

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**IDENTIFICATION D'INTERACTIONS ENTRE
L'UROTENSINE-II ET DES PROTÉINES MYOCARDIQUES
CHEZ LE RAT**

Par
Kathy Turcotte

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

Jury d'évaluation

Président du jury	Pr Thomas Sanderson, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Pr Danielle Jacques, Université de Sherbrooke
Examineur interne	Pr Thomas Sanderson, INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Pr Alain Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier

©droits réservés de Kathy Turcotte, 2009

RÉSUMÉ

L'urotensine-II (U-II) est un acteur important impliqué dans diverses anomalies touchant entre autres le système cardiovasculaire. Ce peptide formé de 11 acides aminés est actuellement décrit comme l'agent vasoconstricteur le plus puissant identifié à ce jour. Son action est permise grâce à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPGs), le récepteur UT. Jusqu'à tout récemment, les RCPGs étaient décrits comme des protéines situées à la membrane plasmique des cellules. Or, des études menées par différents groupes de recherche ont montré une localisation nucléaire pour certains d'entre eux associés à des peptides vasoactifs tels l'angiotensine-II, la bradykinine et l'endothéline.

Suite à ces observations, le but de notre projet de recherche vise à évaluer la présence du récepteur UT ou de toutes autres protéines capables de lier l'U-II à la surface des noyaux de cellules provenant de tissus cardiaques de rat. Pour ce faire, nous avons d'une part fait la synthèse d'analogues biotinylés et photoactivables de l'U-II. Ainsi, une molécule de biotine a été ajoutée en position N-terminale, dans le but d'être utilisée comme sonde étant donné sa forte affinité pour l'avidine. De plus, les analogues ont subi la substitution des acides aminés des positions 3 ou 4 de la séquence de l'urotensine humaine (*hU-II*) par un groupement photoactivable, le p-benzoyl-phénylalanine (Bpa). Ce groupement est nécessaire pour le photomarquage qui constitue un moyen efficace permettant l'étude des complexes ligand-récepteur.

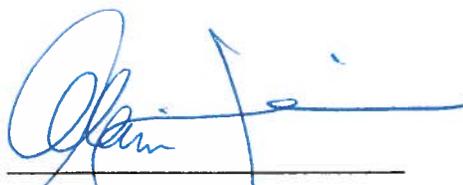
D'autre part, l'affinité de l'U-II a été vérifiée par des essais de liaison/compétition utilisant le radioligand [Tyr(¹²⁵I)⁹]*hU-II* sur des fractions membranaires ainsi que des fractions enrichies en noyaux. Des immunobuvardages de type Western utilisant un anticorps dirigé contre le récepteur UT ont également été réalisés sur ces fractions cellulaires isolées. Finalement, les complexes formés suite au photomarquage entre les sondes biotinylés photoactivables radiomarquées à l'iode 125 et chacune des fractions cellulaires ont été purifiés sur colonne d'avidine. Les produits de la purification ont été révélés par autoradiographie grâce à l'émission du signal radioactif.

Nos résultats nous montrent qu'il y a liaison spécifique entre l'*h*U-II et les fractions cellulaires isolées et que l'affinité du peptide est plus grande envers la fraction nucléaire comparativement à la fraction membranaire. On observe également que le déplacement du radioligand [Tyr(¹²⁵I)⁹]*h*U-II par le peptide froid *h*U-II est comparable pour les fractions membranaire et nucléaire. Par contre, ce déplacement est plus marqué au niveau des fractions membranaires en ce qui concerne l'urantide, un antagoniste peptidique du récepteur UT.

Les résultats obtenus suite aux immunobuvardages, montrent la présence d'une protéine correspondant au poids moléculaire du récepteur UT au niveau de la fraction membranaire. Cette même protéine est retrouvée dans la fraction nucléaire accompagnée de 2 autres espèces immunoréactives de poids moléculaires différents. Finalement, les résultats de l'autoradiographie révèlent la présence du récepteur UT au niveau membranaire et nucléaire lorsque comparés au signal provenant du photomarquage avec les cellules qui surexpriment ce récepteur.

En conclusion, nos résultats apportent de nouveaux éléments au sujet de la présence d'un récepteur nucléaire spécifique au peptide U-II. Une meilleure compréhension du mode de fonctionnement de ce récepteur et des actions qui lui sont rattachées suite à l'activation par son ligand pourrait permettre le développement d'outils diagnostiques et/ou thérapeutiques mieux adaptés aux traitements des différentes maladies associées au système urotensinergique.


Kathy Turcotte
Étudiant


Alain Fournier
Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche Alain Fournier, merci de m'avoir accordé ta confiance en m'accueillant dans ton laboratoire et d'avoir cru en moi pour ce projet de recherche, merci pour ton support et tous tes encouragements.

Merci à tous les membres du LEMPP présents ou anciens : Chantal, Alexandra, Martin, Yan, Josée, Duc et Annie. Merci à Steve pour son encadrement lors de mon stage à Rouen.

Merci à Stéphane Boivin, de m'avoir tout appris à propos de Power Point, merci pour ton aide, même en direct du Texas et pour avoir été le meilleur des coéquipiers de duathlon.

Un merci vraiment spécial à Myriam Létourneau pour son rôle indispensable dans le laboratoire, ses conseils, sa patience, son écoute et son infatigable optimisme. Merci pour ton amitié et pour toutes ces soirées d'escalade.

Merci à Jacinthe Aubin, mon rayon de soleil, merci pour ta bonne humeur de tous les matins au labo et pour ton énergie contagieuse. Merci pour ces millions de fous rires en ta compagnie, pour nos plans rocambolesques, pour ton écoute et ton support à tout moment.

Merci à Geneviève Dupéré-Minier, François Binet et Anik Cloutier, merci d'accueillir mes moments de jasette dans votre labo, merci pour votre amitié mais surtout merci d'être les complices de mon humour.

Merci à Jad Hobeika, pour son incroyable support au cours de mes deux années de maîtrise, pour les récupérations de chimie, ses conseils judicieux et ses encouragements.

Un énorme merci à ma très chère et précieuse famille ainsi qu'à mes amis Marie-Claude Dion, Manon Glazer, Sébastien Harton, Mélanie Lavoie et Pascale Grégoire; pour leur support moral, leurs oreilles attentives et leur présence si importante dans ma vie au cours des bonnes et des moins bonnes journées.

Finalement un merci tout particulier à Charles Delisle, pour sa présence à mes cotés, sa belle énergie et pour m'avoir donné la motivation d'accélérer la rédaction de mon mémoire au cours des derniers mois...

Merci au FRSQ pour le financement.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
REMERCIEMENTS.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système urotensinergique.....	1
1.1.1 La découverte de l'urotensine-II.....	1
1.1.2 Précurseur de l'urotensine-II.....	3
1.1.3 La distribution de l'urotensine-II.....	4
1.1.4 Les actions biologiques de l'urotensine-II.....	5
1.1.4.1 Études <i>in vitro</i>	5
1.1.4.2 Études <i>in vivo</i>	7
1.1.5 Le récepteur de l'urotensine-II.....	10
1.1.6 La structure du récepteur UT.....	11
1.1.7 Signalisation intracellulaire.....	12
1.1.8 L'expression et la distribution du récepteur UT.....	14
1.1.9 Les pathologies associées au système urotensinergique.....	15
1.1.10 Développement d'antagonistes.....	17
1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).....	18
1.2.1 Introduction aux RCPGs.....	18
1.2.2 Découverte des RCPGs nucléaires.....	20
1.2.3 Peptides vasoactifs et leurs RCPGs nucléaires.....	21
1.2.4 Effets des RCPGs : membrane plasmique vs noyau.....	23
1.2.5 Voie de signalisation des RCPGs nucléaires.....	24
1.2.6 Mécanisme de localisation nucléaire des RCPGs.....	25
1.2.7 Objectifs de la recherche.....	27
2. Matériel et méthodes	29
2.1 Développement de sondes biotinylées-photoactivables.....	29
2.1.1 Choix de la résine et du type de groupement protecteur.....	29
2.1.2 Produits utilisés lors de la synthèse.....	29
2.1.3 Principe de la synthèse sur phase solide.....	30
2.1.4 Couplage du premier acide aminé.....	31
2.1.5 Détermination du taux de substitution sur la résine.....	32
2.1.6 Cycle de synthèse.....	33
2.1.7 Clivage du lien peptide-résine.....	35
2.1.8 Cyclisation.....	36
2.1.9 Déformylation du tryptophane.....	36

2.1.10 Première purification.....	37
2.1.11 Spectrométrie de masse.....	37
2.2 Évaluation de l'activité biologique des peptides.....	38
2.2.1 Culture cellulaire.....	38
2.2.2 Mesure de l'activité biologique par bioluminescence.....	39
2.3 Isolation des fractions membranaires/nucléaires à partir de cardiomyocytes et évaluation de l'affinité des sondes biotinylées photoactivables	42
2.3.1 Animaux et produits utilisés.....	42
2.3.2 Isolation de la fraction membranaire et nucléaire des cardiomyocytes.....	42
2.3.3 Dosage des protéines des fractions membranaires et nucléaires.....	43
2.3.4 Marquage des peptides au Na ¹²⁵ I.....	44
2.3.5 Électrophorèse, transfert et immunobuvardage de type Western.....	45
2.3.6 Évaluation de l'affinité de l'hU-II pour les fractions membranaires et nucléaires.....	46
2.3.7 Évaluation du déplacement du peptide [Tyr(¹²⁵ I) ⁹]hU-II.....	48
2.4 Purification des complexes photomarqués et méthodes de détection	50
2.4.1 Photomarquage du peptide N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ³ -Tyr(¹²⁵ I) ⁹]-hU-II).....	50
2.4.2 Purification sur colonne d'avidine monomérique.....	52
2.4.3 Électrophorèse et autoradiographie des fractions d'éluion.....	54
3. RÉSULTATS.....	55
3.1 Développement de sondes biotinylées photoactivables.....	55
3.2 Évaluation de l'activité biologique des peptides.....	58
3.3 Évaluation de l'enrichissement des fractions membranaires et nucléaires isolées à partir de cardiomyocytes et évaluation de l'affinité de l'hU-II pour ces fractions cellulaires.....	60
3.3.1 Iodation des peptides au Na ¹²⁵ I.....	60
3.3.2 Électrophorèse, transfert et immunobuvardage de type Western.....	61
3.3.3 Évaluation de l'affinité de l'hU-II pour les fractions membranaires vs nucléaires.....	65
3.3.4 Évaluation du déplacement du peptide [Tyr(¹²⁵ I) ⁹]hU-II.....	66
3.4 Purification des complexes photomarqués et méthode de détection.....	68

4. DISCUSSION.....	70
4.1 Développement de sondes biotinylées photoactivables.....	70
4.2 Évaluation de l'activité biologique des sondes biotinylées photoactivables.....	71
4.3 Évaluation de l'enrichissement des fractions membranaires et nucléaires.....	72
4.4 Évaluation de l'affinité de l'³HU-II pour les fractions membranaires et nucléaires.....	75
4.5 Purification des complexes photomarqués sur colonne d'avidine et autoradiographie.....	78
5. CONCLUSION.....	79
6. PERSPECTIVES.....	80
APPENDICE.....	81
RÉFÉRENCES.....	84

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure primaire de l'urotensine II humaine (<i>hU-II</i>).....	2
Figure 2	Précurseur de l'urotensine II chez l'humain.....	3
Figure 3	Structure primaire du récepteur de l'urotensine-II humain (<i>hUT</i>).....	12
Figure 4	Schématisation du mécanisme de signalisation intracellulaire au niveau des cellules musculaires vasculaires lisses.....	13
Figure 5	Schéma général de l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G par des médiateurs extracellulaires variés.....	18
Figure 6	Cycle de l'activation des protéines G.....	19
Figure 7	Mécanisme de bioluminescence de l'aequorine.....	40
Figure 8	Schéma expérimental illustrant la purification de complexes biotinylés	53
Figure 9	Structure primaire de l'urotensine humaine et des analogues biotinylés photoactivables.....	55
Figure 10	Caractérisation de la sonde N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ³]-hU-II après purification par CLHP analytique.....	56
Figure 11	Caractérisation de la sonde N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ⁴]-hU-II après purification par CLHP analytique.....	57
Figure 12	Courbe concentration-réponse : pourcentage de bioluminescence en fonction de la concentration des peptides.....	59
Figure 13	Profil d'élution du peptide N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ³]-hU-II sur cartouche Sep-Pack C ₁₈ , suite à la réaction d'iodation.....	60
Figure 14	Immunobuvardage de type Western : localisation de la protéine Sp3 au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat.....	61
Figure 15	Immunobuvardage de type Western : localisation de la protéine VE-cadhérine au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat	62

