of the endothelin-B receptor using a selective IRL-1620-derived photoprobe....60
5. Chapitre 5....71
5.1 Première partie : La synthèse et la caractérisation des sondes photosensibles....71
5.1.1 Choix de sondes peptidiques....71
5.1.2 Synthèse des sondes photosensibles....74
5.1.3 L'iodation des sondes peptidiques....81
5.1.4 Évaluation de l'impact du groupement Bpa et de l'iode sur les propriétés pharmacologiques des peptides synthétisés....82
5.1.5 Les tests de liaison....87
5.2 Deuxième partie : l'identification du domaine de liaison des récepteurs de l'ET....89
5.2.1 L'identification des protéines photomarquées....89
5.2.2 Le domaine de liaison des récepteurs de l'ET....90
5.2.3 La controverse autour du Bpa....91
5.2.4 Mutagénèse dirigée....95
5.2.5 Perspectives....96
Conclusion....98

Appendice 99
Abréviations des acides aminés 99
Liste des références 100

Liste des Figures

Figure 1 : Structure primaire des trois isoformes de l'ET retrouvés dans le génome humain. Les acides aminés en gras de ET-2 et ET-3 sont ceux qui diffèrent de ET-1. 7

Figure 2 : Biosynthèse et mécanisme d'action de l'ET-1 8

Figure 3 : La structure du récepteur ET_A humain avec ses sept domaines transmembranaires 13

Figure 4 : Représentation schématique du récepteur ET_B humain de l'ET.....14

Figure 5 : Cascade d'événements intracellulaires de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses induisant leur contraction 15

Figure 6 : Les différentes étapes de la technique de photomarquage.....27

Figure 7 : Groupements chimiques utilisés fréquemment dans les études de photomarquage.....29

Figure 8 : Réactions photochimiques des composés arylazides lors du photomarquage.....31

Figure 9 : Réactions photochimiques des composés diazirines lors du photomarquage.....32

Figure 10 : Réactions impliquées lors du marquage par photoaffinité à l'aide d'un benzophénone.....35

Figure 11 : Acides aminés modifiés utilisés pour le marquage par photoaffinité : a) p-benzoyl-phénylalanine, b) Nitroazido-phénylalanine, c) Azido-phénylalanine. 37

Figure 12 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de p-nitrophénoxyde. 77

Figure 13 : Trois autres réactifs utilisés pour activer l'homopipéridine dans le but de former le cycle urée sur les peptides dérivés du TTA-386. 78

Figure 14 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de 4-nitrophényle (second protocole). 79

Figure 15 : Profil d'élution du [Tyr(I)^6,Bpa^4]IRL-1620 et du [Tyr(I)^6,LBpa^6]TTA-386 sur HPLC analytique suite à la réaction d'iodation..... 82

Figure 16 : Photomarquage du résidu méthionine par le Bpa et schéma de son mécanisme de libération lors du traitement au CNBr. 94

Liste des Tableaux

Tableau I : Actions biologiques de l'ET (Doherty, 1992). 11

Tableau II : Structure de certains analogues de l'ET. 22

Liste des abréviations

Aca	acide aminocaproïque
Acm	acétamidométhyle
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
Ang II	angiotensine II
ANP	*atrial natriuretic peptide*
APN	aminopeptidase N
Ar	aryle
BigET	Big-endothéline
Boc	t-butyloxycarbonyle
BP	benzophénone
Bpa	*p*-benzoyl-phénylalanine
CHO	cellules d'ovaires d'hamster chinois
CT	calcitonine
Da	Dalton
DAG	diacylglycérol
DC	dichroïsme circulaire
DIEA	diisopropyléthylamine
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
E. coli	Escherichia coli
EDCF	*endothelium derived constricting factors*
EDRF	*endothelium derived relaxing factors*
ET	endothéline
ETR-GFP	*endothelin receptor-green fluorescent protein*
Fmoc	9-fluorènylméthyloxycarbonyle
For	formyle
GFP	*green fluorescent protein*
GPCR	récepteurs couplés aux protéines-G
GRK	*GPCR kinase*
HPLC	*High pressure liquid chromatography*
INRS	Institut National de la Recherche Scientifique
IP_3	inositol triphosphate
K_d	constante de dissociation
LEMPP	Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides
MALDI-TOF	m*atrix assisted laser desorption ionization time of flight*
MAP KINASES	*Mitogen-activated protein kinases*
MDR	m*ultidrugs resistance*
MS	Spectromètre de masse
NAD	Nicotinamide adénosine dinucléotide
NEP	Endopeptidase neutre
NO	Oxyde nitrique
PACAP	*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*
PAGE	p*olyacrylamide gel electrophoresis*

PGI_2	prostacycline
PIP_2	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PM	poids moléculaire
RMN	résonance magnétique nucléaire
Sar	sarcosine
SDS	dodécylsulfate de sodium
Suc	succinyle
TFA	acide trifluoroacétique
7TM	sept passages transmembranaires
UV	ultraviolet
VIP	v*asoactive intestinal peptide*

Introduction

Les pathologies cardiovasculaires (cardiopathies et accidents vasculaires cérébraux) comptent parmi les principales causes de maladie, d'invalidité et de décès au Canada. Selon la plus récente enquête menée par Statistiques Canada, 36% des mortalités en 1999 ont été causées par des maladies cardiovasculaires. Malheureusement, avec le vieillissement de la population canadienne la situation ne risque pas de changer. En effet, selon le recensement de 2001, les personnes âgées de 65 ans et plus représentaient 13 % de la population canadienne. Selon les prévisions, ce pourcentage dépasserait les 20 % d'ici 2025 avec l'entrée des « baby-boomers » dans ce groupe d'âge. L'investissement dans la recherche sur de nouveaux agents pharmacologiques et des techniques chirurgicales novatrices semble donc être un pilier important pour l'avenir de notre population.

Depuis quelques années, le Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP) de l'INRS-Institut Armand-Frappier a fait des maladies cardiovasculaires, un sujet majeur de ses recherches. En effet, le groupe de chercheurs dirigé par le professeur Alain Fournier étudie de nombreux facteurs peptidiques démontrant des actions centrales et périphériques sur les fonctions vasculaires et cardiaques. Parmi ceux-ci, l'endothéline (ET) a attiré tout spécialement leur attention en particulier à cause de la nature de ses propriétés biologiques et structurales uniques. En effet, l'ET est une hormone s'avérant comme l'un des plus puissants agents vasoconstricteurs connus, avec une durée d'action exceptionnellement longue pour un ligand agissant sur un récepteur couplé aux protéines G. Cette substance se retrouve notamment dans le cœur et les vaisseaux sanguins de plusieurs mammifères, incluant l'humain. Malheureusement, des études ont démontré que l'ET est impliquée dans plusieurs pathologies cardiovasculaires dont l'hypertension, l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose.

Pour établir des stratégies thérapeutiques mieux ciblées pour ces maladies, il est essentiel de comprendre le mode d'action de l'ET au niveau moléculaire. Une connaissance améliorée du mode de fonctionnement de ce peptide permettrait de mieux moduler ses effets parfois néfastes sur le système cardiovasculaire lorsque la balance homéostatique

est en déséquilibre. C'est dans cette optique que nous avons entrepris des travaux afin de caractériser le domaine de liaison de l'endothéline sur ses récepteurs ET_A et ET_B et d'identifier les résidus des récepteurs participant à l'interaction avec le ligand.

De nombreuses recherches sur l'ET et ses récepteurs ont été menées depuis la découverte de ce peptide. Or afin d'évaluer l'interaction d'une protéine avec son récepteur, plusieurs approches expérimentales peuvent être utilisées. Les études de structure-activité de l'ET, l'analyse mutationelle et la génération de récepteurs mutants comprenant des délétions en sont des exemples. L'originalité de nos recherches repose sur le fait que nous ayons utilisé la technique de photomarquage pour caractériser l'interaction entre l'ET et ses deux récepteurs. Cette technique grandement employée pour étudier les interactions ligands-protéines n'a jamais été utilisée avec l'ET. Ainsi, par complémentarité aux études déjà entamées, nous avons monté un protocole de marquage par photoaffinité pour identifier le domaine de liaison de l'ET sur ses récepteurs. Nos études nous ont alors conduit à l'identification d'un domaine transmembranaire (le cinquième) des récepteurs ET_A et ET_B qui serait impliqué dans la liaison de plusieurs analogues de l'ET. La connaissance de plus en plus grande de l'interaction entre l'ET et ses récepteurs pourra alors permettre le développement de nouveaux outils pharmacologiques voire thérapeutiques ou diagnostiques.

Les différents objectifs spécifiques associés à ce projet de recherche, soit le photomarquage des récepteurs de l'ET, sont :

1. Synthétiser sur phase solide des peptides photosensibles dérivés d'analogues de l'ET.
2. Évaluer l'affinité et la sélectivité de ces sondes pour les récepteurs de l'ET via des tests pharmacologiques sur l'aorte de rat et le parenchyme pulmonaire de cobayes.
3. Radiomarquer les sondes photosensibles capables de se lier aux récepteurs lors des tests biologiques.
4. Déterminer l'affinité de ces sondes sur les récepteurs humains de l'ET clonés dans des cellules CHO.
5. Photomarquer les récepteurs.
6. Digérer les complexes photomarqués ligand-récepteur afin d'évaluer le fragment des récepteurs lié aux sondes.

Cette thèse est présentée sous la forme d'une thèse par articles. Elle est donc divisée en deux parties distinctes pour répondre aux règles de présentation des mémoires et thèses de l'INRS. Elle débute avec une revue de la littérature de l'ET. Le chapitre 1 de ce document présente ainsi les résultats de nombreuses recherches expérimentales menées sur cette hormone dont les résultats des travaux effectués sur le domaine de liaison des récepteurs. Le deuxième chapitre de cette thèse est ensuite voué à la description du marquage par photoaffinité et des différents agents photoactivables disponibles pour ce genre d'études. Les deux articles décrivant les résultats du photomarquage du récepteur ET_A et du récepteur ET_B de l'ET constitueront les chapitres 3 et 4 respectivement de cette thèse. Ces chapitres regroupent la totalité des travaux de recherche qui nous ont menés à l'identification du domaine transmembranaire des récepteurs qui est impliqué dans la liaison avec l'ET. Finalement, le chapitre 5 résume la stratégie que nous avons employée lors de nos recherches ainsi que sa portée sur les connaissances actuelles de l'ET et de ses récepteurs.

Partie 1 : Revue de la littérature

Chapitre 1

L'Endothéline

1.1 La découverte de l'endothéline

L'endothélium vasculaire a longtemps été considéré comme une simple barrière empêchant tout contact entre les cellules sanguines et la paroi des tissus vasculaires. Or, depuis une vingtaine d'années, plusieurs découvertes ont permis de révéler son importance au niveau physiologique. De nos jours, l'endothélium est considéré comme un tissu multifonctionnel jouant un rôle majeur dans l'homéostasie du système cardiovasculaire. En effet, il a été reconnu que l'endothélium vasculaire produit et libère des substances vasodilatatrices connues sous le nom de EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factors) (Furchghott et Zawadski, 1980). Il a aussi été observé qu'un endothélium vasculaire intact est essentiel pour obtenir une vasoconstriction (Holden et McCall, 1984). De plus, au cours de la même année, O'Brien et McMurtry (1984) ont démontré que les cellules endothéliales en culture provoquaient une contraction des artères coronaires suggérant ainsi la libération par les cellules endothéliales d'une substance vasoconstrictrice nommée EDCF (Endothelium Derived Constricting Factor). Deux ans plus tard, il a été démontré que l'EDCF perd complètement son effet vasoconstricteur lors d'un traitement préalable à la trypsine, une protéase, suggérant ainsi que l'EDCF est de nature protéique (Gillespie *et al.*, 1986).

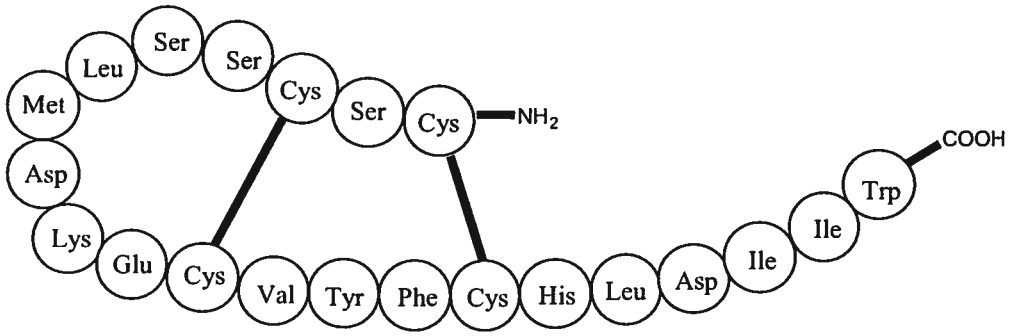
La caractérisation complète d'un peptide vasoconstricteur dérivé de l'endothélium a été réalisée en 1988 par Yanagisawa et ses collègues (Yanagisawa *et al.*, 1988). Ils ont démontré que le surnageant des cellules endothéliales d'aortes porcines en culture permettait une contraction des artères coronaires isolées de porc. Un peptide dérivé des cellules endothéliales a ensuite été purifié et séquencé. Ce peptide, originalement nommé endothéline porcine, est maintenant connu sous le nom de endothéline-1 (ET-1). ET-1 est un peptide de 21 acides aminés dont le poids moléculaire est de 2492 Da. Sa chaîne d'acides aminés est repliée et maintenue par deux ponts disulfures entre les Cys^{1}-Cys^{15} et Cys^{3}-Cys^{11}. De plus, ses extrémités amino- et carboxy-terminales demeurent libres. Les caractéristiques vasoconstrictrices de ET-1 sont d'une magnitude bien supérieures à celles

de l'angiotensine II ou de la norépinéphrine, faisant ainsi de ET-1 l'un des plus puissants vasoconstricteurs connus jusqu'à ce jour, chez les mammifères (Yanagisawa *et al.*, 1988). Depuis son isolation, il a été démontré que ET-1 est encodée dans le génome de plusieurs espèces de mammifères (Saida *et al.*, 1989 ; Kimura *et al.*, 1989 ; Yanagisawa *et al.*, 1989). En effet, l'analyse du génome humain a révélé l'existence de trois gènes distincts encodant pour l'ET. Inoue et son équipe (1989) ont ainsi identifié une région encodant pour la même chaîne d'acides aminés que le peptide originalement isolé du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc, soit l'ET-1. Les deux autres ont alors été nommés endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3). Ces isoformes ne varient que très légèrement du peptide original. En effet, ET-2 n'a que deux acides aminés différents de ET-1 : [Trp^6,Leu^7]ET-1 ; et ET-3 en a six : [Thr^2,Phe^4,Thr^5,Tyr^6,Lys^7,Tyr^{14}]ET-1 (Figure 1).

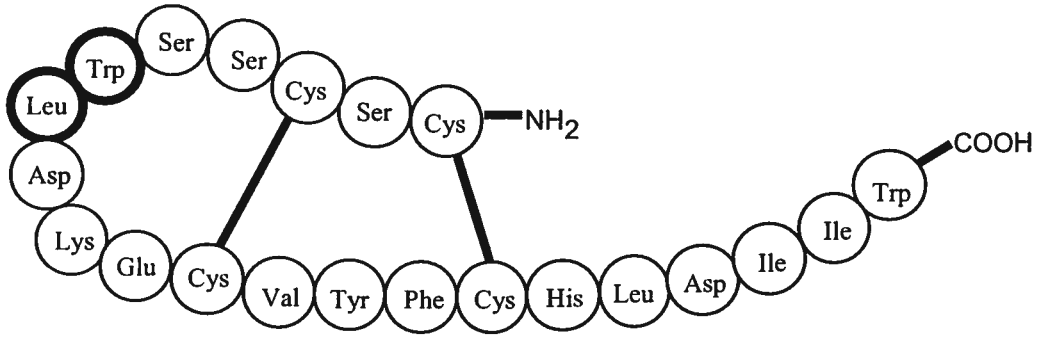
1.2 La biosynthèse de l'ET

L'étude de la biosynthèse des ETs a révélé une voie métabolique très similaire pour ces trois isopeptides (Figure 2). Leur synthèse est stimulée via différents facteurs tels que l'angiotensine II, l'insuline, la bradykinine, les cytokines et certains facteurs de croissance (Ferro et Webb, 1996). Les ETs sont synthétisées à partir de précurseurs connus sous le nom de préproendothélines formés de 160 à 238 acides aminés (Mateo et De Artinano, 1997). Ces protéines sont ensuite scindées entre les positions 51-52 et 92-93 par une convertase, la furine, en proendothélines de 37 à 41 acides aminés aussi appelées Big-endothélines (Denault *et al.*, 1995). Finalement, les Big-ET sont scindées entre les résidus tryptophane et valine pour donner les peptides actifs ET-1 et ET-2, et entre les résidus tryptophane et isoleucine pour donner ET-3. Ce dernier clivage enzymatique implique une métalloendopeptidase spécifique appelée enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). Les caractéristiques vasoconstrictrices des Big-ET étant négligeables, leur conversion en ET s'avère alors essentielle pour l'obtention d'un effet constricteur *in vivo* (Kashiwabara *et al.*, 1989).

ET-1



ET-2



ET-3

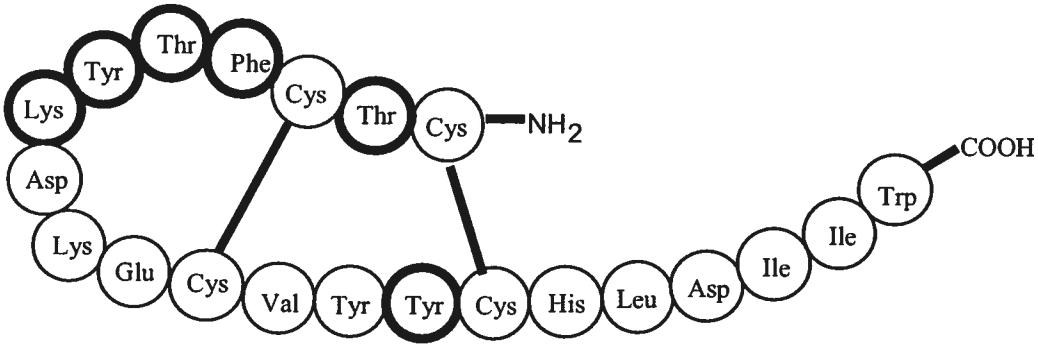


Figure 1 : Structure primaire des trois isoformes de l'ET retrouvés dans le génome humain. Les acides aminés en gras de ET-2 et ET-3 sont ceux qui diffèrent de ET-1.

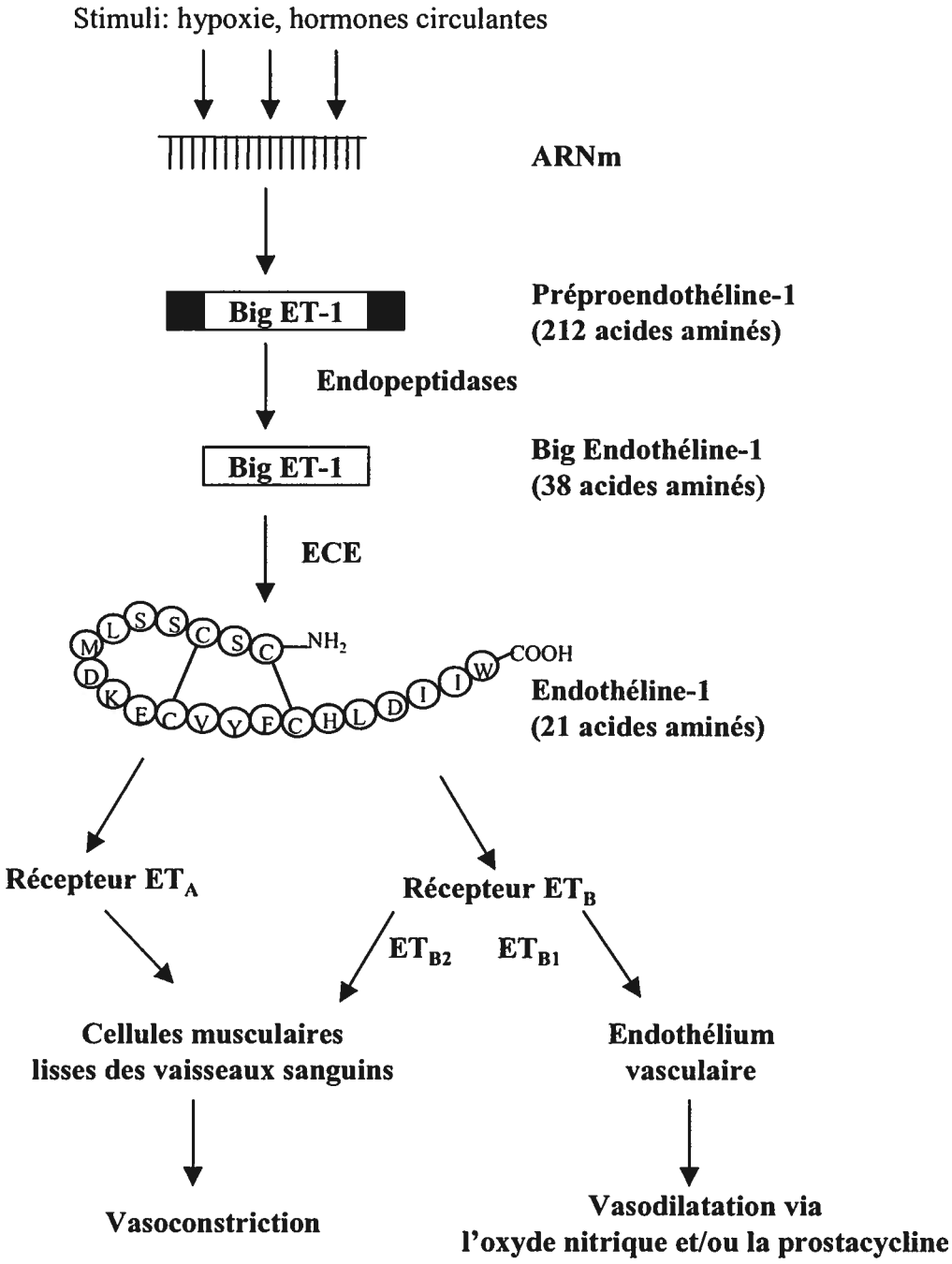


Figure 2: Biosynthèse et mécanisme d'action de l'ET-1 (Tiré de Ferro et Webb, 1996).

1.3 L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE)

L'ECE a été isolée et caractérisée par l'équipe de Ohnaka en 1992. Comme mentionné précédemment, l'ECE est une métalloendopeptidase transmembranaire de type II fortement glycosylée (~10 sites de glycosylation de type N) ayant un poids moléculaire variant de 120-130 kDa. Cette enzyme possède un court domaine cytosolique dans sa portion N-terminale, un segment hydrophobe transmembranaire simple sous forme d'hélice et un grand ectodomaine extracellulaire dans lequel est retrouvée la séquence consensus du site de liaison au zinc : HEXXH ainsi que le site catalytique de l'enzyme (Ohnaka, *et al.* 1992; Takahashi *et al.* 1993). Elle est inhibée par le phosphoramidon mais aucune inhibition n'est constatée en présence de thiorphan, un inhibiteur puissant de plusieurs métalloprotéases (Balwierczak, *et al.* 1995). Cette protéine a été clonée et celle-ci apparaît comme étant un membre de la famille des zinc métallopeptidases qui inclut la NEP, une protéine qui présente des similarités de séquence importantes avec l'ECE (Valdenaire, Rohrbacher, et Mattei 1995). Cette enzyme est responsable du clivage de la BigET en ET tel que décrit précédemment (Figure 2). La sélectivité pour les différentes isoformes de la BigET est BigET-1>>BigET-2 = BigET-3 (Battistini, Brown, et Vane 1995). Plusieurs ADN complémentaires (ADNc) de l'ECE ont été isolés, qui codent pour trois formes de l'ECE : ECE-1, ECE-2 et ECE-3 (Emoto et Yanagisawa 1995; Hasegawa *et al.* 1998; Ikura *et al.* 1994; Schmidt *et al.* 1994; Shimada *et al.* 1995; Shimada *et al.* 1994; Xu *et al.* 1994). De façon générale, ECE-1 est exprimée majoritairement au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses et est responsable du clivage de la BigET-1 (Orzechowski *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 1995). ECE-2 est exprimée de façon prédominante dans le système nerveux central, plus particulièrement au niveau du cerveau, et clive également préférentiellement BigET-1. Pour sa part, ECE-3 clive seulement BigET-3 et non BigET-1. De plus, quatre isoformes de l'ECE-1 humaine ont été décrites à ce jour : ECE-1a et ECE-1b (Valdenaire *et al.* 1995), (aussi nommées ECE-1β et ECE-1α respectivement) (Shimada *et al.* 1995), ECE-1c (Schweizer *et al.* 1997) et ECE-1d (Valdenaire *et al.* 1999). Ces quatre isoformes sont codées par le même gène par le biais de quatre promoteurs différents (Orzechowski *et al.* 1997; Valdenaire *et al.* 1999) et ne diffèrent que par la séquence de leur domaine cytosolique N-terminal.

1.4 Effets physiologiques de l'ET

Des analyses par buvardage Northern ont permis de détecter l'ARNm de l'ET-1 dans une grande variété de tissus mammifères dont les poumons, le cœur, les reins, le foie, le cerveau, la moelle épinière et le système nerveux périphérique. La grande distribution de l'ET et de ses récepteurs démontre que ce peptide participe aux fonctions d'une multitude d'organes (Tableau I). Les propriétés physiologiques des ETs sont multiples suggérant une implication de celles-ci dans diverses pathologies dont l'hypertension, l'ischémie, l'infarctus du myocarde, l'asthme, l'arythmie et l'insuffisance rénale aiguë (Goraca, 2002 ; Touyz et Schiffrin, 2003; Orth, et al., 2001; Schmitz-Spanke et Schipke, 2000). En effet, c'est au niveau du système vasculaire que se retrouvent les effets les plus dominants. Ainsi, lorsque l'ET est liée à son récepteur, un léger effet dilatateur est observé dû à une libération, au niveau de l'endothélium, d'oxyde nitrique (NO) (Warner et al., 1989) et de prostacycline (PGI_2) (De Nucci et al.1988). Cette vasodilatation est suivie par une contraction longue et soutenue résultant d'une liaison ligand-récepteur quasi irréversible. L'élimination de l'ET de son récepteur est un phénomène très lent aux conditions physiologiques expliquant ainsi pourquoi ses effets constricteurs possèdent une très longue durée d'action, soit plus de soixante minutes (Yanagisawa et al., 1988).

Même si l'ET est principalement connue pour ses caractéristiques vasoconstrictrices, il est de plus en plus clair que son effet s'étend au-delà de la vasoconstriction. Des études récentes ont d'ailleurs démontré que l'ET pourrait avoir un rôle dans l'apoptose (Filippatos et al., 2001). Ainsi, ET-1 serait un facteur de survie important pour les fibroblastes et les cellules endothéliales en activant les Map kinases (mitogen-activated protein kinases). De plus l'ET cytosolique préviendrait les surplus de calcium nucléaire dans les cellules musculaires lisses les protégeant ainsi de l'apoptose. Toutefois, d'autres études tendent à prouver l'effet opposé de l'ET. Selon l'équipe de Klainguti (2000), le taux d'ET du myocarde augmenterait après les 20 minutes suivant une ischémie ce qui suggérerait un rôle important de l'ET comme inducteur de l'apoptose. Ces résultats proposent donc que l'ET pourrait être proapoptotique pour les cellules épitheliales et antiapoptotique pour les cellules musculaires lisses.

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

TISSUS OU ORGANES CIBLES	EFFETS BIOLOGIQUES
Muscles vasculaires lisses	• Constriction de longue durée des muscles vasculaires isolés ; • Actions mitogènes sur les cellules musculaires lisses en culture ; • Vasoconstriction des artères coronaires ; • Augmentation de la pression sanguine.
Endothélium vasculaire	• Libération d'oxyde nitrique.
Muscles lisses non-vasculaires	• Constriction des muscles lisses de l'intestin, de la trachée et de l'utérus.
Cœur	• Augmentation de la contractilité ; • Augmentation du débit cardiaque ; • Stimulation de la libération d'ANP.
Poumons	• Bronchoconstricteur puissant.
Tissu nerveux	• Augmentation de la libération de neurotransmetteurs.
Reins	• Inhibition de la libération de la rénine ; • Diminution du flux sanguin rénal ; • Diminution de la vitesse de filtration glomérulaire ; • Diminution de l'excrétion urinaire de Na^+ et de K^+.
Foie	• Activation de la glycogénolyse ; • Stimulation de la production de PGE_2 par les cellules de Kupffer ; • Augmentation de la pression portale ; • Régulation du flux biliaire.
Glandes surrénales	• Stimulation de la biosynthèse de l'aldostérone ; • Libération de catécholamines.

1.5 Les récepteurs de l'ET

Les actions causées par les ETs sont médiées via deux types de récepteurs. En effet, deux ans après la découverte de ces agents vasoconstricteurs, les gènes encodant pour leurs récepteurs ont été clonés et caractérisés. Ils sont connus sous les noms de récepteur ET_A et ET_B (Arai *et al.*, 1990 ; Sakurai *et al.*, 1990). Ces récepteurs sont localisés surtout dans les vaisseaux sanguins. Toutefois, leur présence a été signalée dans plusieurs tissus non-vasculaires tels que le cœur, la rate, les reins, les voies respiratoires, le foie, le pancréas, l'utérus, les glandes surrénales et le système nerveux central (Stjernquist, 1998). Dans le système vasculaire, le récepteur ET_A est composé de 427 acides aminés chez l'homme (PM 48 516 Da). Il appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines-G (GPCR) caractérisée par leurs sept passages transmembranaires (7TM). Il se retrouve majoritairement à la surface des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins pouvant ainsi provoquer leur contraction et leur prolifération. ET-1 possède une affinité beaucoup plus forte pour le récepteur ET_A que ET-2 et ET-3 (ET-1> ET-2 >> ET-3) (Figure 3).

En ce qui concerne le récepteur ET_B formé de 442 acides aminés chez l'humain (PM 46 901 Da), sa localisation se limite principalement à l'endothélium vasculaire où il peut induire la libération de EDRFs tels que l'oxyde nitrique et la prostacycline provoquant ainsi une vasodilatation (Figure 4) (Warner, De Nucci et Vane, 1989). Ce récepteur appartient également aux GPCRs. Les gènes des récepteurs ET_A et ET_B, localisés respectivement sur les chromosomes 4 (Hosada et al., 1992) et 13 (Arai et al., 1993), possèdent une organisation structurale similaire. En effet, il existe entre 55 et 64% de similitude entre les récepteurs ET_A et ET_B humains dépendamment du tissu étudié (Gray et Webb, 1996). La région la plus conservée se retrouve dans les segments hydrophobes qui constituent les hélices transmembranaires. De plus, ces récepteurs possèdent deux sites de N-glycosylation dans leur domaine N-terminal. Toutefois, par opposition au récepteur ET_A, le récepteur ET_B n'est aucunement sélectif liant ainsi ET-1, ET-2 et ET-3 avec une affinité similaire. Or, ce récepteur est aussi retrouvé dans le muscle vasculaire lisse où il peut induire une vasoconstriction. Pour différencier ces deux sous-types de

récepteurs ET_B, on nomma ET_{B1} le récepteur retrouvé au niveau de l'endothélium et ET_{B2}, le récepteur localisé dans le muscle lisse vasculaire (Masaki *et al.*, 1992).

Un troisième récepteur de l'ET, nommé ET_C, a été retrouvé et cloné chez *Xenopus laevis,* une grenouille africaine. Ce récepteur, qui semble plutôt sélectif pour l'ET-3, n'a par contre pas encore été cloné dans le génome des mammifères (Karne et al., 1993).

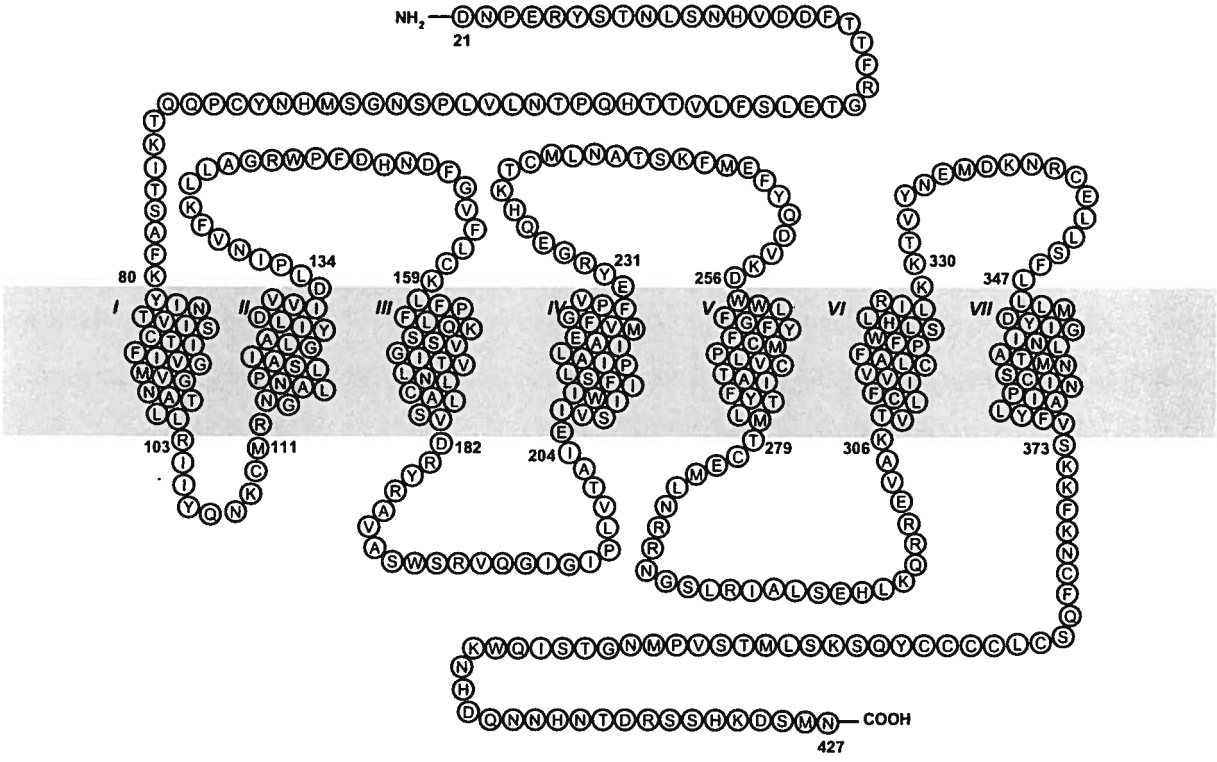


Figure 3 : La structure du récepteur ET_A humain avec ses sept domaines transmembranaires (Voir Appendice A pour les abréviations des acides aminés).

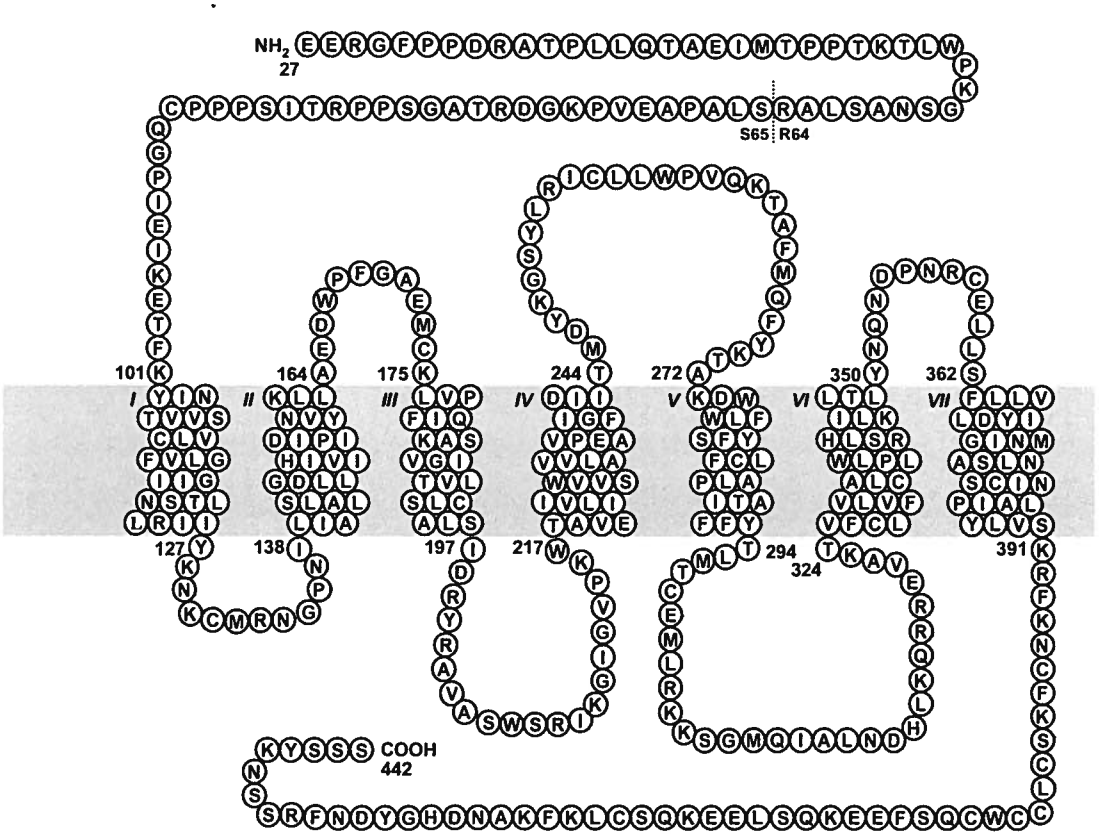


Figure 4 : Représentation schématique du récepteur ET_B humain de l'ET (Voir Appendice A pour les abréviations des acides aminés).

1.6 Voie de signalisation intracellulaire de l'ET

Les nombreux effets produits par les récepteurs de l'ET sont causés par une cascade d'événements (Figure 5). Premièrement, le complexe récepteur-ET se lie à certaines protéines G, plus précisément G_q et G_i, activant ainsi la phospholipase C (PLC) (Neylon, 1999). Celle-ci à son tour hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP_2) en deux produits : l'inositolphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). Ce phénomène entraîne la mobilisation du calcium cytoplasmique par l'IP_3 et l'activation de la protéine kinase C par le DAG. C'est par cette voie de signalisation cellulaire que l'ET produit les mécanismes contractiles (muscles) et sécrétoires (cellules endothéliales) (D'Orléans-Juste et al., 1996).

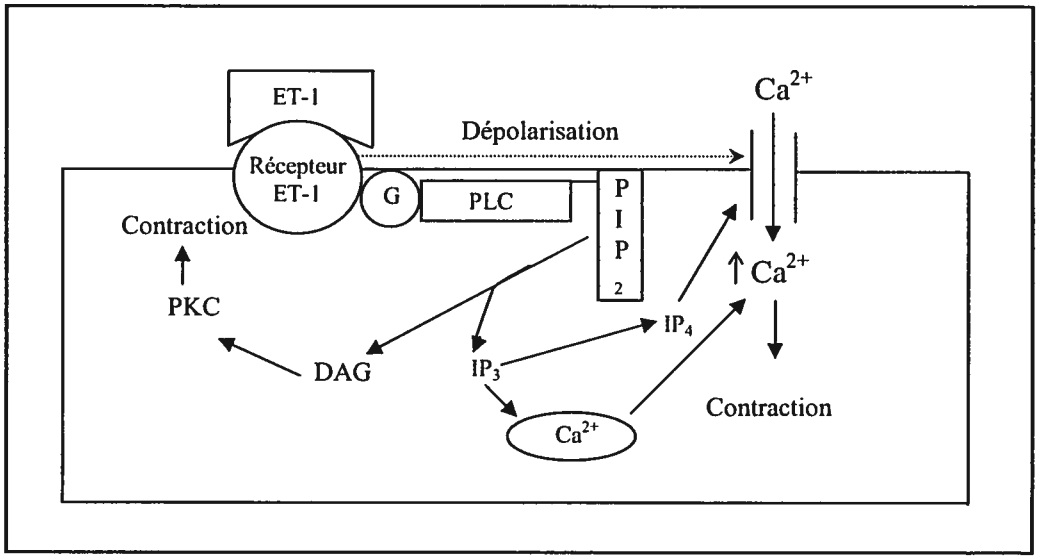


Figure 5 : Cascade d'événements intracellulaires de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses induisant leur contraction (Tiré de Mateo et De Artinano, 1997).

Suite à cette cascade d'événements, il a été démontré que les récepteurs de l'ET sont internalisés. En effet, ET_B serait dirigé vers le lysosome pour y être dégradé. Selon les recherches de Hirata et ses collaborateurs, des expériences de liaison à l'aide de [^{125}I]ET sur des cellules musculaires ont démontré, après 24 heures, une diminution des sites de liaison de l'ET suggérant un phénomène de régulation négative (Hirata et al., 1988). Une étude à l'aide de rats a démontré, cette fois-ci in vivo, les mêmes résultats (ET-1 exogène). Il semblerait que le récepteur ET_B possède un rôle important dans le contrôle du niveau de l'ET et de sa clairance puisqu'une diminution de celle-ci provoque une augmentation de l'ET plasmatique (Fukuroda et al., 1994).

Aussi, pour visualiser le devenir de chaque type de récepteur à l'intérieur de la cellule, la protéine fluorescente verte (green fluorescent protein : GFP) a été fusionnée avec la portion en N-terminal de chaque récepteur (ETR-GFP). Les récepteurs ET_A-GFP et ET_B-GFP ont alors été transfectés dans les cellules d'ovaires de hamsters chinois (CHO). Comme il a été démontré à l'aide d'un microscope à fluorescence, les deux récepteurs partagent dans un premier temps, la même voie de translocation. En effet, les récepteurs liés à l'ET seraient phosphorylés par les kinases GPCR (GRK), liés à l'arrestine et

finalement internalisés via la voie des clathrines pour se retrouver dans l'endosome de triage (*sorting endosome*). L'endosome de triage est une structure tubulovésiculaire où les protéines membranaires destinées à la dégradation sont séparées des protéines recyclées. A partir de ce point, le sort des deux types de récepteurs serait différent. D'un côté, ET_A serait dirigé vers la membrane plasmique. D'un autre côté, ET_B serait dirigé vers les lysosomes pour la dégradation (Bremnes et al., 2000). La différence entre les voies de translocation des récepteurs explique en partie les effets soutenus de ET_A. Puisque ET_A est à nouveau disponible à la surface membranaire, celui-ci peut être encore activé ce qui donne des effets biologiques prolongés. Par opposition, le récepteur ET_B, agirait comme mécanisme de clairance de l'ET au niveau plasmatique puisque le récepteur lié à l'ET est dirigé vers les lysosomes pour y être dégradé.

Selon une étude de Trejo et Couglin (1999), la queue C-terminale des récepteurs jouerait un rôle important suite à l'internalisation des protéines. En effet, la présence des résidus sérines dans la queue des récepteurs couplés aux protéines G stabiliserait la liaison de la protéine arrestine qui ordonnerait au récepteur de se diriger vers les lysosomes (Oakley et al., 1999). Selon l'hypothèse avancée par les auteurs, une liaison moins stable à l'arrestine mènerait vers un recyclage des récepteurs. Il est alors intéressant d'observer que le récepteur ET_B, qui est dirigé vers les lysosomes a un groupe de sérines en C-terminal alors que le récepteur ET_A, qui est recyclé, n'en possède pas. Une meilleure stabilisation de l'arrestine avec ET_B pourrait donc expliquer la différence dans les voie de translocation des deux types de récepteurs de l'ET.