Figure 16	Immunobuvardage de type Western : localisation de la protéine Cx43 au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat	63
Figure 17	Immunobuvardage de type Western : localisation du récepteur UT au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat	64
Figure 18	Courbe de compétition de la liaison de l' hU -II en présence du peptide $[Tyr(^{125}I)^9]hU$ -II sur les fractions membranaires et nucléaires.....	66
Figure 19	Pourcentage de déplacement du peptide $[Tyr(^{125}I)^9]hU$ -II en présence de différents peptides froids.....	67
Figure 20	Autoradiographie des fractions d'élution obtenues suite à la purification sur colonne d'avidine monomérique.....	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Structure primaire de l'urotensine II provenant de différentes espèces.....	2
Tableau II	Résumé des différentes actions de l'U-II répertoriées au niveau des vaisseaux périphériques chez l'humain et chez le rat.....	9
Tableau III	Cycle de couplage des acides aminés.....	35
Tableau IV	Protocole employé pour les essais de liaison.....	47
Tableau V	Protocole employé pour les tests de compétition.....	48
Tableau VI	Protocole employé pour la réaction de liaison avant le photomarquage.....	50
Tableau VII	Masse moléculaire et pourcentage de pureté des sondes après déformylation du tryptophane.....	56
Tableau VIII	Activité biologique des analogues biotinylés photoactivables et de l'hU-II sur le récepteur hUT.....	59
Tableau IX	Affinité de la liaison de l'hU-II sur les fractions membranaires vs les fractions nucléaires en présence de 1×10^{-10} M de peptide [Tyr(125 I) 9]hU-II	66
Tableau X	Pourcentage de déplacement du peptide [Tyr(125 I) 9]hU-II en présence de différents peptides froids au niveau des fractions membranaire et nucléaire.....	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-Br-Z	2-bromobenzyloxycarbonyle
2-Cl-Z	2-chlorobenzyloxycarbonyle
5-HT	Sérotonine
AA	Acide aminé
AC	Adénylyl cyclase
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEBSF	Fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
ANP	Peptide natriurétique de l'oreillette
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT ₁ /AT ₂	Récepteurs de l'angiotensine sous-type 1 et 2
Bzl	Benzyle
Boc	tert-butyloxycarbonyle
Bop	Hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium
Bpa	benzoylphénylalanine
BSA	Albumine de sérum bovin
CEE	Cellules endothéliales endocardiques
CHO	Ovaire de hamster chinois
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CMVL	Cellule musculaire vasculaire lisse
cpm	Comptes par minute
CREB	Élément de réponse liant l'AMPc
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine

DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithio-threitol
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDTA	Éthylène diamine tétraacétique
EGTA	Éthylène glycol tétraacétique
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EP ₃	Récepteur des prostaglandines sous-type 3
éq	Équivalent
ET	Endothéline
ET-1	Endothéline-1
ET _A /ET _B	Récepteurs de l'endothéline sous-type A et B
EtOH	Éthanol
Fmoc	9-fluorènylméthoxy-carbonyl
GDP	Guanosine-5'-diphosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GRK	Kinases associées au RCPG
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HF	Acide fluorhydrique
i.d.	Diamètre interne
IP	Inositol phosphate
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP ₃ R	Récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate
i.v.	Intraveineux
KI	Iodure de potassium
KCN	Cyanure de potassium
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotéine de faible densité
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginine méthyl ester
LPA	Acide lysophosphatidique
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted-laser-desorption-ionization time of flight</i>

MeOH	Méthanol
Me-4-Bzl	Méthyle-4-benzyle
NF-kB	Facteur de transcription nucléaire-kB
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
NPY	Neuropeptide Y
OcHex	Ester de cyclohexyle
O-Bzl	Ester de benzyle
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PBS	Tampon phosphate
PC	Prohormone convertase
PCR-RT	Réaction de polymérisation en chaîne-transcriptase inverse
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PTH	Hormone parathyroïdienne
PTHrP	Peptide relié à l'hormone parathyroïdienne
PVDF	Difluorure de polyvinylidène
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RS	Réticulum sarcoplasmique
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse de gel de polyacrylamide du dodécylsulfate de sodium
SENr	Récepteur au neuropeptide de l'épithélium sensoriel
SLN	Signal de localisation nucléaire
SNC	Système nerveux central

SVF	Sérum de veau fœtal
TBS	Tampon Tris
TBST	Tampon Tris/Tween-20
TFA	Acide trifluoroacétique
UCE	Enzyme de conversion de l'urotensine
UT	Récepteur de l'urotensine
U-II	Urotensine-II
UV	Ultraviolet
Y ₁	Récepteur au neuropeptide Y de type 1

Abréviations des acides aminés

Acide Aminé	Abréviation à trois lettres	Abréviation à une lettre
Acide aminohexanoïque	Ahx	-
Acide glutamique	Glu	E
Acide aspartique	Asp	D
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	Bpa	-

1. INTRODUCTION

1.1 Le système urotensinergique

1.1.1 La découverte de l'urotensine-II

L'urotensine fut découverte à la fin des années 60 par l'équipe de Bern et Lederis à partir d'extraits d'urophyse de poissons téléostéens (Bern et Lederis, 1969). On retrouve à l'intérieur de la famille de l'urotensine quatre membres possédant des effets biologiques distincts (urotensine I, II, III et IV).

C'est en 1980, suite à une étude effectuée sur l'urophyse du poisson gobie (*Gillichthys mirabilis*) que l'U-II a été identifiée. L'urophyse est un organe neurohémal, similaire à la neurohypophyse, localisé dans la région caudale de la moelle épinière de certains poissons. L'U-II présente chez le poisson gobie (gU-II) s'est avérée être un peptide cyclique formé de 12 acides aminés : H-Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH, possédant un fort pouvoir vasoconstricteur au niveau du système vasculaire du poisson (Pearson *et al.*, 1980). Plus tard, la caractérisation de l'U-II à partir de cerveau de grenouille a permis d'envisager la présence de ce peptide chez les vertébrés supérieurs (Conlon *et al.*, 1992). C'est au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire que l'U-II a été identifiée chez les mammifères dont la souris et le rat (Coulouarn *et al.*, 1999).

Des études d'hybridation *in situ* menées par l'équipe de Coulouarn en 1998, ont permis d'isoler au niveau de la moelle épinière l'ARNm codant pour la forme humaine de l'urotensine II (hU-II) (Coulouarn *et al.*, 1998). Par ces études, les auteurs montrent que l'hU-II est composée de 11 acides aminés, possédant un pont disulfure entre les résidus cystéines situés aux positions 5 et 10, comme présenté à la Figure 1.

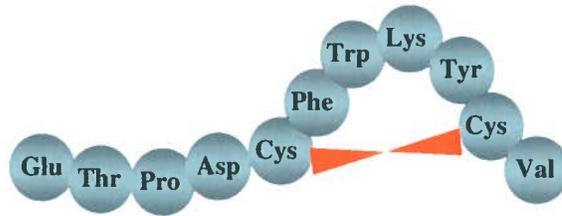


Figure 1 : Structure primaire de l'urotensine II humaine (hU-II).

Les isoformes de l'U-II présentées dans le tableau I contiennent toutes un pont disulfure formant un motif hexapeptidique cyclique [Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys] conservé chez les différentes espèces au cours de l'évolution. Ce motif, localisé à l'extrémité C-terminale confèrerait la majeure partie de l'activité biologique du peptide. De plus, parmi toutes les isoformes de l'U-II identifiées jusqu'à ce jour, on note la présence d'un résidu acide (Asp/Glu) qui précède directement le domaine cyclique. La partie N-terminale de l'U-II se différencie au niveau de sa longueur et de sa séquence dépendamment de l'espèce en question. (Coulouarn *et al.*, 1998; 1999).

Tableau I : Structure primaire de l'urotensine II provenant de différentes espèces.
(Douglas et Ohlstein, 2000).

Espèces	Acides aminés	Séquences
Humain/singe	11	Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val
Souris	14	Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val
Rat	14	Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val
Poisson gobie	12	Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val
Grenouille	13	Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val
Porc-A	12	Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val
Porc-B	12	Gly-Pro-Pro-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val

1.1.2 Précurseur de l'urotensine-II

Chez l'humain, la formation de l'U-II mature est dérivée d'un précurseur de grande taille, comme c'est le cas également pour d'autres peptides vasoactifs tels l'endothéline (ET), la vasopressine ou le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) (Figure 2).

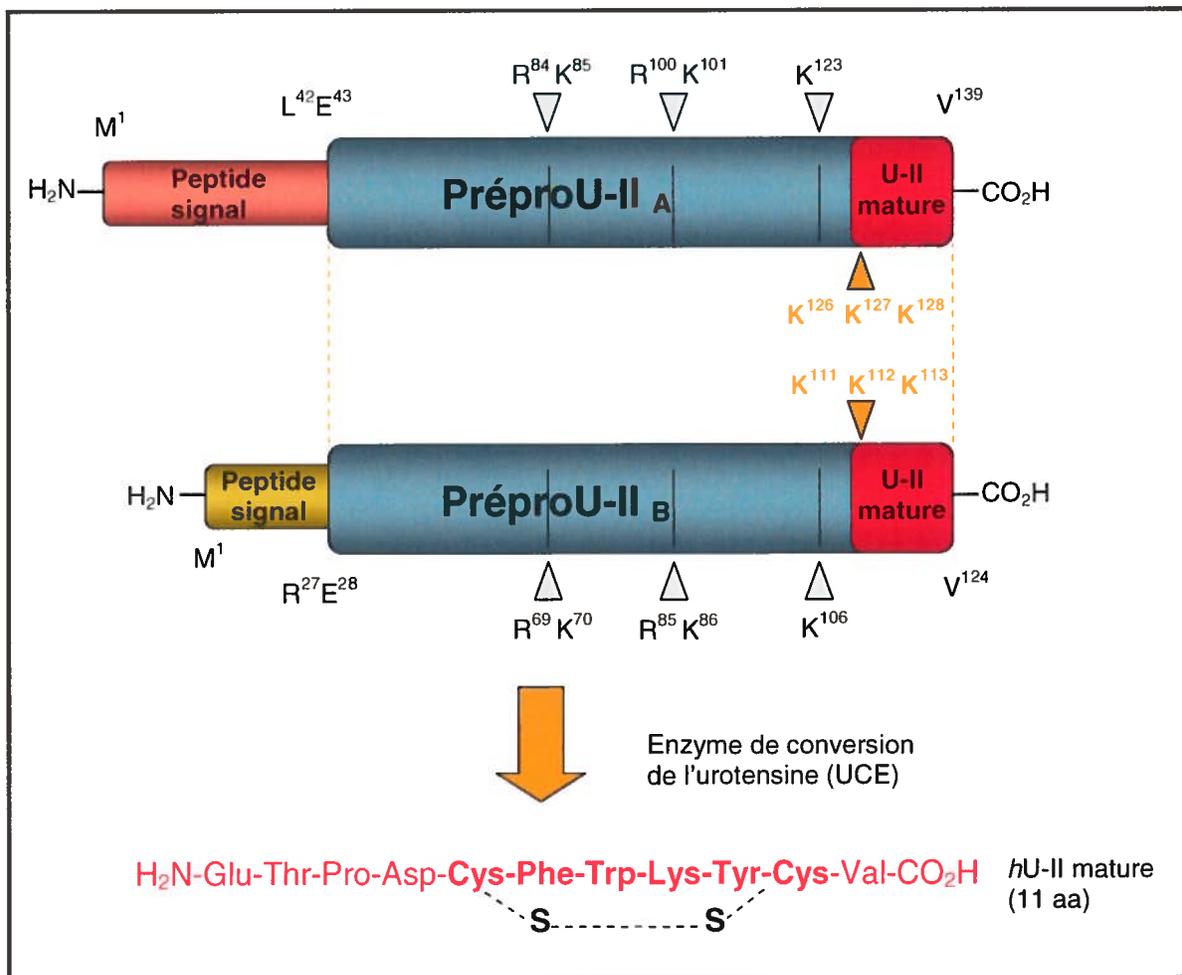


Figure 2 : Précurseur de l'urotensine-II chez l'humain (Douglas et Ohlstein, 2000).

En effet, deux types de prépropeptides ont été identifiés comme étant les précurseurs de l'hUII (Coulouarn *et al.*, 1998). Ces précurseurs sont codés par un même gène (UTS2) localisé au niveau du chromosome 1p36 et constitué de 5 exons. L'isoforme A est composée de 139 acides aminés, alors que l'isoforme B l'est plutôt de 124. La composition de chacune des isoformes ne diffère qu'au niveau du peptide signal.

Le clivage protéolytique de l'un ou l'autre de ces précurseurs se fait dans une région riche en résidus basiques (Lys-Lys-Arg), permettant la libération de l'*h*U-II sous sa forme biologiquement active (Russel *et al.*, 2003). L'enzyme de conversion spécifique à l'urotensine (UCE) n'a pas encore été identifiée, par contre, plusieurs enzymes peuvent être responsables de ce clivage protéolytique. En effet, il a été démontré en 2004 par le groupe de Russel que la furine, une endoprotéase, fonctionnerait comme l'UCE intracellulaire alors que la trypsine, une sérine-protéase, pourrait agir sur la prépro-U-II en circulation (Russel *et al.*, 2004).

De plus, comme on peut le constater dans le tableau I, le nombre d'acides aminés constituant l'U-II varie selon les espèces, allant de 11 acides aminés chez l'humain, jusqu'à 14 chez le rat et la souris. Cette variation est probablement due au fait que les sites de clivage de la prépro-U-II (région riche en résidus basiques), pour la prohormone convertase (PC) varient d'une espèce à l'autre.

1.1.3 La distribution de l'urotensine-II

Au cours des dernières années, diverses techniques tels l'immunobuvardage de type Northern, l'hybridation *in situ*, la réaction de polymérisation en chaîne - transcriptase inverse (PCR-RT) et l'immunohistochimie ont été mis en œuvre afin de démontrer la localisation dans l'organisme du peptide U-II et l'expression de l'ARNm de son précurseur. Ces différentes méthodes ont permis de montrer que l'U-II était fortement exprimée à l'intérieur du système nerveux central (SNC), principalement au niveau de la médulla oblongata et des neurones moteurs de la moelle épinière (Coulouarn *et al.*, 1999). De plus, l'U-II a été localisée au niveau des cardiomyocytes, des artères thoraciques, des cellules endothéliales vasculaires et musculaires vasculaires lisses, suggérant un rôle important au niveau du tonus vasculaire (Douglas, 2003). La présence de l'U-II ne se limite pas qu'aux systèmes nerveux central et cardiovasculaire. En effet, on retrouve ce peptide dans une grande variété de tissus périphériques tels les reins, les poumons, le foie, la prostate, les muscles squelettiques ainsi qu'au niveau de certaines glandes endocrines : pancréas, placenta, thymus, thyroïde, rate, glandes surrénales (Coulouarn *et al.*, 1998;

Totsune *et al.*, 2001). Cette vaste distribution dans l'organisme laisse prétendre que l'U-II pourrait être responsable d'actions biologiques très variées.

1.1.4 Les actions biologiques de l'urotensine-II

1.1.4.1 Études *in vitro*

Vasoconstriction

Depuis qu'il a été démontré que l'U-II provenant de l'urophyse de poisson possédait de puissants effets vasoconstricteurs chez le rat, les effets physiologiques humains sont devenus d'un grand intérêt. Le clonage de l'U-II chez l'humain et l'identification de son récepteur ont provoqué l'accroissement des recherches sur le potentiel pathophysiologique de ce peptide. Les effets biologiques les plus importants de *hU-II* sont répertoriés au niveau du système cardiovasculaire où il a été décrit comme le plus puissant agent vasoconstricteur connu à ce jour (Douglas et Ohlstein, 2000). Cependant, les propriétés vasoactives de l'U-II présentent de grandes variations selon l'origine anatomique du tissu étudié, de l'espèce où il a été isolé ainsi que de l'analyse biologique effectuée, qu'elle soit de nature *in vitro* ou *in vivo*.

Des études *in vitro* effectuées chez le lapin ont permis de mesurer une réponse vasoconstrictrice en ce qui concerne l'aorte thoracique et les artères coronaires alors qu'aucune réponse n'est observée au niveau de l'artère pulmonaire (Camarda *et al.*, 2002). Cette hétérogénéité des tissus face à l'action de l'U-II a été observée chez différentes espèces. En effet, chez le rat, une différence de réactivité est observée selon les diverses portions de l'aorte soumises à l'étude. Notamment, l'U-II est responsable d'une très forte action vasoconstrictrice au niveau de l'aorte thoracique comparativement à l'artère carotide, alors que pratiquement aucune réponse n'est observée au niveau de l'aorte abdominale (Douglas *et al.*, 2000). De façon générale, l'efficacité du pouvoir constricteur de l'U-II se résume comme suit : aorte thoracique > aorte abdominale > artères mésentériques.

Chez l'humain contrairement aux autres espèces, l'action vasoconstrictrice de l'U-II est beaucoup plus ubiquitaire. On peut observer son action notamment au niveau des artères coronaires, mammaires et radiales ainsi qu'au niveau des veines ombilicales et saphènes (Douglas, 2003). Cependant, comme c'est le cas pour d'autres espèces, l'intensité de la réponse chez l'humain demeure très variable. Par exemple, diverses expériences *in vitro* effectuées sur différents types de vaisseaux sanguins humains montrent que l'U-II a un pouvoir vasoconstricteur environ 50 fois plus puissant que celui de l'endothéline-1 (ET-1) au niveau des artères radiales, mammaires et coronaires. Par contre, 30% des artères à l'étude n'ont pas répondu à l'action de l'U-II, ce qui ne fut pas le cas en ce qui concerne la réponse à l'ET-1 (Maguire *et al.*, 2000). De grandes variations sont également perçues au niveau des petites artères pulmonaires où l'efficacité de la contraction varie de 14% à 220% (en fonction de la contraction causée par 50 mM KCl) (MacLean *et al.*, 2000).

Enfin, lors d'une étude menée par l'équipe de Hillier, sur différents types d'artères ou de veines isolées chez l'humain, on n'observe parfois aucune activité vasoconstrictrice ni vasodilatatrice pour un grand nombre de ces vaisseaux, principalement ceux de calibre petit et moyen (Hillier *et al.*, 2001).

Vasodilatation

Différentes équipes de recherche ont démontré que l'U-II est capable de générer une action vasodilatatrice, mais que celle-ci est dépendante de la présence d'un endothélium intact au niveau des vaisseaux sanguins. L'effet relaxant endothélium-dépendant de l'U-II a été montré au niveau de l'aorte de rat et de lapin (Bottrill *et al.*, 2000 et Ishihata *et al.*, 2006). Chez le rat, l'U-II est également responsable de la relaxation périphérique de vaisseaux importants comme les artères rénales et mésentériques mais seulement en présence d'un endothélium fonctionnel (Zhang *et al.*, 2003).

La vasodilatation provoquée par l'U-II survient suite à une production de calcium à l'intérieur de la cellule endothéliale, responsable de la libération de facteurs relaxants tels l'oxyde nitrique (NO), la prostaglandine I₂ (PGI₂) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). On remarque entre autres, que les effets dilatateurs du NO

peuvent atténuer la contraction causée par l'U-II sur l'aorte de rat. De plus, l'utilisation d'un produit tel le N^o-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) a montré une augmentation du pouvoir contractile de l'U-II (Ishihata *et al.*, 2006). Cette molécule est capable d'inhiber l'enzyme responsable de la formation du NO, nommée l'oxyde nitrique synthase (NOS). Il semble que l'action des facteurs relaxants puisse agir de manière à limiter l'action constrictrice de l'U-II. Ainsi, on pourrait croire que l'U-II exerce un rétro-contrôle sur sa propre action. À de très fortes concentrations du peptide, l'activité vasoconstrictrice serait limitée par la libération de NO ou de PGI₂.

1.1.4.2 Études *in vivo*

Comme mentionné précédemment, les effets biologiques de l'U-II sont très variables et ceci peut être attribuable au type d'analyse effectuée. Des études *in vivo* menées chez des rats conscients ont montré, suite à l'administration de très fortes doses d'U-II (3000 pmol/kg), des effets déprimeurs généralisés. Ces effets, causés par une dilatation du lit vasculaire, résultent alors en une chute de la pression artérielle et un phénomène de tachycardie. En revanche, lorsque l'administration s'effectue par infusion sur une période de 6h, on note la présence d'une tachycardie dose-dépendante ainsi qu'une lente augmentation de la pression sanguine. On note également que les effets cardiovasculaires provoqués par l'infusion de l'U-II sont réduits par la présence de l'inhibiteur L-NAME, suggérant une implication de l'action du NO dans ce processus (Gardiner *et al.*, 2006).

Chez le singe anesthésié (macaque cynomolgus), lorsqu'une faible dose d'U-II (<30 pmol/kg) est administrée par voie intraveineuse (i.v.) on observe une augmentation de la force de contraction du muscle cardiaque (effets inotropes positifs) accompagnée d'un phénomène de vasodilatation. Cependant, l'administration d'une forte dose du peptide serait responsable d'une vasoconstriction périphérique, d'une réduction moyenne de la pression sanguine et d'une sévère diminution d'environ 80% de la force de contraction cardiaque menant à un collapse cardiovasculaire (Ames *et al.*, 1999).

Enfin, des études menées chez des patients sains montrent que l'infusion d'U-II au niveau de l'artère brachiale produit un puissant effet vasoconstricteur (Böhm *et al.*, 2002) ce qui concorde avec les résultats obtenus par l'équipe de Ames (1999) et de Maguire (2000). Par contre, ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus *in vitro* par l'équipe d'Hillier (2001) ainsi que les observations *in vivo* du groupe de Wilkinson (Wilkinson *et al.*, 2002). Le tableau II résume les différents effets de l'U-II observés chez l'humain et chez le rat au niveau de plusieurs vaisseaux périphériques.

À la lumière de ces différentes informations, il semble que le rôle de l'U-II au niveau de la régulation cardiovasculaire ne soit pas encore clairement établi. Étant donné les actions parfois contradictoires observées suite à l'administration de ce peptide, le rôle réel de l'U-II dans l'organisme continue d'alimenter de nombreux questionnements.

Tableau II : Résumé des différentes actions de l'U-II répertoriées au niveau des vaisseaux périphériques chez l'humain et chez le rat (Zhu *et al.*, 2006).

Vaisseaux	Humains		Rats	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Aorte			Constriction (Bottrill <i>et al.</i> , 2000; Douglas <i>et al.</i> , 2000)	
Artère coronaire	Constriction (Maguire <i>et al.</i> , 2000)		Constriction : artères coronaires isolées (Bottrill <i>et al.</i> , 2000) et cœurs perfusés (Gray <i>et al.</i> , 2001) Dilatation : Cœurs perfusés (Katano <i>et al.</i> , 2000)	
Artère pulmonaire	Constriction : 30% des artères de $\approx 0,25$ mm i.d. (MacLean <i>et al.</i> , 2000) Aucun effet : artères $\approx 0,5$ mm i.d. (Bennett <i>et al.</i> , 2004) Dilatation : artères $\approx 0,07$ mm i.d. (Stirrat <i>et al.</i> , 2001)		Constriction : artères de 2-3 mm i.d. (MacLean <i>et al.</i> , 2000)	
Artère rénale			Dilatation : artères $\approx 0,2$ mm i.d. (Zhang <i>et al.</i> , 2003)	
Artère mésentérique			Aucun effet (Bottrill <i>et al.</i> , 2000)	Dilatation (Gardiner <i>et al.</i> , 2001)
Artère mammaire	Constriction (Maguire <i>et al.</i> , 2000) Variable : constriction 3 sur 8 (Paysant <i>et al.</i> , 2001) Aucun effet (Hillier <i>et al.</i> , 2001)			
Artère radiale	Constriction (Maguire <i>et al.</i> , 2000)			
Microvasculature cutanée	Aucun effet (Hillier <i>et al.</i> , 2001)	Constriction : hypertendus Dilatation : normotendus (Sondermeijer <i>et al.</i> , 2005)		
Veine Saphène	Constriction (Maguire <i>et al.</i> , 2000) Aucun effet (Hillier <i>et al.</i> , 2001)			
Veine ombilicale	Constriction (Maguire <i>et al.</i> , 2000)			
Vaisseaux : avant-bras		Constriction (Böhm & Pernow, 2002) Aucun effet (Wilkinson <i>et al.</i> , 2002)		

1.1.5 Le récepteur de l'urotensine-II

C'est en 1995, qu'un groupe de chercheurs a fait la découverte chez le rat, d'un nouveau gène codant pour un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) dont la séquence avait des similarités avec les récepteurs de la somatostatine sst₄ et δ -opioïde présents chez le rat ainsi que le récepteur humain de la galanine. Le transcrit de ce récepteur a été identifié majoritairement au niveau de certains tissus sensoriels et neurologiques (épithélium olfactif, rétine, cervelet, plexus choroïde), il fut alors nommé SENR «*sensory epithelial neuropeptide-like receptor*» (Tal *et al.*, 1995). Indépendamment du groupe de Tal, une autre équipe parvint à identifier chez le rat, le gène d'un récepteur orphelin le GPR14 (Marchese *et al.*, 1995) qui s'est avéré identique au SENR. Chacun de ces groupes a prouvé que ce nouveau gène sans intron, codait pour un récepteur de 386 acides aminés.

Un an après la découverte de l'U-II, quatre groupes de chercheurs indépendants ont démontré que l'U-II pouvait agir comme ligand endogène d'un récepteur "orphelin" couplé aux protéines G chez le rat, le GPR14 ou SENR (Ames *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1999, Mori *et al.*, 1999 et Nothacker *et al.*, 1999).

C'est l'équipe de Ames qui, en utilisant le récepteur GPR14 comme sonde, a identifié un gène similaire chez l'humain codant pour une protéine de 389 acides aminés (Ames *et al.*, 1999). Par une approche de criblage de type « pharmacologie inverse » près de 700 ligands ont été présentés au récepteur orphelin GPR14 chez le rat et à son homologue chez l'humain. La stratégie de pharmacologie inverse consiste à utiliser un récepteur orphelin comme appât afin de recruter un ligand endogène. Ce ligand sert ensuite à explorer les rôles biologiques et pathophysiologiques de ce récepteur. De tous ces ligands potentiels, seul l'U-II de gobie a su lier et activer ces récepteurs (Ames *et al.*, 1999). Comme prévu, l'U-II humaine s'est montrée capable de stimuler une libération de calcium à l'intérieur de cellules HEK-293 surexprimant le récepteur humain (Ames *et al.*, 1999). Maintenant, l'union internationale de pharmacologie « International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification » désigne le récepteur de l'urotensine II (GPR14) sous l'abréviation UT (Davenport et Maguire 2000).

1.1.6 La structure du récepteur UT

Comme on peut le constater à la figure 3, le récepteur UT est formé de 389 acides aminés et fait partie de la super famille 1 des RCPGs. En effet, on y retrouve plusieurs des caractéristiques typiques des RCPGs, telles que les 7 domaines transmembranaires, des sites de N-glycosylation (Asn²⁹ et Asn³³), un pont disulfure liant deux segments extracellulaires (Cys¹²³ et Cys¹⁹⁹) ainsi que des sites de phosphorylation PKA/PKC au niveau des boucles intracellulaires 2 et 3. Chez le rat comme chez l'humain on a identifié un motif d'internalisation, "NPXXY" situé au niveau du 7^e domaine transmembranaire (TM7) entre les résidus Asn³¹¹ et Tyr³¹⁵, requis pour l'internalisation du récepteur (Tal *et al.*, 1995, Marchese *et al.*, 1995 Ames *et al.*, 1999).