1.7 Les études de structure-activité de l'ET

La cascade d'événements décrite ci-haut conduit à de nombreux effets biologiques (Tableau I) qui en cas d'anomalies peuvent être à l'origine de pathologies. Il est alors important de comprendre le mode d'action à l'échelle moléculaire de l'ET et de ses récepteurs puisque les mécanismes de reconnaissance des ligands aux récepteurs sont à la base du fonctionnement cellulaire.

La structure tridimensionnelle que l'ET adopte dans l'espace joue évidemment un rôle majeur pour sa liaison avec le récepteur. Des études de résonance magnétique nucléaire

(RMN) et de dichroïsme circulaire (DC) ont montré que l'ET-1 forme une structure en hélice alpha impliquant les résidus 9 à 16 (Perkins, Hider et Barlow, 1990 ; Aumelas et al., 1991 ; Tam et al., 1994). Toutefois, des études de cristallographie décrivent différemment la structure de ce peptide. En effet, selon cette méthode, l'extrémité N-terminale formerait un feuillet plissé β suivi par un renflement entre les résidus 5 et 7, d'une boucle liée par un lien hydrogène entre les résidus 7 et 11, et d'une longue hélice irrégulière jusqu'en C-terminale (Wallace et Janes, 1995). Une structure définitive de l'ET-1 s'avère donc difficile à obtenir puisque sa conformation varie selon les études réalisées et les milieux utilisés (Wallace et Janes, 1995).

Par contre, il a été démontré par des études de structure-activité que les extrémités N- et C-terminales de l'ET doivent être libres pour induire une activité biologique (Nakajima et al., 1989). De plus, selon les études initiales sa structure bicyclique serait essentielle pour sa liaison et son activité biologique sur le récepteur ET_A (Doherty, 1992). Plus précisément, le pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 serait beaucoup plus important que celui entre les cystéines 3 et 11 puisque son ouverture donne un analogue dix fois moins puissant sur l'aorte de rat (tissu ET_A majoritaire) que lors du bris du pont disulfure 3-11 (Topouzis, Pelton et Miller, 1989).

A l'opposé, la liaison et l'activité biologique via les récepteurs ET_B n'exigeraient aucunement la présence de ponts disulfures, tel qu'illustré par une activité biologique équipotente de l'analogue substitué tétra-alanyl [$Ala^{1,3,11,15}$]ET-1 versus le peptide original ET-1 (Randell, Douglas et Hiley, 1989). La liaison aux récepteurs ET_B requiert toutefois la chaîne d'acides aminés hydrophobes en C-terminal et notamment la présence du tryptophane en position 21 (Panek et al., 1992). Néanmoins, des recherches menées dans notre laboratoire ont permis d'observer que le résidu tryptophane en position 21 de l'ET pouvait subir certaines transformations sans altérer l'activité biologique sur le récepteur ET_B. Ainsi une modification par un groupe formyle sur le noyau indole de sa chaîne latérale n'affecte pas l'activité biologique de ET-1 dans la trachée de cobaye. L'importance de ce groupement protecteur a été observée lors de l'évaluation pharmacologique de deux analogues de ET. Ainsi, le peptide [$Cys(Acm)^{3,11}$,$Trp(For)^{21}$]-(3-11)-Aca-(17-21)ET a montré une activité agoniste partielle chez le cobaye alors que son homologue déformylé n'a montré aucune activité. La perte d'activité biologique de

l'analogue déformylé suggère que le groupement formyle produit un effet stabilisateur sur l'arrangement spatial de la molécule tel qu'il a été démontré par des études de modélisation moléculaire (Germain et al., 1993, Forget et al., 1996).

Parmi les isoformes de l'ET, la région chargée Asp^{8}-Lys^{9}-Glu^{10}, est hautement conservée. La substitution de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique par une alanine a montré que ces sites étaient sensibles aux modifications. En effet, il a été observé que [Ala^{8}]ET-1 était 125 fois moins actif que l'ET-1, et que [Ala^{10}]ET-1 n'était qu'un agoniste partiel. Les charges négatives des fonctions carboxyliques situées aux positions 8 et 10 semblent donc être critiques pour l'activité de l'ET-1. La position 9 occupée par la lysine n'apparaît pas quant à elle aussi importante puisque la substitution de cet acide aminé par une alanine, une leucine ou un acide glutamique ne modifie en rien l'activité biologique de l'ET-1 (Pelton, 1997).

Le but principal des études de structure-activité de l'ET est de définir le rôle joué par chaque acide aminé dans la stabilité de la molécule entière et dans ses fonctions biologiques. Ces études permettent alors une meilleure compréhension des interactions de l'ET avec ses récepteurs pouvant même conduire à la création d'outils pharmacologiques-clés de ce peptide. Hormis les recherches sur l'importance des ponts disulfures, le tryptophane[21] et les acides aminés chargés, des analyses par balayage au moyen de l'acide aminé alanine ont été effectuées par Tam et ses collègues. Ils ont alors découvert que les résidus Asp^{8}, Tyr^{13}, Phe^{14}, Leu^{17} et Trp^{21} sont d'une importance majeure pour l'activité biologique de l'ET sur les récepteurs de type ET_A. Ainsi, la substitution des acides aminés aux positions 13, 14 et 21 par une alanine réduit considérablement la liaison des peptides, démontrant ainsi que ces résidus sont importants pour le contact avec le récepteur. De façon moins drastique mais tout de même notable, les trois résidus Val^{12}, Asp^{18} et Ile^{20} se montrent partiellement tolérants à la substitution par une alanine. Ces résultats démontrent ainsi l'importance des acides aminés hydrophobes, plus particulièrement des aromatiques, au niveau de la liaison et de l'activité de l'ET (Tam et al., 1994). Des résultats similaires présentés par l'équipe de Hunt suggèrent que les résidus 8, 13, 20 et 21 sont aussi des sites importants pour la liaison au récepteur et que les résidus 10, 14, 17 et 18 sont responsables de son activation (1991).

1.8 Les analogues de l'ET

Plusieurs outils pharmacologiques (agonistes et antagonistes) disponibles actuellement pour la caractérisation des récepteurs ET_A et ET_B ont été développés à partir des études de structure-activité de l'ET (Tableau II). Puisque l'équipe de Kimura a démontré que seule la portion C-terminale de l'ET et son Trp^{21} sont essentiels à sa liaison au récepteur ET_B (1988), plusieurs ligands sélectifs pour ce récepteur ont été synthétisés tels que BQ-3020 (N-acétyl-[$Ala^{11,15}$] ET-1 (6-21) (Ihara et al., 1992), [$Ala^{1,3,11,15}$]ET-1 (Randell, Douglas et Hiley, 1989) et l'IRL-1620 (N-succinyl-[Glu^{9}, $Ala^{11,15}$] ET-1 (8-21) (Takai et al., 1992). Or il existe aussi des ligands naturels qui ont une sélectivité pour le récepteur ET_B. La sarafotoxine 6c, un peptide retrouvé dans le venin de certaines vipères, possède d'ailleurs une sélectivité 30 000 fois plus importante pour le récepteur ET_B que ET_A (Williams et al., 1991). L'isoforme ET-3 est aussi un ligand sélectif pour ET_B. Ainsi, même si ces deux derniers peptides contiennent de grandes similarités avec ET-1, il semblerait que les différences dans la séquence en acides aminés soit le facteur expliquant la différence d'affinité pour le récepteur ET_A. A l'opposé, il existe le BQ-788, un antagoniste peptidique qui est plus sélectif pour l'inhibition de l'ET via le récepteur ET_B (Ishikawa et al., 1994). Ce composé a d'ailleurs largement été utilisé dans la recherche expérimentale sur les animaux lors de la caractérisation des récepteurs de l'ET.

Pour ce qui est du récepteur ET_A, l'un des premiers antagonistes sélectifs pour ce récepteur a été le BQ-123, un peptide dérivé des produits de fermentation de la bactérie *Streptomyces misakiensisy* (Ihara et al., 1992). BQ-123 est en fait un pentapeptide cyclique qui a permis de confirmer le rôle de l'ET dans plusieurs pathologies (Moreland, 1994). Le BQ-610 est aussi un antagoniste peptidique de ET_A. En effet, ce composé inhiberait la vasoconstriction cérébrale produite par une hémorragie subarachnoïde laquelle serait médiée par l'action de l'ET sur le récepteur ET_A (Zuccarello, Lewis et Rapoport, 1994). Parmi les antagonistes peptidiques, il faut aussi compter l'hexapeptide TTA-386 (hexaméthylèneiminocarbonyle-Leu-trp-ala-βAla-Tyr-phe) qui est l'un des plus puissants antagonistes du récepteur ET_A (Kitada et al., 1993).

Tel que le démontre la description ci-haut, plusieurs composés peptidiques ont des propriétés agonistes ou antagonistes pour le récepteur ET_B ou des propriétés antagonistes

sélectives pour le récepteur ET_A. Néanmoins, malgré toutes les recherches menées jusqu'à ce jour un seul agoniste sélectif pour le récepteur ET_A a été développé. Ce peptide, un analogue cyclisé tronqué de l'ET, démontrerait une sélectivité 1000 fois plus grande pour le récepteur ET_A (Langlois et al., 2003). Le développement d'un tel agoniste permettra alors de poursuivre la caractérisation pharmacologique et structurale de ce récepteur.

La recherche sur les analogues de l'ET ne se limite toutefois pas aux composés peptidiques. Puisque plusieurs pathologies du système cardiovasculaire sont intimement reliées à l'ET, le développement d'antagonistes est primordial pour le traitement clinique. Or l'administration d'un composé peptidique doit généralement se faire de façon parentérale. Donc le développement d'antagonistes non-peptidiques pouvant être administrés oralement est d'un grand intérêt médical. Le composé SB-209670 est capable d'inhiber l'effet contractile de l'ET dans l'aorte de rat et démontre une sélectivité 90 fois plus grande pour ET_A que ET_B (Ohlstein, et al., 1994). Néanmoins, l'un des antagonistes les plus connus est le Ro47-0203 aussi appelé Bosentan (Clozel et al., 1993). Ce dérivé sulphonamide est un antagoniste non sélectif pour les deux récepteurs de l'ET. Dans les modèles expérimentaux de syncope, le Bosentan agit comme vasodilatateur et comme bloqueur neurohormonal améliorant ainsi la performance ventriculaire gauche et réduisant le dysfonctionnement rénal. Les essais cliniques sur des patients hypertendus indiquent que le Bosentan réduit la pression sanguine sans augmenter la vitesse cardiaque ou la stimulation neurohormonale. (Roux et al., 1999). De plus, l'administration du Bosentan et de l'antagoniste sélectif ET_A LU135252 aux patients pris avec des problèmes cardiaques a démontré l'amélioration de leurs fonctions hémodynamiques (Russell et Molenaar, 2000). Un autre antagoniste pourrait aussi venir améliorer la survie des gens atteints du cancer de la prostate. Le ABT-627, mieux connu sous le nom de atrasantan, provient d'une famille de quatre petites molécules antagonistes (ABT-627, ABT-546, A-182086 et A-192621) qui démontrent une sélectivité différente pour les récepteurs ET_A et ET_B (Jae et al., 2001; Wessale et al., 2002). L'atrasantan, qui est sélectif pour le récepteur ET_A, est présentement étudié au sein d'un sous-groupe de patients souffrant d'un cancer avancé de la prostate (Carducci et al., 2003 ; Jimeno et Carducci, 2005). L'ET étant suspecté de jouer un rôle important dans le développement du cancer de la

prostate, l'emploi d'un antagoniste pourrait diminuer la prolifération des cellules malignes. Or les études cliniques n'ont pas encore réussi à démontrer un avantage considérable à l'utilisation de l'atrasentan par rapport au placebo. De nombreux effets indésirables ont été observés de façon plus fréquente chez ceux qui ont été traités à l'atrasentan comparativement aux patients traités par placebo. Les patients souffraient alors d'oedème périphérique, de rhinite, de mal de tête, d'infection, de dyspnée et d'insuffisance cardiaque. Le rôle de l'atrasentan comme médicament anticancéreux n'est donc pas encore au point. Toutefois, les études sur ce composé continuent non seulement pour le cancer de la prostate mais aussi pour le cancer du rein, de l'ovaire, du sein, du cerveau, du poumon ainsi que pour le cancer colorectal. De telles avancées scientifiques suggèrent donc que les antagonistes des récepteurs de l'ET ont un potentiel thérapeutique important qui ne se borne pas au traitement des maladies cardiovasculaires.

Tableau II. Structure de certains analogues de l'ET.

ANALOGUES DU RÉCEPTEUR ET_A	
Agoniste peptidique	[D-Lys^{9}]cyclo$^{11-15}$ ET-1(9-21)
Antagoniste peptidique	BQ-123 : cyclo (D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu) BQ-610 : hexaméthylèneiminocarbonyle-Leu-D-Trp(CHO)-D-Trp TTA-386 : hexaméthylèneiminocarbonyle-Leu-D-Trp-D-Ala-βAla-Tyr-D-phe
Antagoniste non-peptidique	LU135252 : acide α-[4,6-diméthoxy-2-pyrimidinyl)oxy]-méthoxy-phényl-(S)-benzène-propanoïque ABT-546 : acide [2S-(2,2-diméthylpentyl)-4S-(7-méthoxy-1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(N,N-di(n-butyl) aminocarbonylméthyl)-pyrrolidine-3R-carboxylique Atrasentan : dérivé de l'acide 2,4-Diarylpyrrolidine-3-carboxylique
ANALOGUES DU RÉCEPTEUR ET_B	
Agoniste Peptidique	BQ-3020 : N-acétyl-[Ala^{11,15}] ET-1 (6-21) [Ala^{1,3,11,15}]ET-1 IRL-1620 : N-succinyl-[Glu^{9}, Ala^{11,15}] ET-1 (8-21) Sarafotoxine 6c : [Thr^{2},Asn^{4},Asp^{5},Met^{6},Thr^{7},Glu^{9}, Leu^{12}, Asn^{13}, Gln^{17}, Val^{19}]ET-1 ET-3 : [Thr^{2},Phe^{4},Thr^{5},Tyr^{6},Lys^{7},Tyr^{14}]ET-1
Antagoniste Peptidique	BQ-788 : N-cis-2,6-diméthylpipéridinocarbonyl-L-γMe-Leu-D-Trp(COOMe)-D-NleONa
Antagoniste non peptidique	A-192621 : dérivé de l'acide 2,4-Diarylpyrrolidine-3-carboxylique
ANALOGUES NON-SPÉCIFIQUES DES RÉCEPTEURS ET_A ET ET_B	
Antagoniste non peptidique	Bosentan : 4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxy-éthoxy)-5-(2-méthoxy-phénoxy)-2,2'-bipyrimidin-4-yl]-benzène-sulfonamide SB-209670 : acide disodique (+)-(1S, 2R,3S)-5-propoxy-1-(3,4-méthylène-dioxyphényl)-3-(2-carboxyméthoxy-4-méthoxyphényl)indane-2-carboxylique A-182086 : dérivé de l'acide 2,4-Diarylpyrrolidine-3-carboxylique

1.9 Domaine de liaison des récepteurs de l'ET

Comme le suggèrent les essais cliniques, le développement d'analogues de l'ET est primordial. Néanmoins, la mise au point de nouveaux composés nécessitent non seulement une connaissance approfondie du peptide mais aussi de ses récepteurs afin de bien évaluer leurs interactions. Plusieurs chercheurs se sont donc attardés à déterminer les domaines sur les récepteurs de l'ET qui sont essentiels à la liaison du peptide. Les régions extracellulaires en N-terminal des récepteurs couplés aux protéines G sont reconnues comme étant des domaines importants pour la liaison des ligands (Nagayama et al., 1991). Plus précisément, des études ont démontré que les acides aminés de la partie N-terminale des récepteurs ET_A qui sont à proximité du premier domaine transmembranaire seraient essentiels à la liaison de l'ET puisque leur délétion inactive la réponse cellulaire (Hashido et al., 1992). Une petite région de 29 acides aminés en N-terminale de ET_B serait quant à elle cruciale pour la stabilisation du complexe ligand-récepteur. Une étude plus approfondie de cette région a démontré que la charge de Asp^{75} et le résidu Pro^{93} serait essentielle dans la stabilisation du complexe ET_BR-ET-1. Ce segment pourrait interagir avec une autre région du récepteur qui elle serait, en réalité, le site de liaison (Takasuka et al., 1994).

Une autre perte d'activité a également été observée au niveau du récepteur ET_B. En effet, l'ablation du segment C-terminal après Cys^{402} n'influence pas l'activité de ET_B mais la suppression incluant Cys^{402} inactive le récepteur (Koshimizu et al., 1995). Selon ces chercheurs, la Cys^{402} serait essentielle pour la signalisation intracellulaire du calcium. Les acides aminés cystéine des récepteurs sont des sites de palmitoylation importants. La palmitoylation permettant aux protéines G de s'associer aux récepteurs de l'ET, la perte d'activité pourrait être causée par une non reconnaissance du récepteur ET_B par les protéines G.

L'équipe menée par Sakamoto a, quant à elle, utilisé les récepteurs chimères (hybrides) ET_A/ET_B, obtenus par biologie moléculaire, pour identifier les boucles peptidiques extracytosoliques du récepteur ET_A et ET_B impliquées dans leur sélectivité. Ils ont ainsi démontré qu'ils pouvaient permettre à ET_B de lier BQ-123, un antagoniste sélectif pour ET_A, en remplaçant les régions transmembranaires I, II, III et VII de ET_B par la séquence

de ET_A (Sakamoto et al., 1993). Ils ont également démontré que ET_A pouvait lier l'IRL-1620, un agoniste spécifique de ET_B, s'ils changeaient la région IV-VI de ET_A par la séquence retrouvée dans ET_B. De plus, ils ont prouvé que l'activation du récepteur chimère ET_A (pouvant lier l'IRL-1620) provoquait une augmentation transitoire du taux de $[Ca^{2+}]_i$ ce qui démontre que les modifications apportées n'altéraient pas leur activité biologique. Il a ainsi été proposé que les récepteurs de l'ET peuvent être divisés en deux régions distinctes, une incluant les domaines transmembranaires I, II, III et VII qui serait impliquée dans la liaison du ligand à son récepteur et une autre région composée des domaines transmembranaires IV à VI qui serait responsable de la sélectivité du ligand. Ces résultats s'ajoutent à ceux observés par l'équipe d'Adachi (1992) qui a montré que le remplacement de la première boucle extracellulaire de ET_A par la séquence de ET_B provoquait une perte d'affinité pour BQ-123 alors que la substitution des autres domaines extracellulaires n'affectait en rien l'inhibition par le BQ-123. Si à l'inverse, cette boucle de ET_A est substituée dans le récepteur ET_B, BQ-123 peut s'y lier. BQ-123 se lierait donc sur la première boucle extracellulaire du récepteur ET_A. Peu de temps après, l'équipe identifia un court segment de cette boucle correspondant aux jonctions 140-144 (K-L-L-A-G), qui semble être essentiel pour la liaison du ligand par ET_A (Adachi et al., 1993).

De plus, des études de modélisation moléculaire en association avec des études de mutagénèse dirigée ont permis d'identifier les acides aminés non conservés dans les récepteurs ET_A et ET_B qui peuvent être importants dans la sélectivité des ligands. En effet, la mutation d'un acide aminé du récepteur peut à elle seule empêcher la formation du complexe ligand-récepteur si l'acide aminé est situé ou impliqué dans le site de liaison du ligand. Ces études ont alors montré que la Tyr^{129} (Krystek et al., 1994 ; Lee et al., 1994) et la Lys^{140} (Adachi et al., 1994) situées dans le deuxième domaine transmembranaire du récepteur ET_A humain et la Lys^{181} localisée dans le troisième domaine transmembranaire du récepteur hET_B (Zhu et al., 1992) sont des acides aminés importants pour la liaison de ET. Ainsi, par de nombreuses approches (études de structure-activité, analyse mutationelle, génération de récepteurs mutants) de nombreux chercheurs participent à l'évaluation de l'interaction entre l'ET et ses récepteurs. Par complémentarité aux études déjà entamées, la technique de photomarquage a donc été utilisée.

Chapitre 2

Le photomarquage

2.1 Les usages du photomarquage

Introduit par Westheimer (Singh et al., 1962), le photomarquage réfère à une variété de méthodes faisant appel à la photochimie. Cette technique utilisée depuis plus d'une quarantaine d'années, permet d'explorer les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines en utilisant un agent photoactivable. Le marquage par photoaffinité permet entre autres, d'identifier et de localiser le récepteur cible de ligands comme les peptides, les médicaments et les toxines. Il permet également d'établir l'existence d'isoformes de récepteurs. Cette information est cruciale afin de développer des médicaments agissant comme agoniste ou antagoniste de récepteur tout en prévenant les réactions secondaires souvent médiées par une reconnaissance non spécifique du ligand. De plus, les sondes photosensibles peuvent être utilisées afin de vérifier l'expression d'un récepteur chez diverses espèces, organes, tissus et types cellulaires.

Le photomarquage est aussi fréquemment utilisé pour marquer et identifier directement le site de liaison ligand-récepteur ou enzyme-substrat. Après protéolyse et purification du site de liaison (ou catalytique), il est possible de séquencer la région reconnue par le ligand. Cette région peut ensuite être modifiée par mutagénèse dirigée afin d'évaluer son rôle dans l'activité biologique de la protéine.

Finalement, l'utilisation de sondes photosensibles permet d'obtenir de l'information sur la structure du complexe ligand-récepteur et permet, avec l'aide de la mutagénèse dirigée, la résonance magnétique, le dichroïsme circulaire et la bioinformatique d'établir des modèles structuraux 3D. Une fois la modélisation complétée, il est possible de comparer la structure obtenue avec d'autres modèles protéiques aux fonctions biologiques connues. Puisque la présence d'un ligand induit un changement conformationnel du récepteur en une forme active afin d'induire la réponse cellulaire, le photomarquage permet donc d'obtenir des données sur la structure du complexe ligand-récepteur, contrairement à la cristallographie et la résonance magnétique nucléaire qui, de façon générale, permettent d'étudier la structure tridimensionnelle des ligands et des récepteurs sous leurs formes individuelles libres (Dorman et Prestwich, 2000).

2.2 La méthodologie générale

Les recherches biochimiques via la technique de photomarquage requiert l'usage d'un protocole bien défini. De façon générale, une sonde de haute affinité, dont sa séquence contient un dérivé chimique réactif à la lumière UV, est mise en présence de la protéine à l'étude. Le ligand souvent peptidique doit posséder une haute affinité pour la protéine malgré la présence du groupement photosensible. A ce moment, une interaction non-covalente s'établit entre le ligand photosensible et la protéine. Sous irradiation, le groupement photoactivable de la sonde forme un intermédiaire hautement réactif qui peut réagir avec son environnement immédiat, créant ainsi un lien irréversible entre le ligand et sa cible. La protéine photomarquée peut ensuite être repérée sur un gel de polyacrylamide et purifiée. Une digestion chimique et/ou enzymatique permet ensuite de cliver cette protéine en plusieurs fragments dont un sera lié à la sonde. La séparation des fragments de digestion sur un gel de polyacrylamide (PAGE), en condition dénaturante et réductrice, compte tenu de la présence du 2-mercaptoéthanol et du dodécylsulfate de sodium (SDS), permet de déterminer la masse du fragment lié à la sonde. Une analyse de la structure primaire de la protéine et un séquençage nous permet finalement de déterminer spécifiquement la nature du fragment lié au dérivé photoactivable présent dans la sonde utilisée. Connaissant la séquence de la sonde et de la protéine étudiée, il est alors possible de positionner les acides aminés jouant un rôle potentiel dans la reconnaissance du ligand (Figure 6).

De plus, afin de permettre l'identification et l'analyse du complexe photomarqué ligand-protéine, la sonde photosensible utilisée doit nécessairement être détectable grâce à un atome radioactif (^{125}I, ^{35}S, ^{3}H), une séquence fluorescente (biotine-tag) ou encore être immunoréactive et reconnue par un anticorps. L'emploi de l'iode comme radiomarqueur est fréquent puisque le marquage peut s'effectuer après la synthèse du ligand photosensible contrairement au soufre et au tritium (Kienhuis et al., 1991). Toutefois, l'avantage du marquage par fluorescence à l'aide de la biotine permet l'utilisation de la spectrométrie de masse qui offre la possibilité d'analyser et de séquencer, sans contaminer l'appareil, les fragments d'une protéine photomarquée (Sachon et al., 2003).

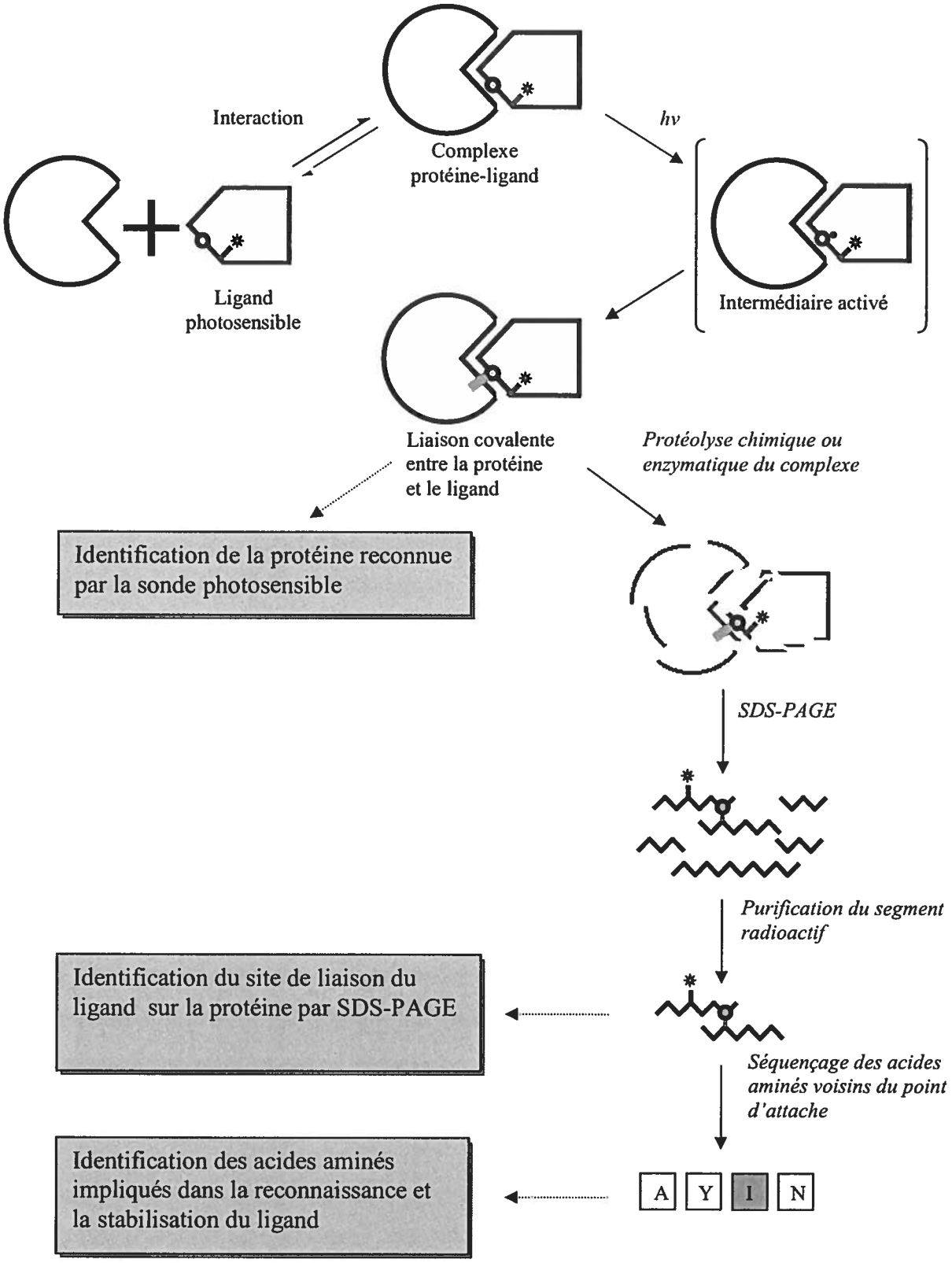


Figure 6. Les différentes étapes de la technique de photomarquage (inspiré du schéma trouvé sur le site web http://wwwlib.umi.com/dissertations/preview_all/9948975)

2.3 Les groupes photoactivables

La première étape de la technique de marquage par photoaffinité consiste à synthétiser une sonde portant un agent photosensible. Or il existe un nombre limité de groupements chimiques photoactivables pouvant être utilisé pour le photomarquage. Afin de choisir le bon groupement, il est à noter que celui-ci doit rencontrer plusieurs exigences. Tout d'abord, le groupe photosensible doit être relativement stable (inerte) à la lumière ambiante jusqu'au moment de l'activation par une source extérieure. Il doit être activable à une longueur d'onde près du visible afin de prévenir des dommages photolytiques de l'échantillon (>280 nm zone d'absorbance des protéines). La durée de vie de l'intermédiaire doit être assez longue pour que celui-ci ait le temps de réagir avec la protéine étudiée mais assez courte afin de prévenir sa diffusion vers un site non-spécifique causée par la dissociation du ligand. La forme intermédiaire activée ne doit pas subir de réarrangement intramoléculaire afin de le stabiliser ce qui aurait pour effet de diminuer considérablement les rendements. La forme activée doit être hautement réactive et capable de s'insérer à l'intérieur de lien de toutes natures, et ce, sans discrimination. Ce ne sont pas tous les groupements photoactivables qui peuvent s'insérer dans un lien aliphatique C-H. De plus, plusieurs groupes photosensibles montrent une certaine préférence pour quelques liens. Le complexe ligand activé-récepteur doit être suffisamment stable afin de permettre l'isolation, la purification et le séquençage du fragment. Finalement, le groupement photoactivable doit être assez petit afin d'éviter un phénomène d'encombrement stérique qui pourrait limiter l'accessibilité au site (Brunner, 1993 ; Kotzyba-Hibert et al., 1995).

De nombreuses études ont montré la grande efficacité du photomarquage en utilisant les groupements suivants comme agents photosensibles : les aryldiazirines, les azides, les composés diazonium et les benzophénones (Figure 7). Il a été démontré que ces groupements, une fois excités, prennent une configuration électronique différente et peuvent former un lien covalent chimique avec une biomolécule. La majorité des réactifs se basent sur la chimie des nitrènes ou des carbènes comme il sera expliqué dans les prochaines sections.

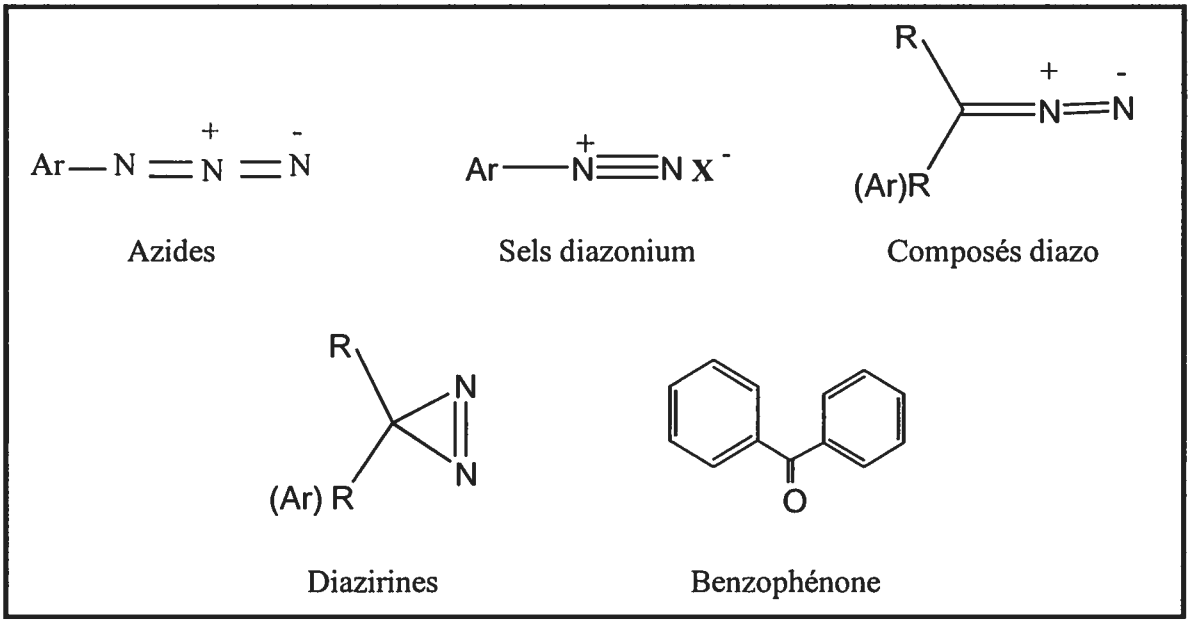


Figure 7. Groupements chimiques utilisés fréquemment dans les études de photomarquage.

2.4 Les azides

Ils ont tenu un rôle primordial dans le développement du photomarquage et sont des groupements encore utilisés. Les azides sont des composés chimiques formés d'un groupe de trois azotes liés à partir d'un des atomes d'azote à une structure aryle. Ils peuvent prendre la forme de phénylazide substitué avec des groupements nitro- ou non. La popularité de ces groupements réside en leur grande stabilité chimique dans l'obscurité. La chimie des nitrènes explique la réactivité de ces composés. Leur déficience en électron est responsable de leur très grande réactivité à réagir avec des doubles liens ou avec des hétéroatomes (S,O,N...) possédant des paires d'électrons libres. La réaction est extrêmement rapide et favorisée par la formation d'un gaz N_2. Sous irradiation, l'azide perd deux atomes d'azote et se retrouve sous forme d'espèce N radicalaire (singulet) (Brunner, 1993). Longtemps on a cru que l'intermédiaire radicalaire était responsable de la nouvelle liaison formée entre le ligand et la protéine cible. Cependant, des recherches ont démontré que le cycle de l'intermédiaire activé subissait un réarrangement en azacycloheptatetraène (Bayley et Staros, 1984). Cette forme est beaucoup moins réactive que la forme radicalaire et ne peut, contrairement à d'autres groupements photosensibles, s'introduire à l'intérieur d'un lien C-H sans que celui-ci ne soit activé. Ce problème a été corrigé avec le développement d'une nouvelle classe dérivée des azides, les perfluorophénylazides. Ces groupements se sont montrés plus réactifs que les précédents en s'introduisant dans les liens C-H. La substitution par les fluors sur le cycle défavorise considérablement l'expansion du cycle perfluorophénylnitrène en azacycloheptatétrane en augmentant la barrière énergétique nécessaire au réarrangement (Figure 8) (Schnapp et al., 1993). Par après, ces molécules ont été remodelées afin d'augmenter encore leur efficacité vis-à-vis certaines protéines ou molécules. Les arylazides substitués avec des fluors peuvent être activés à des longueurs d'onde inférieures à 300 nm, ce qui est utile en présence de protéine sensible. Cependant, l'un des inconvénients des azides est la possibilité de perdre l'iode radioactif nécessaire à la détection. Il a en effet été démontré que l'azide dans un cycle aromatique peut réagir avec l'iode et provoquer son détachement du ligand (Henriksen et Buchardt, 1990).

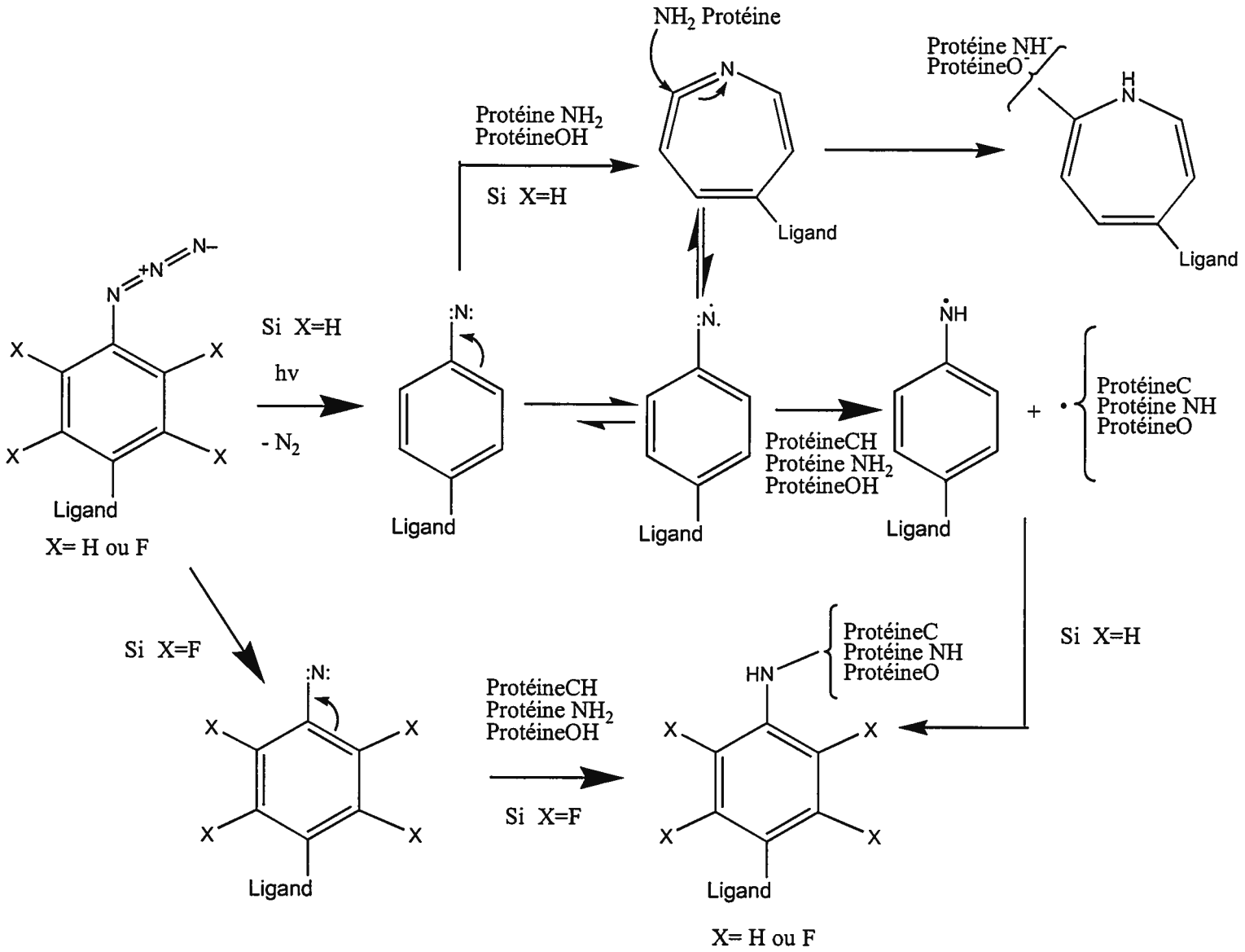


Figure 8. Réactions photochimiques des composés arylazides lors du photomarquage.

2.5 Les diazirines (et les composés diazo)

Les diazirines firent leur apparition dans les années 70 (Smith et Knowles, 1973). Ces groupements ont été reconnus pour leur stabilité face à diverses conditions. Les diazirines sont la forme cyclique et neutre des composés diazo. Ils ne possèdent que deux atomes d'azote et forment un intermédiaire activé autour de 360 nm via un carbène contrairement aux arylazides (nitrène). Sous irradiation les diazirines et les diazo forment une espèce diradicalaire. A ce moment, leur déficience en électron en font de puissants électrophiles. Un premier radical arrache un proton d'un lien C-H de la protéine ce qui le neutralise. Le nouveau radical (C·) nouvellement formé sur le récepteur peut partager son électron avec celui du radical sur le ligand et former un lien covalent intermoléculaire (Figure 9).

L'utilisation des diazirines possèdent quelques inconvénients non négligeables. L'activation des diazirines conduits à la formation d'une espèce linéaire fortement alkylante pouvant être responsable de réactions indésirables. Ce problème fut limité avec la synthèse du 3-trifluorométhyl-3-aryldiazirines en 1980 (Brunner et al., 1980). L'espèce activée est stabilisée par la présence des fluors évitant ainsi les réactions secondaires. Lorsque le groupement est activé dans un solvant organique de type aprotique, le carbène peut s'insérer à un lien C-H avec un rendement de plus de 70 %. Cependant, les diazirines peuvent être instables dépendamment des conditions des analyses. En effet, la liaison avec la chaîne latérale de la lysine sera brisée lors du séquençage du peptide. D'autres formes telles que le perfluorophénylazides sont préférables, mais en contre partie, elles sont moins stables à la chaleur et demandent une longueur d'onde plus courte donc plus énergétique afin d'être activées.

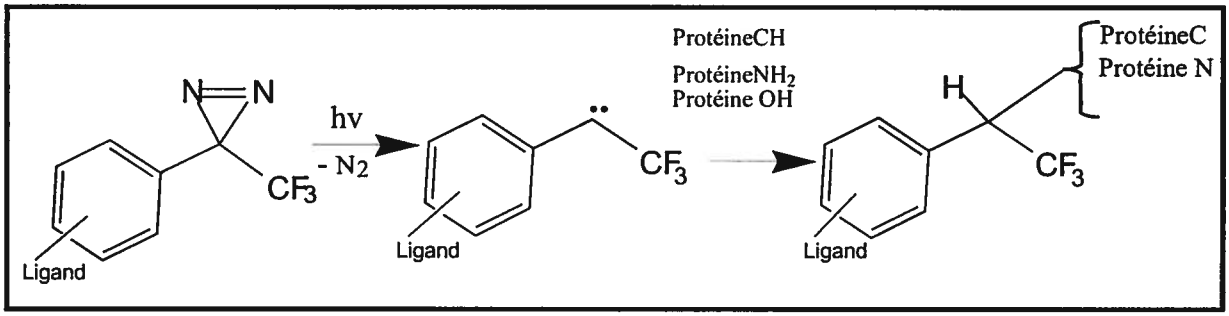


Figure 9. Réactions photochimiques des composés diazirines lors du photomarquage.

2.6 Les benzophénones (BP)

Les groupements dérivant des benzophénones ($(C_6H_5)_2CO$) possèdent deux avantages majeurs dans les études de photomarquage. Le premier est leur stabilité chimique à la luminosité. En effet, ils sont plus stables que les diazoaryles, les arylazides et les diazirines, et ils peuvent être manipulés à la lumière ambiante (Weber et Beck-Sickinger, 1997). De plus, leur activation à 350-360 nm est sans risque pour les protéines. Le second avantage provient de leur réactivité exceptionnelle une fois irradiée.