Le récepteur *hUT* est codé par un gène sans intron situé sur le chromosome 17q25.3 et possède 75% de similarité avec le récepteur de 386 acides aminés retrouvé chez le rat (Protopopov *et al.*, 2000). Le récepteur qui se rapproche le plus en terme de séquence protéique est le récepteur de la somatostatine (*sst4*) avec 27% d'homologie totale dont 41% au niveau des domaines transmembranaires (Ames *et al.*, 1999).

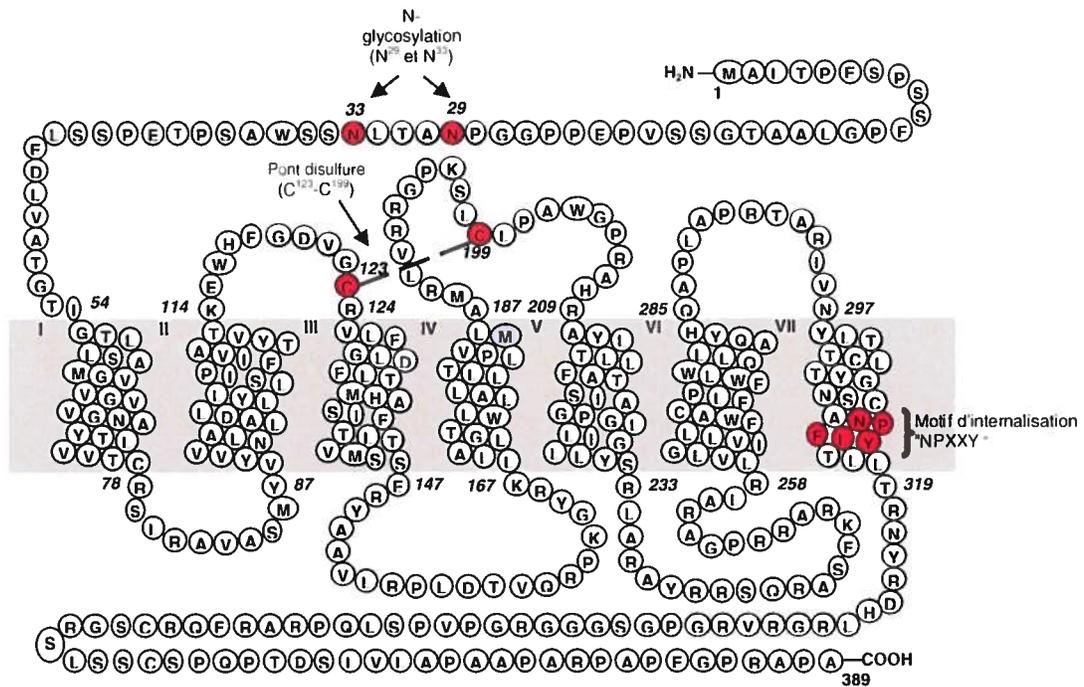


Figure 3 : Structure primaire du récepteur de l'urotensine-II humain (*hUT*)

1.1.7 Signalisation intracellulaire

Le mécanisme de signalisation intracellulaire impliquant l'U-II et son récepteur UT a principalement été étudié au niveau de la cellule musculaire vasculaire lisse (CMVL). Les différentes voies de signalisation observées suite à l'action de l'U-II menant à la vasoconstriction, la vasodilatation, la prolifération et l'hypertrophie cellulaire, sont résumées à la figure 4.

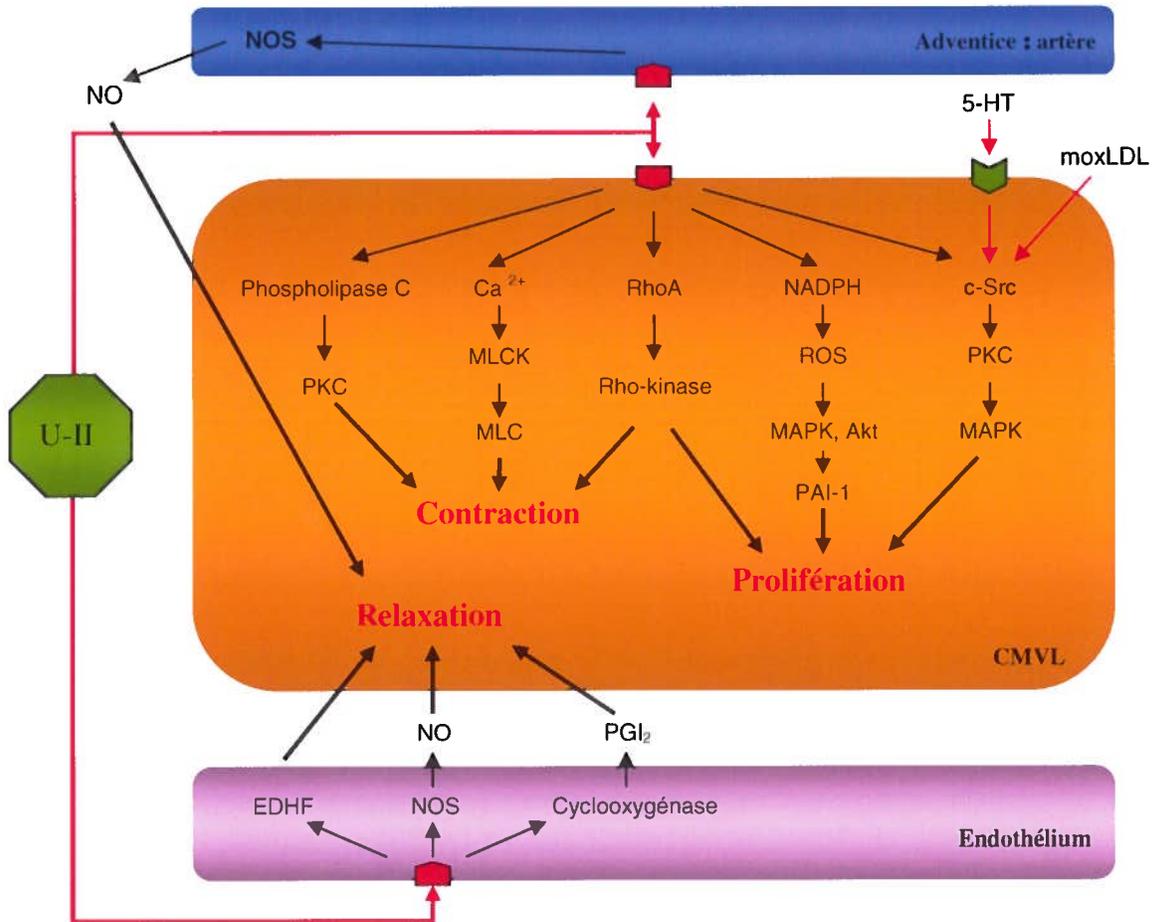


Figure 4 : Schématisation du mécanisme de signalisation intracellulaire au niveau des cellules musculaires vasculaires lisses. (Zhu *et al.*, 2006).

En tant que membre de la famille des RCPGs, UT est fonctionnellement couplé à la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de la protéine Gq. Lorsque que l'U-II lie son récepteur, il y a dissociation du complexe formé par la protéine G- $\alpha\beta\gamma$ vers sa forme active G $\alpha_{q/11}$ qui est alors responsable l'activation de la PLC. Cette dernière mettra en œuvre l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂) en 2 messagers secondaires, l'inositol 1,4,5,-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ est responsable d'une libération de Ca²⁺ intracellulaire, suite à sa liaison avec son récepteur (IP₃R) situé à la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS). Cette libération de Ca²⁺ provenant du RS accompagné de l'ouverture des canaux calciques à voltage dépendant est impliquée dans le phénomène de contraction. Le DAG, quant à lui agit en stimulant la

protéine kinase C (PKC) qui joue un rôle au niveau de la phosphorylation de certaines protéines intracellulaires impliquées dans les processus de contraction, de prolifération et d'hypertrophie cellulaire. Cependant, lorsque l'U-II agit sur son récepteur localisé à la membrane des cellules endothéliales ou au niveau de l'adventice des artères, il y a libération de NO, de EDHF et de PGI₂. Ces acteurs sont impliqués au niveau de la vasodilatation et viennent contrer l'effet vasoconstricteur de l'U-II.

Enfin, l'U-II joue un rôle additionnel en interagissant avec différents facteurs impliqués au niveau de la prolifération cellulaire. En effet, chez des cellules musculaires vasculaires lisses en culture, l'U-II agit en synergie avec la sérotonine (5-HT) et les lipoprotéines de faible densité (LDL) légèrement oxydées, stimulant ainsi la prolifération des CMLVs via la voie de signalisation c-SRC/PKC/MAPK tel que représenté à la figure 4 (Watanabe *et al.*, 2001a et 2001b). Ce phénomène contribue entre autres au développement de pathologies telles l'athérosclérose et l'hypertension.

1.1.8 L'expression et la distribution du récepteur UT

Afin de mesurer l'expression et la distribution du récepteur UT, différents types d'expériences ont été menés comme l'utilisation d'anticorps spécifiques, de peptides radiomarqués ou encore l'évaluation des taux d'ARNm. Le gène du récepteur s'est avéré être largement exprimé dans de nombreux tissus chez l'humain.

Des évidences d'immunoréactivité face au récepteur ont été observées au niveau du système nerveux central et au niveau périphérique dans des organes importants comme le cœur, les reins, le pancréas et le foie (Douglas et Ohlstein, 2000).

L'utilisation du radioligand (¹²⁵I-U-II) a montré chez l'humain, que la plus forte densité de récepteurs se trouvait au niveau des muscles squelettiques où les analyses de saturation démontrent une densité de récepteurs (B_{max}) de 2 fmol/mg. UT a également été localisée au niveau du cortex cérébral et de la racine dorsale des ganglions de la moelle épinière (Maguire *et al.*, 2000). D'autres études ont montré une forte densité de récepteur au

niveau des cardiomyocytes ventriculaires (Gong *et al.*, 2004) ainsi qu'au niveau des artères coronaires isolées chez le rat (Bottrill *et al.*, 2000) et chez l'humain (Maguire *et al.*, 2004).

La présence de l'ARNm du récepteur UT a également été décelée au niveau du cerveau, de l'hypothalamus, de la medulla oblongata, de l'hypophyse, de l'hippocampe, des reins, des glandes surrénales, des ventricules et oreillettes cardiaques, des artères thoraciques, de l'aorte et des cellules musculaires vasculaires lisses. (Matsushita *et al.*, 2001, Totsune *et al.*, 2001, Ames *et al.*, 1999 et Coulouarn *et al.*, 1998).

Différentes hypothèses ont été formulées suite à la variation de la réponse à l'U-II, comme par exemple, la variation de densité de récepteurs ou l'efficacité de liaison des seconds messagers qui peuvent varier selon le type de cellules ou de tissus.

1.1.9 Les pathologies associées au système urotensinergique

L'U-II avait d'abord attiré l'attention des groupes de recherche de par ses puissants effets vasoconstricteurs observés principalement au niveau cardiovasculaire. Plus tard, suite à de nombreux travaux de recherche, ce peptide s'est vu impliquer dans un grand nombre de désordres physiologiques touchant également d'autres systèmes. Ainsi, l'implication physiopathologique associée à ce peptide est devenue d'un grand intérêt parmi les différents systèmes de l'organisme.

En effet, on observe des taux plasmatiques élevés d'U-II en association avec certaines maladies cardiovasculaires comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, les maladies coronariennes, l'athérosclérose ainsi que certains désordres tels le diabète, l'insuffisance rénale et certains syndromes métaboliques. L'équipe de Douglas, a été la première à démontrer une association entre l'U-II et l'insuffisance cardiaque (Douglas *et al.*, 2003). Le niveau d'expression de l'U-II serait plus élevé dans le tissu myocardique de patients atteints d'insuffisance cardiaque que chez les groupes contrôles. Des études effectuées chez le rat montrent une hausse de l'U-II et de son récepteur au niveau du myocarde suite

à un infarctus. Enfin, l'U-II serait responsable des différents changements observés lors d'insuffisance cardiaque comme entre autres l'hypertrophie des cardiomyocytes ou l'augmentation de l'expression de fibronectine et de collagène par ces derniers (Tzanidis *et al.*, 2003).

Au niveau des artères coronaires, les taux d'U-II et d'UT se sont avérés augmentés au niveau des plaques d'athérome ce qui favoriserait l'athérosclérose étant donné l'action mitogène du peptide auprès des CMVLs (Ames *et al.*, 1999, Sauzeau *et al.*, 2001). De plus, comme les maladies métaboliques sont pour la plupart des facteurs de risque en ce qui concerne les maladies cardiovasculaires, l'implication du système urotensinergique a été observée au niveau de ces différentes maladies. D'abord, à partir de pancréas de rat perfusés, on observe que l'U-II inhiberait la relâche d'insuline en réponse au glucose (Silvestre *et al.*, 2001). L'U-II a démontré des taux 2 fois plus élevés chez des patients atteints de diabète de type 2 (Totsune *et al.*, 2003) ainsi qu'une différence de polymorphisme au niveau du gène de l'U-II associé au développement de ce même type de diabète dans la population japonaise (Wenyi *et al.*, 2003).

Finalement, suite à des observations faites chez les poissons conséquemment à une administration du peptide, l'U-II agirait de manière à réguler certaines fonctions endocrines. En effet, ces observations démontrent une augmentation des taux de catécholamines et de cortisol ainsi qu'une stimulation de la relâche des acides gras et l'inhibition de la sécrétion de prolactine (Bern *et al.*, 1985, Conlon *et al.*, 1996). À la lumière de ces résultats, l'U-II constitue une cible intéressante pour le développement de molécules capables de bloquer ses effets via l'action de son récepteur et pour élucider davantage les implications physiopathologiques de ce peptide.

1.1.10 Développement d'antagonistes

La plupart des antagonistes du récepteur UT, des molécules peptidiques et non-peptidiques développées au cours des dernières années, ont fait l'objet d'étude surtout au niveau des systèmes cardiovasculaire et rénal. Notamment, l'urantide [Pen⁵, DTrp⁷, Orn⁸] hU-II (4-11), s'est avéré être l'antagoniste le plus puissant du récepteur UT. Ce peptide antagonise complètement la contraction induite par l'U-II au niveau de l'aorte de rat, par contre il possède un pouvoir d'action en tant qu'agoniste capable d'induire la mobilisation calcique au niveau des cellules CHO qui surexpriment le récepteur UT (Camarda *et al.*, 2004).

Plusieurs autres antagonistes ont été développés dans le but d'inhiber l'action vasoconstrictrice de l'U-II. Parmi ceux-ci on retrouve le peptide BIM-23127 qui agit en freinant l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par l'action de l'U-II (Johns *et al.*, 2004). L'antagoniste sélectif Palosuran (ACT-058362) est, quant à lui, une molécule non-peptidique, qui s'est montrée efficace pour le traitement des rats, chez qui on a induit le diabète par des traitements de Streptozotocine. En effet, l'utilisation de cet antagoniste agirait de façon à augmenter la sécrétion d'insuline du pancréas et ralentirait la hausse des niveaux de glucose et de lipides dans le sang. Ce type de traitement est bénéfique pour la fonction rénale et la survie de ces modèles expérimentaux atteint de diabète type 1 (Clozel *et al.*, 2006). D'autres exemples comme ceux-ci font preuve que le développement d'antagonistes sélectifs à l'UT demeure un outil bénéfique pour la prévention des maladies des systèmes cardiovasculaire et rénal.

1.2 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

1.2.1 Introduction aux RCPGs

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de récepteurs endocriniens membranaires connus à ce jour. Comme il a été mentionné précédemment, UT fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Jusqu'à présent, environ 200 sous-types de RCPGs ont été clonés et ce nombre exclut les récepteurs olfactifs qui constituent une famille à part, formée de 400 à 1000 types de récepteurs différents. Ces récepteurs sont des protéines monomériques de longueur variable qui ont en commun, leurs 7 hélices transmembranaires (TM-1 à TM-VII) connectées par trois boucles intra et extracellulaires (Baldwin 1993). Les RCPGs sont capables de reconnaître un nombre varié de médiateurs extracellulaires comme des photons, des ions, des agents sensoriels, des molécules endogènes (acides aminés, nucléosides, lipides, peptides) ou exogènes (protéines, hormones) comme illustré à la figure 5 (Bockaert *et al.*, 1999).

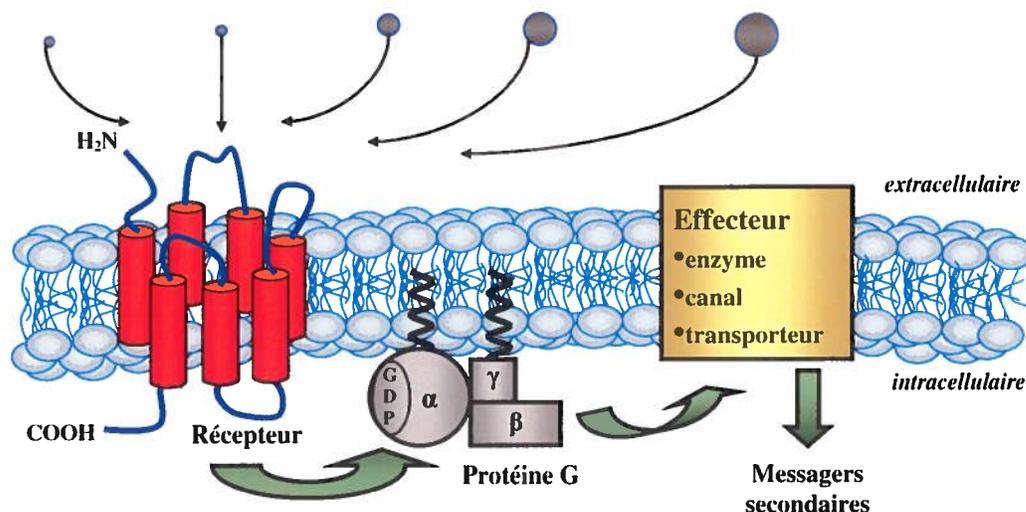


Figure 5 : Schéma général de l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G par des médiateurs extracellulaires variés.

De façon générale, lorsqu'un RCPG est activé par un agoniste, il y a un signal qui est déclenché par l'intermédiaire du récepteur localisé sur la cellule. Il y a alors un changement conformationnel observable au niveau du complexe agoniste-récepteur. En effet, suite à l'activation du récepteur, il y a phosphorylation du nucléotide GDP en GTP, la sous-unité α ainsi phosphorylée se dissocie des sous-unités β/γ constituant la protéine G (Conklin *et al.*, 1993 et Neer *et al.*, 1995). La protéine G alors active, permet la régulation de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques résultant majoritairement en la modulation de messagers secondaires tels l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), l'IP₃, le calcium ou le DAG.

L'activité des protéines G est de courte durée, le retour à l'état initial survient suite au déclenchement de l'activité d'une GTPase qui fait partie intégrante des protéines G et qui est responsable de la déphosphorylation de la sous-unité α -GTP actif en α -GDP inactif, provoquant alors la réassociation des sous-unités α et β/γ (Tan *et al.*, 2004).

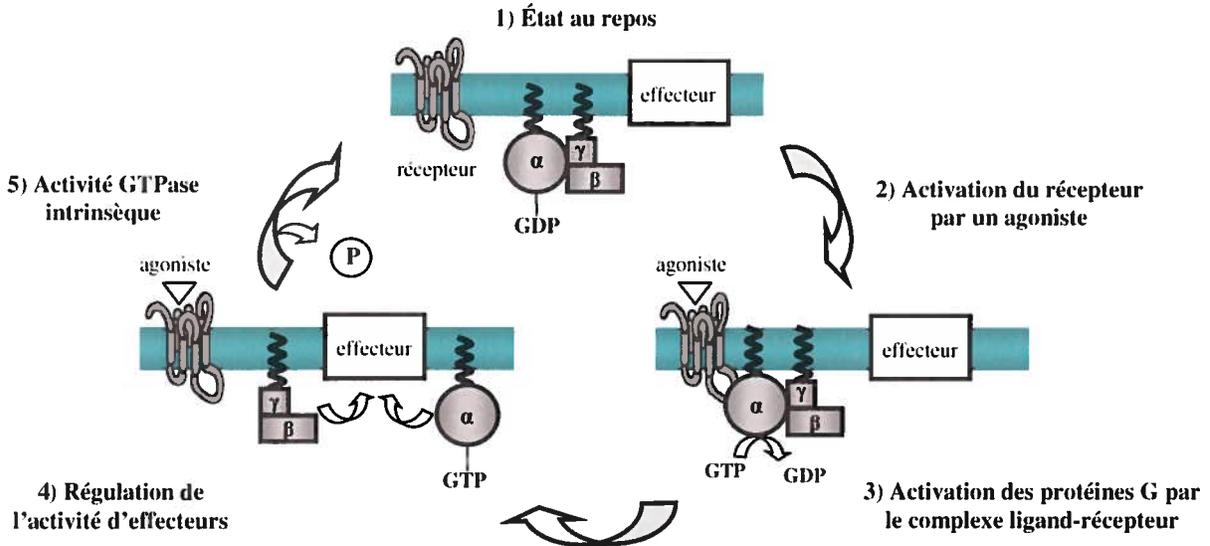


Figure 6 : Cycle de l'activation des protéines G.

Le cycle d'échange GDP en GTP se poursuit tant que le récepteur est activé ou que le système ne soit désensibilisé. La désensibilisation de la réponse induite par l'agoniste peut être causée par différents mécanismes comme la diminution de la concentration de l'agoniste, le découplage par phosphorylation du récepteur, l'internalisation du complexe agoniste-récepteur ou finalement la régulation négative du nombre de récepteurs à la surface cellulaire qui peut être provoquée par une diminution de la synthèse du récepteur ou par une augmentation de sa dégradation.

Les effets obtenus suite à l'activation des RCPGs dépendent principalement du type de protéines α . Les protéines $G\alpha$ sont répertoriées en 4 classes ($G_s\alpha$, $G_{i/o}\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ et $G_{12}\alpha$). D'une part, la protéine $G_s\alpha$ stimulerait l'adénylyl cyclase (AC), une enzyme membranaire qui catalyse la production d'AMPc, alors que la protéine $G_{i/o}\alpha$ agit à l'opposé en inhibant l'AC. D'autre part, les sous-unités de la classe $G_q\alpha$ sont connues pour l'activation de l'enzyme phospholipase C (PLC) responsable de l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et DAG. De plus, le complexe β/γ à qui on ne connaissait initialement aucun rôle, serait impliqué dans l'activation de phospholipases et de MAP-kinases. En résumé, les protéines G prennent en charge le transfert de l'information du récepteur vers des enzymes (AC, PLC) qui régulent ensuite l'activité selon le type de cellules dont il est question.

Les RCPGs font partie de la classe de récepteurs la plus ciblée dans le domaine de la recherche pharmaceutique. Le nombre de RCPGs connus ne cessent d'augmenter de même que l'intérêt porté sur l'étude de leurs mécanismes d'action. En effet, de meilleures connaissances à ce sujet seraient bénéfiques pour l'élucidation de certaines pathophysiologies auxquelles ces récepteurs sont associés. Enfin, l'identification de ligands pour les RCPGs «orphelins» pourrait également contribuer à la découverte de nouveaux médicaments.

1.2.2 Découverte des RCPGs nucléaires

Jusqu'à tout récemment les RCPGs étaient connus uniquement comme des entités protéiques localisées à la membrane plasmique des cellules, qui suite à leur activation par

un ligand extracellulaire, étaient responsables de la production de messagers secondaires. Ces messagers tels IP₃, DAG, Ca²⁺, AMPc et la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) participent ensuite à une cascade d'événements menant à une réponse comme l'apoptose, la prolifération et la division cellulaire. La plupart du temps, les RCPGs sont activés par un messager qui se lie à la partie extracellulaire du récepteur et la transduction du signal se fait via la voie Ras/MAPK qui mène à des modifications transcriptionnelles mitogènes.

Par contre, différentes études ont montré que certains ligands lipidiques connus pour activer un RCPG au niveau de la membrane plasmique pourraient également pénétrer à l'intérieur de la cellule et y activer un récepteur intracellulaire fonctionnel. Il a été démontré que les récepteurs des prostaglandines (PGE₂) (Bhattacharya *et al.*, 1998,1999; Gobeil *et al.*, 2002), du facteur d'activation des plaquettes (PAF) (Marrache *et al.*, 2002), de l'acide lysophosphatidique (LPA) (Gobeil *et al.*, 2003b) et de l'apéline (Lee *et al.*, 2004) étaient colocalisés à la membrane ainsi qu'à l'intérieur des noyaux de certaines cellules d'organes. Il en est de même pour des peptides comme le neuropeptide Y (NPY), l'endothéline (ET-1) et l'angiotensine II (Ang II). Leurs récepteurs respectifs Y₁ (Jacques *et al.*, 2003a), ET_A, ET_B, (Jacques *et al.*, 2005) AT₁ et AT₂ (Jacques *et al.*, 2003b) ont été localisés au niveau du noyau des cellules endothéliales endocardiques (CEE).

Diverses expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont été nécessaires afin d'élucider l'existence d'une localisation nucléaire ainsi que la fonctionnalité des RCPGs à cet endroit. Parmi celles-ci on retrouve l'immunohistochimie, la microscopie électronique et à fluorescence, l'analyse autoradiographique en utilisant des radioligands pour des essais de liaison ou des essais fonctionnels sur des tissus intacts, des cellules et des noyaux isolés.

1.2.3. Peptides vasoactifs et leurs RCPGs nucléaires.

Comme mentionné brièvement un peu plus tôt, les peptides NPY, ET-1 et Ang II ainsi que leurs récepteurs, bien connus pour leurs rôles au niveau de l'homéostasie

cardiovasculaire, ont été au centre de nombreux projets de recherche afin d'élucider la présence d'un RCPG intracellulaire. La plupart des expérimentations ont été menées sur une lignée de cellules endothéliales provenant de l'endocarde (CEE) de fœtus humain de 20 semaines ou de rats adultes.

Parmi les recherches effectuées sur le NPY, certaines ont permis de montrer que ce peptide est présent à l'intérieur des CEEs, au niveau du cytosol mais, aussi au niveau du noyau de ces cellules. On remarque, également, un marquage plus marqué au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire, incluant l'espace entre les deux membranes, en plus d'une colocalisation au niveau du ou des nucléoles (Jacques *et al.*, 2006). La distribution du peptide et de son récepteur Y₁ mesurée par immunofluorescence est perçue majoritairement au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire (Jacques *et al.*, 2003a).