La photochimie impliquant les groupements benzophénones (BP) est bien caractérisée. La photoactivation des BPs ($\lambda \geq 320$ nm) génère un carbone et un oxygène radicalaires [$C^{\bullet}$-$O^{\bullet}$]. Le radical $O^{\bullet}$ va déloger un proton situé à proximité sur le récepteur (C_α-H), ce qui provoquera sur celui-ci l'apparition d'un carbone $C^{\bullet}$. Le carbène du ligand peut alors lier le $C^{\bullet}$ du récepteur et ainsi former un nouveau lien covalent intermoléculaire (Figure 10). Cette réaction ne peut avoir lieu que si l'oxygène de la fonction cétone du BP se trouve une distance de moins de 3.1Å du récepteur (Dorman et Preststwich, 1994). Le carbène hautement instable peut théoriquement s'introduire à l'intérieur d'un lien O-H aqueux. Cependant, le lien C_α-H plus faible, est préféré. Il est ainsi possible de travailler en milieux aqueux. Par contre, l'ordre de réactivité du BP avec le –H d'une protéine donneuse étant: NCH > SCH > $C=CH_2$ > $-CH_2-$ > CH_3, le BP réagit particulièrement en présence d'un hétéroatome tertiaire riche en électrons tel que celui qui est retrouvé dans la méthionine, la lysine et l'arginine (O'Neil *et al.* 1989). Cette réactivité des BP pour les SCH est l'une des principales faiblesses de la méthode. La présence de méthionine au niveau du récepteur peut donc induire en erreur.

Malgré leurs premières synthèses dans les années 70, ce n'est que depuis quelques années que les BPs sont couramment utilisés. Dans cette catégorie se retrouve un analogue de l'acide aminé phénylalanine : le *p*-benzoyl-phénylalanine (Bpa). D'usage relativement fréquent, cet agent photoréactif est approprié pour cartographier les sites de liaison impliqués dans l'interaction entre un peptide et son récepteur. Son utilité a été démontrée par Kauer et al. (1986) qui a incorporé le Bpa dans un peptide de 17 acides aminés pouvant se lier et marquer efficacement la calmoduline. La popularité du Bpa est d'abord due à sa compatibilité avec la synthèse peptidique en phase solide que ce soit en chimie

acide- (Boc) ou base-dépendante (Fmoc). Il peut donc être incorporé dans la chaîne d'acides aminés d'un peptide au moyen de la même stratégie de couplage que pour tous les autres résidus d'acides aminés. De plus, une fois activé par les rayons UV, le Bpa réagit préférentiellement avec les liens C-H des acides aminés et ce, même en présence d'eau ou de nombreux types de nucléophiles. Par ailleurs, afin de produire une liaison covalente, le Bpa doit être irradié à une longueur d'onde se situant entre 350-360 nm, évitant ainsi une irradiation excessivement énergétique et potentiellement dommageable pour les structures protéiques. Finalement, le Bpa est chimiquement plus stable que les autres agents photosensibles et peut donc être manipulé à la lumière ambiante sans danger d'être activé (Dorman et Prestwich, 1994). Les nombreux avantages des benzophénones par rapport aux arylazides et aux diazirines ont donc fait en sorte que ces derniers ont été remplacés par leur correspondant benzophénone au cours des années.

Par contre, peu importe l'agent photosensible utilisé, la sonde générée doit essentiellement être radiomarquée pour permettre la visualisation de la protéine photomarquée. Or cette sonde doit obligatoirement avoir dans sa séquence une tyrosine afin d'y incorporer un atome d'iode radioactif. La séparation du radioisotope et de l'agent photosensible dans une sonde limite l'identification du site de photoinsertion d'une protéine à un fragment de cette protéine plutôt qu'à un acide aminé spécifique via le séquençage d'Edman. Des chercheurs se sont alors attardés sur ce problème et ont développé un analogue du Bpa, le p-(4-hydoxybenzoyl)phénylalanine. Les modifications apportées au Bpa permettent maintenant son marquage directement à l'iode. La présence d'une tyrosine dans la sonde devient donc inutile pour le radiomarquage (Wilson *et al.* 1997, Dong et al., 2002). Ce nouvel agent photosensible permet alors de séquencer une plus grande zone du fragment protéique analysé.

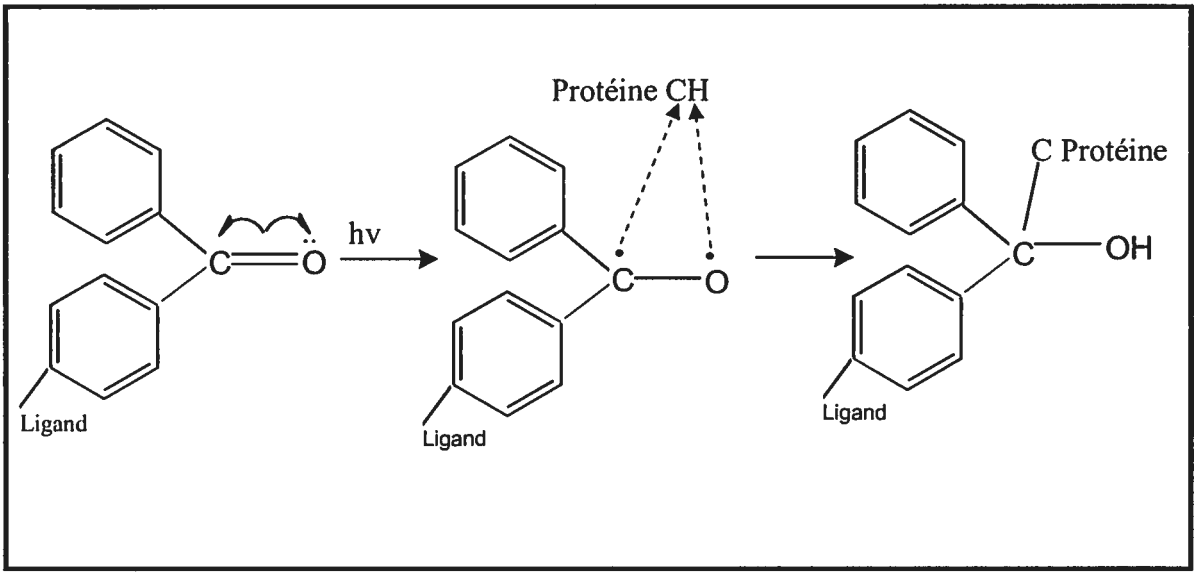


Figure 10. Réactions impliquées lors du marquage par photoaffinité à l'aide d'un benzophénone.

2.7 Le développement des sondes photosensibles

Que ce soit les arylazides, les diazirines ou les benzophénones, ces agents photoactivables ne sont utiles que s'ils sont incorporés à un ligand reconnaissant la protéine étudiée. Or le développement de ligands photosensibles a été grandement facilité par les études de structure/activité menées sur les ligands peptidiques biologiquement actifs. Par exemple, les analyses par balayage au moyen de l'acide aminé alanine d'un ligand [ALA-scan], déterminent quels sont les acides aminés indispensables à son activité et à sa liaison. Ces études permettent alors d'orienter le choix des acides aminés pouvant probablement être substitués par le groupement photosensible tout en préservant l'affinité du peptide. Chez certains peptides, la substitution d'un acide aminé par le dérivé photoréactif représente une perturbation trop importante et peut être la raison d'une perte considérable de l'activité et de la sélectivité du peptide. Dans ce cas, il est nécessaire de trouver des méthodes alternatives ou de modifier l'emplacement ou la nature des groupements photoactivables.

Lorsque l'analyse du ligand est terminée et que l'emplacement de l'agent photosensible est choisi, il faut ensuite procéder à la synthèse de la sonde. Trois approches peuvent alors être considérées. La première consiste à faire la synthèse chimique de la sonde lorsqu'il s'agit d'un petit peptide. Il est alors possible et préférable d'incorporer le groupement photosensible lors de la synthèse en utilisant l'acide aminé phénylalanine déjà modifié sous forme d'azidophénylalanine, de nitro-azidophénylalanine ou de Bpa (Figure 11). Toutefois, il est aussi possible de lier à la chaîne latérale de la phénylalanine, de la lysine ou de la cystéine un groupement photoactivable suite à la synthèse de la sonde (Fahrenholz et Thierauch, 1980 ; Bayley, 1983). Une deuxième approche de synthèse peut aussi être utilisée lorsqu'il s'agit de préparer une sonde polypeptidique de plus grande taille. La mutagénèse dirigée permet alors de modifier la structure primaire d'une protéine en y introduisant à une position désirée un acide aminé qui pourra être modifié spécifiquement avec un agent photoactivable. Pour ce faire, la cystéine semble être l'acide aminé idéal à introduire dans une protéine. En effet, le groupement thiol de la cystéine est d'une très haute réactivité et généralement cet acide aminé n'est pas très fréquent dans les protéines. De plus, la majorité des cystéines des protéines sont liées entre elles pour former un pont disulfure. L'ajout d'une nouvelle cystéine à la séquence est alors favorable pour sa modification par un agent photosensible. Cette approche a d'ailleurs déjà été utilisée pour l'étude de l'ATP synthase d'*E.Coli*. Deux résidus sérines de la sous-unité ε de la partie F1 de l'enzyme ont été substitués par une cystéine. La réaction de ces mutants avec un dérivé azide a alors permis la synthèse d'une sonde photoactivable capable de reconnaître différentes sous-unités de l'enzyme (Aggeler et al., 1992). La troisième approche qui nécessite encore beaucoup de recherche est l'incorporation de l'agent photosensible lors de la synthèse naturelle des peptides. Cette option permettrait alors aux nouvelles chaînes photosensibles synthétisées de photomarquer les composantes impliquées dans la traduction protéique. Cependant, l'ARNt ne reconnaissant généralement pas les acides aminés modifiés, la synthèse chimique demeure encore la seule voie vraiment accessible pour la production des sondes photosensibles.

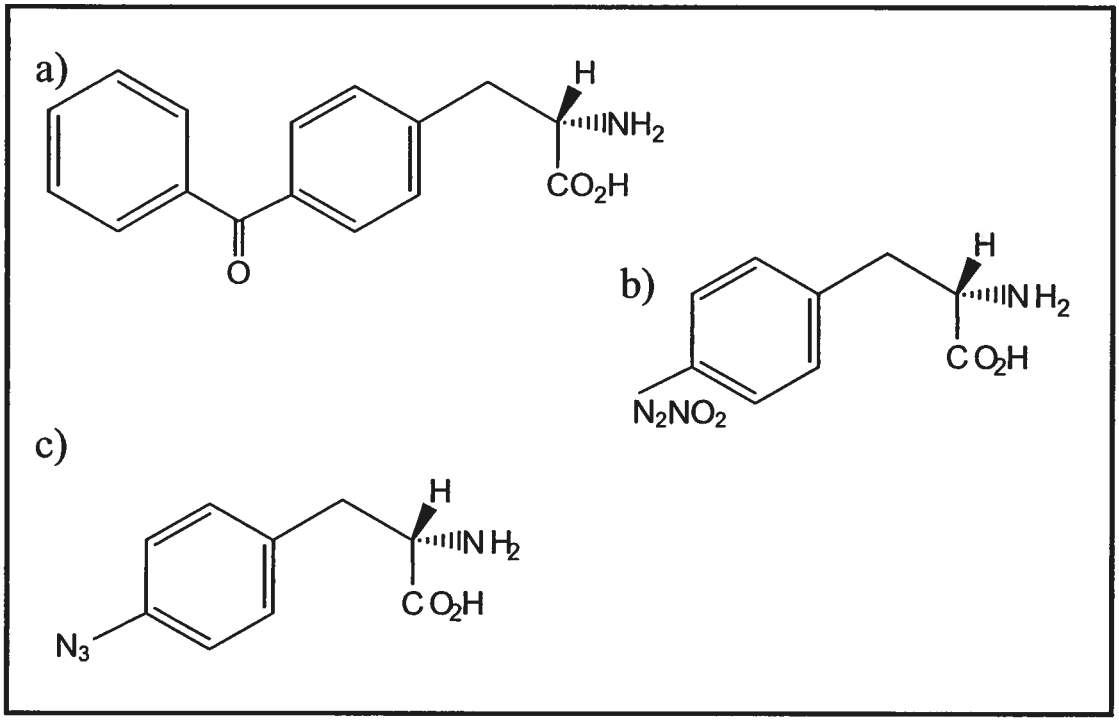


Figure 11. Acides aminés modifiés utilisés pour le marquage par photoaffinité : a) p-benzoyl-phénylalanine, b) Nitroazido-phénylalanine, c) Azido-phénylalanine.

2.8 Études basées sur le photomarquage

Le développement du photomarquage et son utilisation n'a cessé d'augmenter au fil des années. Une recherche rapide sur le web permet d'ailleurs d'observer que cette technique a fait l'objet de plusieurs milliers d'articles depuis les quarante dernières années dont déjà une quinzaine parus dans les trois premiers mois de l'année 2005. Des études fort intéressantes et aussi très différentes les unes des autres peuvent alors être consultées.

2.8.1 Identification de récepteurs

Par exemple, plusieurs recherches sont menées afin d'enrayer un mal de plus en plus fréquent en Amérique du nord : l'hypercholestérolémie. L'absorption intestinale du cholestérol est un important régulateur du niveau de cholestérol sanguin. L'Ezetimibe qui est un inhibiteur spécifique de l'absorption intestinale du cholestérol a été introduit récemment dans la pratique médicale. Or son mécanisme d'action demeure encore

inconnu. Il a toutefois été démontré qu'en utilisant des analogues de l'Ezetimibe imperméables à la membrane, leur liaison à la bordure en brosse de la membrane des entérocytes du petit intestin était suffisante pour inhiber l'absorption du cholestérol. Des études de marquage par photoaffinité en utilisant des analogues photosensibles de l'Ezetimibe a alors pu identifier une protéine membranaire de 145 kDa qui serait la cible de ce ligand (Kramer et al., 2000). La purification et le séquençage de cette protéine a ensuite confirmé que la cible moléculaire de l'inhibiteur Ezetimibe est l'Aminopeptidase N (APN) retrouvée dans la bordure en brosse de la membrane des entérocytes. Cette découverte suggère donc que la liaison de l'Ezetimibe à l'APN du petit intestin inhiberait l'endocytose des microdomaines membranaires riches en cholestérol limitant son absorption. Le marquage par photoaffinité a ainsi permis d'identifier et de localiser la protéine cible de l'Ezetimibe et a aussi conduit à sa purification utile afin de déterminer les mécanismes d'action de cet inhibiteur (Kramer et al., 2005).

L'équipe de Mésange a aussi utilisé le photomarquage afin d'identifier les protéines cibles du tamoxifène, le deuxième agent anti-tumoral le plus populaire mondialement (Mésange et al., 2002). Le tamoxifène avait tout d'abord été conçu comme un antagoniste du récepteur aux œstrogènes. Malheureusement ce médicament possède des effets secondaires nuisibles qui ont amené certains chercheurs à croire que le tamoxifène avait plus d'un récepteur. Une photosonde, la 4-(2-morpholinoéthoxy)benzophénone a alors été synthétisée. Cette sonde a été créée afin de ne pas lier le récepteur aux œstrogènes. Par contre, elle est toujours capable de reconnaître et de compétitionner avec le tamoxifène pour un site de liaison ressemblant à celui du récepteur oestrogénique. Quatre protéines de 60 kDa, 49,5 kDa, 27,5 kDa et 14 kDa ont finalement été photomarquées par cette sonde. Le séquençage a ensuite permis l'identification de trois de ces protéines et la démonstration par le fait même que la liaison du tamoxifène n'est pas spécifique au récepteur aux œstrogènes ce qui pourrait expliquer les effets indésirables de ce médicament.

2.8.2 Caractérisation du site de liaison ligand-récepteur

Le photomarquage a aussi été utilisé avec succès pour caractériser différents récepteurs dont les ligands étaient de nature peptidique. En 2004, Pham et ses collaborateurs se sont attardés à la liaison de la calcitonine sur son récepteur (Pham et al., 2004). La calcitonine

est un peptide de 32 acides aminés sécrété par la thyroïde, dont l'action principale est d'inhiber la résorption osseuse causée par les ostéoclastes. Étant donné son action sur le squelette, la calcitonine est utilisée en clinique pour le traitement de l'ostéoporose. Le développement d'analogues plus puissants et plus sélectifs permettrait alors d'augmenter l'efficacité des traitements. Un analogue photosensible de la calcitonine, dans lequel l'acide aminé en position 19 a été remplacé par un Bpa, le [$Arg^{11,18}$,Bpa^{19}]CT, a donc été synthétisé afin de mieux caractériser le site de liaison de la calcitonine sur son récepteur. Une digestion protéique suivant le photomarquage a alors montré la proximité du résidu 19 du peptide et du domaine extracellulaire N-terminal du récepteur, délimité par les résidus Cys^{134} et Lys^{141}.

En ce qui a trait à l'urotensine II, un des plus puissants agents vasoactifs connus chez les mammifères, le photomarquage a permis de caractériser précisément le site de liaison urotensine-récepteur. Un analogue de l'urotensine II contenant le Bpa en sixième position de sa séquence a en effet identifié le quatrième domaine transmembranaire du récepteur de l'urotensine (connu auparavant sous le nom de GPR14) comme un site de liaison important (Boucard et al., 2003). Une digestion enzymatique du complexe photomarqué a, plus précisément, ciblé deux résidus soit les méthionines des positions 184 et 185, qui seraient impliquées dans la liaison du peptide.

2.8.3 Identification de site catalytique enzymatique

Le photomarquage peut aussi être utilisé à d'autres fins que celui d'identifier les sites de liaison ligand-récepteur. En fait, en incorporant un agent photosensible à l'intérieur d'un substrat, il est aussi possible de marquer un site catalytique d'une enzyme. Par exemple, la déshydrogénase UDP-glucose (UGDH) est la seule enzyme capable de fournir aux vertébrés l'UDP-glucuronate à plusieurs transférases. En utilisant la sonde spécifique [^{32}P]nicotinamide 2-azidoadénosine dinucléotide ($2N_3$ NAD^+), l'équipe de Huh a identifié le site de liaison du NAD^+ sur l'UGDH. Pour ces recherches, ils ont alors synthétisé chimiquement un gène encodant pour 1509 paires de bases et ils l'ont exprimé dans *E.coli* sous forme de protéine soluble. Lors de la photolyse, la sonde et l'enzyme synthétisée ont formé un complexe pouvant être inhibé par la présence de NAD^+ démontrant que la sonde synthétisée était sélective pour le site catalytique du NAD^+. Un séquençage et une analyse de l'enzyme ont permis de découvrir que la région délimitée par les résidus Ile-7 et Thr-

19 était le site de liaison du NAD^+. En utilisant la mutagénèse dirigée, cette équipe a ensuite montré que lorsque Gly-13 est remplacée par un résidu Glu, aucune activité enzymatique ne pouvait être mesurée. Aucune incorporation de la sonde $[^{32}P]2N_3NAD^+$ n'a également été observée avec le mutant G13E. Ces recherches indiquent donc que la glycine en position 13 joue un rôle important lors de la liaison du NAD^+ sur l'enzyme UGDH (Huh et al., 2004).

2.8.4 Études de l'ADN

Le marquage par photoaffinité joue aussi un rôle important dans l'étude des interactions protéine-ADN d'une variété de systèmes biochimiques dont le mécanisme de réparation de l'ADN par l'excision de nucléotides. Cette réaction responsable de la suppression des lésions de l'ADN procède dans l'ordre suivant : reconnaissance de la lésion ; vérification des dommages ; incision en 3' de la lésion ; incision en 5' de la lésion ; resynthèse de l'ADN et ligation de l'ADN. Les protéines responsables de cette réparation sont UvrA, UvrB et UvrC. Or, pour mieux comprendre l'architecture moléculaire de ces protéines lors de la réparation d'ADN, il est nécessaire d'identifier les domaines spécifiques de ces protéines qui sont en contact avec l'ADN. Dans cet optique, une équipe de la Caroline du Nord a utilisé des brins d'ADN reliés à un composé azido. Ceux-ci ont été incorporés à un double brin d'ADN via l'ADN polymérase pour jouer le rôle de sonde photosensible et de brin d'ADN endommagé. Un autre brin de séquence complémentaire (contenant aussi un groupe azido) a été fixé à l'ADN afin de jouer le rôle du brin non-endommagé. Cette construction d'ADN a par la suite été mis en contact avec huit mutants de UvrB pour identifier son domaine de liaison. Suite à une activation par UV des composés azido et à une analyse des résultats obtenus, le mécanisme de reconnaissance de l'ADN endommagé via les protéines Uvr a été précisé. Ainsi UvrA et UvrB se lient au site endommagé, où UvrA est en contact direct avec l'ADN ; 2) Un transfert du brin endommagé s'effectue vers UvrB qui est plus près du brin d'ADN non endommagé; 3) la poche de reconnaissance de lésion d'ADN de UvrB permet l'identification de la lésion avec une libération simultanée de UvrA (DellaVecchia et al., 2004).

2.8.5 Aspect thérapeutique

Le photomarquage peut aussi être utilisé pour le développement de nouveaux traitements contre le cancer. Le Paclitaxel (Taxol) et le docétaxel (Taxotère) sont deux médicaments fréquemment employés lors de la chimiothérapie. Or, le traitement clinique avec ces agents anti-cancéreux provoque de nombreux effets secondaires dont la résistance aux agents thérapeutiques (multidrugs resistance : MDR) causée notamment par une surexpression de la glycoprotéine P (Geney et al., 2002). La P-glycoprotéine impliquée à la MDR peut expulser plusieurs agents anti-tumoraux de la cellule cancéreuse faisant ainsi échouer la chimiothérapie. Cette protéine complexe possède douze segments transmembranaires. Pour la caractériser, plusieurs sondes photosensibles dont des analogues du paclitaxel ont été synthétisées. L'analyse des résultats de modélisation moléculaire a alors révélé un unique domaine de liaison du paclitaxel sur la P-glycoprotéine soit la partie C-terminale. Suite à ces résultats, une nouvelle génération de composés taxanes possédant de 2 à 3 fois la puissance des agents de la première génération ont été développés. Un de ces composés le SB-T-1 10131 démontre une excellente activité contre une variété de cellules cancéreuses résistantes aux agents thérapeutiques (Peer et al., 2005).

2.9 L'endothéline et le photomarquage

Depuis la découverte de l'endothéline en 1988, deux études seulement ont été réalisées sur ce peptide en utilisant la technique de photomarquage (Schvartz et al., 1990 ; Kundu et Misono, 1991). A cette époque, les récepteurs de l'ET n'étaient pas encore connus. Ces deux études partageaient donc le même but, c'est-à-dire identifier les récepteurs de l'ET en utilisant différents tissus de mammifères. Pour ce faire, l'équipe de Kundu a utilisé l'agent photosensible azido pour transformer l'ET en sonde photosensible. La synthèse de l'ET étant déjà faite, une réaction chimique entre le peptide et le réactif N-hydroxysuccinimidyl 4-azidobenzoate a permis de lier un groupement azidobenzoyl sur la lysine en position 9 de la chaîne d'acides aminés de l'ET. Cette sonde, qui a été radiomarquée à l'iode 125 pour permettre sa détection, a ensuite été incubée avec deux préparations de membranes pulmonaires, soit de bœuf ou de rat. Une fois l'incubation

terminée, une irradiation à la lumière UV a permis de lier de façon covalente l'ET aux récepteurs membranaires. Finalement, une électrophorèse sur gel SDS suivie d'une autoradiographie ont permis d'identifier une bande protéique radiomarquée dont le poids apparent était de 34 kDa dans les deux préparations membranaires. Le marquage de cette protéine pouvait d'ailleurs être inhibé seulement par la présence d'ET non radioactive et non par la présence d'angiotensine II ni de [Arg^8]-vasopressine. Ces résultats ont montré que l'ET pouvait se lier à une protéine ou à une sous-unité protéique de poids moléculaire de 34 kDa dans les membranes de poumons de bœuf et de rat (Kundu et Misono, 1991).

Or des résultats très similaires avaient été publiés un an auparavant. La sonde photosensible azidoendothéline avait alors été utilisée pour photomarquer une préparation membranaire de cerveau de rat. Cette fois, deux protéines de poids moléculaires de 52 et de 30 kDa avaient été photomarquées. Une digestion enzymatique par la protéase V8 de Staphylococcus aureus avait alors suggéré que la protéine de plus faible poids moléculaire était en fait un produit de dégradation protéolytique de la protéine de 52 kDa. Cet article avait donc plutôt démontré que le poids moléculaire du récepteur de l'ET est d'environ 50 kDa en soustrayant la masse de la sonde de celle du complexe photomarqué (Schvartz et al., 1990). En comparant ces résultats au poids moléculaire des deux récepteurs de l'ET maintenant clonés, les travaux de photomarquage menés par ces deux équipes se sont donc avérés être des pistes probantes.

Partie 2 : Articles scientifiques

Chapitre 3

3.1 Mise en contexte de l'article 1

Les travaux menés dans mon laboratoire d'accueil sont fortement axés sur l'endothéline. Des études de structure-activité de ce peptide ont d'ailleurs déjà été publiées par notre groupe afin de comprendre l'interaction entre l'ET et ses récepteurs (Forget et al., 1996, Langlois et al., 2003). Or, le but du projet de recherche de cet article consistait à caractériser le domaine de liaison d'analogues de l'ET sur le récepteur ET_A mais en utilisant une autre approche, soit la technique de photomarquage. Le marquage par photaffinité avait déjà été employé par notre groupe lors d'une collaboration avec le professeur André De Léan de l'Université de Montréal. Pour ces études, un analogue photosensible du super-agoniste pBNP1 (Mimeault et al., 1993), le [N-α-p-benzoylbenzoyl, Tyr^{18}]pBNP1, a conduit au photomarquage spécifique du récepteur NPR-A des peptides natriurétiques, une famille de peptides qui agit sur l'homéostasie du système cardiaque (Coupal et al., 1999). Puisque cette technique avait eu du succès pour la caractérisation d'un récepteur important du système cardiovasculaire, nous avons alors appliqué cette technique à l'ET.

Les résultats obtenus suite aux expériences de photomarquage du récepteur ET_A ont été publiés en 2005 dans la revue *Biochemistry*, vol. 44(21), p.7844-54. Le développement et la caractérisation des deux sondes photosensibles spécifiques au récepteur ET_A conçues à partir de la structure du TTA-386, un antagoniste peptidique spécifique à ET_A, y sont tout d'abord présentés. Les résultats démontrent aussi clairement que le [^{125}I-Tyr^5, D-$pBpa^6$]-TTA-386 et le [^{125}I-Tyr^5L-$pBpa^6$]-TTA-386 sont capables de lier de façon covalente le récepteur ET_A lors d'une irradiation du complexe ligand-récepteur. La digestion chimique et enzymatique permet finalement d'identifier le segment du récepteur qui se lie à ces ligands.

3.2 Contribution de l'étudiant à l'article 1

Tous les travaux de laboratoire ont été pilotés et largement effectués par moi-même sous la supervision du Dr Fournier. Ainsi, le début de mon projet a consisté en la recherche, l'achat et l'installation de l'équipement nécessaire pour le photomarquage. En ce qui concerne les travaux de recherche, le protocole de départ a été basé sur celui de Coupal et al. (1999). Toutefois, plusieurs problèmes sont survenus à chaque étape du projet ce qui m'a amenée à le modifier en grande partie. Ainsi, j'ai tout d'abord dû choisir les analogues de l'ET qui me serviraient comme molécules de départ pour le développement de sondes photosensibles. J'ai ensuite fait la synthèse de ces sondes. Or, puisque le TTA-386 est un peptide possédant en N-terminal de sa chaîne un cycle urée difficile à produire, nous avons dû explorer diverses avenues afin de mettre au point notre stratégie de synthèse même si la synthèse peptidique sur phase solide est un protocole grandement employé dans notre laboratoire. L'évaluation pharmacologique des peptides a ensuite été réalisée sur deux préparations soit l'aorte de rat et le parenchyme pulmonaire de cobaye. Même si cette technique était utilisée dans nos laboratoires, de nombreuses mises au point et un remodelage du protocole ont été nécessaires afin entre autres d'augmenter le taux de survie des tissus lors de l'expérimentation. En ce qui concerne la contribution des autres auteurs de cet article, Philipe Lampron a collaboré au travail relatif à la culture des cellules CHO transfectées avec le récepteur ET_A, un outil cellulaire unique obtenu du Dr Michel Detheux de la Compagnie Euroscreen. Stéphane Boivin, qui développait alors une stratégie pour le photomarquage du récepteur ET_B m'a aidée à la mise au point du radiomarquage et des tests de liaison. Le photomarquage et les digestions des complexes photomarqués sont des techniques que j'ai développées et mises au point seule. Jacinthe Aubin a quant à elle collaboré à cet article par son aide pour la réalisation des tests de photomarquage. Finalement, la rédaction de cet article a été réalisée par moi-même. Celui-ci a été revu et corrigé par mon directeur de thèse.

3.3 ARTICLE 1

TRANSMEMBRANE DOMAIN V OF THE ENDOTHELIN-A RECEPTOR IS A BINDING DOMAIN OF ET_A-SELECTIVE TTA-386 – DERIVED PHOTOPROBES

Sophie Tessier, Stéphane Boivin, Jacinthe Aubin, Philipe Lampron, Michel Detheux et Alain Fournier

En utilisant comme gabarit de synthèse le TTA-386, un antagoniste spécifique du récepteur ET_A de l'ET, six analogues photosensibles ont été développés afin de déterminer le domaine de liaison du récepteur. Parmi ces sondes, deux dérivés contenant en position 6 l'acide aminé photosensible D- ou L-*p*-benzoyl-phénylalanine ont démontré des propriétés pharmacologiques très similaires à celles du TTA-386. L'affinité de ces sondes a aussi été évaluée sur des cellules CHO transfectées exprimant le récepteur ET_A humain. Les résultats ont montré que la liaison des peptides radiomarqués était inhibée par la présence de ET-1 et de BQ-610. Ainsi, ces photosondes ont été employées pour marquer les récepteurs ET_A des cellules CHO. Le photomarquage a produit un complexe ligand-protéine apparaissant sur gel SDS-PAGE aux environs de 66 kDa. Un excès de ET-1 ou de BQ-610 a complètement aboli la formation du complexe démontrant la sélectivité des photosondes. Des digestions des complexes [^{125}I-Tyr^5,D- ou L-Bpa^6]TTA–386-ET_A ont été effectuées et les fragments de récepteur ont ensuite été analysés pour définir la région du récepteur liée aux ligands. Les résultats ont montré que la digestion enzymatique par l'endoprotéinase Lys-C donnait un fragment de 4,8 kDa correspondant au segment Asp^{256}-Lys^{299} alors que la migration des produits de clivage suite à une digestion par l'enzyme V8 a révélé un fragment de 2,9 kDa. Puisque ces fragments doivent se chevaucher, ce dernier correspondrait aux résidus Trp^{257}-Glu^{281}. Un clivage au CNBr est finalement venu confirmer l'identité du domaine de liaison en donnant un fragment de 3,9 kDa correspondant aux acides aminés Glu^{249}-Met^{278}. Par conséquent, la combinaison des données de clivage suggère fortement que le domaine de liaison du récepteur ET_A inclurait une portion du cinquième domaine transmembranaire, soit les résidus Trp^{257} à Met^{278}.

Article publié dans : Biochemistry, 2005 ; vol. 44 (21), p.7844-54.

7844 *Biochemistry* **2005**, *44*, 7844−7854

Transmembrane Domain V of the Endothelin-A Receptor Is a Binding Domain of ET_A-Selective TTA-386-Derived Photoprobes†

Sophie Tessier,‡ Stéphane Boivin,‡ Jacinthe Aubin,‡ Philipe Lampron,‡ Michel Detheux,§ and Alain Fournier*,‡

Institut National de la Recherche Scientifique—Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 boulevard Hymus, Pointe-Claire (Montréal), Québec, Canada, H9R 1G6, and Euroscreen SA, 802 route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgique

Received January 15, 2005; Revised Manuscript Received March 24, 2005

ABSTRACT: On the basis of the structure of TTA-386, a specific antagonist of the endothelin-A receptor subtype (ET_A), photosensitive analogues were developed to investigate the binding domain of the receptor. Among those, a derivative containing, in position 6, the photoreactive amino acid D- or L-*p*-benzoyl-phenylalanine showed pharmacological properties very similar to those of TTA-386. Affinity of the probes were also evaluated on transfected CHO cells overexpressing the human ET_A receptor. Data showed that binding of the radiolabeled peptides were inhibited by ET-1 and BQ-610. Therefore, these photolabile probes were used to label the ET_A receptor found in CHO cells. Photolabeling produced a ligand−protein complex appearing on SDS−PAGE at around 66 kDa. An excess of ET-1 or BQ-610 completely abolished the formation of the complex showing the selectivity of the photoprobes. Digestions of the [^{125}I-Tyr^5, D- or L-Bpa^6]TTA-386−ET_A complex were carried out, and receptor fragments were analyzed to define the region of the receptor where the ligand interacted. Results showed that Endo Lys-C digestion gave a 4.8 kDa fragment corresponding to the Asp^{256}−Lys^{299} segment, whereas migration after V8 digestion revealed a fragment of 2.9 kDa. Because the fragments of these two digestions must overlap, the latter would be the Trp^{257}−Glu^{281} stretch. A cleavage with CNBr confirmed the identity of the binding domain by giving a fragment of 3.9 kDa corresponding to Glu^{249}−Met^{278}. Thus, the combined cleavage data strongly suggested that the binding domain of ET_A includes a portion of the fifth transmembrane domain, between residues Trp^{257} and Met^{278}.

Endothelin (ET)[1] is a polypeptide that was first isolated from the culture medium of porcine aortic endothelial cells (*1*). This hormone is primarily involved in the regulation of the cardiovascular system where it acts as one of the most potent vasoconstrictors known. Moreover, ET is also implicated in other biological activities, such as neurotransmission and modulation of cell processes including calcium transport, mitosis, and expression of many genes (*2*).

Analysis of the ET gene revealed the existence of three distinct isoforms named ET-1, ET-2, and ET-3 (*3*). All those peptides include 21 residues and exhibit important sequence similarities. In particular, they all contain two intramolecular disulfide bonds in positions 1−15 and 3−11. Effects of ET are mediated via two different receptors designated as ET_A and ET_B (*4*). These two subtypes of receptor were cloned and pharmacologically characterized (*5*). The ET receptors belong to the seven transmembrane G-protein coupled receptor superfamily, and their similarity at the amino acid level is at around 68%. Activation of the ET_A receptors found on vascular smooth muscle cells generates a sustained vasoconstriction. On the other hand, the vascular ET_B receptors are mostly localized on endothelial cells, and they mediate a vasodilatation through the release of nitric oxide. However, a subtype of ET_B receptor is located on the vascular smooth muscle cells where it also partly mediates their constriction (*6*). Hence, malfunctions of the ET system could be involved in diseases such as hypertension, local ischaemia including myocardial infarction, and renal and heart failure (*7*−*10*).

The classification of ET receptors was initially established on the different activity and binding profiles obtained with the ET peptide isoforms. To date, a few studies have been carried out to elucidate which segments of the ET receptors are crucial for ligand selectivity, activity, and affinity (*11*). For instance, site-directed mutagenesis showed that a large number of amino acids within ET_A, such as Gly^{97}, Lys^{140}, Lys^{159}, Gln^{165}, and Phe^{315}, located in transmembrane (TM) regions 1, 2, 3, 3, and 6, respectively, influence ET-1 binding

† Financial support was obtained from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). A.F. is "Chercheur National" from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). S.T. receives a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). S.B. and P.L. are recipients of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (514) 630-8816. Fax: (514) 630-8850. E-mail: alain.fournier@iaf.inrs.ca.

‡ Université du Québec.

§ Euroscreen SA.

[1] Abbreviations: ACN, acetonitrile; Aebsf, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; BOP, benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate; Bpa, *p*-benzoyl-phenylalanine; BSA, bovine serum albumine; CHO cells, Chinese hamster ovary cells; CNBr, cyanogen bromide; DIPEA, diisopropylethylamine; DMF, dimethylformamide; ECL, enhanced chemiluminescence; equiv, equivalent; ET, endothelin; ET_A and ET_B, endothelin type A and type B receptors, respectively; GPCR, G protein-coupled receptor; HF, hydrogen fluoride; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PVDF, polyvinylidene fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEM, standard error of the mean; Suc, succinoyl; TFA, trifluoroacetic acid; TM, transmembrane.

10.1021/bi0500933 CCC: $30.25 © 2005 American Chemical Society
Published on Web 04/28/2005

(*12*). In addition, molecular modeling and site-directed mutagenesis studies identified a few nonconserved amino acids in ET_A and ET_B receptors that could be implicated in ligand selectivity. For instance, it was concluded that Tyr^{129} (*13*, *14*) and Lys^{140} (*15*), in the second TM domain of ET_A receptors, and Lys^{181}, in the third TM domain of ET_B receptors, play a crucial role in the ET binding (*16*). It was also suggested that the ET receptors could be divided into two distinct parts, yet TM domains I, II, III, and VII would be involved in the ligand selectivity, while TM domains IV, V, and VI would be responsible for the binding process (*17*). So far, chimeric ET_A and ET_B receptors have been produced for the elucidation of a specific domain that influences the affinity of the receptor toward BQ-123, a selective ET_A antagonist. Thus, substitution of the first extracellular loop domain of the ET_A receptor with the corresponding domain of the ET_B receptor reduced drastically the inhibition by BQ-123, while the replacements of other extracellular domains of ET_A did not. These observations suggested that the first extracellular loop domain of the ET_A receptor is involved in ligand binding (*18*).

All these studies, mainly using site-directed mutagenesis, provided clues on some residues and their ability to modulate the ET_A receptor−ligand complex formation and activation. However, to further characterize the amino acids involved in these biological processes, other analytical methods had to be explored. We then focused on photoaffinity labeling followed by fragmentation of the resulting photoligand−receptor complex for identifying sites of interaction between the ligand and the receptor. Benzoyl-phenylalanine (Bpa) (*19*), a photosensitive amino acid employed successfully to probe the substance P receptor (*20*), angiotensin II receptor (*21*), and urotensin II receptor (GPR14) (*22*), was exploited as a photolabile moiety.

In this paper, we describe the development of photoreactive probes derived from TTA-386, an antagonist compound able to inhibit the aorta contractions as well as the calcium release induced by ET-1 via ET_A receptors (*23*). Therefore, by applying a Bpa−scan stategy, we developed six photosensitive probes derived from TTA-386 (*24*). In fact, leucine-1, tryptophane-2, and phenylalanine-6 were substituted successively with D- or L-*p*-benzoyl-phenylalanine (Table 1). The results showed that the radioactive analogues [$Tyr(^{125}I)^5$, D-Bpa^6]TTA-386 and [$Tyr(^{125}I)^5$, L-Bpa^6]TTA-386 exhibited functional and binding properties useful for the efficient covalent labeling of human ET_A receptors expressed in transfected CHO cells. This step followed by the fragmentation of the photoligand−receptor complex enabled us to identify a site of the binding domain interacting with the photoprobes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Male Sprague−Dawley rats and male Hartley guinea pigs were obtained from Charles River Canada (St-Constant, QC) and kept on a 12-h light−dark cycle with laboratory chow and tap water ad libitum according to standards approved by the Canadian Committee on Animal Care. Boc-L-Bpa and Boc-D-Bpa were purchased from Advanced Chem Tech (Louisville, KY). All other amino acids were obtained from ChemImpex International (Wood Dale, IL) or Albatross (St-Laurent, QC). Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) was obtained from Albatross. Tetrahydrofuran, DIPEA, homopiperidine, and 4-nitrophenylchloroformate were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON). Chloramine-T, NaI, bovine serum albumin (BSA), protease inhibitor cocktail, anti-endothelin receptor A antibody, CNBr, Endo Lys-C, and V8 protease were also provided by Sigma-Aldrich. The PNGase F kit was obtained from New England BioLabs (Pickering, ON). The Western blot ECL revelation kit, $Na^{125}I$, and ^{14}C molecular weight standards were purchased from Amersham Biosciences (Montreal, QC). Ham-F12 culture medium, calf serum, and antibiotics were obtained from Biomedia (Drummondville, QC). Recombinant CHO-K1 cell line expressing the human ET_A receptor was obtained from Euroscreen (Brussels, Belgium).

Peptide Synthesis. TTA-386 and its analogues were synthesized using the solid-phase strategy combined with the Boc chemistry methodology. Peptides were assembled on a multireactor system, and chloromethylated resin was used as the solid support. Boc−amino acid couplings were performed in *N*,*N*-dimethylformamide (DMF) in the presence of diisopropylethylamine (DIEA) and BOP as a condensing reagent. TTA-386 (hexamethyleneiminocarbonyl-Leu-D-Trp-D-Ala-βAla-Tyr-D-Phe) and six photosensitive analogues were synthesized by substituting either leucine-1, tryptophane-2, or phenylalanine-6 with a D- or L-Bpa residue (Table 1). Bpa was incorporated into peptides during solid-phase synthesis following the same procedure as for the other amino acid residues. The hexamethyleniminocarbonyl moiety was attached to the free N-terminus of each peptide-resin using 10 equiv of *p*-nitro-phenoxychloroformate diluted in tetrahydrofuran/dichloromethane, in the presence of 1 equiv of DIEA. After 12 h at room temperature, under nitrogen atmosphere, peptide-resins were washed with dichloromethane and DMF. A solution of 20% homopiperidine/DMF was finally added to the peptide-resins, and the reaction was pursued for another 12 h in the same conditions (*25*). Peptides were cleaved from their solid support with hydrogen fluoride (HF) (10 mL g^{-1} resin) using *m*-cresol (1 mL g^{-1} resin) as a scavenger. The reaction was carried out for 60 min at 0 °C. HF was rapidly evaporated, and the resin was washed with anhydrous diethyl ether. Crude synthetic peptides were extracted with trifluoroacetic acid (TFA). After evaporation of TFA, the remaining product was precipitated with diethyl ether. The collected material was dried under vacuum and stored at −20 °C until purification.

Peptide Purification. Crude peptides were purified by means of preparative reverse-phase HPLC using a Jupiter C_{18} column (Phenomenex (CA), 15 μm, 300 Å, 25 cm × 2.12 cm) attached to a Waters Prep LC 500A system equipped with a model 441 absorbance detector (Milford, MA). The material was purified with a 3 h linear gradient from (A) 0.005% ammonium acetate in H_2O, pH 9, to (B) CH_3CN (80%) in 0.005% aqueous ammonium acetate, pH 9. The flow rate was maintained at 20 mL min^{-1}, and detection was at 230 nm. The homogeneity of each fraction was assessed by analytical reverse-phase HPLC. Fractions corresponding to the purified peptides were pooled, lyophilized, and analyzed by mass spectrometry. Purification led to peptide purity equal or superior to 98%, and their molecular mass was confirmed with MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE, PerSeptive Biosystems, Foster

City, CA, matrix was the α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, accelerating voltage at 20 kV, laser at 337 nm and 20 pulses/s). Peptides in a powder form were kept at −20 °C until biological and biochemical characterizations.

Peptide Iodination with "Cold" Iodine. Iodination of the Tyr^5 residue of each photoprobe was carried out using chloramine-T. Peptides (10 mg) were incubated in a total volume of 10 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), containing 1.2 equiv of NaI. To favor the production of the monoiodinated or diiodinated peptides, we used 0.5 and 2.0 equiv of chloramine-T, respectively. After 30 s at room temperature, the reaction was stopped by the addition of 400 mg of sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$) dissolved in 3 mL of sodium phosphate buffer. Monoiodinated peptide was separated from unlabeled and diiodinated peptide by preparative reverse-phase HPLC according to the procedure described previously. Peptide purity was assessed with analytical reverse-phase HPLC, and molecular weight was determined using MALDI-TOF mass spectrometry.