L'ET-1 a également été localisée au niveau du noyau des CEEs et plus particulièrement au niveau des nucléoles (Jacques *et al.*, 2006). Les récepteurs de l'endothéline montrent toutefois des patrons de distribution différents. L'intensité de la fluorescence émise par le récepteur ET_B est principalement retrouvée à l'intérieur du noyau alors qu'en ce qui concerne le récepteur ET_A, la fluorescence mesurée est la même que ce soit dans le compartiment cytosolique de la cellule qu'au niveau nucléaire (Jacques *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus par mesure de la fluorescence concernant l'Ang II, indiquent que le peptide et le récepteur AT₁ sont présents de façon homogène dans la cellule, c'est-à-dire, autant au niveau nucléaire, cytosolique qu'à la membrane plasmique (Jacques *et al.*, 2003b). En revanche, le récepteur AT₂ est presque uniquement présent au niveau nucléaire. Ces observations suggèrent qu'AT₁ serait surtout actif au niveau de la membrane plasmique et qu'AT₂ régulerait certaines fonctions nucléaires telles que la synthèse de protéines (Bkaily *et al.*, 2003; Jacques *et al.*, 2003b).

Finalement, les peptides NPY, Ang II et ET-1 ont montré que l'activation de leurs récepteurs entraînait une libération de calcium tant au niveau nucléaire que cytosolique et que les concentrations calciques était similaires d'un compartiment à l'autre (Jacques *et al.*, 2003a, 2003b, 2005 et 2006). Cette libération de Ca²⁺ observée au noyau pourrait

ainsi contribuer à faire persister à plus long terme l'effet de ces peptides leur permettant de participer à certaines fonctions nucléaires de la cellule. Effectivement, le calcium nucléaire joue un rôle important dans la cellule, notamment au niveau de la réparation de l'ADN, de la condensation de la chromatine, de l'expression de gènes, de l'apoptose, de la prolifération ou de l'angiogénèse (Gherzi *et al.*, 2001; Jacques *et al.*, 2006). Ces phénomènes sont en partie dus à la mobilisation de protéines capables de lier le Ca^{2+} nucléaire comme la calmoduline, la calréticuline et la calpaïne (Malviya et Rogue, 1998). Ces protéines de liaison peuvent activer certaines kinases qui serviront à décoder le signal calcique au noyau par la phosphorylation de facteurs de transcription comme le «cAMP response element-binding proteins» (CREB) (Heist et Schulman, 1998).

Enfin, la présence des RCPGs au noyau offre aux peptides une protection contre la dégradation enzymatique qui peut se produire n'importe où ailleurs dans la cellule (Jacques *et al.*, 2006), de ce fait, cette nouvelle localisation des RCPGs constitue un système de signalisation nucléaire offrant de nombreux avantages.

1.2.4 Effets des RCPGs : membrane plasmique vs noyau

La découverte d'une localisation intracellulaire permet d'explorer de nouveaux mécanismes de signalisation pour les RCPGs. Les peptides et les récepteurs retrouvés au niveau nucléaire peuvent donc agir directement à l'intérieur du noyau, au lieu de seulement pouvoir procurer leurs effets via l'activation du récepteur à la membrane plasmique. Toutefois, la manière dont les peptides et leurs récepteurs sont générés à l'intérieur de la cellule et comment ils agissent demeure à être élucidé.

Des études sur le récepteur PAF montrent clairement des différences (membrane plasmique vs noyau) au niveau du type de protéine G auquel il est couplé. Le récepteur présent au niveau de la membrane plasmique est couplé à une protéine G_q alors que le récepteur présent au niveau du noyau est couplé à une protéine $G_{i/o}$ (Marrache *et al.*, 2002). De plus, lorsque le récepteur est situé à la membrane plasmique, il génère la

production d'inositol phosphate (IP) dépendant de la PLC, tandis que le récepteur présent au niveau du noyau, est responsable de l'inhibition de l'AC (Marrache *et al.*, 2002).

Parmi les expérimentations effectuées sur les CEEs, certaines ont fait la preuve que les récepteurs nucléaires des peptides NPY, Ang II et ET-1 montraient une sensibilité jusqu'à 10 fois plus grande face à leur ligand comparativement à leurs homologues présents à la membrane plasmique (Booz *et al.*, 1992, Bkaily *et al.*, 2000, 2002 et 2003). Aucune explication n'a été apportée jusqu'à présent concernant les différences de sensibilité observées chez ces peptides. Toutefois, diverses hypothèses demeurent à être vérifiées, dont la possibilité d'un réarrangement du récepteur au niveau nucléaire, favorisant ainsi la liaison avec son ligand spécifique.

L'équipe de Spano (2004) a mis en évidence que certaines différences au niveau de la fonctionnalité des récepteurs peuvent avoir des impacts importants pour l'établissement d'une thérapie spécifique. En effet, ils ont réussi à démontrer que le récepteur de chimiokine CXCR₄ est localisé au niveau du noyau des cellules tumorales alors qu'il est absent sur le noyau des cellules saines (Spano *et al.*, 2004).

Ces observations montrent que le repérage et l'identification du plus grand nombre possible de RCPGs nucléaires deviendra un outil essentiel dans le développement de molécules thérapeutiques.

1.2.5 Voie de signalisation des RCPGs nucléaires

La cascade signalétique observée suite à l'activation d'un RCPG nucléaire fait preuve de la fonctionnalité du récepteur et implique majoritairement l'enveloppe nucléaire. En effet, il a été observé que la membrane nucléaire ainsi que le nucléoplasme renferment un grand nombre de facteurs de signalisation qui participent à la transduction de signaux. Une localisation nucléaire a été identifiée pour les protéines G (G_s, G_i/G_o), les canaux ioniques (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Zn²⁺), les pompes et les échangeurs ioniques (pompe Na⁺/K⁺, Ca²⁺-ATPase échangeur Na⁺/Ca²⁺), ainsi que les différents effecteurs enzymatiques (PLA₂, PLC, PKC, PKA, AC, eNOS). Ce réseau de signalisation nucléaire

montre bien que le noyau peut être responsable d'une réponse cellulaire indépendamment de l'action de la membrane plasmique ou d'événements cytosoliques (Willard et Crouch, 2000; Bkaily *et al.*, 2003; Marrache *et al.*, 2004; Gobeil *et al.*, 2003a et 2006). De plus, certaines molécules effectrices localisées au niveau nucléaire, pourraient intervenir dans le processus de signalisation cellulaire associé à la transcription génique. Ces molécules incluent le facteur nucléaire NF- κ B, l'enzyme MAP kinase (Erk1, Erk2, Erk3) ainsi que les constituants du système PI-3 kinase/Akt (Marrache *et al.* 2002; Gobeil *et al.* 2003a et 2006).

1.2.6 Mécanisme de localisation nucléaire des RCPGs

Plusieurs questions sont encore sans réponse en ce qui concerne l'origine des RCPGs au niveau du noyau. Les mécanismes sous-jacents à cette localisation sont encore inconnus mais plusieurs possibilités peuvent être considérées.

De nombreux chercheurs ont suggéré que les récepteurs nucléaires étaient dérivés de la membrane plasmique (Yang *et al.*, 1997, Lu *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2000). Selon leurs hypothèses, le transfert des récepteurs membranaires vers le noyau, qu'ils soient liés à leur ligand ou non, serait attribuable à la présence d'une courte séquence d'acides aminés basiques (Lys et Arg) qui référerait à un signal de localisation nucléaire (SLN) (Yoneda *et al.*, 1999; Christophe *et al.*, 2000). Ces séquences sont retrouvées soit dans la 3^e boucle intracellulaire ou dans la 8^e hélice du 7^e passage transmembranaire comme il a été rapporté entre autres pour les récepteurs de l'angiotensine, l'endothéline, de la bradykinine et de l'apéline (Lu *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004).

D'autre part, les récepteurs peuvent être transportés dans la région périnucléaire ou nucléaire par le biais de protéines de transport qui elles, possèdent les résidus basiques habituellement retrouvés dans la séquence d'un SLN. Dans certains cas, le SLN peut même être fourni par le ligand, comme dans le cas du système PTHrP/PTH (Watson *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2000).

Des séquences de rétention endoplasmique pouvant participer à la distribution nucléaire ont également été observées au niveau du segment C-terminal du récepteur PAF

(NLSK³³⁸⁻³⁴¹) (Teasdale et Jackson, 1996). Ce type de séquence pourrait être impliqué dans le trafic vésiculaire et la translocation de récepteurs vers le noyau, comme il a été suggéré dans le cas de l'Ang II (Chen *et al.*, 2000)

Finalement, il est important de savoir qu'une localisation nucléaire n'est pas universelle pour tous les types de cellules exprimant un RCPG à leur surface. Par exemple, bien que le récepteur des prostaglandines EP₃ soit trouvé abondamment dans le cerveau, celui-ci n'est présent au niveau nucléaire que dans les cellules des microvaisseaux (Bhattacharya *et al.*, 1999). Ces observations montrent bien qu'il s'agit d'un phénomène faisant appel à des interactions entre des protéines intracellulaires spécifiques, selon le type cellulaire et la localisation de ces cellules dans l'organisme.

Pour l'instant, la conceptualisation de molécules ciblant les RCPGs ne tient pas compte des différences de localisation de ces récepteurs. L'exploration des RCPGs nucléaires ainsi que leurs rôles possibles au niveau physiopathologique reste à être clarifier afin d'ajuster le développement pharmacologique face à ce type de récepteur.

1.2.7 Objectifs de la recherche

L'urotensine-II (U-II) est un peptide vasoactif dont l'action biologique est médiée par un récepteur connu sous l'appellation UT, faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Jusqu'à tout récemment, ces récepteurs étaient décrits comme des protéines localisées à la membrane plasmique des cellules. Or, des études menées par différents groupes de recherche ont démontré une localisation nucléaire pour des RCPGs associés à des peptides tels l'angiotensine, la bradykinine et l'endothéline. De ce fait, comme l'U-II s'apparente de très près à ces familles de peptides, de par ses actions vasoactives, il est donc logique de croire que son récepteur UT, puisse se localiser également au noyau des cellules.

Le tissu cardiaque de rat a été ciblé pour ce projet. D'une part, l'équipe de Douglas (2003) a su démontrer que les niveaux d'expression de l'U-II était plus élevé dans le tissu myocardique de patients atteints d'insuffisance cardiaque (Douglas *et al.*, 2003). D'autre part, des études effectuées chez le rat montrent une hausse de l'U-II et de son récepteur au niveau du myocarde suite à un infarctus. Enfin, l'U-II a été identifiée comme étant responsable des différents changements pathologiques observés lors d'insuffisance cardiaque comme entre autres l'hypertrophie des cardiomyocytes et l'augmentation de l'expression de fibronectine et de collagène par ces derniers (Tzanidis *et al.*, 2003).

Notre hypothèse est donc que le récepteur UT puisse être présent au niveau des noyaux des cellules du tissu cardiaque de rat.

Afin de vérifier notre hypothèse, nos objectifs étaient donc de mettre au point une méthode permettant de mesurer l'affinité de l'*h*U-II pour son récepteur selon sa localisation membranaire ou nucléaire, d'évaluer la présence du récepteur UT au niveau du noyau des cellules et de vérifier si d'autres protéines cellulaires pourraient être capables d'interagir avec l'*h*U-II.

Pour ce faire, des fractions membranaires ainsi que des fractions enrichies de noyaux provenant de tissus cardiaques de rats ont été isolées. Des essais de liaison/compétition

utilisant le radioligand [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II ont été effectués afin d'évaluer l'affinité de l'hU-II pour ces différentes fractions. Des immunobuvardages de type Western utilisant un anticorps dirigé contre le récepteur UT ont également été réalisés sur les fractions membranaires et nucléaires.

D'autre part, nous avons effectué la synthèse peptidique de sondes biotinylées et photoactivables qui ont été radiomarquées à l'iode 125. Ainsi, nous avons pu utiliser la technique de photomarquage afin de procéder à la formation d'un complexe entre les sondes peptidiques et les extraits cellulaires. La présence de la biotine est nécessaire pour procéder à une purification selon l'affinité biotine-avidine. Les complexes formés, suite au photomarquage, entre les sondes radiomarquées et les protéines cellulaires ont été purifiés sur colonne d'avidine et révélés par autoradiographie grâce au signal de radioactivité émis.

L'identification d'une autre localisation pour le récepteur UT ou d'une nouvelle protéine interagissant avec l'hU-II contribuera à une meilleure compréhension du mode de fonctionnement de ce peptide.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Développement de sondes biotinylées photoactivables

2.1.1 Choix de la résine et du type de groupement protecteur

La synthèse peptidique en phase solide est une technique connue depuis longtemps pour la fabrication chimique de peptides et de petites protéines. Au début, cette technique utilisait des acides aminés (AA) possédant un groupement protecteur, le tert-butylloxycarbonyle (Boc), pour protéger la fonction amine de l'acide aminé à coupler et ainsi éviter l'ajout de plus d'un acide aminé à la fois. Un autre groupement protecteur a été développé un peu plus récemment, soit le 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), qui contrairement au Boc, est labile en milieu basique.

La chimie Boc a été privilégiée pour la synthèse des sondes photosensibles puisqu'elle est très efficace et que les Boc-AA sont beaucoup moins dispendieux que les Fmoc-AA. Dans le cadre de ce projet, 2 sondes peptidiques ont été synthétisées et chacune d'entre elles a subi la substitution d'un résidu par le groupement *p*-benzoyl-L-phénylalanine [Bpa] (position 3 et 4 de la séquence de l'*h*U-II). Une molécule de biotine ainsi qu'un espaceur aliphatique (acide aminohexanoïque) ont également été ajoutés au niveau de la portion N-terminale de la séquence du peptide.