Biological Activity Studies. The antagonistic activity of the TTA-386 derivatives was assessed in two different preparations: rat thoracic aorta rings and guinea pig lung parenchyma strips. Male Sprague−Dawley rats weighing 250−300 g were anesthetized, and the thoracic aorta was rapidly removed and cleaned of fat and connective tissues. The endothelium was removed by gentle rubbing of the intimal surface. Aortas were cut into 4-mm rings and were suspended in 5-mL water-jacketed organ baths containing gassed (95% O_2/5% CO_2) and warmed (37 °C) Krebs−Henseleit solution (120 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 4.7 mM KCl, 1.6 mM $MgSO_4$, 1.17 mM KH_2PO_4, 2.5 mM $CaCl_2$, and 11 mM glucose, at pH 7.4). Rings were stretched to a resting force of 1 g with a 60-min equilibration period. Rings were incubated with various concentrations (3×10^{-8} to 1×10^{-6} M) of TTA-386 or its derivatives. After 15 min, cumulative concentrations (1×10^{-10} to 3×10^{-7} M) of ET were added. Mechanical responses were recorded isometrically on a Grass 7E polygraph with force-displacement transducers (Quincy, MA). The contractile responses were expressed as a percentage of the maximal contractile response produced by KCl (80 mM).

Male Hartley guinea pigs (300−350 g) were anesthetized, and lungs were removed. The parenchyma was dissected in strips that were mounted in the system described above. The antagonistic activity of TTA-386 or its analogues was then measured as above-mentioned. The biological activity was expressed as a percentage of the effect produced after the addition of histamine (10^{-6} M).

Noniodinated, monoiodinated, and diiodinated peptides were tested, and concentration−response curves were analyzed using a nonlinear least-squares regression obtained with the Prism 3.02 software (PRISM, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Results are expressed as mean ± SEM of at least three different experiments, and n varied from 8 to 12 animals.

Cell Culture. Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing the human ET_A receptor were grown at 37 °C with 5% CO_2 in Ham-F12 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, 400 μg mL^{-1} of G418, 100 U mL^{-1} penicillin, 100 μg mL^{-1} streptomycin, and 2.5 μg mL^{-1} fungizone.

Immunoblotting. The molecular weight of the ET_A receptor was determined by an immunoblot analysis. Recombinant hET_A-CHO cells were solubilized in a detergent buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Igepal, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) Triton, and 0.01% (v/v) protease inhibitor cocktail) and submitted to a gentle agitation for 45 min at 4 °C. The solubilized membrane solution was then centrifuged at 16 000*g* for 45 min at 4 °C, and proteins of the supernatant were separated by 10% SDS−PAGE. Proteins were transferred on a PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane by electrophoretic blotting, and the ET_A receptor was revealed with an anti-ET_A antibody and a goat-anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase. The receptor was visualized on an X-ray film (Universal X-ray Company of Canada Ltd, Dorval, QC) after an ECL revelation protocol performed according to the procedure from the manufacturer (Amersham Biosciences, Montreal, QC).

Radiolabeling of Peptides. Iodine-125 was incorporated into the tyrosine side chain of TTA-386, [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386, using a modified chloramine-T protocol of that described originally by Watakabe (*26*). Peptides (3 nmol) were incubated in a total volume of 150 μL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mCi $Na^{125}I$ and 1.5 μg of chloramine-T reagent (5 nmol). After 1 min at room temperature, the reaction was stopped by the addition of 20 μL of sodium metabisulfite (0.1 μg μL^{-1}). The mono [^{125}I]-peptide was separated from unlabeled and diiodinated peptides by analytical reverse-phase HPLC using a Waters 600E system and a Jupiter C_{18} column (5 μm, 300 Å, 250 mm × 4 mm) from Phenomenex. The radioactive material was eluted with a 40-min linear gradient from (A) 30% CH_3CN in 0.06% TFA/H_2O to (B) 70% CH_3CN in 0.06% TFA/H_2O. The flow rate was maintained at 1 mL min^{-1}. Fractions were collected at every 30 s, and the elution pattern was established using a Packard γ-counter (Downers Grove, IL). Radiolabeled peptides were diluted 1:10 in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and stored at −20 °C. Specific activity was assumed to be at 2200 Ci/mmol.

Binding Assays. The day before the experiment, recombinant hET_A-CHO cells were seeded in 12-well tissue culture plates at a density of 2.5×10^5 cells/well. The next day, cells at almost 90% confluency were rinsed twice with cold washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, and 100 mM NaCl). Cells (≅ 20 μg of proteins/well) were incubated at 4 °C for 16 h with 1 nM of [$Tyr(^{125}I)^5$]TTA-386, [$Tyr(^{125}I)^5$, D-Bpa^6]TTA-386, or [$Tyr(^{125}I)^5$, L-Bpa^6]-TTA-386 in the presence of increasing concentrations of five unlabeled competitors: ET-1, BQ-610, TTA-386, [D-Bpa^6]-TTA-386, and [L-Bpa^6]TTA-386 in a final volume of 0.5 mL. Binding assays with whole attached cells were performed in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0.001% (w/v) BSA, and 0.01% (v/v) protease inhibitor cocktail containing AEBSF, aprotinin, leupeptin, bestatin, pepstatin A ,and E-64. After incubation, cells were washed twice with cold washing buffer and solubilized in 1 N NaOH, and cell-bound radioactivity was evaluated by γ counting. The IC_{50} values for the various competitors were determined by using the GraphPad Prism 3.02 software. Results are expressed as mean ± SEM of three independent assays carried out in duplicate.

Photoaffinity Labeling. The day before the experiment, recombinant hET_A-CHO cells were seeded in 35 mm dishes

at a density of 5×10^5 cells/dish. The next day, cells at almost 90% confluency were rinsed twice with cold washing buffer. Cells (≃ 40 μg of proteins/well) were incubated at 4 °C for 16 h in 750 μL of binding buffer containing 5 nM of [Tyr(^{125}I)^5, D-Bpa^6]TTA-386 or [Tyr(^{125}I)^5, L-Bpa^6]TTA-386, in the presence or absence of 1 μM ET-1 or 1 μM BQ-610, an ET_A selective antagonist. Cells were washed twice with washing buffer and then irradiated with UV (100 W lamp, 365 nm) for 1 h at 0 °C, at a distance of 6 cm. Afterward, 750 μL of the detergent buffer was added, and cells were gently scraped and solubilized. Cells were further submitted to a gentle agitation for 45 min. The solutions were then centrifuged at 16 000*g* for 45 min at 4 °C. The supernatants were stored at −20 °C until further analysis.

Identification of the Labeled Complex. The solubilized photolabeled receptors were diluted 1:2 with a loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoethanol, and 0.025% (w/v) bromophenol blue) and incubated for 1 h at 37 °C. A 10% SDS−PAGE was performed using a 1 mm-thick gel. After a migration at 175 V for 1 h, the gels were dried on filter papers and exposed to X-ray film with an intensifying screen. [^{14}C]Methylated molecular standards (14−220 kDa) were used to determine the molecular mass of the radiolabeled complex.

Partial Purification of the Photolabeled Complex. The solubilized photolabeled receptors were diluted 1:2 with the loading buffer described above and incubated for 1 h at 37 °C. A 10% SDS−PAGE electrophoresis was performed using a 1.5 mm-thick gel. The gel was then cut into slices, and their radioactive content was measured with a γ-counter. The labeled receptor was electroeluted from the gel slices into electroelution buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, and 0.1% SDS) for 3.5 h at room temperature as recommended by the electroelution apparatus protocol of the manufacturer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The eluate was concentrated to a final volume of 30 μL using Centricon-10 and was stored at −20 °C.

Endoglycosidase, Proteolytic, and Chemical Digestions. Concentrated proteins from hET_A-CHO cells were resuspended in a denaturing buffer and incubated with PNGase-F for 3 h at 37 °C, as described by the manufacturer (New England BioLabs). For CNBr cleavage, the partially purified photolabeled receptors were resuspended in 200 μL of 50% (v/v) TFA/H_2O before adding 200 μL of ACN containing 50 mg of CNBr. The samples were incubated at room temperature, in the dark for 16−18 h. The reaction was terminated by adding 3 mL of water. Samples were lyophylised twice to remove most of the salts. For proteolytic digestions, partially purified photolabeled receptors were digested for 16−20 h at 37 °C with 1 μg of Endo Lys-C protease in 25 μL of digestion buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, and 0.1% SDS. Partially purified receptors were also digested for 7 days at room temperature with 8 μg of V8 protease in 25 μL of buffer containing 100 mM ammonium carbonate, pH 8, and 0.1% SDS. All digestions were terminated by addition of an equal volume of loading buffer followed by an incubation at 37 °C for 1 h.

Analysis of Products of Proteolysis and Chemical Cleavage. The products of proteolysis and chemical cleavage were analyzed by SDS−PAGE using 16.5% Tris-Tricine gels. After a migration at 80 V for 4 h, the gels were dried on filter paper and exposed to X-ray film with an intensifying screen. ^{14}C-Labeled low-molecular protein standards (5−30 kDa) were used to determine the molecular mass of the photolabeled fragments.

Table 1: TTA-386 Synthetic Analogues[a]

peptides	primary sequences
TTA-386	homopiperidinyl-CO-Leu-D-Trp-D-Ala-βAla-Tyr-D-Phe
[d-Bpa^1]-TTA-386	homopiperidinyl-CO-Bpa-D-Trp-D-Ala-βAla-Tyr-D-Phe
[L-Bpa^1]-TTA-386	homopiperidinyl-CO-Bpa-D-Trp-D-Ala-βAla-Tyr-D-Phe
[D-Bpa^2]-TTA-386	homopiperidinyl-CO-Leu-Bpa-D-Ala-βAla-Tyr-D-Phe
[L-Bpa^2]-TTA-386	homopiperidinyl-CO-Leu-Bpa-D-Ala-βAla-Tyr-D-Phe
[D-Bpa^6]-TTA-386	homopiperidinyl-CO-Leu-D-Trp-D-Ala-βAla-Tyr-Bpa
[L-Bpa^6]-TTA-386	homopiperidinyl-CO-Leu-D-Trp-D-Ala-βAla-Tyr-Bpa

[a] As described in Experimental Procedures, TTA-386 and its analogues were synthesized using a solid-phase peptide synthesis strategy combined with the Boc chemistry methodology. The urea moiety was introduced at the N-terminus of each peptide-resin using 10 equiv of *p*-nitro-phenylchloroformate in the presence of 1 equiv DIPEA. After 12 h of reaction at room temperature, under nitrogen, a solution of 20% homopiperidine/DMF was added to the peptide-resins, and the reaction was pursued for another 12 h.

RESULTS

Peptide Synthesis and Purification. Table 1 shows the amino acid sequences of the specific ET_A receptor antagonist, TTA-386, and six photosensitive analogues. The amino acids Leu^1, D-Trp^2, and D-Phe^6 were replaced successively with a D- or L-Bpa residue. The photoprobes were assembled with the so-called Boc chemistry protocol, using BOP as the coupling reagent. As a final step, the addition of the urea cycle at the N-terminus of each peptide was then performed by the incorporation of a *p*-nitrophenoxycarbonyl moiety followed by an aminolysis using homopiperidine. The reaction with *p*-nitrophenoxyde chloroformate was monitored with the Kaiser test, and it demonstrated the absence of remaining free N-terminus in peptides. The extent of the first reaction with *p*-nitrophenyl chloroformate was also checked by HPLC after cleaving an aliquot of peptide-resin. As shown in Figure 1A,B, an overnight treatment gave a single peak, exhibiting a slightly more hydrophobic character than the parent compound (17 min versus 16.3 min). Furthermore, a MALDI-TOF mass spectrometry analysis confirmed the N-terminal introduction of the *p*-nitrophenoxycarbonyl group. Similarly, the aminolysis step was also monitored by HPLC after cleaving a peptide-resin aliquot. As depicted in Figure 1C (the aminolysis product) and Figure 1D (coinjection of the *p*-nitrophenoxycarbonyl peptide and the homopiperidinyl derivative), the 12-h reaction of homopiperidine with the activated *p*-nitrophenyl ester gave a single product different to the starting material. Mass spectrometry analysis confirmed the presence of the urea moiety at the N-terminus of the TTA-386 analogues. Purity of the final peptides (≥98%) was assessed by analytical HPLC.

Pharmacological Studies. The biological activity of the photoprobes was measured in the rat thoracic aorta and guinea pig lung parenchyma bioassays, two pharmacological preparations showing predominant populations of ET_A and ET_B receptors, respectively. Figure 2 shows the concentration−response curves of ET-1 in the presence of growing concentrations of the photosensitive analogues. In isolated endothelium-denuded rat aortic rings, two of the photoprobes synthesized, [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386, pro-

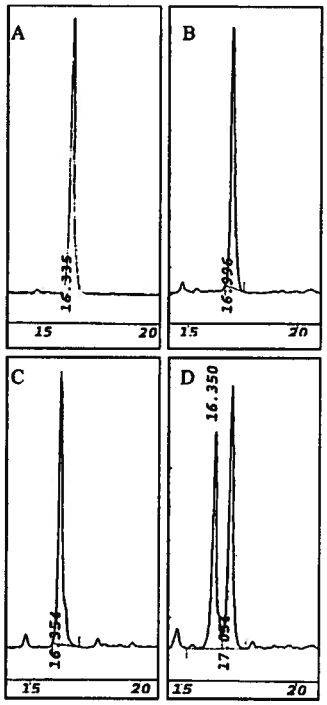


FIGURE 1: Analytical HPLC chromatograms of [D-Bpa^6]TTA-386 during its synthesis: (A) [des-homopiperidinylcarbonyl, D-Bpa^6]-TTA-386, (B) compound A after its reaction with *p*-nitrophenoxychloroformate; (C) compound B after treatment with homopiperidine; and (D) coinjection of compounds B and C on a reverse-phase HPLC using a Vydac C_{18} column (5 μm, 300 Å; 250 mm × 4 mm) with a 30-min linear gradient of acetonitrile (40−70%) in 0.06% aqueous TFA.

duced a parallel rightward shift of the ET-1 concentration−response curves in a concentration-dependent manner. These peptides did not show any agonistic effect and did not exhibit any significant changes in the maximal responses. A nonlinear regression yielded a similar pA_2 value on rat aortic rings for TTA-386 (7.9) and its two antagonist analogues [D-Bpa^6]TTA-386 (7.5) and [L-Bpa^6]TTA-386 (7.7). However, the substitution with Bpa of Leu^1 and Trp^2 of TTA-386 resulted in a complete loss of affinity on ET_A receptors. In addition, none of the six photoprobes produced a potent biological effect, neither agonist nor antagonist, in the lung parenchyma, suggesting that the active probes were still highly selective for the ET_A receptor.

Radioiodination of the probes is an essential step to subsequently allow the visualization of the photolabeled receptor. Hence, a second series of pharmacological activity was evaluated with the probes after iodination with "cold" iodine to confirm that the incorporation of this atom into the phenolic ring of Tyr^5 did not abolish the affinity of the TTA-386 derivatives. Bioassays on rat aorta demonstrated that the pharmacological properties of the new antagonists [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386 are modulated by the presence of one or two iodine atoms on the tyrosine-5 residue. As shown in Figure 3A, monoiodinated or diiodi-

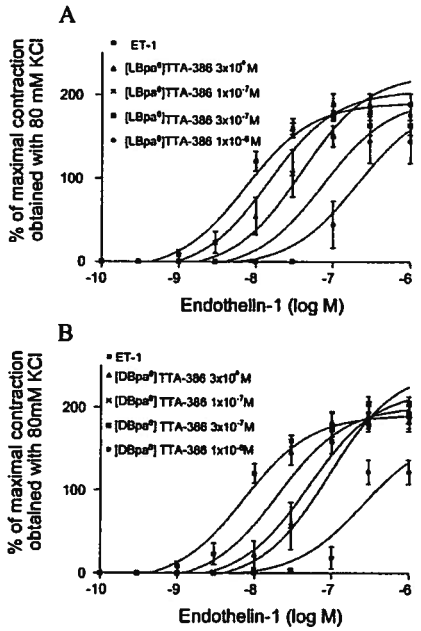


FIGURE 2: Concentration−response curves of ET-1 in the presence of increasing concentrations of [L-Bpa^6]TTA-386 (A) or [D-Bpa^6]-TTA-386 (B) obtained in isolated endothelium-denuded rat aortic rings (ET_A preparation). Results are expressed as percentage of the contractile response induced with 80 mM KCl.

nated [L-Bpa^6]TTA-386 produced a parallel rightward shift of the ET-1 concentration−response curve. Nevertheless, a decrease in the antagonist activity of the iodinated peptide was observed when compared with the ET-1 concentration−response curve in the presence of the noniodinated peptide. Iodination of this peptide did not affect its selectivity toward the ET_A receptor because it remained inactive in the guinea pig lung parenchyma paradigm. Surprisingly though, monoiodination of [D-Bpa^6]TTA-386 produced a weak agonist activity on the rat thoracic aorta, while being inactive on ET_B receptors (Figure 3B). Furthermore, the addition of a second iodine atom in this peptide led to the recovery of an antagonistic activity, slightly less potent than that of the noniodinated counterpart (Figure 3C).

Binding Assays. Intact CHO cells expressing the human ET_A receptor (Figure 4) were used to assess the affinity potencies of the photoprobes showing pharmacological properties. Affinity assessment was carried out by competitive binding assays using [^{125}I-Tyr^5, D-Bpa^6]TTA-386 and [^{125}I-Tyr^5, L-Bpa^6]TTA-386 as tracers. As shown in Figure 5, both analogues were able to bind to receptors and were displaced in the presence of either of the five competitors, ET-1, BQ-610 (a specific ET_A receptor antagonist), TTA-386, [D-Bpa^6]TTA-386, and [L-Bpa^6]TTA-386. The IC_{50} values are given in Table 2. These data suggested that the two radioligands possess a good affinity for ET_A receptors and share the same binding site of ET_A receptors. Unexpectedly, ET-1 was the less efficient competitor for both radioligands. Moreover, ET-1 was unable to completely displace the tracers as demonstrated by the high percentage

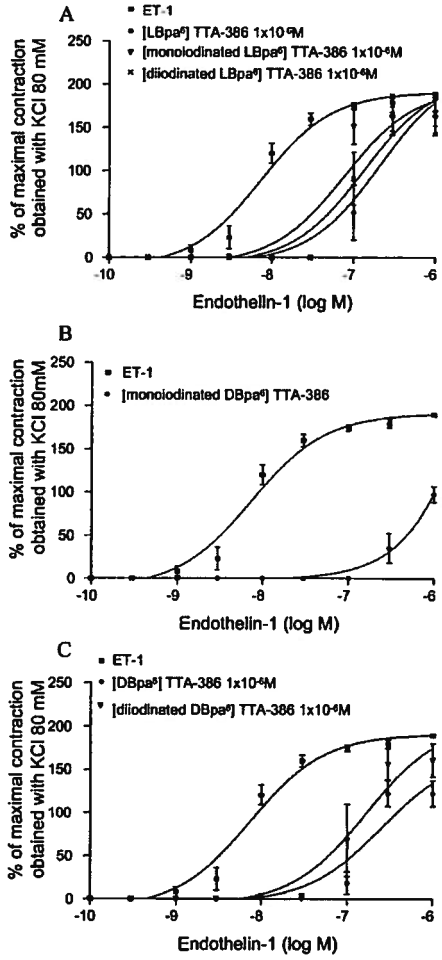


FIGURE 3: Concentration−response curves of ET-1 in the presence of 1 μM of noniodinated, mono-, and diiodinated]L-Bpa^6]TTA-386 (A), concentration−response curves of ET-1 and monoiodinated [D-Bpa^6]TTA-386 (B), and concentration−response curves of ET-1 in the presence of 1 μM of noniodinated and diiodinated [D-Bpa6]-TTA-386 (C). All these concentration−response curves were obtained in isolated endothelium-denuded rat aortic rings (ET_A preparation). Results are expressed as percentage of the contractile response induced with 80 mM KCl.

of remaining radioactivity bound to the cells. Nevertheless, the binding experiments demonstrated that both radioligands exhibited an excellent affinity for ET_A receptors and probably shared the same binding site as ET-1. They were then favored for photoaffinity labeling.

Photoaffinity Labeling of ET_A Receptors. As shown with a 10% SDS−PAGE analysis, photoactivation of [^{125}I-Tyr^5, D-Bpa^6]TTA-386 and [^{125}I-Tyr^5, L-Bpa^6]TTA-386 bound to ET_A receptors found at the surface of CHO cells resulted in their covalent attachment (Figure 6A, lanes 1 and 4; ≈70 kDa complex). Furthermore, the formation of the complex between [^{125}I-Tyr^5, D-Bpa^6]TTA-386 or [^{125}I-Tyr^5, L-Bpa^6]-TTA-386 and the receptor was completely abolished in the presence of ET-1 (lane 2) or BQ-610 (lane 3) demonstrating the specificity of the labeling. In addition, the identity of the ET_A receptor was confirmed by immunoblotting experiments that showed that the 60−70 kDa protein was recognized by antibodies raised against the ET_A receptors (Figure 6B, lane 1). Thus, the 60 kDa photolabeled protein would be the mass of the photosensitive ligands (1125 Da) linked to the glycosylated ET_A receptor (60−70 kDa) since a PNGase F treatment (an enzyme that cleaves asparagine-linked carbohydrates) reduced the receptor mass to 48 kDa, a molecular mass consistent with that calculated from the ET_A receptor sequence (Figure 6B, lane 2).

Analysis of Proteolytic Products and Chemical Cleavages. To identify the binding domain, the ET_A receptor photolabeled with either photoprobe was partially purified by SDS−PAGE and submitted to Endo Lys-C digestion, an enzyme cleaving at the C-terminal side of lysine residues. This enzymatic cleavage produced on a 16.5% acrylamide−tris-tricine separating gel, a well-resolved fragment at 5.9 kDa (Figure 7A, lane 3) that would correspond to the smallest digestion fragment of the receptor photolabeled with the photoligands. Since the iodinated photoprobes have a mass of 1125 Da, then the photolabeled segment would possess a molecular weight at around 4.8 kDa. A computerized analysis with the Peptide Mass software, of the ET_A receptor sequence and of its fragments produced after complete and partial Endo Lys-C digestion, identified four peptide segments Cys^{110}−Lys^{159} (5.5 kDa), Asp^{256}−Lys^{299} (5.3 kDa), Gln^{300}−Lys^{338} (4.8 kDa), and Asn^{339}−Lys^{377} (4.5 kDa) corresponding to a possible segment of the binding domain of ET_A. Except for the second suggestion, the other fragments would be produced after an incomplete digestion by the enzyme (Figure 7B).

To further define the labeled region, we proceeded to an alternative digestion step of the photolabeled complex with V8, an enzyme that cleaves peptide bonds on the carboxylic side of aspartate and glutamate residues. Again, multiple bands were observed, thus, suggesting an incomplete digestion (Figure 8A, lane 4). Nevertheless, the analysis of the bands revealed that the shortest fragment exhibiting a mass of 4 kDa corresponded to the sum of the photoprobe mass (1.1 kDa) and that of the photolabeled segment (2.9 kDa). According to the analysis of the primary structure of the ET_A receptor, five fragments could match these mass data, that is, Leu^{127}−Asp^{152} (3.1 kDa), Phe^{153}−Asp^{182} (3.3 kDa), Ile^{206}−Glu^{230} (2.8 kDa), Gln^{235}−Asp^{256} (2.7 kDa), and Trp^{257}−Glu^{281} (3.1 kDa) (Figure 8B). Except for the last segment, the others would be produced after an incomplete digestion by the enzyme. As mentioned above and demonstrated by the number of bands observed on the gel, even a prolonged V8 treatment (7 days) did not lead to a complete digestion. However, by combining the Endo Lys-C and V8 digestion results, we can reject the possibility that the V8 fragments Ile^{206}−Glu^{230} and Gln^{235}−Asp^{256} are parts of the binding domain because none of the expected proteolytic fragments showed any overlaps. Similarly, the Endo Lys-C fragments Gln^{300}−Lys^{338} and Asn^{339}−Lys^{377} must also be rejected as parts of the binding domain. Thus, taking into account that the labeled sequences produced by the two different enzymatic digestions must overlap, two binding domains can be identified. The ET_A binding domain then

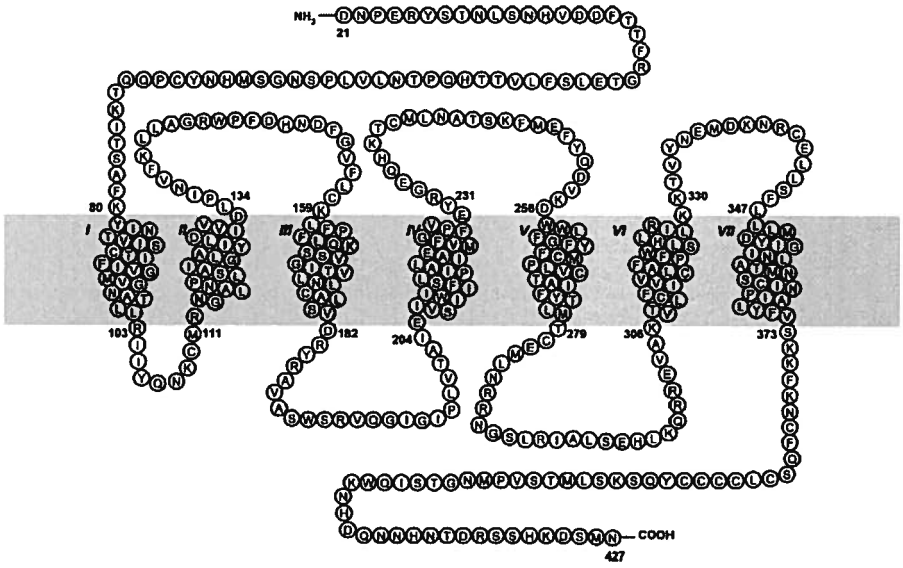


FIGURE 4: Primary structure of the human ET_A receptor.

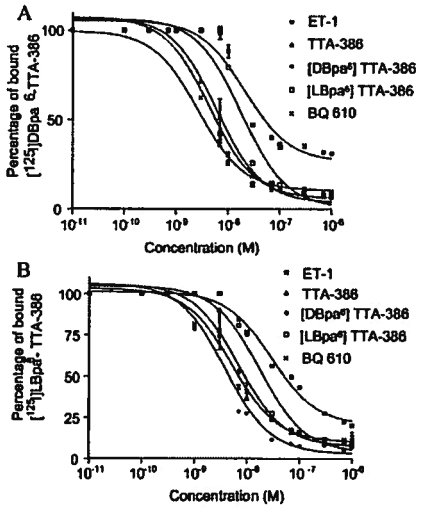


FIGURE 5: Competitive displacement of [D-Bpa^6]TTA-386 (A) and [L-Bpa^6]TTA-386 (B) bound to CHO-ET_A cells using unlabeled ET-1, TTA-386, BQ-610, [D-Bpa^6]TTA-386, and [L-Bpa^6]-TTA-386 as competitors. The IC_{50} values for the displacement of the radioiodinated photoprobes are summarized in Table 2. The data are shown as a percentage of the specific control binding determined in the absence of competing ligands and are representative of three to five similar independent experiments carried out in duplicate.

would be located either in the first extracellular loop between residues Leu^{127} and Asp^{152} or in the fifth transmembrane domain between residues Trp^{257} and Glu^{281}.

To further confirm the labeling site, we proceeded to a chemical treatment with CNBr that cleaves at the carboxylic

Table 2: IC_{50} Values Measured with Competition Binding Assays, Using [Tyr(^{125}I), D-Bpa^6]TTA-386 or [Tyr(^{125}I), L-Bpa^6]TTA-386 as Tracers and Intact CHO Cells Expressing the Human ET_A Receptors[a,b]

competing peptides	IC_{50} values (nM)	
	[Tyr(^{125}I), D-Bpa^6]TTA-386	[Tyr(^{125}I), L-Bpa^6]TTA-386
ET-1	21 ± 8	29 ± 8
BQ-610	3.0 ± 0.5	5.2 ± 0.7
[D-Bpa^6]TTA-386	6.1 ± 0.6	3.8 ± 0.7
[L-Bpa^6]TTA-386	18 ± 6	17 ± 7
TTA-386	4.5 ± 0.7	6.9 ± 0.8

[a] Recombinant hET_A-CHO cells were incubated at 4 °C for 12 h with 1 nM of [Tyr^5(^{125}I), D-Bpa^6]TTA-386 or [Tyr^5(^{125}I), L-Bpa^6]-TTA-386 in the presence of increasing concentrations of five unlabeled competitors: ET-1, BQ-610, TTA-386, [D-Bpa^6]TTA-386, and [L-Bpa^6]TTA-386. After incubation, cells were washed twice with cold washing buffer and solubilized in 1 N NaOH, and cell-bound radioactivity was evaluated with γ-counting as described in Experimental Procedures. [b] The other monosubstituted TTA-386 derivatives were devoid of affinity. Therefore, they were not included in the competition studies.

side of methionine residues. The analysis of the fragment appearing on the gel just before some residual free ligand revealed a mass of 5 kDa that would be the sum of the photoprobe mass (1.1 kDa; Figure 9A, lane 3) and that of the photolabeled fragment (3.9 kDa) (Figure 9A, lane 4). On the basis of this latter mass, only one stretch, corresponding to Glu^{249}–Met^{278} (3.7 kDa) can fulfill the entire data (Figure 9B). In addition, it also strongly suggests that the photocoupling to the receptor did not proceed through a Met side chain because, in such a case, the CNBr cleavage would have essentially produced a fragment exhibiting the mass of the photoprobe. Finally, it can be pinpointed that a PNGase F treatment before the enzymatic and chemical digestions of the receptor did not modify the mass of labeled fragments obtained.

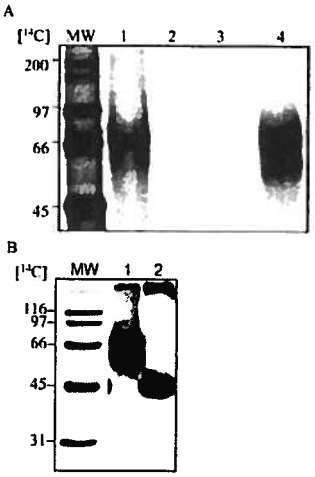


FIGURE 6: ET_A receptor analysis by SDS−PAGE. (A) Specific photolabeling of ET_A receptors with [Tyr(^{125}I), D-Bpa^6]TTA-386 (lane 1) and [Tyr(^{125}I), L-Bpa^6]TTA-386 (lane 4). CHO cells transfected with ET_A receptors were photolabeled with these probes as described in the experimental section. CHO cells expressing the ET_A receptor were equilibraled with 5 nM of one of these ligands, in the dark at 4 °C for 12 h, either alone or in the presence of 1 μM ET-1 (lane 2) or BQ-610 (lane 3). Membrane proteins were solubilized and then analyzed with SDS−PAGE. (B) Immunoblot analysis of ET_A receptors. Identification of the ET_A receptor transfected in CHO cells before (lane 1) and after PNGase F treatment (lane 2). Protein standards of the indicated molecular masses (in kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments.

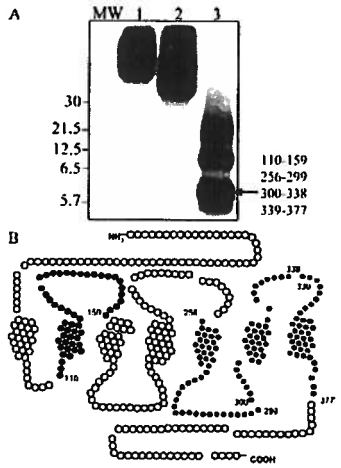


FIGURE 7: Endo Lys-C digestion of ET_A receptors pholotabeled with [Tyr(^{125}I), D-Bpa^6]TTA-386 or [Tyr(^{125}I), L-Bpa^6]TTA-386 (both give the same SDS−PAGE pattern). (A) Partially purified photolabeled ET_A receptors were incubated in the absence (lane 1) or in the presence of 1 μg Endo Lys-C (lane 3) at 37 °C for 18 h. All samples were run on a 16.5% acrylamide−tris-tricine separating gel followed by autoradiography. [^{14}C-Labeled protein standards were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (B) Representation of the ET_A receptor showing, in black closed circles, five possible fragments that could be bound to the photolabile ligands after the Endo Lys-C digestion.

DISCUSSION

The identification of the molecular determinants involved in the affinity of a ligand to its receptor is an essential step to understand the activation process. To reach this goal, photoaffinity labeling appears as a useful strategy for exploring the binding area within a receptor. This approach requires the development of radioactive photoligands able to form with the receptor protein a covalent conjugate that can be mapped subsequently. Hence, we prepared six photosensitive probes derived from the specific ET_A antagonist TTA-386 in which the hydrophobic residues L-leucine-1, D-tryptophan-2 and D-phenylalanine-6 were successively substituted with a D- or L-Bpa residue. The other hydrophobic amino acid, L-tyrosine-5, was conserved because of its usefulness for radiolabeling.

The synthesis of TTA-386 and its analogues was carried out using standard solid-phase procedures with BOP as an activating reagent for the amino acid couplings. For the last step consisting in the introduction of the urea moiety, activation of the free N-terminus was accomplished with *p*-nitrophenoxychloroformate. This reaction produced a *p*-nitrophenol-derived active ester that, after treatment with homopiperidine, generated the hexamethyleneiminocarbonyl group. This approach was successful and gave a single product. Other methodologies were explored for the incorporation of the N-terminal cyclic urea. For instance, instead of activating the N-terminal amino group of the peptide linked to the solid phase, we verified the feasibility of producing a reactive homopiperidine derivative able to couple to the N-terminus of the peptide chain still linked to the solid phase. So far, reactions of homopiperidine with disuccinimidyl carbonate, phosgene, carbonyldiimidazole, or *p*-nitrophenoxychloroformate were checked for their efficacy. However, none of the activated homopiperidine derivatives were able to give a yield of incorporation of the hexamethyleneiminocarbonyl group, in the peptide chain, as good as that obtained after N-terminal activation followed by a homopiperidine treatment.

The synthetic peptides were then characterized for their capacity to selectively recognize the ET_A receptor. We observed, with ET_A and ET_B paradigms, that the first and second residues of TTA-386 cannot be substituted with D- or L-Bpa because [D- or L-Bpa^1]TTA-386 and [D- or L-Bpa^2]-TTA-386 were completely devoid of antagonistic activity. The reasons for that loss of affinity were not studied. Nevertheless, it is clear that hydrophobicity is not the only pharmacophoric parameter required by positions 1 and 2 to confer affinity to TTA-386 toward the ET_A receptor. Nonetheless, an antagonist activity was obtained with analogues [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386, two analogues in which Bpa replaced the D-phenylalanine amino acid. Their analogous structure is probably the key factor explaining the maintenance of a potent antagonistic effect with these peptides. Furthermore, the stereochemistry of the Bpa residue did not affect the peptides activity, and as such, pA_2 values of 7.5 and 7.7 were calculated for [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386, respectively. Therefore, considering their antagonistic ability, we can postulate that [D-Bpa^6]-TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386 adopt a similar binding conformation to that of TTA-386. Moreover, it also suggested

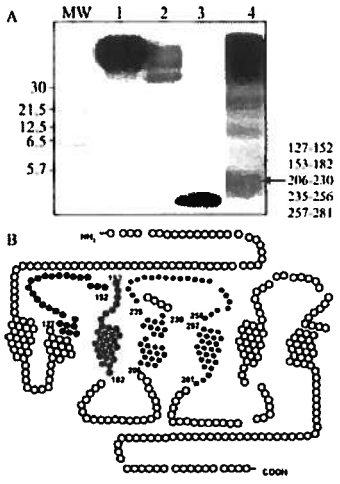


FIGURE 8: V8 protease digestion of ET_A receptors photolabeled with [Tyr(^{125}I), D-Bpa^6]TTA-386 or [Tyr(^{125}I), L-Bpa^6]TTA-386 (both give the same SDS−PAGE pattern). (A) Partially purified photolabeled ET_A receptors were incubated in the absence (lane 1) or in the presence of 8 μg of V8 protease (lane 4) at room temperature for 7 days. The radiolabeled probes (lane 3) were also loaded on the gel. The samples were run on a 16.5% acrylamide−tris-tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C-Labeled protein standards were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (B) Representation of the ET_A receptor showing, in black closed circles, five possible fragments that could be bound to the photolabile ligands after the V8 protease digestion.

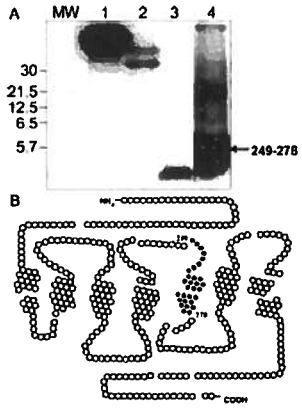


FIGURE 9: CNBr cleavage of ET_A receptors photolabeled with [Tyr-(^{125}I), D-Bpa^6]TTA-386 or [Tyr(^{125}I), L-Bpa^6]TTA-386. (A) Partially purified photolabeled ET_A receptors were incubated in the absence (lane 1) or in the presence of CNBr (125 mg/mL) (lane 4) at room temperature for 18 h in the dark. The radiolabeled probes (lane 3) were also loaded on the gel. The samples were run on a 16.5% acrylamide−tris-tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C-Labeled protein standards were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (B) Representation of the ET_A receptor showing, in black closed circles, one possible fragment that could be bound to the photolabile ligands after the CNBr cleavage.

that residue 6 of those molecules is localized in a region of the binding pocket where the amino acid side chain exhibits some freedom in its movement.

Because the probes need to be radiolabeled for their detection on SDS gel after photoactivation, we verified if the presence of one or two iodine atoms on the peptides modified their pharmacological profile on the ET_A receptor. The lactoperoxidase and iodogen techniques are frequently used for peptides iodination. However, these two reagents are usually utilized to iodinate small amounts of peptides. Because the biological analyses that we had planned to perform would require about 2 mg of peptides, iodination of the two antagonist photolabile peptides was carried out using chloramine-T as an oxidizing reagent. Both iodinated analogues (mono and di) were isolated by RP-HPLC, and their pharmacological studies in isolated endothelium-denuded rat aortic rings revealed that the photosensitive probe [L-Bpa^6]TTA-386 under its mono- or diiodinated form, was still able to bind the ET_A receptor and block the effect of endothelin. In fact, the introduction of the iodine atoms had almost no effects on the affinity, and only a slight decrease of antagonistic activity was measured with both peptides.

The [D-Bpa^6]TTA-386 molecule also showed a similar antagonistic pattern after diiodination. However, instead of giving an antagonist, monoiodination produced an analogue with an agonistic activity on ET_A receptors (apparent EC_{50} at 3×10^{-7} M). To the best of our knowledge, this is the first case described in the literature where the activity of a peptide is reversed by its monoiodination. It is yet unclear why the introduction of one iodine atom into the tyrosine side chain gave rise to an agonist, while the incorporation of a second iodine atom brought back the antagonistic properties. This phenomenon cannot be related to the hydrophobicity or ionization state of the phenolic moiety of Tyr-5, because the tyrosine side chain is more hydrophobic with two iodine atoms than with only one and the decrease of the pK_a value is more pronounced in the former case. Therefore, it appears that monoiodination of [D-Bpa^6]TTA-386 would change the peptide structure and allow a key interaction (or key interactions) leading to the ET_A receptor activation. It is however obvious that D-Bpa is an essential feature for developing the agonistic effect because monoiodination of TTA-386, in which position 6 is occupied with D-Phe, did not behave as an agonist (data not shown). Therefore, we postulated that the introduction of one meta-iodine atom into the Tyr-5 residue, in combination with the presence of a bulky benzoylphenyl group in the proper configuration, probably modified the orientation of the tyrosine-5 side chain in such a way that the phenolate function can induce a biological response. This hypothesis is actually under evaluation.

Competitive assays using radiolabeled [D-Bpa^6]TTA-386 or [L-Bpa^6]TTA-386 revealed a similar affinity for ET_A receptors. Also, both of them appeared selective because they can be displaced by five different ET_A ligands. When used in photolabeling experiments performed in transfected CHO cells, [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386 specifically labeled a protein that migrated as a diffuse band spanning between 60 and 70 kDa on SDS−PAGE. The 60−70 kDa band that was obtained, corresponding to a complex formed by a protein covalently attached to [D-Bpa^6]TTA-386 or [L-Bpa^6]TTA-386, was shown to be superimposable to an ET_A receptor band identified by immunoblotting assays,

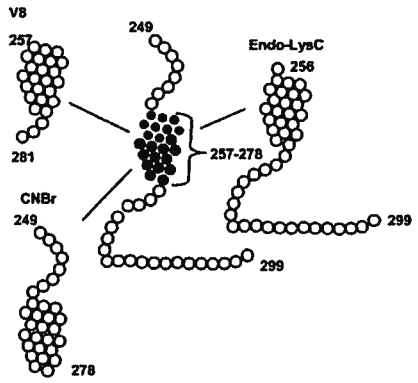


FIGURE 10: Schematic representation of the labeled domain of the ET_A receptor after covalent bonding with [Tyr(^{125}I), D-Bpa^6]-TTA-386 or [Tyr(^{125}I), L-Bpa^6]TTA-386. According to the CNBr cleavage, as well as the Endo Lys-C and V8 protease digestions, the receptor residues 257−278 would form the common fragment.

using anti-ET_A polyclonal antibodies. Moreover, excess of ET-1 or BQ 610 abolished the photolabeling, demonstrating that the two probes compete for the same binding site. Although the theoretical molecular mass of the ET_A receptor is 48 kDa, the visualization of the same band with an anti-ET_A receptor antibody suggested that the photosensitive peptides labeled this receptor. As a matter of fact, a previous PNGase F treatment of cell proteins before the revelation with the antibody showed a protein migrating at around 48 kDa on SDS−PAGE. Thus, the diffuse appearance of the 60−70 kDa band, as well as its susceptibility to PNGase F treatment, confirmed the glycosylated nature of the receptor, a phenomenon frequently encountered (*22*, *27*).

To better define the binding site of [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386 on ET_A receptors, the photolabeled complexes were cleaved using either Endo Lys-C protease, V8 protease, or CNBr in the presence or in the absence of PNgase F. According to the selectivity of these enzymatic or chemical treatments and considering that radiolabeled fragments produced by them must overlap, the 4.8 kDa segment formed after Endo Lys-C treatment would be composed of residues Asp^{256}−Lys^{299}, the 2.9 kDa fragment of V8 protease would be Trp^{257}−Glu^{281}, and CNBr would have produced the fragment Glu^{249}−Met^{278} with a mass of 3.9 kDa. Fragments obtained after the cleavage were unchanged even when the receptor was under its deglycosylated form, demonstrating that the binding domain is not glycosylated. Taken together, these data clearly identify a common sequence of 2.7 kDa that would correspond to residues Trp^{257} and Met^{278} (Figure 10). Thus, this cell surface-oriented segment of the fifth transmembrane domain of the ET_A receptor would play an important role in the binding of the photoprobes [D-Bpa^6]TTA-386 and [L-Bpa^6]TTA-386. Therefore, it appears that both would share the same binding site. Moreover, these data are validated by the fact that an excess of ET-1 or BQ-610 abolished the photolabeling of the ET_A receptor produced with [D-Bpa^6]TTA-386 or [L-Bpa^6]-TTA-386, respectively. Interestingly, a recent photolabeling study of the ET_B receptor, carried out with IRL-1620-derived photoprobes specific for this receptor, also identified a stretch of TM V as a key-feature for the interaction between the ET receptor and its ligands (*28*).

In conclusion, using the photoaffinity labeling technique, we have identified a key segment of the ET_A receptor participating in the interaction with the ET-1 or TTA-386 ligands. This protocol had the advantage that an unaltered form of the receptor, as obtained for instance with the site-directed mutagenesis technique, was explored. Further structural and binding data will however be required to complete the molecular dissection of the ET_A binding pocket.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Myriam Létourneau, Chantal Langlois, Steve Bourgault, and Alexandra Louimaire for their assistance and proof-reading.

REFERENCES

1. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular entothelial cells, *Nature 332*, 411−415.
2. Mateo, A. O., and DeArtinano, A. (1997) Highlights on endothelins: a review, *Pharmacol. Res. 36*, 339−351.
3. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86*, 2863−2867.
4. Masaki, T., Vane, J. R., and Vanhoutte, P. M. (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors, *Pharmacol. Rev. 46*, 137−142.
5. Sakurai, T., Yanagisawa, M., and Masaki, T. (1992) Molecular characterization of endothelin receptors, *Trends Pharmacol. Sci. 13*, 103−108.
6. Shetty, S. S., Okada, T., Webb, R. L., DelGrande, D., and Lappe, R. W. (1993) Functionally distinct endothelin B receptors in vascular endothelium and smooth muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 191*, 459−464.
7. Masaki, T. (2004) Historical review: endothelin, *Trends Pharmacol. Sci. 25*, 219−224.
8. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2003) Role of endothelin in human hypertension, *Can. J. Physiol. Pharmacol. 81*, 533−541.
9. Orth, S. R., Viedt, C., Amann, K., and Ritz, E. (2001) Endothelin in renal diseases and cardiovascular remodeling in renal failure, *Intern. Med. 40*, 285−291.
10. Schmitz-Spanke, S., and Schipke, J. D. (2000) Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases, *Basic Res. Cardiol. 95*, 290−298.
11. Masaki, T., Ninomiya, H., Sakamoto, A., and Okamoto, Y., (1999) Structural basis of the function of endothelin receptor, *Mol. Cell. Biochem. 190*, 153−156.
12. Breu, V., Hashido, K., Broger, C., Miyamoto, C., Furuichi, Y., Hayes, A., Kalina, B., Loffler, B. M., Ramuz, H., and Clozel, M. (1995) Separable binding sites for the natural agonist endothelin-1 and the non-peptide antagonist bosentan on human endothelin-A receptors, *Eur. J. Biochem. 231*, 266−270.
13. Krystek, S. R., Jr., Patel, P. S., Rose, P. M., Fisher, S. M., Kienzle, B. K., Lach, D. A., Liu, E. C., Lynch, J. S., Novotny, J., and Webb, M. L. (1994) Mutation of peptide binding site in transmembrane region of a G protein-coupled receptor accounts for endothelin receptor subtype selectivity, *J. Biol. Chem. 17*, 12383−12386.
14. Lee, J. A., Elliott, J. D., Sutiphong, J. A., Friesen, W. J., Ohlstein, E. H., Stadel, J. M., Gleason, J. G., and Peishoff, C. E. (1994) Tyr-129 is important to the peptide ligand affinity and selectivity of human endothelin type A receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91*, 7164−7168.
15. Adachi, M., Furuichi, Y., and Miyamoto, C. (1994) Identification of a ligand-binding site of the human endothelin-A receptor and specific regions required for ligand selectivity, *Eur. J. Biochem. 220*, 37−43.

16. Zhu, G., Wu, L. H., Mauzy, C., Egloff, A. M., Mirzadegan, T., and Chung, F. Z. (1992) Replacement of lysine-181 by aspartic acid in the third transmembrane region of endothelin type B receptor reduces its affinity to endothelin peptides and sarafotoxin 6c without affecting G protein coupling, *J. Cell. Biochem. 50*, 159−164.
17. Sakamoto, A., Yanagisawa, M., Sawamura, T., Enoki, T., Ohtani, T., Sakurai, T., Nakao, K., Toyo-oka, T., and Masaki, T. (1993) Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin A-selective antagonist and endothelin B-selective agonists, *J. Biol. Chem. 268*, 8547−8553.
18. Adachi, M., Yang, Y. Y., Trzeciak, A., Furuichi, Y., and Miyamoto, C. (1992) Identification of a domain of ET_A receptor required for ligand binding, *FEBS Lett. 2*, 179−183.
19. Kauer, J. C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H. R., Jr., and DeGrado, W. F. (1986) *p*-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide, *J. Biol. Chem. 261*, 10695−10700.
20. Bremer, A. A., Leeman, S. E., and Boyd, N. D. (2001) Evidence for spatial proximity of two distinct receptor regions in the substance P (SP) neurokinin-1 receptor (NK-1R) complex obtained by photolabeling the NK-1R with *p*-benzoylphenylalanine3-SP, *J. Biol. Chem. 376*, 22857−22861.
21. Pérodin, J., Deraet, M., Auger-Messier, M., Boucard, A. A., Rihakova, L., Beaulieu, M.-E., Lavigne, P., Parent, J.-L., Guillemette, G., Leduc, R., and Escher, E. (2002) Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor, *Biochemistry 41*, 14348−14356.
22. Boucard, A. A., Sauvé, S. S., Guillemette, G., Escher, E., and Leduc, R. (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain, *Biochem. J. 370*, 829−838.
23. Kitada, C., Ohtaki, T., Masuda, Y., Masuo, Y., Nomura, H., Asami, T., Matsumoto, Y., Saton, M., and Fujino, M. (1993) Design and synthesis of ET_A receptor antagonists and study of ET_A receptor distribution, *J. Cardiovasc. Pharmacol. 22*, S128−131.
24. Pullen, M., Brown, G., and Nambi, P. (1997) Binding characteristics of [^{125}I]TTA-386, ETA-selective antagonist, *Neuropeptides 31*, 345−349.
25. Bunin, B. (1998) Combinatorial solid-phase synthesis, in *The Combinatorial Index*, pp 77−212, Academic Press, San Diego, CA.
26. Watakabe, T., Urade, Y., Takai, M., Umemura, I., and Okada, T. (1992) A reversible radioligand specific for the ET_B receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 185*, 867−873.
27. Boucard, A. A., Wilkes, B. C., Laporte, S. A., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2000) Photolabeling identifies position 172 of the human AT1 receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure, *Biochemistry 39*, 9662−9670.
28. Boivin, S., Tessier, S., Aubin, J., Lampron, P., Detheux, M., and Fournier, A. (2004) Identification of a binding domain of the endothelin-B receptor using a selective IRL-1620-derived photoprobe, *Biochemistry 43*, 11516−11525.

BI0500933

Chapitre 4

4.1 Mise en contexte de l'article 2

Le but du projet de recherche qui a conduit à cet article consistait à caractériser le domaine de liaison d'analogues de l'endothéline sur le récepteur ET_B en utilisant la technique de photomarquage. Les travaux de marquage par photoaffinité de ce récepteur ont été amorcés en même temps que ceux du récepteur ET_A. Par conséquent, ce projet est une étude parallèle à celle décrite dans le premier article et vient ainsi s'ajouter à nos recherches sur la caractérisation biochimique des récepteurs humains de l'ET.

Les résultats obtenus suite aux expériences de photomarquage du récepteur ET_B ont été publiés en 2004 dans la revue *Biochemistry*, vol. 43, p. 11516-11525. Le développement et la caractérisation d'une sonde photosensible spécifique au récepteur ET_B y sont tout d'abord présentés. Les résultats démontrent aussi clairement que le [Bpa^5,$Tyr(^{125}I)^6$]IRL-1620 est capable de lier de façon covalente le récepteur ET_B lors d'une irradiation du complexe ligand-récepteur. La digestion chimique et enzymatique permet finalement d'identifier le segment du récepteur qui se lie à ce ligand.

4.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2

Les travaux présentés dans cet article ont tous été effectués à part égale par Stéphane Boivin et moi-même sous la supervision du Dr Fournier. Les résultats présentés dans cet article sont le fruit d'un travail d'équipe. Stéphane a débuté ce projet sous ma supervision lors de son premier stage d'étude de baccalauréat. Il a alors réussi à synthétiser des sondes photosensibles et à les purifier. En attendant son retour pour ses études graduées de deuxième cycle, j'ai poursuivi les recherches en effectuant les essais pharmacologiques des sondes photosensibles. Sa Maîtrise s'est donc amorcée par le radiomarquage des sondes photosensibles et les tests de liaison. Nous avons alors collaboré afin de mettre au point ces deux protocoles. Le photomarquage et les digestions enzymatiques ont ensuite été réalisés uniquement par moi puisque Stéphane avait terminé sa Maîtrise.

En ce qui concerne la contribution des autres auteurs de cet article, Philipe Lampron a collaboré au travail relatif à la culture des cellules CHO transfectées avec le récepteur

ET_B, un outil cellulaire unique obtenu du Dr Michel Detheux de la Compagnie Euroscreen. Jacinthe Aubin a quant à elle collaboré à cet article par son aide pour la réalisation des tests de photomarquage. Finalement, la rédaction de cet article a été réalisée à part égale par Stéphane et moi. L'article a ensuite été revu et corrigé par mon directeur de thèse.

4.3 ARTICLE 2

IDENTIFICATION OF A BINDING DOMAIN OF THE ENDOTHELIN-B RECEPTOR USING A SELECTIVE IRL-1620-DERIVED PHOTOPROBE

Stéphane Boivin, Sophie Tessier, Jacinthe Aubin, Philipe Lampron, Michel Detheux et Alain Fournier

L'IRL-1620, un agoniste spécifique du récepteur ET_B de l'ET, a été utilisé comme gabarit de synthèse, lors du développement d'analogues photosensibles requis pour l'identification du domaine de liaison de ce récepteur. Parmi les sondes synthétisées, un peptide contenant en position 5 de sa séquence l'acide aminé photosensible p-benzoyl-L-phénylalanine a montré des propriétés pharmacologiques très similaires à celles de l'IRL-1620 originel sur des modèles biologiques de récepteurs ET_A et ET_B. L'affinité de cette sonde a aussi été évaluée sur des cellules CHO transfectées avec le récepteur ET_B humain. Les résultats ont alors démontré que la liaison du peptide radiomarqué était complètement inhibée par la présence de ET-1 ou d'IRL-1620. Par conséquent, cette sonde photosensible a été employée pour marquer le récepteur ET_B des cellules CHO. Le photomarquage a produit un complexe ligand-protéine apparaissant sur gel SDS-PAGE aux environs de 49 kDa. La présence de ET-1 ou d'IRL-1620 abolit complètement la formation du complexe photomarqué démontrant la sélectivité de cette photosonde. Des digestions du complexe [Bpa^5,$Tyr(^{125}I)^6$]IRL-1620-ET_B ont été effectuées et les fragments de récepteur ont ensuite été analysés pour définir la région du récepteur liée aux ligands. Les résultats ont montré que la digestion enzymatique par l'endoprotéinase Lys-C donnait un fragment de 5,9 kDa correspondant au segment Trp^{274}-Lys^{303} alors que la migration des produits de clivage suite à une digestion par l'enzyme V8 a révélé un fragment de 6,7 kDa. Puisque ces fragments doivent se chevaucher, ce dernier correspondrait aux résidus Trp^{275}-Asp^{313}. Un clivage au CNBr est finalement venu confirmer l'identité du domaine de liaison en donnant un fragment de 3,6 kDa correspondant aux acides aminés Gln^{267}-Met^{296}. Par conséquent, la combinaison des données de clivage suggère fortement que le domaine de liaison agoniste du récepteur ET_B inclurait une portion du cinquième domaine transmembranaire, soit les résidus Trp^{275}- Leu^{295}.

Article publié dans : Biochemistry, 2004 ; vol. 43, p. 11516-11525

11516 *Biochemistry* **2004,** *43,* 11516−11525

Identification of a Binding Domain of the Endothelin-B Receptor Using a Selective IRL-1620-Derived Photoprobe†

Stéphane Boivin,‡,§ Sophie Tessier,‡,§ Jacinthe Aubin,‡ Philipe Lampron,‡ Michel Detheux,∥ and Alain Fournier*,‡

Institut National de la Recherche Scientifique−Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire, Québec, Canada, H9R 1G6, and Euroscreen SA, 802 route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgium

Received April 15, 2004; Revised Manuscript Received June 25, 2004

ABSTRACT: On the basis of the structure of IRL-1620, a specific agonist of the endothelin-B receptor subtype (ET_B), a few photosensitive analogues were developed to investigate the binding domain of the receptor. Among those, a derivative containing the photoreactive amino acid, *p*-benzoyl-L-phenylalanine in position 5 showed, as assessed with endothelin-A (ET_A) and ET_B receptor paradigms, pharmacological properties very similar to those of IRL-1620. The binding capacity of the probe was also evaluated on transfected chinese hamster ovary (CHO) cells overexpressing the human ET_B receptor. Data showed that binding of the radiolabeled peptide was inhibited by ET-1 and IRL-1620. Therefore, this photolabile probe was used to label the ET_B receptor found in CHO cells. Photolabeling produced a ligand−protein complex appearing on SDS−PAGE at around 49 kDa. An excess of ET-1 or IRL-1620 completely abolished the formation of the complex, showing the selectivity of the photoprobe. Digestions of the [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620−ET_B complex were carried out, and receptor fragments were analyzed to define the region of the receptor where the ligand interacts. Results showed that Endo Lys-C digestion gave a 3.8-kDa fragment corresponding to the Asp^{274}-Lys^{303} segment, whereas migration after V8 digestion revealed a fragment of 4.6 kDa. Because the fragments of these two digestions must overlap, the latter would be the Trp^{275}-Asp^{313} stretch. A cleavage with CNBr confirmed the identity of the binding domain by giving a fragment of 3.6 kDa, corresponding to Gln^{267}-Met^{296}. Thus, the combined cleavage data strongly suggested that the agonist binding domain of ET_B includes a portion of the fifth transmembrane domain, between residues Trp^{275} and Met^{296}.

Endothelin (ET)[1] is a potent vasoconstrictor peptide that was first isolated from the supernatant of cultured endothelial cells (*1*). Analysis of the ET gene revealed the existence of three distinct isoforms named ET-1, ET-2, and ET-3 (*2*). All those peptides include 21 residues and exhibit important sequence similarities; in particular, they all contain two intramolecular disulfide bonds in positions 1−15 and 3−11. As a potent vasoconstricting peptide hormone, ET can be an etiological factor of vascular diseases such as hypertension, heart failure, and local ischaemia, including myocardial infarction (*3*−*6*).

ET participates in the regulation of vascular tonus via two classes of cell-surface receptors designated as ET_A and ET_B (*7*). ET_A receptors are mostly located in vascular smooth muscle cells, where they play a major role in vasoconstriction, whereas ET_B receptors are predominantly found in vascular endothelial cells and induce vasodilatation through the production of nitric oxide. Nonetheless, ET_B receptors are also located on vascular smooth muscle cells and partly mediate their constriction (*8*).

ET receptors are members of the seven transmembrane (TM) super family of G protein-coupled receptors (GPCR), and their classification was initially established on the different activity and binding profiles obtained with the ET peptide isoforms. To date, a few studies were carried out to elucidate which segments of the ET receptors are crucial for ligand selectivity, activity, and affinity (*9*). For instance, site-directed mutagenesis showed that a large number of amino acids within ET_A, such as Gly^{97}, Lys^{140}, Lys^{159}, Gln^{165}, and Phe^{315} located respectively in TM regions 1, 2, 3, 3, and 6, influence ET-1 binding (*10*). Similarly, for ET_B, data from cross-linking experiments and chimeric ET_A/ET_B receptor studies concluded that a 60 amino acid domain spanning from

† Financial support was obtained from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). A.F. is "Chercheur National" from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). S.T. received a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). S.B. and P.L. are recipients of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: (514) 630-8816. Fax: (514) 630-8850. E-mail: alain.fournier@inrs-iaf.uquebec.ca.

‡ Université du Québec.

§ Both authors contributed equally to the present study.

∥ Euroscreen SA.

[1] Abbreviations: ACN, acetonitrile; Aebsf, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; BOP, benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate; Bpa, *p*-benzoyl-phenylalanine; BSA, bovine serum albumin; CHO, chinese hamster ovary; CNBr, cyanogen bromide; DIPEA, diisopropylethylamine; DMF, dimethylformamide; ECL, enhanced chemiluminescence; equiv, equivalent; ET, endothelin; ET_A and ET_B, endothelin type-A and -B receptors; GPCR, G protein-coupled receptor; HF, hydrofluoric acid; MALDI−TOF, matrix-assisted laser desorption ionisation−time-of-flight; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PVDF, polyvinylidene fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEM, standard error of the mean; Suc, succinoyl; TFA, trifluoroacetic acid; TM, transmembrane.

10.1021/bi049246x CCC: $27.50 © 2004 American Chemical Society
Published on Web 08/17/2004

Table 1: Amino Acid Sequence of IRL-1620 and Five Related Photoaffinity-Labeling Analogues

peptides	amino acid sequences
IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa^4]IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Bpa-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa^5]IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Bpa-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa^7]IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Bpa-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa^9]IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-Bpa-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH
[Bpa^{10}]IRL-1620	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Bpa-Asp-Ile-Ile-Trp-COOH

Ile^{138} to Ile^{197} (TM2−3) is the ET-1 binding site (*11*). In particular, an Asp residue highly conserved in TM2 of many GPCRs, corresponding to Asp^{147} in ET_B, was suggested as crucial, probably by participating to a hydrogen or electrostatic bond with the ligand or within the receptor itself. Such a phenomenon is frequent and, for instance, was described for the opioid receptors (*12*) as well as the natriuretic peptide receptors (*13*). However, another report produced after the evaluation of an $Asp^{147}Ala-ET_B$ mutant showed that this modified receptor is devoid of any ability of activation, although ET-1 affinity was maintained, hence suggesting that Asp^{147} is rather required for receptor activation than ligand recognition (*14*). Another aspartic acid residue, conserved in many GPCRs and positioned in the TM3 region, was postulated to be involved in the binding of various ligands (*15*). Interestingly, lysine replaces this residue in the ET_B receptor (Lys^{182}), and its substitution using site-specific mutagenesis influenced the binding of ETs, without affecting G protein coupling (*16*). An additional lysine residue in ET_B, Lys^{161}, was also suggested to be important for ET high-affinity binding, because it may confer the nonselective binding characteristics of this receptor for ET isopeptides (*17*). In contrast, data published after the evaluation of a set of ET_B mutants are not in accordance with those results, because they rather demonstrate that binding determinants for ET_B selective agonists would be located in the TM4−6 and their adjacent loop regions (*18*). Moreover, Takasuka et al. showed that Asp^{75} and Pro^{93}, two residues found in the N-terminal extracellular domain, would be involved in the formation of a stable complex between the ET-1 ligand and its ET_B receptor (*19*).

All of these studies, mainly using site-directed mutagenesis, provided clues on some residues and their ability to modulate the ET_B receptor−ligand complex formation and activation. However, to further characterize the amino acids involved in these biological processes, other analytical methods must be explored. We then focused on photoaffinity labeling followed by fragmentation of the resulting photoligand−receptor complex for identifying sites of interaction between the ligand and the receptor. Benzoyl-phenylalanine (Bpa) (*20*), a photosensitive amino acid employed successfully to probe the substance P receptor (*21*), angiotensin II receptor (*22*), and urotensin II receptor (GPR14) (*23*) was exploited as a photolabile moiety.

In this paper, we describe the development of photoreactive probes exhibiting selectivity and agonistic activity toward the ET_B receptor. More precisely, a L-Bpa-scan approach of a synthetic linear analogue of ET-1, Suc-[Glu^9,$Ala^{11,15}$]-ET-1(8−21), specific to ET_B and known as IRL-1620 (*24*, *25*), was carried out to develop effective photolabile agonist ligands. In particular, the radioactive analogue [Bpa^5,Tyr-(^{125}I)^6]IRL-1620 exhibited the functional properties required for the covalent labeling of human ET_B receptors expressed in transfected chinese hamster ovary (CHO) cells. This step followed by the fragmentation of the photoligand−receptor complex enabled us to identify a binding domain interacting with the agonist photoprobe.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Male Sprague−Dawley rats and male Hartley guinea pigs were obtained from Charles River Canada (St-Constant, QC) and kept on a 12-h light−dark cycle with laboratory chow and tap water ad libitum according to standards approved by the Canadian Committee on Animal Care. Boc-L-Bpa was purchased from Advanced ChemTech (Louisville, KY). All other amino acids were obtained from ChemImpex International (Wood Dale, IL) or Albatross Chem Inc. (Montreal, QC). , benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP) was obtained from Albatross Chem Inc. (Montreal, QC). Chloramine-T, NaI, bovine serum albumin (BSA), protease inhibitor cocktail, succinic anhydride, CNBr, Endo Lys-C, V8 protease, and anti-ET_B receptor antibody were provided by Sigma−Aldrich (Oakville, ON). The Western blot ECL revelation kit, $Na^{125}I$ and ^{14}C molecular weight standards were purchased from Amersham Biosciences (Montreal, QC). CHO cells stably expressing the human ET_B receptor were obtained from Euroscreen (Belgium). Ham-F12 culture medium, calf serum, and antibiotics were obtained from Biomedia (Drummondville, QC).

Photoprobes Synthesis. Probes were synthesized using a semiautomatic homemade solid-phase synthesizer, according to a protocol using *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) chemistry. IRL-1620 (Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp) and five photosensitive analogues were synthesized by substituting successively Ala^4, Val^5, Phe^7, His^9, or Leu^{10} with a L-Bpa residue (Table 1). A chloromethylated resin was used as the solid support, and subsequent couplings of Boc amino acids (Boc-Asp(cHex)-OH, Boc-Glu(Bzl)-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Val-OH, Boc-Tyr-(2BrZ)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-His(Tos)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Ile-OH, and Boc-Trp(For)-OH) were performed in *N*,*N*-dimethylformamide (DMF) in the presence of diisopropylethylamine (DIEA) and BOP as a condensing reagent. L-Bpa was incorporated into peptides as a Boc-protected building block during solid-phase synthesis. The peptide resin was treated with succinic anhydride to obtain N^{α}-succinoylated derivatives. Peptide resins were cleaved with hydrofluoric acid (HF) (10 mL g^{-1}) using dimethyl sulfide and *m*-cresol as scavengers. The reaction was carried out for 1 h at 0 °C. HF was rapidly evaporated, and the resin was washed with diethyl ether. Crude synthetic peptides were extracted with TFA and precipitated with diethyl ether. Deformylation of the indole moiety of Trp^{14} was obtained by shaking the peptide (0.3 mg mL^{-1}) in 0.1 N piperidine at 0 °C for 15

min. Then, the solution was diluted with water (1:10), and peptides were purified by means of preparative reverse-phase HPLC using a Waters PrepLC500A system equipped with a model 441 absorbance detector and a Phenomenex Jupiter C_{18} (300 Å, 15 μm, 250 × 21.2 mm) column. Peptides were eluted with a linear gradient for 2 h from A (aqueous NH_4OH at 0.05%) to B (20% ACN in solvent A). Flow rate was maintained at 20 mL min^{-1}, and detection was at 229 nm. Collected fractions were analyzed using reverse-phase HPLC. Fractions corresponding to pure material were pooled, lyophilized, and analyzed by mass spectrometry. Purification led to peptide purity equal to or greater than 98%, and their molecular mass was confirmed with MALDI−TOF mass spectrometry (Voyager-DE, PerSeptive Biosystems, Foster City, CA). Peptides in a powder form were kept at −20 °C until biological and biochemical characterizations.

Iodination with "Cold" Iodine. Peptides (40 mg) were dissolved in a Tris-HCl buffer (0.25 mM at pH 7.5) containing NaCl (0.05 M) and 1.5 equiv of NaI. Chloramine-T (0.8 equiv) was added to start the reaction. After 30 s, 2 equiv of sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$) was added to stop the reaction. Then, the mono and diiodo forms of the peptides were isolated by preparative reverse-phase HPLC using a linear gradient (0−30% ACN/aqueous NH_4OH at 0.05%). Peptide purity was assessed with analytical reverse-phase HPLC, and molecular weight was determined using MALDI−TOF mass spectrometry.

Pharmacological Evaluations. The biological activity of the probes was assessed in two different preparations, rat thoracic aorta rings (*26*) and guinea pig lung parenchyma strips (*27*). Male Sprague−Dawley rats (250−300 g) were anesthetized, and the thoracic aorta was removed and cleaned of connective tissues, Its endothelium was detached by gentle rubbing. Rings (4-mm wide) were cut and mounted under an initial tension of 1 g, in water-jacketed organ baths containing oxygenated Krebs buffer (120 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 11 mM glucose, 4.7 mM KCl, 2.4 mM $MgSO_4$, 1.17 mM KH_2PO_4, and 2.5 mM $CaCl_2$) maintained at 37 °C. Each preparation was allowed to equilibrate for 1 h, and contractions were recorded using a Grass 7E Polygraph equipped with force−displacement transducers. Contractile responses were measured for concentrations of peptides ranging from 10^{-10} to 10^{-5} M. The biological activity was expressed as a percentage of the effect produced by KCl (80 mM).

Male Hartley guinea pigs (300−350 g) were anesthetized, and lungs were removed. The parenchyma was dissected in strips that were mounted in the system described above. Contractile responses were measured for concentrations of peptides ranging from 10^{-10} to 10^{-5} M. The biological activity was expressed as a percentage of the effect produced with histamine (10^{-6} M). Noniodinated and iodinated peptides were tested, and concentration−response curves were analyzed using a nonlinear least-squares regression carried out with the Prism 3.02 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Results are expressed as mean ± SEM, and n varied from 8 to 12 animals.

Cell Culture. CHO cells stably expressing the human ET_B receptor were grown at 37 °C with 5% CO_2 in Ham F-12 nutriment medium supplemented with 10% fetal calf serum, 400 μg mL^{-1} of G418, 100 units mL^{-1} penicillin, 100 units mL^{-1} streptomycin, and 2.5 units mL^{-1} amphotericin B.

Immunoblotting. The molecular weight of the ET_B receptor was determined by an immunoblot analysis. Cells cultured in 100-mm dishes were solubilized in 1.5 mL of a detergent buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Igepal, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% (v/v) Triton, 5 mM EDTA, and 0.01% (v/v) cocktail of inhibitors) and submitted to a gentle agitation at 4 °C. Then, the solution was centrifuged at 20000g for 45 min, and proteins of the supernatant were separated by 10% SDS−PAGE. Proteins were transferred to a PVDF membrane by electrophoretic blotting and probed with a polyclonal antibody against hET_B. Reactivity to the antibody was detected by chemiluminescence using an ECL Western blotting system and exposed to an X-ray film (Universal X-ray Company of Canada Ltd., Dorval, QC).

Radioiodination. Iodine-125 was incorporated into the tyrosine residue following a modified protocol described by Watakabe and co-workers (*25*). Briefly, the peptide (6.6 nmol) was dissolved in 13 μL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). Then, 1 mCi of $Na^{125}I$ (10 μL) was added, and the reaction was initiated with the addition of chloramine-T (14 nmol). The solution was mixed for 30 s, and the reaction was stopped by adding 100 μL of 10 mM sodium metabisulfite. The ^{125}I-labeled peptides were purified by analytical reverse-phase HPLC using a linear gradient of 30−60% ACN in aqueous TFA (0.06%), at a flow rate of 1 mL min^{-1}. Fractions were collected every 30 s, and the radioactivity was monitored with a Cobra II γ counter (Packard−Canberra, Montreal, QC). The monoradioiodinated peptides were diluted 1:10 in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) and stored at −20 °C until their use. Specific activity was assumed to be at 2200 Ci/mmol.

Binding Studies. Binding assays were performed with CHO-ET_B cells cultured in 12-well culture plates until confluence was reached. The culture medium was aspirated, and cells were washed twice with cold buffer A (25 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, and 100 mM NaCl at pH 7.4). Competition binding experiments were performed in 0.5 mL of buffer A supplied with 0.01% (w/v) BSA and 0.01% (v/v) protease inhibitor cocktail containing AEBSF, aprotinin, leupeptin, bestatin, pepstatin A, and E-64. Cells were incubated for 16 h at 4 °C with monoradioiodinated peptides (3×10^{-10} M) in the presence of IRL-1620 or ET-1, at concentrations ranging from 10^{-12} up to 10^{-6} M. The incubation was terminated by rapid removal of the binding buffer, and cells were washed twice with cold buffer A. Cells were collected with a 1 M NaOH solution and transferred to a test tube to allow a radioactivity count. The extent of displacement (IC_{50}) was determined by a nonlinear regression according to a single-site model using the Prism 3.02 software. Results are expressed as the mean ± SEM of three independent determinations carried out in duplicate.

Photolabeling of ET_B Receptors. Transfected CHO-ET_B cells were incubated for 16 h at 4 °C with 6 nmol of radiophotoreactive analogue in buffer A supplied with 0.01% (v/v) protease inhibitor cocktail. Cells were washed, covered with 750 μL of the same buffer, and then irradiated with UV (with a 100 W lamp; 365 nm) at a distance of 6 cm, for 1 h, while kept on ice. Afterward, 750 μL of the detergent buffer was added and cells were submitted to a gentle agitation for 45 min. The solutions were then centrifuged at

16000*g* for 45 min at 4 °C. The supernatants were stored at −20 °C until further analysis.

Identification of the Labeled Complex. The solubilized photolabeled receptors were diluted 1:2 with a loading buffer (62.5 mM Tris-HCl at pH 6.8, 20% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoethanol, and 0.025% (w/v) bromophenol blue) and incubated for 1 h at 37 °C. A 10% SDS−polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed using a 1-mm-thick gel as described by Laemmli (*28*). After a migration of 175 V for 1 h, the gels were dried on filter paper and exposed to X-ray film with an intensifying screen. [^{14}C]Methylated molecular standards (14−220 kDa) were used to determine the molecular mass of the radiolabeled complex.

Partial Purification of the Photolabeled Complex. The solubilized photolabeled receptors were diluted 1:2 with the loading buffer described above and incubated for 1 h at 37 °C. A 10% SDS−PAGE electrophoresis was performed using a 1.5-mm-thick gel. The gel was then cut into slices, and their radioactive content was measured with a γ counter. The labeled receptor was electroeluted from the gel slices into electroelution buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, and 0.1% SDS) for 3.5 h at room temperature as recommended by the electroelution apparatus protocol of the manufacturer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The eluate was concentrated to a final volume of 30 μL using Centricon-10 and was stored at −20 °C.

Proteolytic and Chemical Digestion. For CNBr cleavage, the partially purified photolabeled receptor was resuspended in 200 μL of 50% (v/v) TFA/H_2O before adding 200 μL of ACN containing 50 mg of CNBr. The samples were incubated at room temperature in the dark for 16−18 h. The reaction was terminated by adding 3 mL of water. Samples were lyophylized twice to remove a large part of the salts. For proteolytic digestions, partially purified photolabeled receptors were digested for 16−20 h at 37 °C with 1 μg of Endo Lys-C protease in 25 μL of digestion buffer containing 25 mM Tris-HCl at pH 8, 1 mM EDTA, and 0.1% SDS. Partially purified receptors were also digested for 7 days at room temperature with 8 μg of V8 protease in 25 μL of buffer containing 100 mM ammonium carbonate at pH 8 and 0.1% SDS. All digestions were terminated by addition of an equal volume of Laemmli buffer followed by an incubation at 37 °C for 1 h.

Analysis of Products of Proteolysis and Chemical Cleavage. The products of proteolysis and chemical cleavage were analyzed by SDS−PAGE using 16.5% Tris-Tricine gels. After a migration of 80 V for 4 h, the gels were dried on filter paper and exposed to X-ray film with an intensifying screen. ^{14}C-Labeled low molecular protein standards (5−30 kDa) were used to determine the molecular mass of the photolabeled fragments.

RESULTS

Peptide Synthesis and Purification. Table 1 shows the amino acid sequences of the specific ET_B receptor agonist, IRL-1620, and five photosensitive analogues. The amino acids Ala^4, Val^5, Phe^7, His^9, and Leu^{10} were replaced successively with a L-Bpa residue. The photoprobes were assembled with the so-called Boc chemistry protocol, using BOP as the coupling reagent. Purity of the peptides (≥98%) was assessed by analytical HPLC. Mass spectrometry analysis using MALDI−TOF technology confirmed the exact mass of all synthetic compounds.

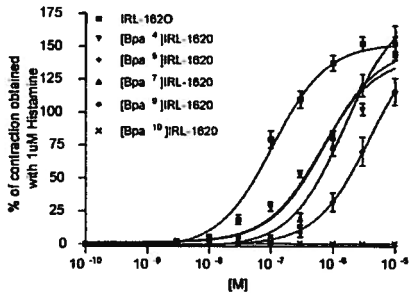


FIGURE 1: Concentration−response curves of IRL-1620 (■) and its photosensitive analogues [Bpa^4]IRL-1620 (▼), [Bpa^5]IRL-1620 (◆), [Bpa^7]IRL-1620 (△), [Bpa^9]IRL-1620 (◇), and [Bpa^{10}]IRL-1620 (×) obtained with the guinea-pig lung parenchyma strip bioassay (ET_B preparation). Results are expressed as a percentage of the contractile response induced with 10^{-6} M histamine.

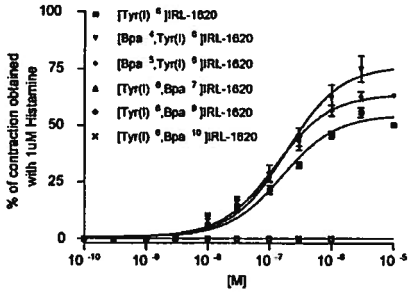


FIGURE 2: Concentration−response curves of [Tyr(I)^6]IRL-1620 (■) and the iodinated Bpa analogues [Bpa^4,Tyr(I)^6]IRL-1620 (▼), [Bpa^5,Tyr(I)^6]IRL-1620 (◆), [Tyr(I)^6,Bpa^7]IRL-1620 (△), [Tyr(I)^6,-Bpa^9]IRL-1620 (◇), and [Tyr(I)^6,Bpa^{10}]IRL-1620 (×) obtained in the guinea-pig lung parenchyma strip bioassay (ET_B preparation). Results are expressed as a percentage of the contractile response induced with 10^{-6} M histamine.

Activity Assays. The biological activity of the photoprobes was measured in the rat thoracic aorta and guinea pig lung parenchyma bioassays, two pharmacological preparations showing predominant populations of ET_A and ET_B receptors, respectively. Figures 1 and 2 show the concentration−response curves of the active compounds, and Table 2 summarizes the results. IRL-1620 at concentrations varying from 10^{-10} to 10^{-6} M induced concentration-dependent contractions in guinea pig lung parenchyma strips with an EC_{50} of 110 nM. The photoreactive analogues were however not as potent as IRL-1620, meaning that the amino acid residues Ala^4, Val^5, Phe^7, or His^9 of IRL-1620 exhibit variable tolerance toward a substitution with a bulky moiety such as Bpa. It is even more obvious with position 10 because the substitution of Leu^{10} with Bpa resulted in a complete loss of activity on ET_B receptors. Moreover, this analogue did not show any antagonistic properties in the ET_B preparation. None of the five peptides produced a biological effect, neither as agonist nor antagonist, in the rat thoracic aorta assay suggesting that the active probes were still highly selective for the ET_B receptor.

Table 2: Biological Activities of IRL-1620 and Photosensitive Analogues in the Rat Thoracic Aorta (ET_A) and Guinea-Pig Lung Parenchyma (ET_B) Bioassays

peptides	ET_A preparation $EC_{50} \pm$ SEM (M)	ET_B preparation $EC_{50} \pm$ SEM (M)
IRL-1620	na[a]	$1.1 \pm 0.9 \times 10^{-7}$
[Bpa^4]IRL-1620	na	$7.4 \pm 0.7 \times 10^{-7}$
[Bpa^5]IRL-1620	na	$6.5 \pm 0.6 \times 10^{-7}$
[Bpa^7]IRL-1620	na	$1.6 \pm 0.2 \times 10^{-6}$
[Bpa^9]IRL-1620	na	$>10^{-6}$
[Bpa^{10}]IRL-1620	na	na
[Tyr(I)^6]IRL-1620	na	$1.6 \pm 0.1 \times 10^{-7}$
[Bpa^4,Tyr(I)^6]IRL-1620	na	$1.9 \pm 0.2 \times 10^{-7}$
[Bpa^5,Tyr(I)^6]IRL-1620	na	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{-7}$
[Tyr(I)^6,Bpa^7]IRL-1620	na	na
[Tyr(I)^6,Bpa^9]IRL-1620	na	na
[Tyr(I)^6,Bpa^{10}]IRL-1620	na	na

[a] na = not active.

Radioiodination of the probes is an essential step to subsequently allow the visualization of the photolabeled receptor. Hence, a second series of pharmacological activity was evaluated with the probes after iodination with "cold" iodine to confirm that the incorporation of this atom into the phenolic ring of Tyr^6 does not abolish the activity nor binding capacity of the IRL-1620 derivatives. So far, iodination of IRL-1620 led to a 50% decrease in efficacy, while the EC_{50} value did not appear to be influenced. On the other hand, as seen with [Bpa^4,Tyr(I)^6]IRL-1620, iodination of tyrosine gave rise to an improvement of the EC_{50} (740 ± 70 versus 190 ± 20 nM). A similar result was obtained with [Bpa^5,Tyr(I)^6]IRL-1620 in which iodination improved the EC_{50} by 5-fold (650 ± 60 versus 130 ± 10 nM). Despite their enhanced potencies, their contractile response was however 50% less effective in the ET_B receptor bioassay. Iodination of [Bpa^7]IRL-1620 and [Bpa^9]IRL-1620 completely abolished their activity and binding capacity on ET_B receptors, while [Tyr(I)^6,Bpa^{10}]IRL-1620 did not exhibit any activity nor binding capacity. All iodinated analogues were inactive in the rat thoracic aorta bioassay.

Binding Experiments. CHO cells expressing the human ET_B receptor (Figure 3) were used to assess the binding potencies of the photoprobes. Because no antagonistic effects were measured with the ET_B inactive analogues, only the compounds showing a biological activity on the ET_B receptor were evaluated on the CHO cells. Binding capacity assessment was carried out by competitive binding assays using [Bpa^4,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 and [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 as tracers. As shown in Figure 4A, binding of [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]-IRL-1620 was inhibited by ET-1 (IC_{50} value of 1.8 ± 0.3 nM) and IRL-1620 (IC_{50} value of 52 ± 1 nM). Similar results were obtained with the radioligand [Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 when using ET-1 as a competitor (IC_{50} value of 1.0 ± 0.1 nM) (Figure 4B). However, IRL-1620 (IC_{50} value of 2.3 ± 0.1 nM) exhibited a more pronounced ability to displace radioiodinated IRL-1620 than its Bpa^5 counterpart (Figure 4B). Although, [Bpa^4,Tyr(I)^6]IRL-1620 was an agonist as good as [Bpa^5,Tyr(I)^6]IRL-1620, its behavior as a tracer was unsatisfactory, and only a weak binding was observed with this peptide. Nevertheless, the binding experiments demonstrated that [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 is very well-recognized by ET_B receptors and shares the same binding site as ET-1. This photoprobe has then been favored for photoaffinity labeling.

Photoaffinity Labeling of ET_B Receptors. As shown with a 10% SDS−PAGE analysis, photoactivation of [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 bound to ET_B receptors found at the surface of CHO cells resulted in the covalent attachment of this probe (lane 1 of Figure 5A; 49-kDa complex and a minor component at 37 kDa). Interestingly, a previous treatment with PNGase F did not modify the separation pattern, thus suggesting that ET_B is not a glycoprotein (data not shown). The formation of the complex between [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 and the receptor was completely abolished in the presence of ET-1 (lane 2) or IRL-1620 (lane 3), demonstrating the specificity of the labeling. In addition, the identity of the ET_B receptor has been confirmed by immunoblotting experiments (Figure 5B), that showed that a 47-kDa protein

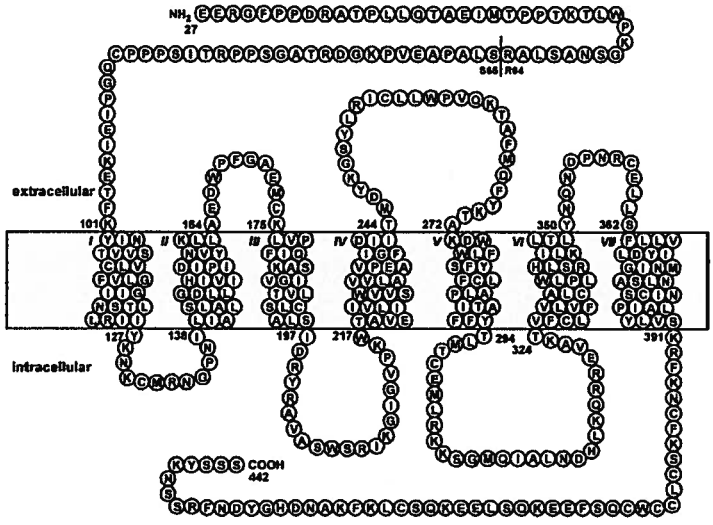


FIGURE 3: Primary structure of the human ET_B receptor.

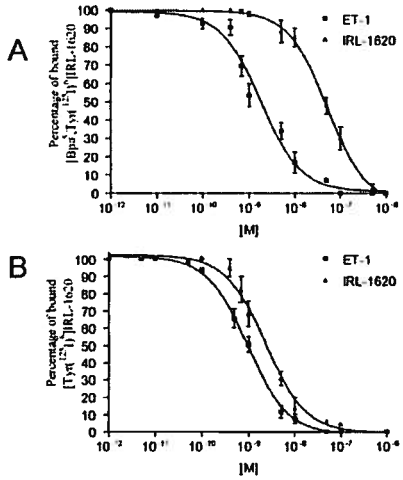


FIGURE 4: Competition binding curves of ET-1 (■) and IRL-1620 (▲) for the binding of [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 (A) or [Tyr(^{125}I)^6]-IRL-1620 (B) to ET_B receptors expressed in transfected CHO cells. The IC_{50} values for the displacement of [Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 binding to ET_B receptors for ET-1 and IRL-1620 are $1.0 \pm 0.1 \times 10^{-9}$ and $2.3 \pm 0.1 \times 10^{-9}$ M, respectively. The IC_{50} values for the displacement of [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 are $1.8 \pm 0.3 \times 10^{-9}$ M for ET-1 and $52 \pm 1 \times 10^{-9}$ M for IRL-1620. The data are shown as a percentage of the specific control binding determined in the absence of competing ligands and are representative of three to five similar independent experiments conducted in duplicate.