2.1.2 Produits utilisés lors de la synthèse

Il existe plusieurs types de résines pouvant être utilisés pour la synthèse en phase solide par la chimie Boc. En ce qui concerne la synthèse des analogues de l'urotensine, une résine chlorométhylée de type Merrifield a été employée. Elle consiste en un polymère de styrène ponté avec du divinylbenzène auquel sont attachés des groupes chlorométhylés. Cette résine permet d'obtenir, suite au clivage, un peptide avec un groupement carboxy-terminal libre.

La résine chlorométhylée (1,2 méq/g) a été obtenue de la compagnie BioRad (Mississauga, ON). La chimie classique des peptides a été utilisée en suivant la stratégie Boc-TFA-HF. L'acide aminé Boc-L-Bpa, a été acheté de la compagnie Matrix Innovation (Montréal, QC). Les acides aminés Boc-Tyr(2-Br-Z), Boc-Asp(O-cHex), Boc-Phe et Boc-Thr(Bzl) provenaient de la compagnie Albatros Chem Inc (Montréal, QC), tandis que Boc-Glu(O-Bzl), Boc-Trp(For), Boc-Cys(Me-4-Bzl), Boc-Lys(2-Cl-Z) et Boc-6-Ahx (acide aminohexanoïque) ont été obtenus de Chem Impex International (Wood Dale, IL). Finalement, les acides aminés Boc-Pro et Boc-Val ont été fournis par Bachem (Torrance, CA) et la d-biotine a été achetée chez Sigma (St-Louis, MO).

L'agent de couplage, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium (Bop) et le diisopropyléthylamine (DIEA) ont été obtenus de Matrix Innovation (Montréal, QC). Les solvants de qualité ACS utilisés lors des synthèses et des purifications soit, l'acétonitrile (ACN), le dichlorométhane (DCM) le diméthylformamide (DMF), l'éthanol (EtOH), l'éther éthylique, le méthanol (MeOH) et le toluène proviennent de Fischer Scientific (Montréal, QC). L'acide trifluoroacétique (TFA) a été acheté chez PSIG polycentric service (Montréal, QC). Le *m*-crésol, le diméthylsulfure et le bicarbonate de césium ont été fournis par Aldrich (Milwaukee, WI), tandis que le diméthylsulfoxyde (DMSO) était de chez Sigma (St-Louis, MO) et que l'acide fluorhydrique (HF) était de Matheson Gas Products (Ottawa, ON). La synthèse a été réalisée dans des réacteurs de verre au moyen d'un synthétiseur semi-automatique fabriqué au laboratoire.

2.1.3 Principe de la synthèse sur phase solide

La synthèse d'une chaîne peptidique débute par la fixation du dernier acide aminé de la séquence peptidique via son groupe carboxylique, situé en C-terminal. Le couplage du premier acide aminé se fait sur des billes insolubles de résine via la formation d'un sel de césium. Le second acide aminé, dont la fonction aminée est protégée par un groupement chimique, est introduit dans le réacteur contenant la résine. Ainsi, le groupement COOH de l'acide aminé va réagir avec la fonction aminée libre du résidu

couplé précédemment, il se forme alors un dipeptide. La fonction aminée est toujours bloquée par un groupe protecteur qui sera éventuellement retiré avec un traitement acide. Ces étapes sont répétées successivement permettant l'insertion des autres acides aminés. Lorsque la synthèse du peptide est complétée, le dernier acide aminé peut alors être déprotégé et le peptide est clivé de la résine insoluble. Les groupements protecteurs portés par les chaînes latérales sont éliminés et le peptide libre est prêt à être purifié et caractérisé.

La présence des groupements protecteurs sur les chaînes latérales de certains acides aminés permet d'éviter des réactions secondaires telles que des branchements latéraux, des réactions d'oxydation ou d'acylation et fait en sorte d'augmenter le rendement de la synthèse. Le retrait des groupements protecteurs varie selon leur labilité et se produit dans des conditions assurant une spécificité réactionnelle. Ainsi, certains groupements sont retirés lors du clivage alors que d'autres résistent à ce traitement et sont retirés ultérieurement.

2.1.4 Couplage du premier acide aminé

Le couplage du premier acide aminé se fait à l'aide d'un sel de césium. Le césium (Cs^+) donne de meilleurs rendements de substitution sur la résine comparativement à d'autres dérivés alcalins tels le sodium, le potassium ou le lithium. Étant donné que le Cs^+ possède un rayon atomique plus important que les autres cations monovalents, ceci lui confère une faible densité de charge, une caractéristique facilitant sa pénétration à l'intérieur du milieu très hydrophobe formé par les billes de résine. Le sel de césium permet donc l'obtention d'un taux adéquat de substitution du premier acide aminé sur la résine chlorométhylée.

La préparation de ce sel, consiste à dissoudre le dernier acide aminé de la séquence peptidique dans une proportion de 3 éq par rapport aux taux de substitution de la résine dans un mélange d'éthanol : eau (4 : 1). Cette solution est ensuite titrée avec du bicarbonate de césium jusqu'à un pH de 7. Ce mélange est ensuite évaporé et asséché

en appliquant un azéotrope toluène-eau. Les cristaux obtenus sont dissous dans du DMF, en présence de résine et de 100 mg de KI par gramme de résine utilisée. Le couplage se fait en 20h à 50°C, sous agitation. La résine sur laquelle est couplé l'acide aminé est ensuite lavée avec du DMF, méthanol et éther puis séchée au dessiccateur rattaché à une pompe mécanique.

2.1.5 Détermination du taux de substitution sur la résine

Le taux de substitution du premier acide aminé sur la résine est déterminé à l'aide d'un test à l'acide picrique. Pour ce faire, 20 mg de résine-AA sont pesés précisément et introduits dans une mini colonne de verre munie d'un robinet. La première étape est la déprotection de l'amine- α porteuse d'un groupement Boc. La résine est tout d'abord lavée trois fois avec 4 mL de DCM et une fois avec 4 mL d'une solution 40% TFA/DCM. Ensuite la déprotection est poursuivie pendant 20 minutes dans un autre volume de 4 mL de 40% TFA/DCM.

La deuxième étape du test à l'acide picrique est la neutralisation de l'amine- α . La solution de TFA/DCM est retirée et plusieurs lavages sont réalisés afin de laver et ensuite neutraliser l'acide aminé-résine. Le protocole utilisé consiste à laver avec 1 x 4 mL 40% TFA/DCM, 5 x 3 mL de DCM, 2 x 4 mL DCM :dioxane (1 :1), 4 x 3 mL de DCM et 2 x 4 mL DIEA 5 % dans le DCM. La réaction de neutralisation s'obtient avec 4 mL de DIEA 5% pendant 5 min.

La troisième étape est la formation du sel entre l'amine- α et l'acide picrique. Avant cette étape, la résine est lavée avec 5 x 3 mL de DCM. Ensuite, la réaction acide-base est amorcée avec une solution 0,05 M acide picrique/DCM (1 min) et la réaction est reprise dans 4 mL de cette même solution pendant 10 min. L'excès d'acide picrique est ensuite enlevé à l'aide de 4 x 4 mL de DCM, 4 x 3 mL d'éthanol absolu et 4 x 3 mL de DCM.

Finalement, un volume de 10 mL d'une solution de 5% DIEA/DCM est ajouté dans la colonne afin de déplacer l'acide picrique lié à l'amine- α de l'acide aminé et de former un sel stable entre l'acide et le DIEA. La résine est par la suite lavée avec de l'éthanol jusqu'à ce que la solution récoltée devienne incolore. Le volume de filtrat est recueilli dans une fiole jaugée et complété à 100 mL avec de l'éthanol absolu. Le picrate, par son absorbance à 358 nm permettra d'établir la quantité de sel formé avec l'amine- α . Il suffit ensuite de faire un calcul pour obtenir en mmole/gramme de résine, le taux de substitution.

Calcul du taux de substitution:

$$\text{mmole/g} = \frac{\text{Absorbance} \times 10^5}{16250 \times \text{poids de l'aliqot de résine utilisé}}$$

2.1.6 Cycle de synthèse

Les acides aminés sont ensuite couplés, un à la suite de l'autre, en cinq étapes. La déprotection de l'amine- α , la neutralisation de celle-ci, la réaction de couplage, les lavages et finalement la vérification avec un test de Kaiser, permet de déterminer si le couplage est complet (Tableau III). Ce cycle est refait autant de fois qu'il y a d'acides aminés à ajouter à la résine.

Déprotection de l'amine terminale

Les acides aminés sont protégés au niveau de l'amine ce qui empêche l'ajout de plus d'un acide aminé à la fois dans la chaîne peptidique. Lorsqu'un autre acide aminé doit être inséré, il faut procéder à la déprotection de cette amine, en deux étapes. Premièrement, une déprotection de 5 min est exécutée avec une solution 40% TFA/DCM sous agitation d'azote. Après avoir drainé le contenu, la même solution est mise en présence de la résine pendant 20 min additionnelles. Des lavages subséquents de 2 min au DCM (2 fois), à l'EtOH et au DCM (2 fois) sont ensuite nécessaires pour enlever toute trace d'acide dans les réacteurs.

Neutralisation

L'amine terminale de la séquence peptidique est maintenant libre pour l'ajout d'un acide aminé. Il faut premièrement neutraliser celle-ci, puisque lors de la déprotection en milieu acide elle s'est chargée positivement. La déprotonation de l'amine se fait en présence d'une base organique, soit 1% (v/v) DIEA/DMF pendant 2 min, et cette étape est suivie d'un lavage de 2 min au DMF. La chaîne peptidique est maintenant prête au couplage de l'acide aminé suivant.

Couplage

L'ajout d'acide aminé à la séquence peptidique requiert la présence d'une base non nucléophile, soit le DIEA, qui permet la formation d'un carboxylate sur l'acide aminé à coupler. Cette réaction est indispensable au couplage. Une fois la fonction carboxylate obtenue, la réaction d'activation à l'aide d'un agent de couplage, le Bop, peut avoir lieu. Cette activation se fait par l'ajout d'un benzotriazole sur le carboxylate. L'ester activé permet ensuite une attaque nucléophile par l'amine terminale sur le carboxylate de l'acide aminé à coupler. Les réactifs de couplage sont toujours utilisés en excès pour s'assurer de l'efficacité de la réaction. Donc, 3 éq d'acide aminé sont dissous dans un volume minimal de DMF puis 3 éq de Bop ainsi que 5 éq de DIEA sont ajoutés avant d'être versés dans les réacteurs avec la résine pour une durée de 30 à 60 min selon le degré d'efficacité du couplage.

Vérification

Le test de Kaiser est un test qualitatif qui permet de savoir si la réaction de couplage est complète, en vérifiant la présence d'amines libres sur un aliquot de peptide-résine. La ninhydrine réagit avec celle-ci pour donner une coloration bleue. Une petite quantité de résine est déposée dans une éprouvette en présence de ninhydrine, pyridine/KCN et phénol et est chauffée 5 min à 110°C. Lorsqu'aucune amine libre n'est détectée, le cycle de synthèse est répété jusqu'à l'assemblage complet du peptide (tableau III). Dans le cas contraire, le couplage de l'acide aminé est repris.

Tableau III : Cycle de couplage des acides aminés.

Étapes du cycle	Réactifs	Temps
Déprotection de l'amine terminale	40% (v/v) TFA/DCM	1 x 5 min
	40% (v/v) TFA/DCM	1 x 20 min
Lavages	DCM	2 x 2 min
	EtOH	1 x 2 min
	DCM	2 x 2 min
Neutralisation	1% (v/v) DIEA / DMF	1 x 2 min
Lavage	DMF	1 x 2 min
Couplage	3 éq. Boc-AA 3 éq. BOP 5 éq. DIEA	Volume minimal DMF
		1 x 30 min ¹
Lavages	DMF	2 x 2 min
	DCM ²	2 x 2 min
Test de Kaiser	Ninhydrine, Phénol, Pyridine/KCN	5 min

¹ Le temps de couplage d'un acide aminé peut varier.

² Entre les couplages, les peptides-résines sont conservés dans du DCM.

2.1.7 Clivage du lien peptide-résine

Lorsque la synthèse de toute la séquence peptidique est terminée, la résine est lavée 4 fois avec du DCM, 2 fois avec du méthanol, 4 fois avec du DCM et finalement 3 fois avec de l'éther. La résine est ensuite séchée toute une nuit au dessiccateur, puisque la réaction de clivage nécessite un milieu anhydre.

Une fois la résine sèche, elle est déposée dans un réacteur en présence de *m*-crésol et de diméthylsulfure (1mL/g de résine). Ces produits ont des rôles de capteurs de carbocations, ce qui minimise les réactions secondaires à cette étape. Le lien ester unissant la séquence peptidique et la résine est alors clivé en milieu acide au moyen de

l'acide fluorhydrique (HF). Après avoir fait le vide complet dans les réacteurs, le HF est ajouté à l'intérieur de ces derniers par condensation (10 mL/g de résine). La réaction a lieu sous agitation, à 4°C, pendant une heure. Le HF est évaporé rapidement suite à cette étape. Le clivage en ces conditions permet d'obtenir le peptide libre ainsi que le retrait de la plupart des groupements protecteurs. Le peptide libre est ensuite lavé plusieurs fois avec de l'éther, solubilisé dans du TFA et récupéré par filtration pour le séparer des billes de résine. Le TFA est évaporé sous vide pour ensuite provoquer la précipitation et le lavage du peptide à l'aide d'éther. La fine poudre ainsi obtenue est conservée à -20°C jusqu'aux étapes suivantes. La masse des peptides peut finalement être vérifiée à l'aide d'une analyse par spectroscopie de masse (MALDI-TOF) (voir 2.1.11).