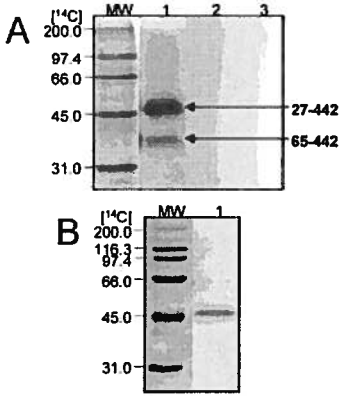


FIGURE 5: ET_B receptor analysis by SDS−PAGE. (A) Specific photolabeling of ET_B receptors with [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620. CHO cells transfected with ET_B receptors were incubated with [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 either alone (lane 1), in the presence of 1 μM unlabeled ET-1 (lane 2), or in the presence of 1 μM unlabeled IRL-1620 (lane 3). (B) Immunoblot analysis of ET_B receptors. Protein standards of the indicated molecular masses (in kilodaltons) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments.

is recognized by antibodies raised against the ET_B receptors. Thus, the 49-kDa photolabeled protein would be the mass of the photosensitive ligand (1972 Da) linked to the ET_B receptor (47 kDa). On the other hand, the 37-kDa photolabeled protein would be a proteolytic truncated form of the receptor appearing during the photolabeling process, because

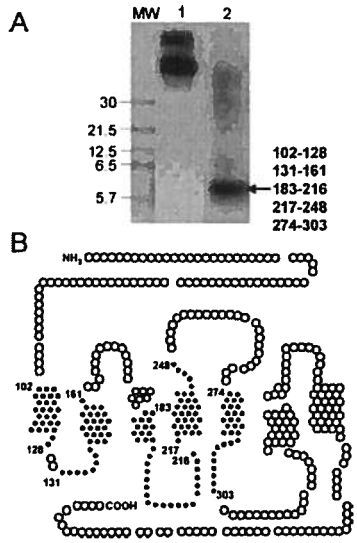


FIGURE 6: Endo Lys-C digestion of ET_B receptors photolabeled with [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620. (A) Partially purified photolabeled ET_B receptors were incubated in the absence (lane 1) or in the presence of 1 μg Endo Lys-C (lane 2) at 37 °C for 18 h. All samples were run on a 16.5% acrylamide-tris-tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C-Labeled protein standards of the indicated molecular masses (in kilodaltons) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (B) Two-dimensional representation of the ET_B receptor shows five possible fragments in black closed circles bound to the photolabile ligand after the Endo Lys-C digestion.

the addition of 5 mM EDTA was shown to strongly reduce its presence (data not shown).

Analysis of Products of Proteolysis and Chemical Cleavage. To identify the binding domain, the ET_B receptor photolabeled with [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 was partially purified by SDS−PAGE and submitted to Endo Lys-C digestion, which cleaves on the C-terminal side of lysine residues. This enzymatic cleavage produced on a 16.5% acrylamide-tris-tricine separating gel, a well-resolved fragment at 5.9 kDa (lane 2 of Figure 6A) that would correspond to the smallest digestion fragment of the photolabeled receptor. Because the iodinated photoprobe has a mass of 2.1 kDa, the photolabeled segment would possess a molecular weight at around 3.8 kDa. According to the analysis of the primary structure of the ET_B receptor, five fragments could match these mass data, i.e., Tyr^{102}-Lys^{128} (3 kDa), Cys^{131}-Lys^{161} (3.4 kDa), Ala^{183}-Lys^{216} (3.5 kDa), Trp^{217}-Lys^{248} (3.6 kDa), and Asp^{274}-Lys^{303} (3.8 kDa) (Figure 6B).

To further define the labeled region, we proceeded to an alternative digestion step of the photolabeled [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]-IRL-1620−ET_B complex with the V8 enzyme, which cleaves peptide bonds exclusively on the carboxylic side of aspartate and glutamate residues. Again, many bands are observed, thus suggesting an incomplete digestion (lane 1 of Figure 7A). Nevertheless, the analysis of the bands revealed that the shortest fragment exhibits a mass of 6.7 kDa corresponding to the sum of the photoprobe mass (2.1 kDa) and that of the photolabeled segment (4.6 kDa). A computerized analysis (with the Peptide Mass software) of the ET_B receptor

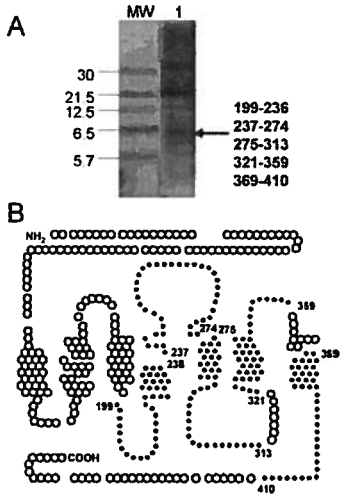


FIGURE 7: V8 protease digestion of ET_B receptors photolabeled with [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620. (A) Partially purified photolabeled ET_B receptors were incubated in the presence of 8 μg V8 protease (lane 1) at room temperature for 7 days. The sample was run on a 16.5% acrylamide-tris-tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C-Labeled protein standards of the indicated molecular masses (in kilodaltons) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (B) Two-dimensional representation of the ET_B receptor shows five possible fragments in black closed circles bound to the photolabile ligand after the V8 protease digestion.

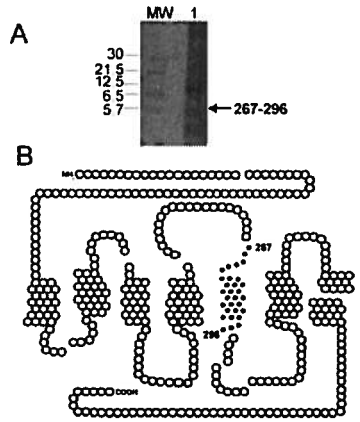


FIGURE 8: CNBr cleavage of ET_B receptors photolabeled with [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620. (A) Partially purified photolabeled ET_B receptors were incubated in the presence of CNBr (125 mg/mL) (lane 1) at room temperature for 18 h in the dark. The sample was run on a 16.5% acrylamide-tris-tricine separating gel followed by autoradiography. ^{14}C-Labeled protein standards of the indicated molecular masses (in kilodaltons) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (B) Two-dimensional representation of the ET_B receptor shows one possible fragment in black closed circles bound to the photolabile ligand after the CNBr cleavage.

sequence and of its fragments produced after complete and partial V8 digestion identified five peptide segments (Arg^{199}-Glu^{236}, Ala^{237}-Asp^{274}, Trp^{275}-Asp^{313}, Val^{321}-Glu^{359}, and Tyr^{369}-Glu^{410}) corresponding to a mass of 4.6 kDa. Except for the last suggestion, all four others would be produced after an incomplete digestion by the enzyme. As mentioned above and demonstrated by the number of bands of various molecular weights observed on the gel, even a prolonged V8 treatment (7 days) did not lead to a complete digestion. However, by combining the Endo Lys-C and V8 digestion results, we can reject the possibility that the last fragment Tyr^{369}-Glu^{410} is part of the binding domain because none of the expected proteolytic segments shows any overlaps. Taking into account that the labeled sequence produced by the two different enzymatic digestions must overlap, the V8 digestion fragment Val^{321}-Glu^{359} must also be rejected as the binding domain as well as the Endo Lys-C fragments Tyr^{102}-Lys^{128} and Cys^{131}-Lys^{161}. Therefore, the binding region would be located between Asp^{199}-Lys^{303}.

To further confirm the labeling site, we proceeded to a chemical treatment with CNBr that cleaves at the carboxylic side of methionine residues. Again, many bands are observed suggesting an incomplete digestion (lane 1 of Figure 8). Nevertheless, the analysis of the shortest fragment, appearing on the gel just before some residual free ligand, revealed a mass of 5.7 kDa that would be the sum of the photoprobe mass (2.1 kDa) and that of the photolabeled fragment (3.6 kDa). Moreover, the band appearing at around 8.4 kDa would correspond to the partially digested fragment Asp^{246}-Met^{296} linked to the photoprobe. On the basis of these SDS−PAGE results, only one segment, corresponding to Gln^{267}-Met^{296} (3.7 kDa) can fulfill the entire data.

DISCUSSION

The identification of the molecular determinants involved in the affinity of a ligand to its receptor is of utmost importance to understand the activation process. A few technologies are designed to reach this goal, and photoaffinity labeling appears as a useful strategy for exploring the binding area within a receptor. This approach relies on the affinity of a radioactive photoligand toward a receptor protein and on its ability to form a covalent conjugate that can be mapped subsequently. Hence, in the present study, we prepared five photosensitive probes exhibiting structures related to that of IRL-1620, a specific ET_B agonist.

A L-Bpa scanning was used for the development of specific photolabile probes for ET_B receptors. Thus, the photosensitive analogues were synthesized by substituting successively Ala^4, Val^5, Phe^7, His^9, and Leu^{10} with a Bpa residue. The other positions in the sequence were kept intact. Accordingly, as shown with structure−activity studies of IRL-1620 (*24*), it was established that N-succinoylation, peptide length, and the presence of a polyanionic cluster formed by the four carboxylic functions at the N terminus (Suc-Asp^1-Glu^2-Glu^3) were essential features to conserve the selectivity toward ET_B. For instance, the replacement of Asp^{11} with an uncharged amino acid such as Gly resulted in a 10-fold increase in affinity toward the ET_A receptor (*29*). Hence, these charged amino acids were not considered for Bpa swap. Similarly, the C-terminal residues Asp^{11}, Ile^{12}, Ile^{13}, and Trp^{14} were not substituted because structure−function analyses of ET confirmed their major roles in affinity (*30, 31*). Finally, Tyr^6 in IRL-1620 was conserved because of the usefulness of this

residue for radiolabeling, whereas Ala was maintained in position 8 to preserve that key feature for the ET_B receptor. Indeed, in ET, it was described that substitution with Ala at positions Cys^3 and Cys^{11} did not have a large detrimental effect on the ET_A activity (2.3 versus 0.94 nM), but substitutions of Cys^1 and Cys^{15} extensively decreased the ET_A activity (170 versus 0.94 nM) without causing a very significant reduction of the ET_B effect (*32*). In IRL-1620, the template compound of the present study, residues matching Cys^1 and Cys^3 of ET are missing. However, in this derivative, the ET-corresponding Cys^{11} and Cys^{15} are substituted with Ala and Ala^{15} represents a crucial characteristic related to ET_B specificity. As a matter of fact, as described before by Saeki et al. (*33*), ET fragments with for instance alanine in position 15 exhibit a better affinity toward ET_B receptor preparations, as compared to their cysteine-containing counterparts.

All five photoprobes were characterized for their capacity to selectively recognize and activate the ET_B receptor. Biological activity studies showed that the amino acid residues Ala^4, Val^5, and Phe^7 are more tolerant to Bpa substitution than His^9 or Leu^{10}. This was somewhat surprising because previous ET studies showed that His^{16} (His^9 in IRL-1620) and Leu^{17} (Leu^{10} in IRL-1620) of ET-1 were not essential residues for binding and activity (*34*, *35*). Therefore, these results suggest that steric hindrance is probably responsible for the loss of activity and binding capacity of the last two peptides rather than the modification of the chemical character of the pharmacophore. Nevertheless, so far, three out of five photoprobes showed a significant potency in the guinea pig lung parenchyma assay.

Iodination of the Bpa analogues modulated their contractile properties without affecting their selectivity. Hence, it appeared that the addition of an iodine atom into the tyrosine side chain most likely contributed to structural restrictions within the binding domain of the ET_B receptor and changed the hydrophobic character of the phenolic moiety. Although, iodination of IRL-1620 did not significantly modify its potency, the ligation of an iodine atom in the Bpa^7 and Bpa^9 derivatives led to a complete loss of activity and binding capacity. In contrast, [Bpa^4,Tyr(I)^6]IRL-1620 and [Bpa^5,Tyr(I)^6]IRL-1620 became after iodination more potent than their counterpart, but this chemical modification influenced their efficacy. Besides the increase of hydrophobicity and reduction of molecular mobility produced by the incorporation of a meta-iodine atom, a decrease of the phenolic pK_a of Tyr^6, coming from the electron-withdrawing effect of the halogen, might also be at the origin of those observations.

Among the synthetic photoprobes, both [Bpa^4,Tyr(I)^6]IRL-1620 and [Bpa^5,Tyr(I)^6]IRL-1620 kept their selective activity toward the guinea pig ET_B receptor. Competition binding experiments between [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 and unlabeled ET-1 or IRL-1620 showed that ET-1 is a better competitor than IRL-1620. In fact, when using [Tyr(^{125}I)^6]-IRL-1620 as a tracer, ET-1 appeared 2.3 times more potent than IRL-1620 for displacing the radioiodinated probe from the ET_B receptors expressed in CHO cells. In this study, with [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 as a radioactive probe, the potency of competition of ET-1 over IRL-1620 exhibited a 30-fold increase. On the other hand, competitive assays with this time [Bpa^4,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 revealed a very weak binding capacity of this compound for the human ET_B receptors found in the CHO cells. It is known that IRL-1620 possesses different species-binding characteristics. For instance, in rat cerebellum, the binding is irreversible, while being reversible in other tissues such as the dog cerebellum and the human lung (*36*). Such different binding characteristics related to variations in the receptor sequence between species could explain why the [Bpa^4,Tyr(I)^6]IRL-1620 probe, while active in the guinea pig lung parenchyma, exhibited no binding capacity for the cloned human ET_B receptor.

Because photolabeling experiments were performed on human ET_B receptors tranfected in CHO cells, [Bpa^5]IRL-1620 was the only photoprobe used. This peptide specifically labeled the ET_B receptor, which migrated as two nonglycosylated entities, one with a mass of 49 kDa and another with a mass of 37 kDa. This particular observation was also made by Takasuka et al. (*19*) who reported that in the presence of 1% SDS, at reduced temperature, the [Tyr(^{125}I)^{13}]ET-1–ET_B receptor complex was stable but displayed, on SDS–PAGE analysis, two bands at approximate molecular weights of 50 and 35 kDa. The 49-kDa band that we obtained, corresponding to a complex formed by a protein attached covalently to [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620, was shown to be superimposable to an ET_B receptor band identified by immunoblotting assays, using anti-ET_B polyclonal antibodies. Moreover, excess of ET-1 or IRL-1620 abolished the photolabeling of these two bands, demonstrating that [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 competes for the same binding site. Our data are as well in agreement with other characterization studies of the ET_B receptor as those performed after cross-linking [Tyr(^{125}I)^{13}]-ET-1 to the receptor using the bifunctional reagents disuccinimidyl suberate, bis(sulfosuccinimidyl)suberate, or *N*-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate (*37*–*40*). Furthermore, as described in a recent report by Grantcharova et al. (*41*), the 37-kDa protein would be the N-terminally truncated receptor produced by the action of a metalloprotease. Thus, the N-terminal segment of the ET_B receptor would be cleaved following a limited proteolysis between residues Arg^{64} and Ser^{65}. This result provides interesting data on the binding site of [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 because it shows that the interaction of this specific radiolabeled photoprobe would not be within the 1–64 segment of the ET_B receptor. Interestingly, addition of 5 mM EDTA during photolabeling allowed a better recovery of the full-length ET_B receptor because the proteolysis was considerably diminished.

To better define the binding site of [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 on ET_B receptors, the photolabeled complex was cleaved using either Endo Lys-C protease, V8 protease, or CNBr. According to the selectivity of these enzymatic or chemical treatments and considering that radiolabeled fragments produced by them must overlap, the 3.8-kDa segment formed after Endo Lys-C treatment would be composed of residues Asp^{274}-Lys^{303}, the 4.6-kDa fragment of V8 protease would be composed of residues Trp^{275}-Asp^{313}, and CNBr would have produced the fragment Gln^{267}-Met^{296} with a mass of 3.7 kDa. When taken together, these data clearly identify a common sequence of 2.8 kDa that would correspond to residues Trp^{275}-Met^{296} (Figure 9). In other words, this cell-surface-oriented segment of the fifth TM domain of the ET_B receptor would play an important role in the binding of the photoprobe [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620. These results are in agreement with data obtained by Sakamoto and co-workers with a series of ET_A and ET_B receptor chimeras. Actually,

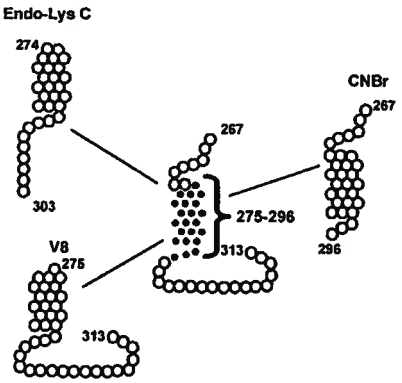


FIGURE 9: Schematic representation of the labeled domain of the ET_B receptor after covalent bonding with [Bpa^5,$Tyr(^{125}I)^6$]IRL-1620. According to CNBr cleavage and Endo Lys-C and V8 protease digestions, receptor residues 275−296 form the common fragment between all of the cleaved photolabeled fragments.

they demonstrated that an ET_A−ET_B receptor hybrid obtained by replacing the TM helices IV, V, and VI of ET_A with those from ET_B can then bind IRL-1620 (*18*).

Finally, the observation that an excess of ET-1 and IRL-1620 abolished the photolabeling of the ET_B receptor produced with [Bpa^5,$Tyr(^{125}I)^6$]IRL-1620 suggests that all of these peptides share the same binding site that would contain, according to our data, the Trp^{275}-Met^{296} stretch. Moreover, after the demonstration by Imumara et al. that the mutation of Trp^{276} to Cys and Trp^{275} to Ala, within the hET_B receptor, did not give rise to any modifications of affinity toward ET-1 and IRL-1620 (*42*), it can be presumed that the two tryptophan residues would not be involved in the direct binding to the ligand, thus suggesting that the affinity domain of ET_B for [Bpa^5,$Tyr(^{125}I)^6$]IRL-1620 would be within the Leu^{277}-Met^{296} segment.

In conclusion, using the photoaffinity-labeling technique, we identify a key segment of the ET_B receptor participating in the interaction with the ET-1 of IRL-1620 ligands. This protocol had the advantage that an unaltered form of the receptor, as obtained for instance with the site-directed mutagenesis technique, was explored. Further structural and binding data will however be required to complete molecular dissection of the ET_B-binding pocket. This study is thus pursued using this time photoprobes derived from specific ET_B antagonists.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Myriam Létourneau, Chantal Langlois, Steve Bourgault, and Alexandra Louimaire for their assistance and proofreading.

REFERENCES

1. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature 332*, 411−415.
2. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989) The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86*, 2863−2867.
3. Goraca, A. (2002) New views on the role of endothelin, *Endocr. Regul. 36*, 161−167.
4. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2003) Role of endothelin in human hypertension, *Can. J. Physiol. Pharmacol. 81*, 533−541.
5. Orth, S. R., Viedt, C., Amann, K., and Ritz, E. (2001) Endothelin in renal diseases and cardiovascular remodeling in renal failure, *Intern. Med. 40*, 285−291.
6. Schmitz-Spanke, S., and Schipke, J. D. (2000) Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases, *Basic Res. Cardiol. 95*, 290−298.
7. Masaki, T., Vane, J. R., and Vanhoutte, P. M. (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors, *Pharmacol. Rev. 46*, 137−142.
8. Shetty, S. S., Okada, T., Webb, R. L., DelGrande, D., and Lappe, R. W. (1993) Functionally distinct endothelin B receptors in vascular endothelium and smooth muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 191*, 459−464.
9. Masaki, T., Ninomiya, H., Sakamoto, A., and Okamoto, Y., (1999) Structural basis of the function of endothelin receptor, *Mol. Cell. Biochem. 190*, 153−156.
10. Breu, V., Hasluido, K., Broger, C., Miyamoto, C., Furuichi, Y., Hayes, A., Kalina, B., Loffler, B. M., Ramuz, H., and Clozel, M. (1995) Separable binding sites for the natural agonist endothelin-1 and the non-peptide antagonist bosentan on human endothelin-A receptors, *Eur. J. Biochem. 231*, 266−270.
11. Wada, K., Hashido, K., Terashima, H., Adachi, M., Fujii, Y., Hiraoka, O., Furuichi, Y., and Miyamoto, C. (1995) Ligand binding domain of the human endothelin-B subtype receptor, *Protein Expression Purif. 6*, 228−236.
12. Mosberg, H. I., and Fowler, C. B. (2002) Development and validation of opioid ligand−receptor interaction models: The structural basis of μ vs. δ selectivity, *J. Pept. Res. 60*, 329−335.
13. Iwashina, M., Mizuno, T., Hirose, S., Ito, T., and Hagiwara, H. (1994) His^{145}-Trp^{146} residues and the disulfide-linked loops in atrial natriuretic peptide receptor are critical for the ligand-binding activity, *J. Biochem. 115*, 563−567.
14. Rose, P. M., Krystek, S. R., Jr., Patel, P. S., Liu, E. C., Lynch, J. S., Lach, D. A., Fisher, S. M., and Webb, M. L. (1995) Aspartate mutation distinguishes ET_A but not ET_B receptor subtype-selective ligand binding while abolishing phospholipase C activation in both receptors, *FEBS Lett. 361*, 243−249.
15. Fukuoka, Y., Ember, J. A., and Hugli, T. E. (1999) Ligand binding sites on guinea-pig C3aR: Point and deletion mutations in the large extracellular loop and vicinity, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 263*, 357−360.
16. Zhu, G., Wu, L. H., Mauzy, C., Egloff, A. M., Mirzadegan, T., and Chung, F. Z. (1992) Replacement of lysine-181 by aspartic acid in the third transmembrane region of endothelin type B receptor reduces its affinity to endothelin peptides and sarafotoxin 6c without affecting G protein coupling, *J. Cell. Biochem. 50*, 159−164.
17. Adachi, M., Furuichi, Y., and Miyamoto, C. (1994) Identification of specific regions of the human endothelin-B receptor required for high affinity binding with endothelin-3, *Biochim. Biophys. Acta 1223*, 202−208.
18. Sakamoto, A., Yanagisawa, M., Sawamura, T., Enoki, T., Ohtani, T., Sakurai, T., Nakao, K., Toyo-oka, T., and Masaki, T. (1993) Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists, *J. Biol. Chem. 268*, 8547−8553.
19. Takasuka, T., Sakurai, T., Goto, K., Furuichi, Y., and Watanabe, T. (1994) Human endothelin receptor ET_B. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand, *J. Biol. Chem. 269*, 7509−7513.
20. Kauer, J. C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H. R., Jr., and DeGrado, W. F. (1986) *p*-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide, *J. Biol. Chem. 261*, 10695−10700.
21. Bremer, A. A., Leeman, S. E., and Boyd, N. D. (2001) Evidence for spatial proximity of two distinct receptor regions in the substance P (SP)*neurokinin-1 receptor (NK-1R) complex obtained by photolabeling the NK-1R with *p*-benzoylphenylalanine3-SP, *J. Biol. Chem. 276*, 22857−22861.
22. Pérodin, J., Deraet, M., Auger-Messier, M., Boucard, A. A., Rihakova, L., Beaulieu, M.-E., Lavigne, P., Parent, J.-L., Guillemette, G., Leduc R., and Escher, E. (2002) Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor, *Biochemistry 41*, 14348−14356.

23. Boucard, A. A., Sauvé, S. S., Guillemette, G., Escher, E., and Leduc, R. (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain, *Biochem. J. 370*, 829−838.
24. Takai, M., Umemura, I., Yamasaki, K., Watakabe, T., Fujitani, Y., Oda, K., Urade, Y., Inui, T., Yamamura, T., and Okada, T. (1992) A potent and specific agonist, Suc-[Glu^9,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8−21), IRL 1620, for the ET_B receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 184*, 953−959.
25. Watakabe, T., Urade, Y., Takai, M., Umemura, I., and Okada, T. (1992) A reversible radioligand specific for the ET_B receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 185*, 867−873.
26. Nguyen, P. V., Yang, X. P., Li, G., Deng, L. Y., Fluckiger, J. P., and Schiffrin, E. L. (1993) Contractile responses and signal transduction of endothelin-1 in aorta and mesenteric vasculature of adult spontaneously hypertensive rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol. 71*, 473−483.
27. Wong, W.-S. F., Bloomquist, S. L., Bendele, A. M., and Fleisch, J. H. (1992) Pharmacological and histological examinations of regional differences of guinea-pig lung: A role of pleural surface smooth muscle in lung strip contraction, *Br. J. Pharmacol. 105*, 620−626.
28. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature 227*, 680−685.
29. Katahira, R., Umemura, I., Takai, M., Oda, K., Okada, T., and Nosaka, A. Y. (1998) Structural studies on endothelin receptor subtype B specific agonist IRL 1620, *J. Pept. Res. 51*, 155−164.
30. Rovero, P., Galoppini, C., Laricchia-Robbio, L., Mazzoni, M. R., and Revoltella, R. P. (1998) Structure−activity analysis of C-terminal endothelin analogues, *J. Cardiovasc. Pharmacol. 31* (Suppl. 1), S251−S254.
31. Cassano, E., Galoppini, C., Giusti, L., Hamdan, M., Macchia, M., Mazzoni, M. R., Menchini, E., Pegoraro, S., and Rovero, P. (1998) A structure−activity study of a C-terminal endothelin analogue, *Folia Biol. 44* (1), 11−14.
32. Topouzis, S., Huggins, J. P., Pelton, J. T., and Miller, R. C. (1991) Modulation by endothelium of the responses induced by endothelin-1 and by some of its analogues in rat isolated aorta, *Br. J. Pharmacol. 102*, 545−549.
33. Saeki, T., Ihara, M., Fukuroda, T., Yamagiwa, M., and Yano, M. (1991) [Ala^{1,3,11,15}]-Endothelin-1 analogs with ET_B agonist activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 179*, 286−292.
34. Forget, M.-A., Lebel, N., Sirois, P., Boulanger, Y., and Fournier, A. (1996) Biological and molecular analyses of structurally reduced analogues of endothelin-1, *Mol. Pharmacol. 49*, 1071−1079.
35. Tam, J. P., Liu, W., Zhang, J.-W., Galantiro, M., Bertolero, F., Cristiani, C., Vaghi, F., and Castiglione, R. (1994) Alanine scan of endothelin: Importance of aromatic residues, *Peptides 15*, 703−708.
36. Nambi, P., Pullen, M., and Spielman, W. (1994) Species differences in the binding characteristics of [^{125}I]IRL-1620, a potent agonist specific for endothelin-B receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther. 268*, 202−207.
37. Miyazaki, H., Kondoh, M., Watanabe, H., Masuda, Y., Murakami, K., Takahashi, M., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. (1990) Affinity labelling of endothelin receptor and characterization of solubilized endothelin-endothelin-receptor complex, *Eur. J. Biochem. 187*, 125−129.
38. Schvartz, I., Ittoop, O., and Huzum, E. (1990) Identification of endothelin receptors by chemical cross-linking, *Endocrinology 126*, 1829−1833.
39. Chiou, W. J., Magnuson, S. R., Dixon, D., Sundy, S., Opgenorth, T. J., and Wu-Wong, J. R. (1997) Dissociation characteristics of endothelin receptor agonists and antagonists in cloned human type-B endothelin receptor, *Endothelium 5*, 179−189.
40. Nambi, P., Pullen, M., Kincaid, J., Nuthulaganti, P., Aiyar, N., Brooks, D. P., Gellai, M., and Kumar, C. (1997) Identification and characterization of a novel endothelin receptor that binds both ET_A- and ET_B-selective ligands, *Mol. Pharmacol. 52*, 582−589.
41. Grantcharova, E., Furkert, J., Reusch, H. P., Krell, H. W., Papsdorf, G., Beyermann, M., Schulein, R., Rosenthal, W., and Oksche, A. (2002) The extracellular N terminus of the endothelin B (ET_B) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process, *J. Biol. Chem. 277*, 43933−43941.
42. Imumura, F., Arimoto, I., Fujiyoshi, Y., and Doi, T. (2000) W276 mutation in the endothelin receptor subtype B impairs Gq coupling but not Gi or Go coupling, *Biochemistry 39*, 686−692.

BI049246X

Chapitre 5

Discussion

L'endothéline, un des plus puissants agents vasoconstricteurs, agit chez les mammifères via deux types de récepteurs, ET_A et ET_B (Arai et al., 1990 ; Sakurai et al., 1990). Il participe à la régulation des fonctions de plusieurs organes, entre autres par l'induction de la constriction des muscles lisses et par la production d'hormones. Étant donné ses nombreuses actions physiologiques, l'ET est impliquée dans diverses pathophysiologies dont l'hypertension, l'infarctus du myocarde et l'asthme. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques nécessite alors une bonne compréhension de l'interaction entre l'ET et ses récepteurs. Dans cet ordre d'idée, nous avons alors entrepris d'approfondir les propriétés biochimiques de ces récepteurs en caractérisant leurs domaines de liaison et ce, en utilisant la technique de marquage par photoaffinité. Pour ce faire, nous avons divisé cette étude en deux volets, soit la synthèse et la caractérisation de nouvelles sondes photosensibles dérivées d'analogues de l'ET et finalement le photomarquage des récepteurs ET_A et ET_B.

5.1 Première partie : La synthèse et la caractérisation des sondes photosensibles

5.1.1 Choix des sondes peptidiques

L'étude de la dynamique des interactions existant entre l'ET et ses récepteurs via la technique de photomarquage requiert, tout d'abord, la synthèse de sondes photosensibles spécifiques pour ET_A et ET_B. Pour ce faire, nous avons dû identifier deux analogues de l'ET susceptibles de devenir les sondes photosensibles nécessaires pour le photomarquage. En ce qui concerne le récepteur ET_A, nous avons opté pour le TTA-386 (hexaméthylèneiminocarbonyle-Leu-trp-ala-βAla-Tyr-phe). Le TTA-386 est un antagoniste peptidique capable d'inhiber la libération de calcium induite par la liaison de ET-1 sur les récepteurs ET_A (Kitada et al., 1993). En fait, une concentration de 10^{-7} M de ce peptide empêche totalement la libération de calcium produite par 10^{-9} M de ET-1. De plus, selon des tests de liaison fait sur des membranes de muscle cardiaque porcin, un tissu riche en ET_A, la valeur de IC_{50} pour le TTA-386 serait de 0,34 nM. La constante de dissociation aurait, selon les tests de saturation effectués sur les mêmes membranes, une

valeur de 155 pM. Une autre équipe du Japon s'est aussi intéressée à ce peptide en déterminant sa capacité de liaison à ET_A en utilisant cette fois-ci des préparations membranaires d'artère mésentérique de rat et de cellules CHO transfectées avec le récepteur ET_A humain (Pullen, Brown et Nambi, 1997). La liaison du TTA-386 sur ces membranes s'est avérée être rapide en atteignant l'équilibre en 15 minutes pour les membranes de rat et en 45 minutes pour les cellules CHO. Ces études suggèrent donc que le TTA-386 est un antagoniste de haute affinité pour ET_A (K_d de 1 nM pour les récepteurs clonés et de 0,8 nM pour l'artère de rat). L'absence de liaison sur le récepteur ET_B cloné a aussi permis de confirmer la sélectivité de ce peptide pour le récepteur ET_A. Notre choix s'est donc arrêté sur cet hexapeptide non seulement parce qu'il a une bonne affinité et une bonne sélectivité pour le récepteur ET_A mais aussi parce qu'il est relativement court et qu'il ne nécessite aucune cyclisation, rendant ainsi sa synthèse plus facile. De plus, sa séquence contient déjà une tyrosine, le résidu favorable pour l'iodation de la sonde photosensible. Par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste comme sonde photosensible permet d'éviter l'internalisation des récepteurs lors des essais de liaison. Nous avons alors décidé d'entreprendre la synthèse de six analogues du TTA-386 dans lequel les résidus hydrophobes 1, 2 et 6 ont été substitués tour à tour par le D- ou le L-pBpa, un dérivé benzophénone.

En 1992, l'équipe de Takai a synthétisé une série d'analogues peptidiques (succinylés) linéaires de l'ET afin de développer un puissant ligand spécifique à ET_B. L'un des composés ainsi élaboré est l'IRL-1620 ([Suc-Glu^9,$Ala^{11,15}$)-ET-1 (8-21)] (Takai *et al.* 1992). Cet analogue peptidique qui correspond à la partie carboxy-terminale de l'ET s'est révélé être un puissant agoniste, du même ordre que ET-1, en plus d'être 100 000 fois plus sélectif pour le récepteur ET_B. Les études de liaison menées par l'équipe de Nambi ont aussi démontré que l'IRL-1620 possédait un K_d de 115 pM sur les récepteurs ET_B clonés (Nambi et al., 1994). Ce peptide, qui est composé de 14 résidus d'acides aminés (Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp), peut être obtenu par synthèse peptidique classique en phase solide en utilisant la chimie Fmoc ou Boc. De plus en étant linéaire, ce peptide permet d'éliminer l'étape de cyclisation. L'IRL-1620 possède aussi une tyrosine qui peut être iodée au besoin. Notre attention s'est donc portée

sur la structure de l'IRL-1620, un excellent modèle pour le développement d'un outil photosensible et spécifique à ET_B.

Or, la substitution d'un acide aminé de l'IRL-1620 par un groupement photosensible (Bpa) induit une contrainte structurale qui influence vraisemblablement les propriétés pharmacologiques de ce peptide. C'est pourquoi, le choix du lieu d'introduction du Bpa a été minutieusement étudié avant la synthèse des analogues, afin de conserver l'activité biologique et de préserver la sélectivité pour le récepteur ET_B. Plusieurs études de structure-activité de l'IRL-1620 ont permis de nous orienter dans le choix des positions pour l'incorporation du Bpa. En effet, un Ala-scan a démontré que la région Suc-Asp^1-Glu^2-Glu^3 occupe un rôle important et ne peut être modifiée. Il semblerait que les quatre groupements carboxyliques de ce segment soient directement impliqués dans la sélectivité de l'IRL-1620 pour ET_B. De plus, le remplacement de Asp^{11} par un acide aminé non chargé comme Gly a pour effet de modifier la structure de l'IRL-1620 et de diminuer de 10 fois sa sélectivité envers ET_B (Katahira et al., 1998). C'est pourquoi nous avons préféré conserver ces acides aminés. Une série d'analogues non-succinylés et succinylés ont aussi démontré que ce groupement est en grande partie responsable de la sélectivité de l'IRL-1620 pour ET_B. En effet, l'analogue IRL-1961 qui est identique en tout point à l'IRL-1620, mais sans le groupement succinyle conserve une certaine activité envers le récepteur mais est 10 fois moins sélectif (Takai et al. 1992). De plus, des analyses ont démontré que l'ajout d'acides aminés en N-terminal de l'IRL-1620 ou une délétion du côté C-terminal résulte en une diminution graduelle de la liaison avec ET_B. C'est pourquoi nous avons choisi la substitution du Bpa plutôt que son addition à la chaîne peptidique. Par ailleurs, l'Ala-scan de l'ET a souligné le rôle clé des résidus Phe^{14}, Leu^{17}, Trp^{21} dans l'activité de ET-1 (Tam et al., 1994). La substitution de l'un de ces trois résidus par Ala a réduit l'affinité de la liaison (< 2% ET). Phe^{14}, Leu^{17}, Trp^{21} semblent importants pour le contact avec le récepteur contrairement à la substitution de Asp^8 ou Leu^{17} qui semble diminuer l'activation du récepteur tout en conservant une bonne affinité (> 90%). La modification de Val^{12}, Asp^{18} ou Ile^{20} résulte en une diminution partielle de l'activité de ET-1 (86 à 50 %) de la puissance (Tam et al., 1994). Ile^{20} et Trp^{21} de ET-1 sont intolérants à la substitution avec Ala tandis que Glu^{10}, Phe^{14}, Leu^{17} et Asp^{18} sont connus pour jouer un rôle plus important dans l'activation que dans la liaison (ET_A).

Ainsi il semble que Val^{12}, Phe^{14}, Leu^{17}, Ile^{20} et Trp^{21} de ET-1, qui correspondent respectivement aux positions Val^{5}, Phe^{7}, Leu^{10}, Ile^{13} et Trp^{14} de l'IRL-1620, soient directement impliqués dans la liaison avec le récepteur. Ce phénomène les rend particulièrement intéressants pour le photomarquage d'autant plus, qu'ils présentent les mêmes caractéristiques que le Bpa, soit d'être assez volumineux et de nature hydrophobe. Cependant, nous avons préféré éviter de substituer Trp^{14} qui est en C-terminal de l'IRL-1620 puisqu'une étude a démontré que ce résidu est nécessaire pour la stabilisation de l'ET avec le récepteur ET_B (Kimura et al., 1988). De plus, notre laboratoire a déjà démontré que la charge de la chaîne latérale de His^{16} de ET-1 peut être retirée sans perte complète d'activité. Ainsi les résidus alanine, valine, phénylalanine, histidine et leucine ont alors semblé être les meilleurs choix pour être remplacés par l'agent photosensible Bpa.

5.1.2 Synthèse des sondes photosensibles

Une fois les peptides choisis, leur synthèse s'avère la première manipulation en laboratoire. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de synthèse peptidique sur phase solide pour chacune des sondes photosensibles. La synthèse des analogues du TTA-386 a été effectuée sans difficulté à l'aide d'un protocole de chimie Boc. La substitution des acides aminés hydrophobes leucine, alanine et phénylalanine par l'agent photosensible p-Bpa ne semble donc pas avoir provoqué de changement majeur dans l'organisation structurale de la molécule puisque l'élongation de la chaîne peptidique s'est effectuée sans problème. Or, l'inconvénient associé à l'utilisation des acides aminés dont leur fonction N-terminale est protégée par le groupement Boc, réside dans la situation que les peptides en élongation sont soumis à de nombreux traitements à l'acide trifluoroacétique (TFA). Des réactions secondaires catalysées en milieu acide auraient donc pu survenir. Nous étions ainsi confrontés par exemple à des risques d'oxydation du résidu tryptophane dont la chaîne latérale n'était pas protégée. De même, l'acide aminé tyrosine aurait pu lui aussi être modifié lors de la synthèse. Il aurait pu subir une substitution sur son noyau aromatique si le groupe protecteur n'avait pas été adéquat. Il en est de même lors de l'étape de clivage du peptide au HF. L'obtention du peptide brut suite à sa synthèse nécessite l'usage d'un acide fort, le HF, pour rompre le lien entre le support solide et la chaîne d'acides aminés. Pendant la réaction de clivage, des capteurs de carbocations ont

été ajoutés afin de réduire les risques de réactions secondaires. L'usage du m-crésol et de l'éthanethiol permet alors de protéger les résidus tryptophane et tyrosine contre une alkylation possible et/ou une oxydation. Toutefois, la présence d'un seul pic majoritaire sur le chromatogramme de chacune des sondes synthétisées avant l'ajout du cycle urée, laisse croire qu'aucune de ces réactions ne s'est produite au niveau de la chaîne peptidique (Voir exemple de HPLC, Figure 1, article 1).

L'antagoniste TTA-386 ne possède pas de fonction N-terminale libre. En effet, celle-ci se termine par le cycle hexaméthylèneimine relié au peptide par un lien urée. Or, l'ajout de ce groupement aux chaînes peptidiques s'est avéré une opération ardue. Deux protocoles différents ont été mis sur pied. Le premier était constitué de deux étapes, soit la formation d'un dérivé de l'hexaméthylèneiminocarbonyle, qui était ensuite mis en présence de l'amine alpha du peptide pour former le cycle recherché. Pour ce faire, nous avons fait réagir le chloroformate de p-nitrophénoxyde avec de l'homopipéridine. Une fois la réaction terminée, l'hexaméthylèneiminocarbonyle de p-nitrophénoxyde a été mis en présence du peptide dont l'amine alpha libre pouvait attaquer le carbonyle du dérivé par substitution nucléophile et ainsi libérer le groupe partant p-nitrophénolate (Figure 12). Des tests de Kaiser effectués à différents temps durant la réaction ont alors montré la présence d'amines libres. Puisqu'il ne faut qu'une proportion d'amines libres relativement faible pour provoquer un test positif de forte intensité (moins de 5%), nous avons alors décidé d'arrêter la réaction et de vérifier le produit de clivage par HPLC. Si la réaction avait fonctionné, la formation du lien urée et l'ajout du cycle auraient provoqué une augmentation du caractère hydrophobe des peptides. Leur temps de rétention sur HPLC analytique aurait donc augmenté de façon très significative. Toutefois, les chromatogrammes obtenus pour notre série de peptides, suite à cette réaction, n'ont démontré aucune différence de profil avec ceux des peptides de départ. L'ajout du cycle n'ayant pas réussi, le protocole a été repris en modifiant les réactifs utilisés pour la formation du dérivé de l'hexaméthylèneiminocarbonyle. La réaction a alors été successivement tentée avec du carbonate de disuccinimidyle, du carbonyldiimidazole et du phosgène, toujours en présence d'homopipéridine comme nucléophile (Figure 13). Les dérivés d'hexaméthylèneiminocarbonyle formés différaient alors d'une réaction à l'autre par leur groupe partant présent sur le carbonyle. La synthèse de tous ces dérivés visait à

évaluer la réactivité de divers groupes partants et leur compatibilité avec l'attaque de l'amine alpha du peptide TTA-386, lors de la deuxième étape du protocole. Malheureusement, aucun des produits synthétisés n'a permis l'ajout du cycle sur la fonction N-terminale des peptides. L'objectif étant d'abord et avant tout de produire le TTA-386 et ses analogues, nous n'avons pas exploré les causes de ces insuccès. A cette étape, nous avons plutôt pensé à inverser la stratégie de réaction soupçonnant que l'amine N-terminale n'était que peu ou pas disponible pour une attaque nucléophile sur une forme ou une autre de l'hexaméthylèneiminocarbonyle activé.

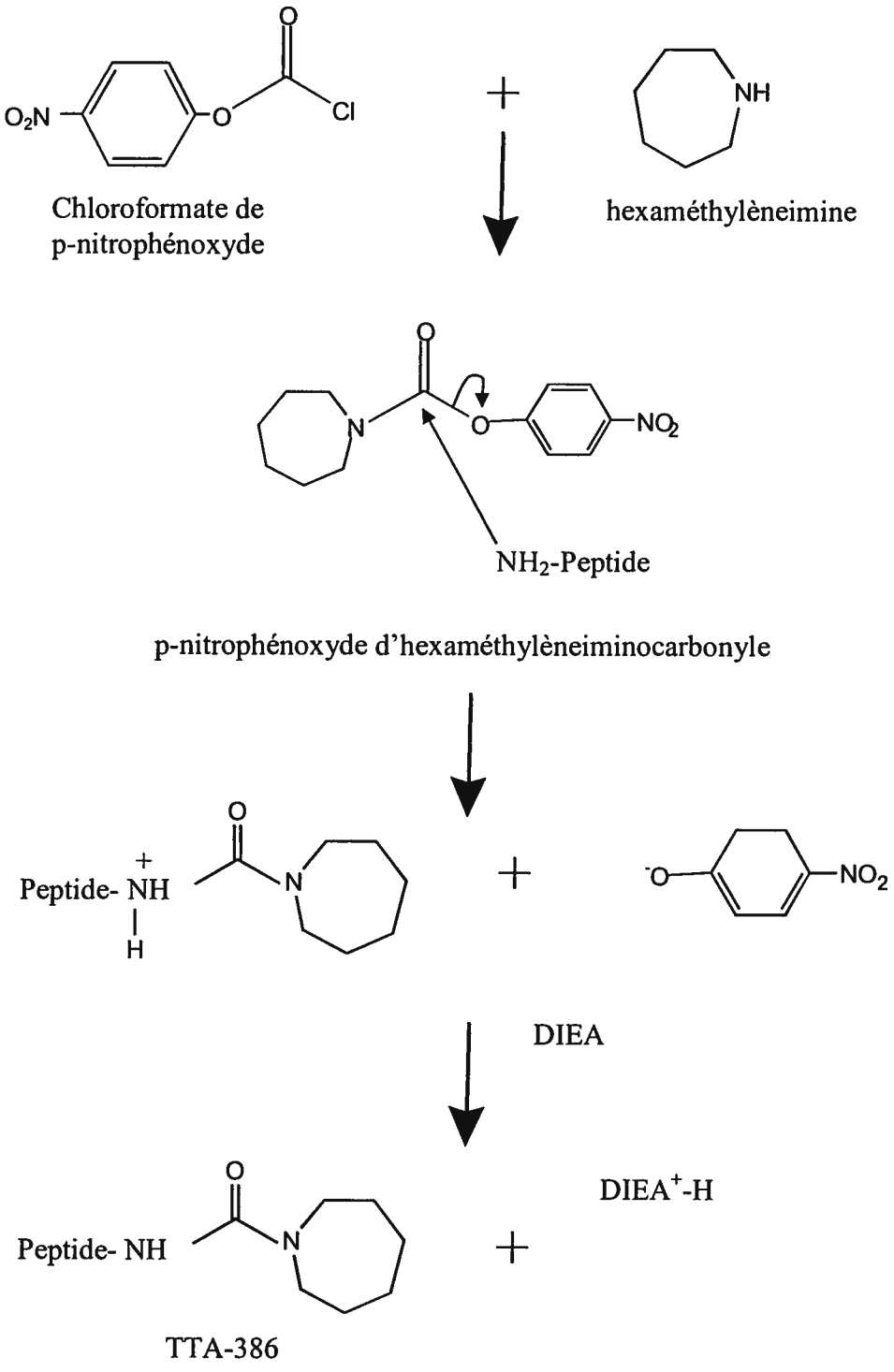


Figure 12 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de p-nitrophénoxyde.

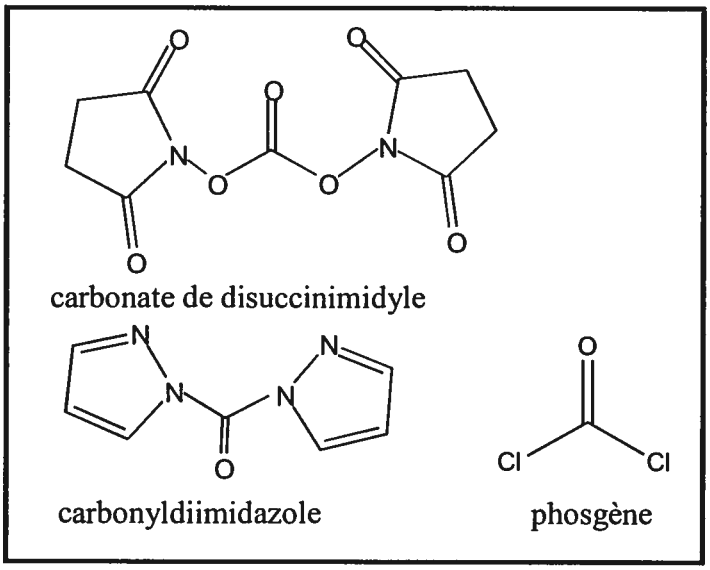


Figure 13. Trois autres réactifs utilisés pour activer l'homopipéridine dans le but de former le cycle urée sur les peptides dérivés du TTA-386.

C'est dans cet ordre d'idée qu'un deuxième protocole a été mis au point en utilisant les mêmes réactifs que dans le premier essai effectué: le chloroformate de 4-nitrophényle et de l'homopipéridine. Dans ce cas-ci, les peptides n'ont donc pas réagi avec un dérivé de l'hexaméthylèneiminocarbonyle mais plutôt avec un réactif de couplage. L'amine alpha des peptides a donc été activé au moyen du chloroformate de 4-nitrophényle pour former les p-nitrophénylcarbonyl-peptides correspondants. Cette première étape du protocole a pu être vérifiée par un test de Kaiser et celui-ci a montré la disparition d'amines libres. Ensuite, nous avons procédé à l'addition d'homopipéridine. L'amine de cette dernière pouvait alors attaquer le carbonyle lié à l'amine alpha du peptide et ainsi produire, après le départ du p-nitrophénolate, le dérivé urée désiré (Figure 14). L'amine alpha du peptide étant déjà occupée, la dernière partie de ce protocole ne pouvait pas être vérifiée par un test de Kaiser. Suite à cette réaction, une analyse par HPLC des produits bruts obtenus après clivage au HF a montré pour tous les peptides la présence d'un nouveau pic majoritaire possédant un temps de rétention plus élevé que celui des peptides de départ. Ce changement de profils ainsi qu'une analyse par spectrométrie de masse suggéraient alors que cette nouvelle approche produisait les analogues attendus (Figure 1, article 1).

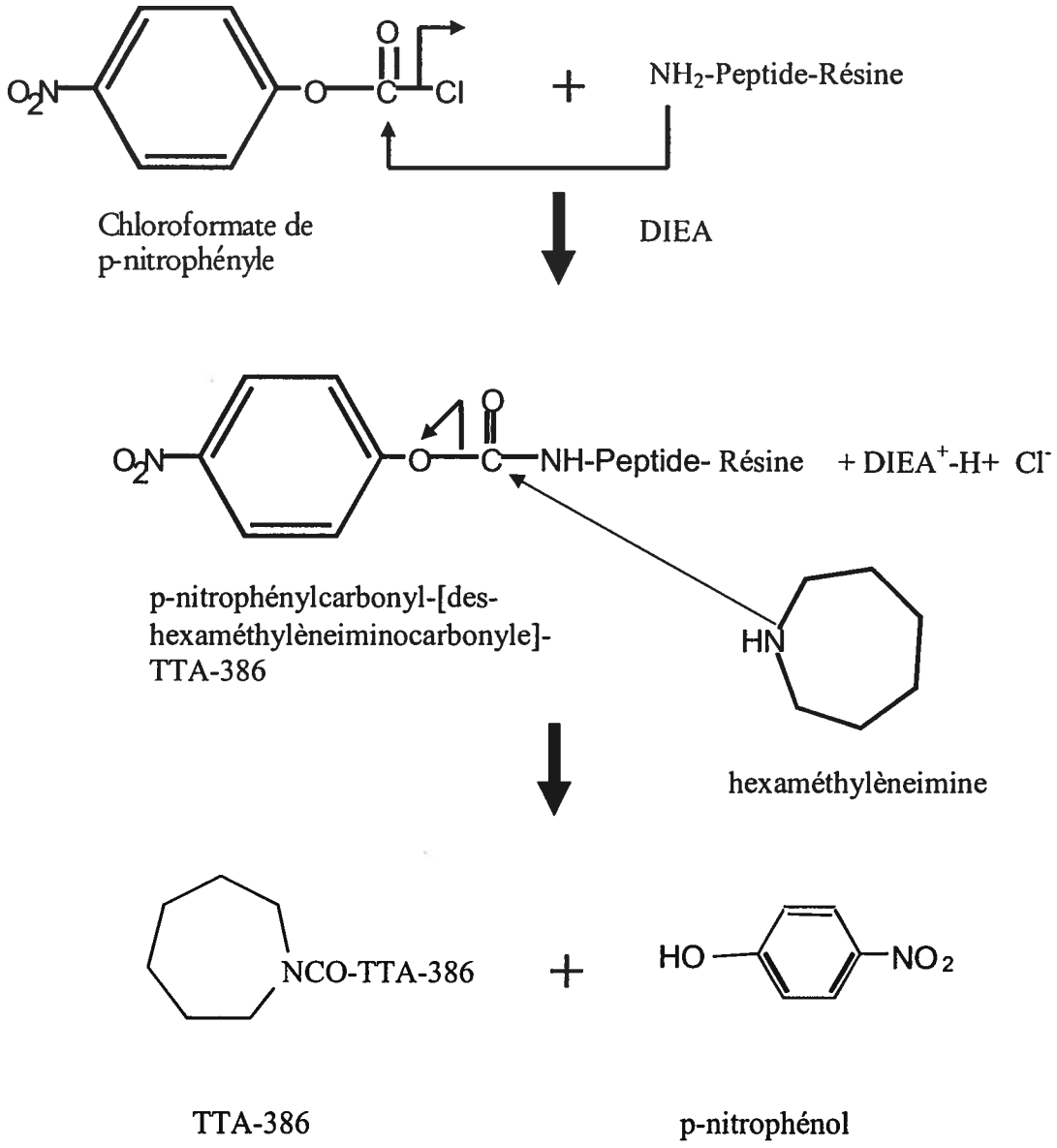


Figure 14 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de 4-nitrophényle (second protocole).

En ce qui a trait aux récepteurs ET_B, six peptides, soit l'IRL-1620 et cinq analogues photosensibles, ont été synthétisés sur phase solide en utilisant la chimie Boc. Ces substitutions successives d'acides aminés ne semblent pas avoir provoqué de changement majeur dans l'organisation structurale de la molécule puisque l'élongation de la chaîne peptidique s'est effectuée sans problème. L'IRL-1620 ainsi que les cinq analogues ont toutefois un groupement succinyle en N-terminale. L'ajout de ce groupement s'est fait sur phase solide en utilisant le même protocole que celui du couplage d'un acide aminé mis à part le fait que l'amine libre des peptides en élongation a réagi avec l'acide succinique au lieu d'un nouveau résidu d'acides aminés. Par la suite, les peptides ont été clivés à l'acide fluorhydrique pour les libérer de la résine, déformylés (i.e. enlever le groupement protecteur formyle sur le résidu tryptophane des peptides) et purifiés par HPLC. L'analyse par chromatographie a alors confirmé l'absence de réactions secondaires majeures qui auraient pu survenir lors de la synthèse et du clivage des peptides. En fait, la séquence en acides aminés des analogues de l'IRL-1620 compte quatre résidus susceptibles de subir des réactions secondaires causées par l'usage fréquent de TFA. Tout d'abord, le résidu tyrosine aurait pu subir une substitution sur son noyau aromatique si le groupe protecteur n'avait pas été adéquat. Il en est de même pour le tryptophane qui aurait pu être oxydé ou alkylé sans la présence du groupement protecteur formyle. L'histidine est, quant à elle, un acide aminé qui racémise très facilement. Finalement, l'acide glutamique peut former l'acide pyroglutamique lors de l'étape de la déprotection du protocole de synthèse sur phase solide si elle est suivie d'une neutralisation. Or cette réaction secondaire peut être évitée en effectuant la neutralisation et le couplage de façon concomitante. La formation du lien peptidique est alors favorisée par rapport à celle de l'acide pyroglutamique. Néanmoins, la présence d'un seul pic majoritaire sur le chromatogramme de chacune des sondes synthétisées laisse supposer qu'aucune de ces réactions ne s'est produite au niveau de la chaîne peptidique L'introduction du groupement photosensible, le départ des groupements protecteurs des chaînes latérales, l'absence de réaction secondaire et la présence du groupement succinyle en N-terminal de tous les peptides ont donc été confirmés par HPLC mais aussi par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF qui a montré que les peptides synthétisés ont tous la masse attendue.

5.1.3 L'iodation des sondes peptidiques

La synthèse des sondes photosensibles s'est ensuite poursuivie par le radiomarquage des peptides afin de visualiser les récepteurs photomarqués ainsi que leurs fragments sur gel SDS-PAGE. Nous avons ainsi utilisé l'iode-125 comme atome radioactif comme il se fait généralement pour le radiomarquage de peptides. L'iode-125 est une molécule peu coûteuse, peu ionisante, mais suffisamment énergétique pour que le rayonnement émis soit mesurable. Généralement, le rendement de conversion électro-chimique sur film photo de l'^{125}I est de 3-10 % alors que celui du tritium (^{3}H) est inférieur à 1 %. Donc, l'image peut être obtenue de 200 à 500 fois plus rapidement avec un ligand marqué à l'iode-125 qu'avec le tritium. De plus, la demi-vie de 60 jours de l'iode est 60 fois plus courte que celle du tritium (12,3 ans), permettant l'élimination des déchets radioactifs plus rapidement. Aussi, l'emploi d'un traceur tel que le carbone-14 aurait nécessité l'achat d'acides aminés déjà marqués faisant augmenter grandement le coût de production des peptides. Or en utilisant l'iode, il est alors possible d'ajouter cet atome aux peptides une fois leur synthèse terminée.

Néanmoins, avant de travailler avec la radioactivité, nous avons entrepris dans un premier temps une iodation non-radioactive des sondes. L'introduction d'atomes d'iode sur la chaîne latérale de la tyrosine des peptides peut entraîner une perte d'affinité en modifiant la densité électronique locale ou en ajoutant une contrainte stérique supplémentaire. L'iodation non radioactive avait donc pour but, via des essais pharmacologiques, d'évaluer l'impact de la présence d'un traceur sur l'affinité des sondes pour les récepteurs de l'ET.

Plusieurs techniques d'iodation, comme l'iodogène ou l'enzyme lactoperoxidase auraient alors pu être utilisées. Toutefois, ces deux réactifs sont employés pour ioder de très petites quantités de peptides lors du radiomarquage. Puisque les analyses biologiques requièrent quelques mg de peptides, nous avons plutôt penché pour l'emploi de la chloramine T, un réactif beaucoup plus abordable pouvant être utilisé pour ioder différentes quantités de peptides. Ainsi, tous les dérivés du TTA-386 et de l'IRL-1620 qui présentaient au départ une affinité pour les récepteurs de l'ET, ont été iodés à l'aide de ce réactif. Tel que démontré par le profil d'élution de deux peptides témoins, les formes non iodés, mono et diiodés de chaque peptide ont pu être facilement séparées par HPLC (Figure 15). En effet,

en utilisant un gradient d'acétonitrile (30 à 60% pour les dérivés d'IRL-1620 et de 40 à 70% pour les dérivés du TTA-386), nous avons pu isolé la forme monoiodée de chaque peptide, leur temps de rétention différant de ceux des peptides non-iodés et diiodés de plus d'une minute.

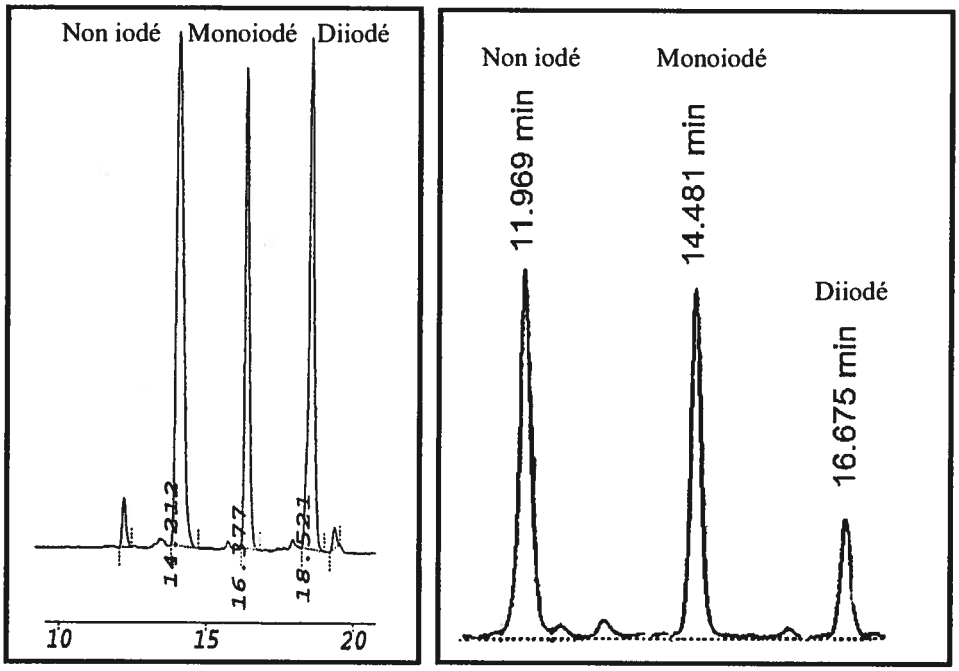


Figure 15 : Profil d'élution du [Tyr(I)^6,Bpa^4]IRL-1620 et du [Tyr(I)^6,LBpa^6]TTA-386 sur HPLC analytique suite à la réaction d'iodation. L'élution est obtenue au moyen d'un gradient linéaire de 30-60% ACN/H_2O*TFA (0,05%) pour les dérivés d'IRL-1620 et de 40 à 70% pour les dérivés du TTA-386 à raison de 1% par minute, à un débit de 1mL par minute.

5.1.4 Évaluation de l'impact du groupement Bpa et de l'iode sur les propriétés pharmacologiques des peptides synthétisés

La substitution d'un acide aminé par le Bpa et l'ajout d'un atome d'iode sur le résidu tyrosine du TTA-386 et de l'IRL-1620 sont deux changements importants dans leur séquence. Afin d'évaluer leur impact sur l'affinité des peptides pour les récepteurs de l'ET, nous avons procédé à des essais pharmacologiques. À l'aide d'un système *in vitro*, l'activité biologique des sondes photosensibles a été évaluée sur deux modèles

biologiques différents, soit l'aorte thoracique de rat et le parenchyme pulmonaire de cobaye qui expriment majoritairement les récepteurs ET_A et ET_B respectivement.

Nous avons ainsi pu observer que le TTA-386 original est un antagoniste peptidique capable d'inhiber la contraction de l'aorte de rat induite par l'ET-1 via les récepteurs ET_A. La valeur du pA_2 calculée suite à l'inhibition concentration-dépendante de la contraction de l'aorte de rat par le TTA-386 est de 7,8. Par comparaison, un composé tel que le bosentan exprime une valeur de pA_2 de 7,2 sur le même tissu (Roux et al., 1999). Par conséquent, l'activité antagoniste du TTA-386 est comparable à celle d'antagonistes déjà connus pour leur effet inhibiteur sur l'activité vasoconstrictrice de l'ET-1. De plus, l'absence d'activité agoniste ou antagoniste sur une préparation ET_B suggère fortement que le TTA-386 est un antagoniste spécifique pour les récepteurs ET_A tel qu'il avait été décrit précédemment (Pullen et al., 1997).

Selon les travaux effectués dans notre laboratoire, la séquence du TTA-386 serait toutefois importante pour l'activité du peptide sur le récepteur ET_A. En effet, la substitution du premier et du second résidu du peptide TTA-386 par l'agent photosensible Bpa inhibe complètement l'activité antagoniste sur les anneaux d'aorte de rat tout en demeurant inactif sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. La perte d'activité des peptides [D ou L-pBpa^1]-TTA-386 est probablement causée par le remplacement de la chaîne alkyle de la leucine par le noyau benzophénone du Bpa. L'insertion de cette structure aromatique relativement volumineuse à côté du cycle hexaméthylène-imonocarbonyle affecte la liaison du peptide au récepteur. Toutefois, il n'est pas clair si l'absence de liaison est causée par un effet sur la conformation du TTA-386 ou si elle est le résultat d'un encombrement stérique entre le ligand et son récepteur. Les mêmes explications peuvent aussi être évoquées en ce qui concerne les peptides [D-pBpa^2]-TTA-386 et [L-pBpa^2]-TTA-386. De plus, même si la chaîne latérale du tryptophane est formée de deux cycles conjugués (noyau indole), ses propriétés biologiques et physiques sont très différentes de celles du Bpa. L'inactivité de ces sondes peut par conséquent aussi s'expliquer par la perte de l'indole. En ce qui concerne les peptides [D-pBpa^6]-TTA-386 et [L-pBpa^6]-TTA-386, le résidu phénylalanine a été substitué par l'agent photosensible Bpa. Ce changement d'acide aminé n'a pas modifié l'activité du peptide suggérant que le remplacement de ce résidu aromatique par un autre de nature similaire mais tout de même

de taille supérieure est parfaitement tolérée. Le benzophénone du Bpa étant localisé dans la partie C-terminale du peptide, il est probablement libre de tourner et ainsi satisfaire la topographie du récepteur. Étonnamment, la configuration absolue du Bpa ne semble en aucun temps affecter l'activité antagoniste des peptides. Que soit inséré dans la chaîne d'acides aminés le D- ou le L-pBpa en position un, deux ou six, aucune différence significative dans le comportement des peptides n'a été observée. L'arrangement spatial de la chaîne latérale du Bpa ne modifie donc pas l'activité du peptide. Des valeurs similaires de pA_2 de 7,8 et 7,5 ont ainsi été calculées pour le [D-pBpa^6]-TTA-386 et le [L-pBpa^6]-TTA-386 respectivement.

Une deuxième série d'essais pharmacologiques a ensuite été réalisée en utilisant cette fois-ci les peptides iodés mais non radioactifs. Dans ce cas, uniquement les sondes qui avaient démontré au préalable une affinité pour le récepteur ET_A ont été étudiées afin de vérifier si la présence de l'iode vient perturber la reconnaissance des peptides pour les récepteurs de l'ET. L'iodation du peptide L-Bpa^6-TTA-386 semble diminuer légèrement son activité antagoniste sur l'aorte de rat sans toutefois modifier sa sélectivité, puisqu'il demeure inactif sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. Or le nombre d'atomes d'iode liés à la tyrosine ne paraît pas affecter son activité puisque les formes monoiodées et diiodées du peptide ont donné des courbes concentration-réponse très similaires. En ce qui a trait au peptide DBpa^6-TTA-386, nous avons observé une activité similaire pour la sonde diiodée. Cependant, la forme monoiodée a produit une activité agoniste sur le récepteur ET_A plutôt qu'une activité antagoniste à une concentration de $3x10^{-7}$ M tout en demeurant inactif sur ET_B. A la lumière de nos connaissances, c'est la première fois qu'un tel cas serait rapporté dans la littérature où l'activité biologique d'un peptide est inversée par sa monoiodation. La raison pour laquelle l'activité du peptide est complètement modifiée lors de l'ajout d'un atome d'iode et qu'elle est rétablie par la présence de deux iodes n'est pas encore complètement expliquée. Nous pouvons toutefois confirmer que ce phénomène ne peut être la conséquence d'une augmentation de l'hydrophobicité puisque le résidu tyrosine serait plus hydrophobe avec deux atomes d'iode qu'avec un seul. Par conséquent, il semblerait que l'ajout d'un iode sur ce peptide changerait de façon drastique la structure du peptide lui permettant par la suite d'activer le récepteur ET_A. Il paraît aussi toutefois évident que la configuration D du Bpa joue un

rôle important dans l'effet agoniste observé, puisque les peptides L-Bpa^6-TTA-386 et TTA-386 monoiodés ne se comportent pas comme des agonistes de ET_A. Par conséquent, nous pensons que l'introduction d'un atome d'iode en position méta du noyau phénolique de la tyrosine, tout juste à côté du groupement benzoylphényle de configuration D, modifierait l'orientation du résidu tyrosine de sorte que la fonction phénolate induirait une réponse biologique. L'ajout d'un deuxième atome d'iode sur la tyrosine renverse totalement la réponse biologique. Nous pouvons donc confirmer que l'activité agoniste observée chez le peptide monoiodé n'est pas causée uniquement par la configuration D du groupement benzoylphényl, car nous pourrions alors observer la même activité chez le peptide diiodé. L'encombrement stérique causé par l'ajout d'un deuxième iode serait alors l'hypothèse la plus probante pour expliquer le retour du comportement antagoniste. La présence d'un deuxième atome d'iode ne permettrait pas de réarrangement spatial de la tyrosine de sorte que le peptide ne pourrait plus induire l'activité biologique.

Pour ce qui est des autres sondes synthétisées, l'IRL-1620 ainsi que ses cinq analogues photosensibles ont été testés sur le modèle ET_B (parenchyme pulmonaire du cobayes). Quatre des cinq sondes [Bpa^4, Bpa^5, Bpa^7 et Bpa^9) ont provoqué une contraction du parenchyme. Les EC_{50} obtenues expérimentalement varient selon la position du Bpa dans la structure des analogues peptidiques: [Bpa^4]IRL-1620 [7,4 x 10^{-7} M], [Bpa^5]IRL-1620 [6,5 x 10^{-7} M], [Bpa^7]IRL-1620 [1,6 x 10^{-6} M] et [Bpa^9]IRL-1620 [EC_{50} > 1 x 10^{-6} M]. Ces résultats confirment que la région N-terminal 1-7 ainsi que les deux ponts disulfures de ET-1 ne sont pas essentiels pour la liaison avec ET_B. L'IRL-1620 a induit une forte contraction et possède un plus petit EC_{50} [1,1 x 10^{-7} M] que les sondes photosensibles développées. En effet, les sondes sont moins puissantes mais tout aussi efficaces que IRL-1620 à l'exception du [Bpa^9]IRL-1620. Le [Bpa^{10}]IRL-1620 n'a induit aucune activité biologique sur le récepteur ET_B. De plus, l'ajout d'ET (1x10^{-6}M) au milieu a induit une forte contraction du tissu ce qui démontre que [Bpa^{10}]IRL-1620 n'a pas les caractéristiques d'un antagoniste puisqu'aucune diminution de la contraction n'a été enregistrée. Ainsi, la substitution de Leu^{10} par le Bpa a aboli complètement l'activité biologique. La modification apportée par le Bpa résulte en une perte d'activité croissante dans l'ordre d'importance suivant: Val^5 $\cong$ Ala^4 < Phe^7 << His^9 <<< Leu^{10}. La région His^9-Leu^{10} de l'IRL-1620 semble être plus sensible aux modifications apportées par le Bpa que

les résidus situés entre les positions 4-7 inclusivement. Notre laboratoire avait démontré que His^9 pouvait moduler l'activité biologique sur ET_B. En effet, His^9 permettrait l'orientation correcte du segment C-terminal d'analogues linéaires et tronqués de ET-1 sur ET_B. Les résultats obtenus avec [Bpa^9]IRL-1620 démontrent une perte d'activité, ce qui correspond aux résultats observés dans le passé (Forget *et al.*, 1995). La perte d'activité de [Bpa^{10}]IRL-1620 n'est pas expliquée à ce stade-ci. Cependant, la modélisation de fragments linéaires C-terminaux de ET-1 a montré que le tryptophane-14 forme un repliement qui vient interagir avec Leu^{10} ce qui permettrait d'activer le récepteur ET_B (Forget et al., 1995 ; Forget et al., 1996). La substitution de Leu^{10} pourrait de même avoir compromis cette interaction dans la structure de l'IRL-1620. Ainsi, l'activité biologique dépendrait d'une interaction hydrophobe entre ET-1 et ses récepteurs. Bien que les résultats obtenus par Atkins en 1995 ont montré que l'IRL-1620 en solution n'adopterait pas de conformation précise (Atkins et al., 1995), il est possible que l'IRL-1620 (et ses sondes photosensibles) n'adoptent une structure qu'en présence du récepteur membranaire.

L'analyse pharmacologique des sondes monoiodées a permis de constater une perte complète d'activité de [$Tyr(I)^6$,Bpa^7]IRL-1620 et de [$Tyr(I)^6$,Bpa^9]IRL-1620. Par contre, la monoiodation de [Bpa^4]IRL-1620 et de [Bpa^5]IRL-1620 a donné des dérivés dont la puissance (EC_{50}) est identique à celle de l'IRL-1620 qui, sous forme mono-iodée, conserve la même activité. En effet, le [$Tyr(I)^6$,Bpa^4]IRL-1620 possède un EC_{50} de 1,89 x 10^{-7} M, [$Tyr(I)^6$,Bpa^5]IRL-1620 un EC_{50} de 1,27 x10^{-7} M et [$Tyr(I)^6$]IRL-1620 un EC_{50} de 1,62 x 10^{-7} M. Il est difficile d'expliquer ces observations. Cependant, il est possible que la présence d'un atome d'iode sur la tyrosine, qui favorise la forme tyrosinate, augmente la réactivité du noyau phénolique au niveau du récepteur, ce qui pourrait compenser pour l'encombrement stérique provoqué par le groupement photosensible «Bpa» voisin. Toutefois, l'iodation semble avoir un effet majeur sur la contraction induite par le Bpa^4(IRL-1620) et le Bpa^5(IRL-1620) ainsi que par l'IRL-1620. Ainsi, les peptides monoiodés sont moins efficaces ; la contraction induite ne représentant qu'environ 50% de la force de contraction observée avec l'IRL-1620 sous forme noniodée. De plus, tous les peptides sous forme diiodée sont inactifs. L'iode est un atome volumineux, riche en électrons, ce qui doit induire une contrainte conformationnelle majeure et nuire à

l'activation du récepteur ET_B. Ce phénomène peut expliquer l'absence d'activité ou d'affinité observée chez tous les analogues diiodés.

Les sondes sous forme mono et diiodées ont été également testées sur le modèle ET_A. Comme attendu, aucun peptide n'a montré une activité agoniste ou antagoniste. La présence d'un atome d'iode ne semble pas influencer la sélectivité du [Bpa^4]IRL-1620 et du [Bpa^5]IRL-1620 mais il y a un impact sur leur activité. Il est à noter que la forme monoiodée est suffisante pour la réalisation du photomarquage et que l'étude pharmacologique de la forme diiodée ne visait qu'à établir des informations nouvelles concernant la relation de structure à activité.

Ainsi, les tests pharmacologiques ont permis d'identifier deux sondes photosensibles soit le [Bpa^4]IRL-1620 et le [Bpa^5]IRL-1620 comme outils potentiels pour le photomarquage du récepteur ET_B et deux sondes, le L-Bpa^6-TTA-386 et le D-Bpa^6-TTA-386 pour le récepteur ET_A.

5.1.5 Les tests de liaison

Les tests pharmacologiques nous ont permis de confirmer que les sondes synthétisées se liaient aux récepteurs de l'ET. Néanmoins, l'activité biologique observée ne permet pas de confirmer que le site occupé par les sondes sur les récepteurs est le même que celui de l'ET. Or des tests de compétition sur des cellules CHO surexprimant les récepteurs de l'ET ont alors révélé que [D-Bpa^6]TTA-386 et [L-Bpa^6]TTA-386 radiomarqués étaient déplacés par cinq différents ligands spécifiques à ET_A (ET-1, BQ-610, TTA-386, [D-Bpa^6]TTA-386 et [L-Bpa^6]TTA-386). Ces résultats suggèrent non seulement que ces deux radioligands possèdent une bonne affinité pour le récepteur ET_A mais qu'ils partagent aussi le même site de liaison que tous ces ligands.

Pour ce qui est du récepteur ET_B, les tests de compétition ont été réalisés à l'aide des peptides chauds suivants: [Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620, [Tyr(^{125}I)^6,Bpa^4]IRL-1620 et le [Tyr(^{125}I)^6,Bpa^5]IRL-1620. Les résultats ont alors montré que la liaison de [Tyr(^{125}I)^6,Bpa^5]IRL-1620 à ET_B était réversible et qu'elle était déplacée par la présence de ET-1 ou d'IRL-1620. Toutefois, comme il peut être observé dans la figure 4 de l'article sur ET_B, l'IRL-1620 ne réussit pas à déplacer le [Tyr(^{125}I)^6,Bpa^5]IRL-1620 aussi facilement que [Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620. La substitution de la valine par le Bpa dans la séquence du peptide semble améliorer légèrement l'affinité du peptide pour le récepteur.

Le remplacement de la chaîne alkyle de la valine par la structure aromatique relativement volumineuse du Bpa à côté des résidus tyrosine et phénylalanine empêche peut-être le peptide d'adopter plusieurs conformations stabilisant ainsi sa liaison avec le récepteur.
Pour ce qui est du [Tyr(^{125}I)^{6},Bpa^{4}]IRL-1620, les tests de compétition n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Il semblerait que, malgré une bonne activité biologique, cette sonde n'ait que peu d'affinité pour le récepteur ET_B. Lors des tests de compétition, l'ajout d'une faible quantité d'ET ou d'IRL-1620 avait pour effet de dissocier la majorité de la liaison de [Tyr(^{125}I)^{6},Bpa^{4}]IRL-1620 / ET_B. Ce peptide possède les caractéristiques d'un agoniste partiel de ET_B, mais il semble que le complexe formé soit très instable. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les analyses ont été effectuées sur le récepteur ET_B de deux espèces différents, soit le cobaye pour les essais pharmacologiques et l'humain pour les tests de compétition. Il est déjà reconnu que le peptide IRL-1620 possède des caractéristiques qui diffèrent d'une espèce à une autre. Par exemple, la liaison de l'IRL-1620 est irréversible dans le cerveau de rat mais réversible dans le cerveau de chien et les poumons humains (Nambi, Pullen et Spielman, 1994). De telles différences de liaison peuvent alors être expliquées par la séquence du récepteur ET_B qui varie d'une espèce à l'autre. Une telle explication pourrait aussi s'appliquer à notre sonde [Bpa^{4},Tyr(I)^{6}]IRL-1620 qui est active dans le parenchyme pulmonaire de cobaye mais aucunement capable de se lier au récepteur ET_B humain. Toutefois, cette hypothèse est peu probable compte tenu de la très haute homologie inter-espèce des récepteurs de l'ET. Il a été montré que les séquences protéiques humaines et de rat sont à plus de 92% identiques pour le récepteur ET_A (Hosoda et al., 1991; Horis et al., 1992). Des résultats similaires ont été obtenus avec le récepteur ET_B. En effet, les séquences primaires issues de l'homme, du rat et de la souris présentent plus de 88% d'homologie (Sakamoto et al., 1991; Sakurai et al., 1990). Compte tenu du niveau élevé d'homologie inter-espèces des récepteurs, l'hypothèse avancée pour expliquer cette différence d'affinité n'est peut-être pas la meilleure. Néanmoins, puisque cette sonde avait une affinité très faible pour le récepteur que nous voulions photomarquer, nous avons décidé de ne pas utiliser ce dérivé pour la suite de notre recherche.

5.2 Deuxième partie : L'identification du domaine de liaison des récepteurs de l'ET

5.2.1 L'identification des protéines photomarquées

Le photomarquage des récepteurs ET_A et ET_B a donc eu lieu par la suite en utilisant seulement les sondes qui avaient montré une bonne affinité pour les récepteurs clonés. Ainsi une irradiation des sondes incubées avec les cellules CHO transfectées a permis de photomarquer de façon spécifique les récepteurs de l'ET. Pour ce qui est du récepteur ET_A, [D-Bpa^6]TTA-386 et [L-Bpa^6]TTA-386 ont photomarqué une protéine qui migrait aux alentours de 65 kDa. Or, la masse théorique du récepteur ET_A étant de 48 kDa, nous avons alors procédé à quelques analyses supplémentaires afin de confirmer l'identité du récepteur. Pour ce faire, nous avons procédé à une pré-incubation de nos cellules avec l'ET ou le BQ 610, deux ligands spécifiques à ET_A, avant d'irradier les cellules en présence de nos sondes. Nous avons alors observé que la présence des ligands venait complètement abolir le photomarquage démontrant ainsi que les deux sondes compétitionnent pour le même domaine de liaison. De plus, une analyse par immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-ET_A nous a permis de visualiser la même bande que celle du photomarquage à 65 kDa suggérant fortement que la protéine photomarquée est le récepteur ET_A. Également, un traitement à la glycopeptidase F (une endoglycosidase qui hydrolyse le lien entre l'asparagine et le premier résidu N-acétylglucosamine sur une chaîne d'oligosaccharides N-liés) des cellules avant la révélation à l'anticorps a montré une protéine migrant à 48 kDa sur gel SDS-PAGE. Par conséquent, la susceptibilité de la protéine à cette enzyme ainsi que sa reconnaissance par l'anticorps Anti-ET_A démontrent hors de tout doute que la protéine photomarquée est le récepteur ET_A sous sa forme glycosylée.

En ce qui concerne le récepteur ET_B, l'utilisation de la sonde [Tyr(^{125}I)^6,Bpa^5]IRL-1620 a permis de lier deux protéines suite au photomarquage, soit une première de 49 kDa et une seconde de 37 kDa. Toutefois, le photomarquage de ces deux protéines est aboli par la présence d'ET-1 et d'IRL-1620 démontrant alors que le ligand photosensible occupe le même site de liaison que ces ligands et que fort probablement ce site serait le récepteur de l'ET. L'analyse par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique au récepteur a confirmé que le complexe ligand-récepteur de 49 kDa correspond au récepteur ET_B. Le poids moléculaire identifié par photomarquage et immunobuvardage du récepteur ET_B est

en accord avec celui proposé par d'autres équipes qui l'ont établi à l'aide d'agents de réticulation et de l'endothéline[^{125}I] (Takasuka et al., 1994 ; Miyazaki *et al.,* 1990; Schvartz *et al.,* 1990; Chiou *et al.,* 1997; Nambi *et al.* 1997). La protéine de 37 kDa représente le complexe [Tyr(^{125}I)^{6},Bpa^{5}]IRL-1620 — récepteur ET_B tronqué. En effet, le récepteur ET_B serait très sensible à la protéolyse ce qui a pour effet de produire un long fragment de 37 kDa et un second de 10 kDa. Un site de protéolyse (partielle) a déjà été caractérisé par Grantcharova *et al.* (2002) et il semble bien que nos conditions expérimentales conduisent à l'obtention des fragments correspondants. Ainsi, la région N-terminale (extracellulaire) de ET_B serait clivée entre les résidus R64 ↓ S65 résultant, ainsi, en la formation de deux fragments (37 kDa et 12 kDa). La molécule de 37 kDa a été identifiée comme étant le récepteur tronqué en N-terminal. La protéolyse est un phénomène non recherché. Cependant, dans ce cas-ci, elle apporte des informations préliminaires utiles à la caractérisation du site de liaison de la sonde. En effet, nos résultats suggèrent que la région N-terminale du récepteur ET_B ne serait pas impliquée dans le site de liaison de la sonde photosensible.

5.2.2 Le domaine de liaison des récepteurs de l'ET

Suite au marquage par photoaffinité, les complexes sonde-récepteurs ont été soumis à différentes digestions chimique et enzymatiques. Nous avons ensuite identifié les fragments du récepteur liés aux sondes en comparant leur masse moléculaire à celle déduite à partir de la séquence du récepteur. A l'aide des enzymes Endoprotéinase Lys C et Endoprotéinase V8, nous avons été en mesure de déterminer que le domaine d'incorporation des sondes [D-Bpa^{6}]TTA-386 et [L-Bpa^{6}]TTA-386 se situe entre les résidus Trp^{257}-Glu^{281}. La scission au bromure de cyanogène des complexes photomarqués est ensuite venue confirmer ces résultats. En effet, puisque les fragments de tous les clivages doivent se chevaucher, le site de liaison trouvé a alors pu être restreint aux résidus Trp^{257} et Met^{278}, un fragment de 2,7 kDa. Nous avons ainsi déterminé que le site d'incorporation de ces deux sondes se situe dans la partie extracytosolique du cinquième domaine transmembranaire du récepteur ET_A. Ce domaine de liaison serait aussi affine pour l'ET puisqu'une pré-incubation des cellules avec l'ET inhibe totalement le photomarquage du récepteur.

De façon intéressante, le photomarquage du récepteur ET_B utilisant cette fois-ci la sonde [Bpa^5,$Tyr(^{125}I)^6$]IRL-1620 identifie le même domaine transmembranaire comme site de liaison. En effet, suite aux mêmes clivages enzymatiques et chimique un fragment de 2,8 kDa composé des résidus Trp^{275}-Met^{296} du cinquième domaine transmembranaire jouerait un rôle important dans la liaison des ligands.

A notre connaissance, c'est la première fois que le cinquième domaine transmembranaire du récepteur ET_A est identifié comme un domaine de liaison pour l'ET. Par contre, l'équipe menée par Sakamoto a déjà identifié en 1993 les boucles extracytosoliques du récepteur ET_B impliquées dans sa sélectivité. Ils ont ainsi démontré qu'ils pouvaient permettre à ET_A de lier l'IRL-1620, s'ils changeaient la région IV-VI de ET_A par la séquence retrouvée dans ET_B. Nos résultats de photomarquage viennent donc corroborer ces résultats en identifiant la région V du récepteur ET_B comme une région importante dans la reconnaissance et la liaison de IRL-1620 et de ses analogues.

5.2.3 La controverse autour du Bpa

Tel qu'il a été présenté dans la revue de la littérature de ce travail, plusieurs agents photosensibles auraient pu être utilisés pour identifier le domaine de liaison des récepteurs de l'ET. Or, nous avons plutôt opté pour l'usage d'un groupement benzophénone : le p-benzoylphénylalanine (pBpa). Son choix est d'abord dû à sa compatibilité avec la synthèse peptidique en phase solide. Il a donc pu être incorporé dans la chaîne d'acides aminés de nos sondes au moyen de la même stratégie de couplage que pour tous les autres résidus d'acides aminés. De plus, afin de produire une liaison covalente, le Bpa doit être irradié à une longueur d'onde se situant entre 350-360 nm, évitant ainsi une irradiation excessivement énergétique et potentiellement dommageable pour les structures protéiques. Le Bpa est aussi chimiquement plus stable que les autres agents photosensibles et peut être manipulé à la lumière ambiante sans danger d'être activé (Dorman et Prestwich, 1994). De plus, une fois activé par les rayons UV, le Bpa réagit préférentiellement avec les liens C-H des acides aminés et ce, même en présence d'eau ou de nombreux types de nucléophiles.

Ainsi pour tous ces avantages, cet acide aminé photosensible est devenu très populaire pour la caractérisation biochimique de récepteurs et protéines. Or de façon étonnante, une grande proportion des sites de liaison identifiés par le Bpa s'est avérée être des résidus

méthionine même si ce résidu n'est pas très répandu dans les séquences protéiques (Boucard et al., 2003; Sachon et al., 2003 ; Boucard et al., 2000 ; Kage et al., 1996). Le Bpa aurait donc une préférence accrue pour cet acide aminé lorsque celui-ci se retrouve dans le domaine de liaison de la protéine. Avant cette observation, il était entendu que le Bpa pouvait former un lien covalent irréversible avec n'importe quel résidu se trouvant à une distance de 3,1 Å (Dorman et Prestwich, 1994). Les nouveaux résultats obtenus ont toutefois démontré que tous les résidus méthionine se trouvant à une distance pouvant aller jusqu'à 6 Å du Bpa étaient favorisés lors du photomarquage. Cette nouvelle caractéristique du Bpa ne vient toutefois pas rejeter tous les travaux de photomarquage menés jusqu'à présent avec ce résidu. D'autres acides aminés ont aussi été le point de contact du Bpa. Par exemple, lors du photomarquage du récepteur de l'angiotensine I, le ligand photosensible [Sar^1, Bpa^8]AngII s'est alors lié de façon covalente aux résidus Phe^{293} et Asn^{294} (Pérodin et al., 2002). Par ailleurs, l'emploi de la sonde photosensible [Bpa^6]VIP, un analogue du «Vasoactive Intestinal Peptide», a permis de délimiter le domaine de liaison du VPAC1 humain, un récepteur qui peut lier de façon non sélective le peptide VIP et le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) avec une affinité similaire. Ce domaine de liaison s'étend des résidus 104-108 constitué des acides aminés sérine, cystéine, thréonine, acide aspartique et acide glutamique (Tan, Couvineau et Laburthe, 2004). Il faut cependant être prudent lors de l'interprétation des résultats en sachant que le Bpa réagira préférentiellement avec les résidus Met se trouvant à proximité du domaine de liaison plutôt qu'avec n'importe quel autre acide aminé.

Cette observation a d'ailleurs été possible par le clivage au bromure de cyanogène des protéines photomarquées. En effet, lorsqu'un résidu méthionine est lié de façon covalente à un Bpa via son groupement thiométhyle, le clivage au CNBr sépare la sonde de la protéine photomarquée. Par conséquent, lorsque le produit de clivage migre sur un gel SDS-PAGE, une seule bande de poids moléculaire égal à la sonde est alors visible. La libération du ligand photosensible lié à une méthionine a été observée dans le cas du récepteur de la substance P (NK-1) (Kage et al., 1996) et des récepteurs de l'hormone parathyroïde (PTH-1 et PTH-2) (Behar et al., 2000 ; Behar et al., 1999). Par contre, le Bpa peut aussi se lier à la méthionine par le groupement γ-CH_2 de l'acide aminé. Dans ce

cas, la sonde n'est pas séparée du fragment photomarqué lors du clivage au CNBr (Figure 16).

Lorsque nous avons fait l'interprétation de nos résultats, nous avons pris en ligne de compte cette caractéristique du Bpa. Lors du clivage au CNBr des récepteurs photomarqués, nous avons alors fait co-migrer nos sondes photosensibles en même temps que les récepteurs clivés chimiquement afin de pouvoir déterminer si le fragment observé était en fait la photosonde. Pour ce qui est du récepteur ET_A, une bande apparaît clairement au-dessus de celle du ligand libre. Par conséquent, nous avons alors émis l'hypothèse que les sondes [D-Bpa^6]TTA-386 et [L-Bpa^6]TTA-386 ne liaient pas le récepteur via un résidu méthionine. Cependant, lorsque nous regardons le gel du récepteur ET_B, nous pouvons clairement voir une bande apparaître juste avant la bande correspondant au ligand résiduel. Nous avons alors pensé que le Bpa ne liait pas le récepteur via une méthionine. D'un autre côté, cette bande pourrait être le résultat d'une liaison du Bpa au groupement γ-CH_2 de la méthionine. Ceci expliquerait alors la présence de ligand libre mais aussi la présence du fragment de récepteur photomarqué. Dans ce cas, le résidu Met^{296} serait le point de contact de la sonde [Bpa^5,Tyr(^{125}I)^6]IRL-1620 avec le récepteur ET_B démontrant alors que la sonde photosensible aurait établi un contact avec la partie C-terminale du cinquième domaine transmembranaire.

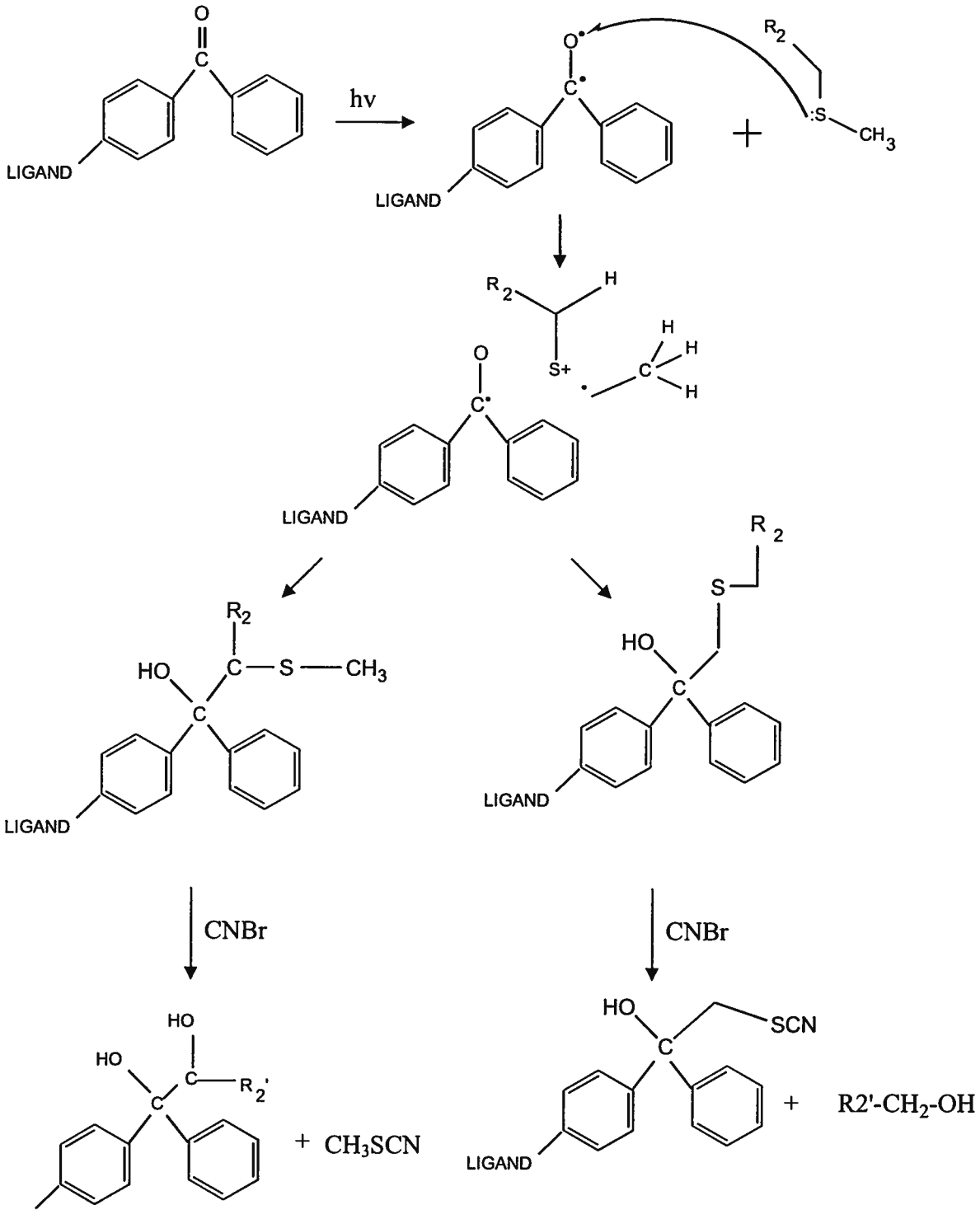


Figure 16 : Photomarquage du résidu méthionine par le Bpa et schéma de son mécanisme de libération lors du traitement au CNBr (R_2 : récepteur, R_2' : protéine clivée au CNBr) (schéma tiré de l'article de Rihakova et al., 2002).

5.2.4 Mutagénèse dirigée

La prise de connaissance de cette nouvelle caractéristique du Bpa aurait pu venir mettre en doute l'avenir de cet agent photosensible. Or, il en est tout autrement depuis qu'une équipe de Sherbrooke a décidé de mettre à profit cette nouvelle caractéristique du Bpa (Rihakova et al., 2002). En effet, ils ont développé une technique nommée «Methionine proximity assay» qui consiste à produire des récepteurs mutants où les résidus soupçonnés d'être responsables de la liaison des ligands sont tour à tour remplacés par une méthionine. Chaque récepteur est alors photomarqué en utilisant un ligand-Bpa et clivé au CNBr. La séparation du ligand de son récepteur photomarqué vient par la suite confirmer l'identité des acides aminés responsables de la liaison du ligand.

Par exemple, il avait été démontré, par le même groupe de chercheurs, que la sonde photosensible [Sar^1, Bpa^3]AngII se liait au segment 168-185 du récepteur AT_1 humain. Ce court fragment, qui ne contient aucun résidu méthionine, avait alors été identifié suite à des digestions protéiques. Pour spécifier l'acide aminé de ce fragment qui est responsable de la liaison de la sonde, ils ont alors produit des récepteurs mutants où les résidus thréonine^{175}, isoleucine^{177} et isoleucine^{172} ont été substitués par une méthionine. Le photomarquage de ces récepteurs mutants suivi de leur clivage au CNBr ont alors spécifié que la position 172 était le point de contact avec la sonde. En effet, la migration du récepteur clivé a montré une seule bande de poids moléculaire égal à celui de la sonde suggérant un relâchement du ligand suite au clivage au CNBr (Boucard et al., 2000).

Une deuxième étude a été réalisée en utilisant la technique «Methionine proximity assay». Ainsi pour cartographier le domaine de liaison du récepteur NPRA des peptides natriurétiques, plusieurs mutants ont été produits où, à tour de rôle, un résidu du domaine de liaison était substitué par une méthionine. Le photomarquage de ces récepteurs a ensuite été produit en utilisant plusieurs ligands portant l'agent photoactivable Bpa. L'emploi de divers ligands photosensibles et de plusieurs récepteurs mutés a alors permis non seulement d'identifier différents sites de contact importants pour la liaison des peptides natriurétiques mais aussi de soumettre un modèle moléculaire représentant la liaison ligand-récepteur (Jossart et al., 2005).

5.2.5 Perspectives

La technique de mutagénèse dirigée semble un outil révolutionnaire dans le monde du photomarquage. Or, son emploi nécessite à prime abord une connaissance des domaines de liaison des récepteurs étudiés. Par conséquent, une telle technique n'aurait pu être utilisée dans l'étude des récepteurs de l'ET puisque aucun résultat de photomarquage n'était disponible. Toutefois, maintenant que nous avons ciblé une région des récepteurs qui semble importante pour la liaison de nos sondes photosensibles, la suite logique de ce projet de recherche consisterait alors à produire de récepteurs mutants où les résidus du cinquième domaine transmembranaire de ET_A et ET_B seraient substitués par une méthionine. Nous pourrions ainsi identifier de façon plus précise l'acide aminé responsable de la liaison du ligand. Ce projet pourrait être entrepris en utilisant les sondes photosensibles déjà synthétisées afin de comparer les résultats obtenus avec ceux présentés dans cette thèse.

Néanmoins, même s'il a été démontré que le groupement photosensible Bpa réagit préférentiellement avec la méthionine, il est aussi capable de se lier avec différents acides aminés. Donc pour rendre la technique de mutagénèse plus performante, nous pourrions aussi utiliser, tel que suggéré par l'équipe de Escher, le résidu *p,p'*-NO_2-benzoyl-phénylalanine. L'ajout du groupement nitro- au Bpa le rend plus hydrophobe et par surcroît spécifique au résidu méthionine tel qu'il a été démontré à l'aide de mutants des récepteurs de l'angiotensine (Rihakova et al., 2002). Il serait donc intéressant de synthétiser les sondes qui ont lié les récepteurs de l'ET, mais cette fois-ci en y incorporant ce nouveau résidu.

Toutefois, avant d'entreprendre les études de mutagénèse dirigée, nous pourrions aussi poursuivre nos études de photomarquage en synthétisant de nouvelles sondes photosensibles. Les travaux décrits dans cette thèse ont été réalisés à l'aide d'analogues de l'ET. Il serait donc intéressant d'utiliser l'ET même comme gabarit de synthèse pour créer de nouvelles sondes photosensibles et ainsi comparer les résultats de photomarquage obtenus.

En utilisant le Bpa de configuration D et L comme agent photosensible pour ces nouvelles sondes, nous pourrions du même coup investiguer sur la différence d'activité biologique que nous avons observée pour la sonde photosensible [$DBpa^6$]-TTA-386 portant un ou

deux atomes d'iode sur son résidu tyrosine. La comparaison de l'activité biologique de ces peptides mono et diiodés pourrait nous éclairer davantage sur le rôle joué par la configuration du Bpa tout comme le rôle des atomes d'iode dans le changement d'activité biologique observé pour le [DBpa^{6}]-TTA-386 vs le [LBpa^{6}]-TTA-386. En tentant de reproduire le même phénomène que nous avons obtenu, nous pourrions peut-être avoir quelques éléments-clés qui nous permettraient d'expliquer ce changement drastique dans l'activité biologique de notre peptide.

Conclusion

L'ET qui est l'un des plus puissants agents vasoconstricteurs agit via deux types de récepteurs, soit ET_A et ET_B. Cette substance se retrouve notamment dans le cœur et les vaisseaux sanguins de plusieurs mammifères, incluant l'humain. Malheureusement, des études ont montré que l'ET est impliquée dans plusieurs pathologies cardiovasculaires dont l'hypertension, l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose. Pour contrer les effets de l'ET, il est donc primordial de bien connaître son interaction avec ses deux récepteurs. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de marquage par photoaffinité afin d'approfondir les propriétés biochimiques de ces récepteurs et d'en connaître davantage sur les sites de liaison de l'ET.

Les résultats de ce projet de recherche démontrent la synthèse et la caractérisation de trois sondes photosensibles soit [D- et L-Bpa^6]-TTA-386 et [Bpa^5]IRL-1620 spécifiques respectivement au récepteur ET_A et ET_B. La spécificité et l'affinité des peptides synthétisés, déterminées par des tests pharmacologiques sur l'aorte de rat et le parenchyme pulmonaire de cobayes, ainsi que par des tests de liaison sur des cellules transfectées, sont venues confirmer leur utilité en tant qu'outils indispensables pour le photomarquage des récepteurs de l'ET.

La seconde étape du projet de recherche nous a ensuite permis de déterminer, à l'aide de la technique de photomarquage, que le cinquième domaine transmembranaire des récepteurs de l'ET était responsable de la liaison de nos sondes photosensibles.

L'identification de ce domaine pourrait maintenant permettre l'usage de la technique de «Methionine proximity assay» afin de cerner plus précisément les résidus responsables de la liaison de l'ET sur ses récepteurs.

Appendice

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
p-benzoyl-phénylalanine	p-Bpa	

Références

ADACHI, M., Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1994. «Identification of a Ligand Binding Site of the Human Endothelin-A Receptor and Specific Regions Required for Ligand Selectivity». European Journal of Biochemistry., vol. 220, p. 37-43.

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

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

AGGELER, R., K. Chicas-Cruz, S. X. Cai, J.F.W. Keana et R.A. Capaldi. 1992. «Introduction of reactive cysteine residues in the ε subunit of *Escherichia coli* F_1 ATPase, modification of these sites with tetrafluorophenyl azide-maleimides, and examination of changes in the binding of the ε subunit when different nucleotides are in catalytic sites».Biochemistry, vol.31, p.2956-2961.

AHN, K., K. Beningo, G. Olds et D. Hupe. 1992. «The Endothelin-Converting Enzyme from Human Umbilical Vein is a Membrane-Bound Metalloprotease Similar to that from Bovine Aortic Endothelial Cells». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol.89, p. 8606-8610.

ARAI, H., K. Nakao, K. Takaya, K. Hosoda, Y. Ogawa, S. Nakanishi et H. Imura. 1993. «The human endothelin B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 3463-3470.

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

ATKINS, A.R., R.C. Martin et R. Smith. 1995. «1H NMR studies of sarafotoxin SRTb, a nonselective endothelin receptor agonist, and IRL-1620, an ETB receptor-specific agonist». Biochemistry, vol. 34, p. 2026-2033.

AUMELAS, A., L. Chiche, E. Mahe, D. Le-Nguyen, P. Sizun, P. Berthault et B. Perly. 1991. «Determination of the Structure of [Nle^7]-Endothelin by ^{1}H-NMR». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 37, p.315-324.

BALWIERCZAK, J. L., P. J. Kukkola, P. Savage, and A. Y. Jeng. 1995. «Effects of Metalloprotease Inhibitors on Smooth Muscle Endothelin- Converting Enzyme Activity». Biochemical Pharmacology, vol. 49, p. 291-296.

BATTISTINI, B., M. Brown, and J. R. Vane. 1995. «Selective Proteolitic Activation and Degradation of ETs and Big ETs in Parenchymal Strips of the Guinea-Pig Lung». Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 207, p. 675-681.

BAYLEY, H. 1983. In photogenerated reagents in biochemistry and molecular biology, Amsterdam / New York / Oxford: Elsevier. 187pages.

BAYLEY, H. et J.V. Staros. 1984. In azides and nitrenes, Éd. E.F.V. Scriven, pp.433-490. Orlando : Academic

BEHAR, V., A. Bisello, G. Bitan, M. Rosenblatt et M. Chorev. 2000. « Photoaffinity cross-linking identifies differences in the interactions of an agonist and an antagonist with the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor.». Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p.9-17.

BEHAR, V., A. Bisello, M. Rosenblatt et M. Chorev. 1999. « Direct identification of two contact sites for parathyroid hormone (PTH) in the novel PTH-2 receptor using photoaffinity cross-linking.» Endocrinology, vol. 140, p.4251-4261.

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

BOUCARD, A.A., B.C. Wilkes, S. A. Laporte, E. Escher, G. Guillemette et R. Leduc. 2000. «Photolabeling identifies position 172 of the human AT_1 receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure». Biochemistry, vol. 39, p.9662-9670.

BREMNES, T., J.D. Paasche, A. Mehlum, C. Sandberg, B. Bremnes et H. Attramadal. 2000. «Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors». Journal of Biological Chemistry, vol.275, p.17596-17604.

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

BRUNNER, J., Senn H. et F.M. Richards. 1980. «3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents». Journal of Biological Chemistry, vol. 255, p.3313-3318.

CARDUCCI, M.A., R.J. Padley, J. Breul, N.J. Vogelzang, B.A. Zonnenberg, D.D. Daliani, C.C. Schulman, A.A. Nabulsi, R.A. Humerickhouse, M.A. Weinberg, J.L. Schmitt et J.B. Nelson. 2003. « Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial». Journal of Clinical Oncology, vol 21, p.679-689.

CHIOU, W. J., S.R. Magnuson, D. Dixon, S. Sundy, T.J. Opgenorth et J.R. Wu-Wong. 1997. «Dissociation characteristics of endothelin receptor agonists and antagonists in cloned human type-B endothelin receptor» Endothelium, vol. 5, p.179-189.

CLOZEL, M., V. Breu, G.A. Gray, B. Kalina, B.M. Loffler, K. Burri, J.M. Cassal, G. Hirth, M. Muller, W. Neidhart et H. Ramuz. 1994. «Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist». The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol.270, p.228-235.

COUPAL, M., A. De Léan, N. McNicoll et A. Fournier. 1999. « Development of p-Benzoylbenzoylated [N,C,rANP(1-28)]pBNP32 (pBNP1) Derivatives and Affinity Photolabeling of the Bovine NPR-A Receptor ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.258, p.181-186.

DE NUCCI, G., R. Thomas, P D'Orléans-Juste, E. Antunes, C. Walder, T.D. Warner et J.R. Vane. 1988. «Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 85, p.9797-9800.

DELLAVECCHIA, M.J., D.L. Croteau, M. Skorvaga, S.V. Dezhurov, O. I. Lavrik et B. Van Houten. 2004. «Analyzing the Handoff of DNA from UvrA to UvrB Utilizing DNA-Protein Photoaffinity Labeling». Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p.45245-45256

DENAULT, J.-B., A. Claing, P. D'Orléans-Juste, T. Sawamura, T. Kido, T. Masaki et R. Leduc. 1995. «Processing of Proendothelin-1 by Human Furin Convertase». FEBS Letters, vol. 362, p.276-280.

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

D'ORLÉANS-JUSTE, P., J.-P. Gratton, R. Leduc, G. Bkaily et A. Claing. 1996. «L'Endothéline : Pharmacologie Cardio-vasculaire et Considérations Physio-pathologiques». Médecine/Sciences, vol.12, p. 563-574.

DONG, M., D.I. Pinon et L.J. Miller. 2002. «Development of a biologically active secretin analogue incorporating a radioiodinatable photolabile p-(4-hydroxybenzoyl)phenylalanine in position 10». Regulatory Peptides, vol. 109, p. 181-187.

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

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

EMOTO, N. and M. Yanagisawa. 1995. «Endothelin-Converting Enzyme-2 Is a Membrane-Bound, Phosphoramidon- Sensitive Metalloprotease With Acidic PH Optimum». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 15262-15268.

FAHRENHOLZ, F. et K.H. Thierauch. 1980. «Synthesis of p-amino-L-phenylalanine derivatives with protected p-amino group for preparation of p-azido-L-phenylalanine peptides». International journal of peptide and protein research, vol.15, p.323-330.

FERRO, C.J. et D.J. Webb. 1996. «The Clinical Potential of Endothelin Receptor Antagonists in Cardiovascular Medicine». Drugs, vol. 51, p. 12-27.

FILIPPATOS, G.S., Gangopadhyay, N., Lalude, O., Parameswaran, N., Said, S.I., Spielman, W. et B.D. Uhal. 2001. «Regulation of apoptosis by vasoactive peptides». American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology, vol. 281, p. L749-L761.

FORGET, M-A, N. Lebel, P. Sirois, Y. Boulanger, B. Battistini et A. Fournier. 1995. «Structure-activity studies of the C-terminal segment of structurally reduced analogues of ET-1». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26, p.S107-S110.

FORGET, M-A., N. Lebel, P. Sirois, Y. Boulanger et A. Fournier. 1996. «Biological and Molecular Analyses of Structurally Reduced Analogues of Endothelin-1». Molecular Pharmacology, vol. 49, p. 1071-1079.

FUKURODA, T., T. Fujikawa, S. Ozaki, K. Ishikawa, M. Yano et M. Nishikibe. 1994. «Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.199, p.1461-1465.

FURCHGOTT, R.F. et J.V. Zawadski. 1980. «The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine». Nature, vol.288 p. 373-376.

GENEY, R. M. Ungureanu, D. Li et I. Ojima. 2002. «Overcoming multidrug resistance in taxane chemotherapy». Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, vol. 40, p.918-925.

GERMAIN, M., B. Battistini, J.G. Filep, P. Sirois et A. Fournier. 1993. « Endothelin Derivatives Showing Potent Effects in the Guinea Pig Trachea». Peptides, vol. 14, p. 613-619.

GILLESPIE, M.N., J.O. Owasoyo, I.F. McMurtry et 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.

GORACA, A. 2002 «New views on the role of endothelin». Endocrine Regulations, vol. 36, p. 161-167.

GRANTCHAROVA, E., J. Furkert, H.P. Reusch, H.W. Krell, G. Papsdorf, M. Beyermann, R. Schulein, W. Rosenthal, et A. Oksche. 2002. «The extracellular N terminus of the endothelin B (ETB) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process». Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 43933-43941.

GRAY, G.A. et D.J. Webb. 1996. «The Endothelin System and Its Potential as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease». Pharmacology and Therapeutics, vol.72, p.109-148.

HASEGAWA, H., K. Hiki, T. Sawamura, T. Aoyama, Y. Okamoto, S. Miwa, S. Shimohama, J. Kimura, and T. Masaki. 1998. «Purification of a Novel Endothelin-Converting Enzyme Specific for Big Endothelin-3». FEBS Letters, vol. 428, p. 304-308.

HASHIDO, K., T. Gamou, M. Adachi, H. Tabuchi, T. Watanabe, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1992. «Truncation of N-terminal Extracellular or C-terminal Intracellular Domains of Human ET_A Receptor Abrogated the Binding Activity to ET-1». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 187, p. 1241-1248.

HENRIKSEN, U., et O. Buchardt. 1990. «Aryl azides as photolabels. Retention of iodine during photochemical ring expansion of an iodinated tyrosine derivative». Tetrahedron Letters, vol. 31, p.2443-2444.

HIRATA Y, H. Yoshimi, S. Takaichi, M. Yanagisawa et T. Masaki. 1988. «Binding and receptor down regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in culture rat vascular smooth muscle cells». FEBS Letters, vol.239, p.13-17.

HOLDEN, W.E. et E. McCall. 1984. «Hypoxia-Induced Contractions of Porcine Pulmonary Artery Strips Depends on Intact Endothelium». Experimental Lung Research, vol.7, p.101-112.

HORI, S., Y. Komatsu, R. Shigemoto, N. Mizuno et S. Nakanishi. « Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors ». Endocrinology, vol.130, p.1885-1895.

HOSADA, K., K. Nakao, N. Tamura, H. Arai, Y. Ogawa, S. Suga, S. Nakanishi et H. Imura. 1992. «Organization, structure, chromosomal assignment and expression of the human endothelin-A receptor». Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p.18797-18804.

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

HUH, J.W., H.Y. Yoon, H.J. Lee, W.B. Choi, S.J. Yang et S.W. Cho. 2004. « Importance of Gly-13 for the Coenzyme Binding of Human UDP-glucose Dehydrogenase». Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p.37491-37498.

HUNT, J.T., V.G. Lee, P.D. Steir, A. Hedberg, E. C.-K. Liu, D. McMuller et S. Moreland. 1991. «Structure-Activity Relationships of Monocyclic Endothelin Analogs» » Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 1, p.33-38.

IHARA, M., K. Noguchi, T. Saeki, T. Fukuroda, S. Tsuchida, S. Kimura, T. Fukami, K. Ishikawa, M. Nishikibe et M. Yano. 1992. «Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor». Life Sciences, vol. 50, p.247-255.

IHARA, M., T. Saeki, T. Fukuroda, S. Kimura, S. Ozaki, A.C. Patel et M. Yano. 1992. «A novel radioligand [^{125}I]BQ-3020 selective for endothelin ET_B receptors». Life Sciences, vol. 51, p.47-52.

IKURA, T., T. Sawamura, T. Shiraki, H. Hosokawa, T. Kido, H. Hoshikawa, K. Shimada, K. Tanzawa, S. Kobayashi, S. Miwa, and a. l. et. 1994. «CDNA Cloning and Expression of Bovine Endothelin Converting Enzyme». Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 203, p.1417-1422.

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.

ISHIKAWA, K., M. Ihara, K. Noguchi, T. Mase, N. Mino, T. Saeki, T. Fukuroda, T. Fikami, S. Ozaki, T. Nagese, M. Nishikibe et M. Yano, 1994. «Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B receptor antagonist, BQ-788». Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 91, p. 4892-4896.

JAE, H.S., M. Winn, T.W. Von Geldern, B.K. Sorensen, W.J. Chiou, B. Nguyen, K.C. Marsh et T.J. Opgenorth. 2001. «Pyrrolidine-3-carboxylic acids as endothelin antagonists. 5. Highly selective, potent, and orally active ET(A) antagonists». Journal of Medicinal Chemistry, vol.44, p.3978-3984.

JIMENO A. et M. Carducci. 2005. «Atrasantan : a novel and rationally designed therapeutic alternative in the management of cancer». Expert review of anticancer therapy, vol. 5, p.419-427.

JOSSART, C., M. Coupal, N. McNicoll, A. Fournier, B.C. Wilkes et A. De Léan. 2005. «Photolabeling Study of the Ligand Binding Domain of Natriuretic Peptide Receptor A: Development of a Model». Biochemistry, vol. 44, p.2397-2408

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

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

KASHIWABARA, T., Y. Inagaki, H. Ohata, A. Iwamatsu, M. Nomizu, A. Morita et K. Nishikori. 1989. «Putative Precursors of Endothelin Have Less Vasoconstrictor Activity *In Vitro* But a Potent Pressor Effect *In Vivo*». FEBS Letters, vol. 247, p.73-76.

KATAHIRA, R., I. Umemura, M. Takai, K. Oda, T. Okada et A.Y. Nosaka. 1998. «Structural studies on endothelin receptor subtype B specific agonist IRL-1620 [suc-[Glu^9,$Ala^{11,15}$]ET-1(8-21)] and its analogs with dipalmitoyl phosphatidylcholine vesicles by RMN spectroscopy». Journal of Peptide Research, vol. 51, p.155-164.

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

KIMURA, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinmi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto et T. Masaki. (1988) «Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety». Biochemical Biophysical Research Communications, vol.156, p.1182-1186.

KIMURA, C., Y. Itoh, S. Ohklubo et M. Fujino. 1989. «Cloning and Sequencing of a Canine Gene Segment Encoding Mature Endothelin». Nucleic Acids Research, vol. 17, p 3290.

KIENHUIS, C.B.M., J.J.T.M. Heuvel, H.A. Ross, L.M.J.W. Swinkels, J.A. Foekens et Th. J. Benraad. 1991. «Six methods for direct radioiodination of mouse epidermal growth factor compared: effect of nonequivalence in binding behavior between labeled and unlabeled ligand». Clinical Chemistry, vol. 37, p.1749-1755.

KITADA, C., T. Ohtaki, Y. Masuda, Y. Masuo, H. Nomura, T. Asami, Y. Matsumoto, M. Satou et M. Fujino. 1993 «Design and Synthesis of ET_A Receptor Antagonists and Study of ET_A Receptor Distribution». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol.22, p.S128-131.

KLAINGUTI, M., S. Aigner, J. Kilo, H.M. Eppenberger, A. Mandinova, U. Aebi, M.C. Schaub, S.G., Shaw, T.F. Luscher et D. Atar. 2000 «Lack of nuclear apoptosis in cardiomyocytes and increased endothelin-1 levels in a rat model of myocardial stunning». Basic Research in Cardiology, vol.95, p.308-315.

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

KOTZYBA-HIBERT F., I. Kapfer et M. Goeldner. 1995. «Recent Trends in Photoaffinity Labeling». Angewandte Chemie (International ed. in English), vol. 34, p.1296-1312.

KOZUKA, M., T. Ito, S. Hirose, K.M. Lodhi et H. Hagiwara. 1991. «Purification and Characterization of Bovine Lung Endothelin Receptor». Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 16892-16896.

KRAMER, W., H. Glombik, S. Petry, H. Heuer, H.L. Schafer, W. Wendler, D. Corsiero, F. Girbig et C. Weyland. 2000. « Identification of binding proteins for cholesterol absorption inhibitors as components of the intestinal cholesterol transporter.» FEBS Letters, vol. 487, p. 293-297.

KRAMER W., F. Girbig, D. Corsiero, A. Pfenninger, W. Frick, G. Jahne, M. Rhein, W. Wendler, F. Lottspeich, E.O. Hochleitner, E. Orso et G. Schmitz. 2005. « Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane». Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p.1306-1320.

KRYSTEK, S.R., P.S. Patel, P.M. Rose, S.M. Fisher, B.K. Kienzle, D.A. Lach, E.C.K. Liu, J.S. Lynch, J. Novotny et M.L. Webb. 1994. «Mutation of Peptide Binding Site in Transmembrane Region of a G-Protein-Coupled Receptor Accounts for Endothelin Receptor Subtype Selectivity». Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 12383-12386.

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

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

LEE, J.A., J.D. Elliot, J.A. Sutiphong, W.J. Freisen, E.H. Ohlstein, J.M. Stadel, J.G. Gleason et C.E. Peishoff. 1994. «Tyr-129 is Important to the Peptide Ligand Affinity and Selectivity of Human Endothelin Type A Receptor». Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 91, p. 7164-7168.

MASAKI, T., M. Yanagisawa et K Goto. 1992. «Physiology and Pharmacology of Endothelins». Medicinal Research Reviews, vol.12, p.391-421.

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

MÉSANGE, F., M. Sebbar, J. Capdevielle, J.-C. Guillemot, P. Ferrara, F. Bayard, M. Poirot et J.-C Faye. 2002. «Identification of two tamoxifen target proteins by photolabeling with 4-(2-morpholinoethoxy)benzophenone». Bioconjugate Chemistry, vol. 13, p.766-772.

MIMEAULT, M., A. Fournier, J. Féthière et A. De Léan. 1993. «Development of Natriuretic Peptide Analogs Selective for the Atrial Natriuretic Factor-R1A Receptor Subtype». Molecular Pharmacology, vol. 43, p. 775-782.

MIYAZAKI, H., M. Kondoh, H. Watanabe, Y. Masuda, K. Murakami, M. Takahashi, M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1990. «Affinity labelling of endothelin receptor and characterization of solubilized endothelin-endothelin-receptor complex». European Journal of Biochemistry, vol. 187, p. 125-129.

MORELAND, S. 1994. «BQ-123, a selective endothelin ET_A receptor antagonist». Cardiovascular Drug Reviews, vol.12, p.48-69.

NAGAYAMA, Y., H.L. Wadsworth, G.D. Chazenbalk, D. Russo, P. Seto et B. Rapoport. 1991. «Thyrotropin-luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor Extracellular Domain Chimeras as Probes for Thyrotropin Receptor Function». Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 88, p. 902-905.

NAKAJIMA, K., S.-I. Kumagaye, H. Nishio, H. Kuroda, T. Watanabe, Y. Kobayashi, H. Tamaoki, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989. «Synthesis of Endothelin-1 Analogues, Endothelin-3, and Sarafotoxin S6b : Structure-Activity Relationships». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol.13, p. S8-S12.

NAMBI, P., M. Pullen, J. Kincaid, P. Nuthulaganti, N. Aiyar, D.P. Brooks, M. Gellai, et C. Kumar. 1997. «Identification and characterization of a novel endothelin receptor that binds both ETA- and ETB-selective ligands», Molecular Pharmacology, vol. 52, p.582-589.

NAMBI, P., M. Pullen et W. Spielman. 1994. «Species differences in the binding characteristics of [^{125}I]IRL-1620, a potent agonist specific for endothelin-B receptors». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 268, p.202-207.

NEYLON, C. B. 1999. «Vascular biology of endothelin signal transduction». Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol. 26, p. 149-153.

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

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

OHLSTEIN, E.H., P. Nambi, S.A. Douglas, R.M. Edwards, M. Gellai, A. Lago, J.D. Leber, R.D. Cousins, A. Gao, J.S. Frazee, C.E. Peishoff, J.W. Bean, D.S. Eggleston, N.A. Elshourbagy, C. Kumar, J.A. Lee, T.L. Yue, C. Louden, D.P. Brooks, J. Weinstock, G. Feuerstein, G. Poste, R.R. Ruffolo et J.G. Gleason. 1994. «SB 209670, a rationally designed potent nonpeptide endothelin receptor antagonist». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol.91, p. 8052-8056.

OHNAKA, K., M. Nishikawa, R. Takayanagi, M. Haji, and H. Nawata. 1992. «Partial Purification of Phosphoramidon-Sensitive Endothelin Converting Enzyme in Porcine Aortic Endothelial Cells: High Affinity for Ricinus Communis Agglutinin». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 185, p. 611-616.

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

ORTH, S. R., Viedt, C., Amann, K. et E. Ritz. 2001. «Endothelin in renal diseases and cardiovascular remodeling in renal failure». Internal Medicine, vol. 40, p.285-291.

ORZECHOWSKI, H. D., C. M. Richter, H. Funke-Kaiser, B. Kroger, M. Schmidt, S. Menzel, H. Bohnemeier, et M. Paul. 1997. «Evidence of Alternative Promoters Directing Isoform-Specific Expression of Human Endothelin-Converting Enzyme-1 MRNA in Cultured Endothelial Cells». Journal of Molecular Medicine, vol. 75, p. 512-521.

PANEK, R.L., T.C. Major, G.P. Hingorani, A.M. Doherty, D.G. Taylor et S.T. Rapundalo. 1992. «Endothelin and Structurally Related Analogs Distinguish between Endothelin Receptor Subtypes». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 183, p.566-571.

PEER M., E. Csaszar, E. Vorlaufer, S. Kopp et P. Chiba. 2005. « Photoaffinity labeling of P-glycoprotein». Mini Reviews in Medicinal Chemistry, vol. 5, p.165-172.

PELTON, J.T. et J.P. Huggins. Éd., 1997. Endothelins in Biology and Medicine. New York : CRC Press, p.307-325.

PERKINS, T.D.J., R.C. Hider et D.J. Barlow. 1990. « Proposed Solution Structure of Endothelin». International Journal of Peptide and Protein Research, vol.36, p.128-133.

PERODIN J., M. Deraet, M. Auger-Messier, A.A. Boucard, L. Rihakova, M.-E. Beaulieu, P. Lavigne, J.-L. Parent, G. Guillemette, R. Leduc et E. Escher. 2002. «Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor». Biochemistry, vol. 41, p.14348-14356.

PHAM, V., J.D. Wade, B.W. Purdue et P.M. Sexton. 2004. « Spatial proximity between a photolabile residue in position 19 of salmon calcitonin and the amino terminus of the human calcitonin receptor». Journal of Biological Chemistry, vol.279, p.6720-6729.

PULLEN, M., G. Brown et P. Nambi. 1997. «Binding Characteristics of [^{125}I]TTA-386, ET_A-Selective Antagonist». Neuropeptides, vol.31, p.345-349.

RANDALL, M.D., S.A. Douglas et C.R. Hiley. 1989. «Vascular Activities of Endothelin-1 and Some Alanyl Substituted Analogues in Resistance Beds of the Rat». British Journal of Pharmacology, vol. 98, p. 685-699.

RIHAKOVA L. M. Deraet, M. Auger-Messier, J. Pérodin, A.A. Boucard, G. Guillemette, R. Leduc, P. Lavigne et E. Escher. 2002.«Methionine proximity assay, a novel method for exploring peptide ligand-receptor interaction». Journal of Receptors and Signal Transduction, vol. 22, p297-313.

ROUX, S., V. Breu, T. S.I. Ertel et M. Clozel. 1999. «Endothelin antagonism with bosentan : a review of potential applications». Journal of Molecular Medicine, vol. 77, p. 364-376.

RUSSELL, F.D. et P. Molenaar, 2000. «The human heart endothelin system : ET-1 synthesis, storage, release and effect». TiPS, vol.21, p. 353-359.

SACHON E., O. Tasseau, S. Lavielle, S. Sagan et G. Bolbach. 2003. «Isotope and affinity tags in photoreactive substance P analogues to identify the covalent linkage within the NK-1 receptor by MALDI-TOF analysis». Analytical Chemistry, vol. 75, p.6536-6543.

SAIDA, K., Y. Mitsui et N. Ishida. 1989. «A Novel Peptide, Vasoactive Intestinal Contractor, of a New (Endothelin) Peptide Family. Molecular Cloning, Expression, and Biological Activity». Journal of Biological Chemistry, vol.264, p. 14613-14616.

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

SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sakurai, Y. Takuwa, H. Yanagisawa et T. Masaki. 1991. «Cloning and functional expression of human cDNA for the ET_B endothelin receptor». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p.656-663.

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

SCHMIDT, M., B. Kroger, E. Jacob, H. Seulberger, T. Subkowski, R. Otter, T. Meyer, G. Schmalzing, and H. Hillen. 1994. «Molecular Characterization of Human and Bovine Endothelin Converting Enzyme (ECE-1)». FEBS Letters, vol. 356, p. 238-243.

SCHMITZ-SPANKE, S. et J. D. Schipke. 2000. «Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases». Basic Research in Cardiology, vol. 95, p.290-298.

SCHNAPP, K.A., R. Poe, E. Leyva, N. Soundararajan, M.S. Platz. 1993. «Exploratory photochemistry of fluorinated aryl azides. Implications for the design of photoaffinity labeling reagents». Bioconjugate Chemistry, vol. 4, p.172-177.

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

SCHWEIZER, A., O. Valdenaire, P. Nelbock, U. Deuschle, J. B. Dumas Milne Edwards, J. G. Stumpf et B. M. Loffler. 1997. «Human Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1): Three Isoforms With Distinct Subcellular Localizations». Biochemical Journal, vol. 328 p. 871-877.

SHIMADA, K., M. Takahashi et K. Tanzawa. 1994. «Cloning and Functional Expression of Endothelin-Converting Enzyme from Rat Endothelial Cells». The Journal of Biological Chemistry, vol.269, p. 18275-18278.

SHIMADA, K., M. Takahashi, M. Ikeda et K. Tanzawa. 1995. «Identification and Characterization of Two Isoforms of an Endothelin- Converting Enzyme-1». FEBS Letters, vol. 371, p. 140-144.

SINGH, A., E.R. Thorton et F.H. Westheimer. 1962. «The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin». Journal of Biological Chemistry, vol.237, p.3007-3008.

SMITH, R.A. et J.R. Knowles. 1973. «Aryldiazirines. Potential Reagents for Photolabeling of Biological Receptor Sites». Journal of the American Chemical Society, vol. 95, p. 5072-5073.

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

TAKAHASHI, M., K. Fukuda, K. Shimada, K. Barnes, A. J. Turner, M. Ikeda, H. Koike, Y. Yamamoto et K. Tanzawa. 1995. «Localization of Rat Endothelin-Converting Enzyme to Vascular Endothelial Cells and Some Secretory Cells». Biochemical Journal, vol. 311, p. 657-665.

TAKAHASHI, M., Y. Matsushita, Y. Iijima, and K. Tanzawa. 1993. «Purification and Characterization of Endothelin-Converting Enzyme From Rat Lung». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 21394-21398.

TAKAI, M., I. Umemura, K. Yamasaki, T. Watakabe, Y. Fujitani, K. Oda, Y. Urade, T. Inui, T. Yamamura et T. Okada. 1992. « A Potent and Specific Agonist, Suc-[Glu^{9},$Ala^{11,15}$]-Endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B Receptor ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 184, p.953-959.

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

TAM, J.P., W. Liu, J.-W. Zhang, M. Galantiro, F. Bertolero, C. Cristiani, F. Vaghi et R. Castiglione. 1994. «Alanine Scan of Endothelin : Importance of Aromatic Residues». Peptides, vol.15, p. 703-708.

TAN, Y.V., A. Couvineau et M. Laburthe. 2004. «Diffuse pharmacophoric domains of vasoactive intestinal peptide (VIP) and further insights into the interaction of VIP with the N-terminal ectodomain of human VPAC1 receptor by photoaffinity labeling with [Bpa^6]VIP». Journal of Biological Chemistry, vol.279, p.38889-38894.

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

TOUYZ, R.M. et E.L. Schiffrin. 2003. «Role of endothelin in human hypertension». Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 81, p.533-541.

TREJO, J. et S.R. Coughling. 1999. « The Cytoplasmic Tails of Protease-activated Receptor-1 and Substance P Receptor Specify Sorting to Lysosomes *versus* Recycling» Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 2216-2224.

VALDENAIRE, O., E. Rohrbacher, and M. G. Mattei. 1995. «Organization of the Gene Encoding the Human Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1)». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 29794-29798.

VALDENAIRE, O., D. Lepailleur-Enouf, G. Egidy, A. Thouard, A. Barret, R. Vranckx, C. Tougard, and J. B. Michel. 1999. «A Fourth Isoform of Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1) Is Generated From an Additional Promoter Molecular Cloning and Characterization». European Journal of Biochemistry, vol. 264, p. 341-349.

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

WARNER, T.,D., G. De Nucci et J.R. Vane. 1989. «Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat». European Journal of Pharmacology, vol.159, p. 325-326.

WARNER, T.D., J.A. Mitchell, G. De Nucci et J.R. Vane. 1989. «Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13, p. S85-S88.

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

WESSALE, J.L., A.L. Adler, E.I. Novosad, S.V. Calzadilla, B.D. Dayton, K.C. Marsh, M. Winn, H.S. Jae, T.W. Von Geldern, T.J. Opgenorth et J.R. Wu-Wong. 2002. «Pharmacology of endothelin receptor antagonists ABT-627, ABT-546, A-182086 and A-192621 : *ex vivo* and *in vivo* studies». Cinical Science, vol.103, p.112S-117S.

WILLIAMS, D.L., K.L. Jones, D.J. Pettibone, E.V. Lis et B.V. Clineschmidt. 1991. «Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothein receptor subtypes». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 175, p. 556-561.

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

WU-WONG J.R., D.B. Dixon, W.J. Chiou, B.D. Dayton, E.I. Novosad, A.L. Adler, J.L. Wessale, S.V. Calzadilla, L. Hernandez, K.C. Marsh, G. Liu, B. Szczepankiewicz, T.W. Von Geldern et T.J. Opgenorth. 1999. «Pharmacology of A-216546: a highly selective antagonist for endothelin ET(A) receptor». European Journal of Pharmacology, vol. 366, p189-201.

XU, D., N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaw, D. deWit, et M. Yanagisawa. 1994. «ECE-1: a Membrane-Bound Metalloprotease That Catalyzes the Proteolytic Activation of Big Endothelin-1». Cell, vol. 78, p. 473-485.

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

YANAGISAWA, M. et T. Masaki. 1989. «Endothelin, a Novel Endothelium-Derived Peptide : Pharmacological Activities, Regulation and Possible Roles in Cardiovascular Disease». Biochemical Pharmacology, vol. 38, p. 1877-1883.

ZHU, G., L.H. Wu, C. Mauzy, A.M. Egloff, T. Mirzadegan et F.Z. Chung. 1992. «Replacement of Lysine-181 by Aspartic Acid in the Third Transmembrane Region of Endothelin Type B Receptor Reduces its Affinity to Endothelin Peptides and Sarafotoxin 6c Without Affecting G Protein Coupling». Journal of Cellular Biochemistry, vol. 50, p. 159-164.

ZUCCARELLO, M., A.I., Lewis et R.M. Rapoport. 1994. «Endothelin ET_A and ET_B receptors in subarachnoid haemorrhage-induced cerebral vasospasm». European Journal of Pharmacology, vol.259, p. R1-R2.