2.1.8 Cyclisation

Les cystéines libres des analogues de l'hU-II peuvent former par un pont disulfure suite à une réaction d'oxydation en présence de DMSO. Les peptides sont préalablement solubilisés dans un volume minimal d'une solution 50% DMSO/tampon phosphate (PBS). Le pH est ajusté à 9,0 avec du NH₄OH et le tout est ensuite dilué dans l'eau afin d'obtenir une concentration finale de 0,2% DMSO. La réaction de cyclisation s'effectue pendant 60 min, à la température de la pièce. Le pH est finalement ajusté à 5,0 afin de procéder à la purification des peptides par CLHP préparative sur phase inverse.

2.1.9 Déformylation du tryptophane

La dernière réaction nécessaire pour l'obtention du peptide pur est la déprotection du résidu Trp dont l'indole porte un groupement formyle. Le peptide lyophilisé est dissous à une concentration de 0,3 mg/mL dans une solution aqueuse contenant 0,1N de pipéridine (Produits chimiques A et C, Montréal, QC). La réaction se fait sous agitation à 4°C pendant 15 min et est arrêtée en diluant la solution dans un grand volume d'eau (2L).

2.1.10 Première purification

La purification des sondes synthétisées est effectuée au moyen d'un système CLHP préparatif Waters Prep LC500A, jumelé à des pompes de modèle Waters 590 et à un détecteur d'absorbance 441 (longueur d'onde à 230 nm). La solution contenant les peptides à purifier est injectée sur une colonne Phenomenex Jupiter C-18, 15 μ m, 300Å. Le matériel est ensuite élué au moyen d'un gradient linéaire de 10 à 60% ACN/H₂O - 0,05% NH₄OH en 120 min. Le débit est maintenu à 20 mL/min.

Des fractions de 5 mL sont récoltées lors de la purification et sont ensuite analysées par CLHP analytique au moyen d'un système Beckman de modèle Gold avec un détecteur modèle 168 réglé à 215 nm et relié à une colonne Phenomenex Gemini 5 μ m, C₁₈ 110 Å. L'éluion est effectuée selon un gradient linéaire de 20 min allant de 20 à 60% ACN/H₂O - 0,06% TFA à un débit de 1 mL/min. Les fractions sont ensuite regroupées, évaporées et lyophilisées selon la nature du produit et sa pureté.

2.1.11 Spectrométrie de masse

Les peptides synthétisés sont analysés par spectrométrie de masse, au moyen de la technologie MALDI-TOF «*Matrix Assisted Laser Desorbition Ionization-Time Of Flight*». Le spectromètre utilisé est de marque Voyager DE, Perseptive Biosystem (Farmingham, MA). Lors de l'analyse, le laser est réglé à 337 nm, le voltage d'accélération à 20 kV et l'acquisition à 20 pulses/sec. La matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (Aldrich, Milwaukee, WI) a été utilisée pour les analyses. Le calibrant utilisé préalablement aux analyses est une solution contenant l'angiotensine-1, les fragments 7-38 et 18-39 de l'hormone adrénocorticotropique et l'insuline bovine.

2.2 Évaluation de l'activité biologique des peptides

2.2.1 Culture cellulaire

Les cellules utilisées pour l'évaluation de l'activité biologique des analogues de l'*hU-II* ont été fournies par la compagnie Euroscreen (Bruxelles, BE). Il s'agit de cellules CHO-K1 (cellules d'ovaire de hamsters chinois) transfectées de façon à surexprimer conjointement le récepteur *hUT* et la protéine aequorine capable de bioluminescence. Les produits utilisés pour la culture ont été fournis par la compagnie Sigma (St-Louis, MO) soit : le milieu de culture HAM-F12 et le milieu modifié Dubelco-Eagle (DMEM), le sérum de veau fœtal (SVF), le G418 (géniticine), le mélange pénicilline/streptomycine, la trypsine/EDTA, le fongizone (Amphotérine B), la puromycine et la BSA (albumine de sérum bovin). Les bouteilles de culture cellulaire utilisées provenaient de la compagnie Sarstedt (Montréal, QC).

La lignée cellulaire a été reçue congelée dans un vial contenant 95% de milieu de culture HAM-F12 additionné de 5% de DMSO. Les cellules ont été décongelées à 37°C pendant 2 minutes et centrifugées à 1000g pendant 10 min dans le but de retirer le DMSO. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans le milieu HAM-F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 400 µg/mL de G418 (géniticine), 100 IU/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 2,5 µg/mL de fongizone (Amphotérine B) et 5µg/mL de puromycine. Elles ont ensuite été transférées dans un flacon de culture (75 cm²) propre aux cellules adhérentes, i.e avec une surface de culture préalablement traitée, «Cell+».

Ces cellules ont par la suite été placées dans un incubateur à 37°C avec 5% CO₂ jusqu'à ce qu'elles aient adhéré et atteint la confluence. Cette étape constituait le passage P0. Après une incubation d'environ 2 ou 3 jours, les cellules confluentes ont subi un premier passage. Le tapis cellulaire a été décollé avec 2mL d'une solution de 0,05% trypsine/ 0,02% EDTA et l'action de la trypsine a été neutralisée par l'ajout de 8 mL de milieu de culture. Les cellules détachées du flacon ont été concentrées par

centrifugation (1500g pendant 10 min) et resuspendues dans une proportion 1:10 dans le milieu de culture HAM-F12. Ce nouveau flacon correspond au passage P1. Le maintien des cultures a été effectué de cette façon tout au long de l'expérience.

Des aliquots de cellules ont été congelés après les quelques premiers passages à raison de 1-2 millions de cellules/mL afin d'assurer l'approvisionnement de la lignée cellulaire. Le milieu de congélation utilisé est composé de 95% de milieu de culture additionné de 5% DMSO.

2.2.2 Mesure de l'activité biologique par bioluminescence

Le phénomène de bioluminescence a été mis en évidence chez la méduse *Aequoria victoria* au cours des années 60. L'extraction et la purification de la protéine aequorine a permis de démontrer son rôle dans la luminescence naturelle de cet organisme. On connaît maintenant l'aequorine comme un complexe moléculaire formé d'apoequorine, d'oxygène moléculaire et d'un chromophore, la coelentérazine. L'apoequorine est une protéine possédant trois sites de haute affinité pour le calcium. Lorsque les ions Ca^{2+} se lient à la protéine, celle-ci subit un changement conformationnel permettant l'oxydation de la coelentérazine en coelentéramide qui est alors excité. De manière *in vitro*, la réaction se termine par l'émission d'une lumière bleue, avec un pic à 469nm et d'une molécule de CO_2 (figure 7).

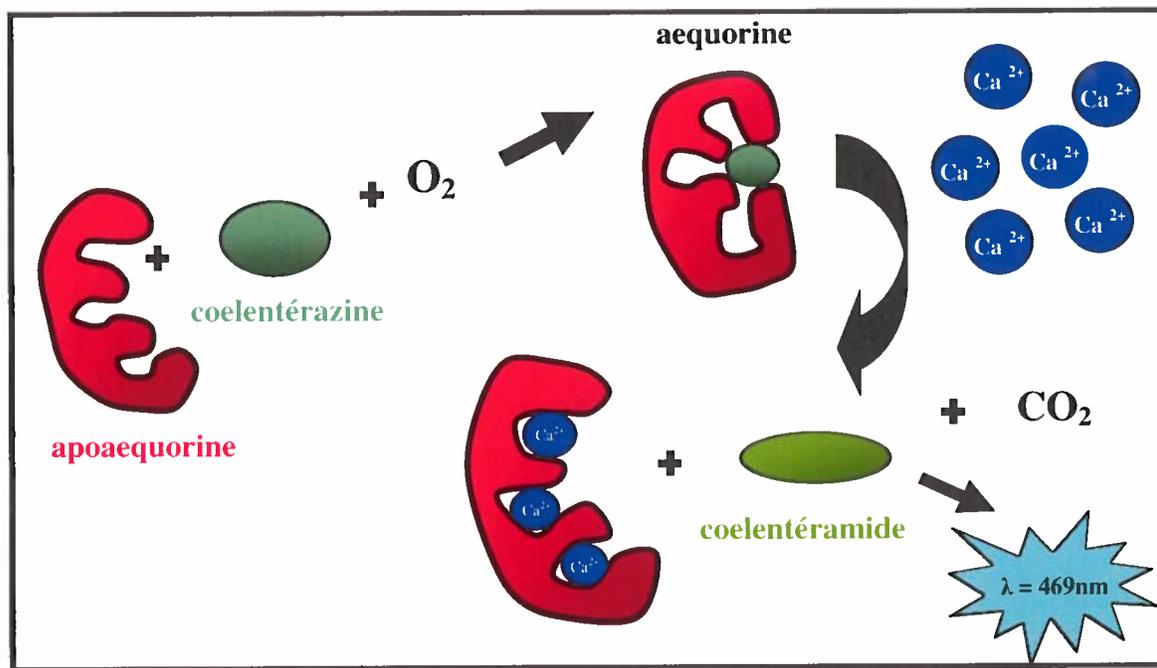


Figure 7 : Mécanisme de bioluminescence de l'aequorine.

L'activité biologique des peptides a été évaluée à partir de cellules CHO-K1 décrites dans la section 2.2.1 et le protocole utilisé est celui fourni par la compagnie Euroscreen. Les cellules à mi-confluence sont détachées à l'aide d'un râteau à cellules dans une solution de 5mM EDTA-PBS, centrifugées à 1500g et suspendues dans un milieu DMEM/HAM-F12 (avec Hapes sans rouge de phénol) supplémenté de 0,1% BSA, ainsi que de : 100IU/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine et 2,5 µg/mL fungizone (Amphotérine B). Les cellules sont comptées à l'hémacymètre, centrifugées et suspendues dans le milieu DMEM/HAM-F12 supplémenté de BSA afin d'obtenir une concentration finale de 5×10^6 cellules/mL. Le substrat coelenterazine *h* (Calbiochem, Gibbstown, NJ), provenant d'une solution mère à 500 µM diluée dans le méthanol, est ajouté aux cellules pour une concentration finale de 5 µM. Les cellules sont placées dans un tube protégé de la lumière afin d'éviter la dégradation du substrat et incubées pendant 4 h à température de la pièce sur un appareil à rotation afin de reconstituer l'aequorine sous sa forme active. Par la suite, les cellules sont diluées 10 fois dans le milieu de culture supplémenté en BSA et mis sous agitation pendant 30 min à température de la pièce.

Pendant ce temps, des concentrations croissantes de peptides à analyser ont été diluées dans le milieu DMEM/HAM-F12 supplémenté de BSA et distribuées en duplicata dans une plaque opaque à luminescence de 96 puits (Dynex, Chantilly, VA). La digitonine (Calbiochem, Gibbstown, NJ) est utilisée comme contrôle positif (100% de luminescence) à une concentration finale de 50 μ M. Un volume de 50 μ L de cellules/puits (25 000 cellules) a été injecté dans les puits contenant les différentes concentrations de peptides à analyser ainsi que dans ceux contenant la digitonine. La lumière émise est mesurée pendant 20 sec immédiatement après l'injection des cellules dans chacun des puits. Le lecteur de microplaque Synergy HT et le logiciel KC4 de la compagnie Bio-Tek Instruments (Winooski, VT) ont été utilisés pour mesurer la luminescence libérée. L'intensité de la lumière émise est représentée par une courbe concentration-réponse du pourcentage de bioluminescence mesurée suite à l'action de la digitonine, en fonction de la concentration de peptides. Le logiciel utilisé pour l'analyse des courbes est GraphPad Prism 4.

2.3 Isolation des fractions membranaires/nucléaires à partir de cardiomyocytes et évaluation de l'affinité des sondes biotinylées photoactivables.

2.3.1 Animaux et produits utilisés

Les cardiomyocytes ont été isolés de rats mâles Spragues Dawley de 250g obtenus de la compagnie Charles River (St-Constant, QC). Le Somnotol[®] employé pour anesthésier les animaux a été acheté chez CDMV (St-Hyacinthe, QC). Les produits utilisés dans la composition des tampons qui ont servi à l'isolation des fractions membranaires et nucléaires provenaient de la compagnie Sigma (St-Louis, MO).

Tampon A : 10 mM Hepes-Na pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 1mM DTT; 1mM PMSF et 0,1% (v/v) cocktail d'inhibiteurs de protéases composé d'AEBSF (fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle), d'aprotinine, de leupeptine, de bestatine, de pepstatine A et d'E-64.

Tampon B : tampon A + 0,1% (v/v) Triton X-100

Tampon C : 20mM Hepes-Na pH 7,9; 25% (v/v) glycérol; 0,42M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA; 0,5 mM DTT; 1 mM PMSF et 0,1 % (v/v) cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Tampon PBS : 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄; pH 7,4.

2.3.2 Isolation de la fraction membranaire et nucléaire des cardiomyocytes

Les rats sont sacrifiés en sectionnant l'aorte abdominale suite à une anesthésie au Somnotol (0,1 mg/kg). Le cœur est ensuite prélevé et conservé dans un tampon phosphate (PBS) à 4°C. Les cœurs sont rincés avec du PBS, sectionnés en morceaux, pulvérisés dans l'azote liquide et broyés avec l'aide d'un mortier. La poudre fine ainsi obtenue a été suspendue dans 10 mL de tampon A. Les manipulations subséquentes ont été effectuées sur glace.

Un homogénéisateur à tissu Tekma Tissumizer, modèle SDT (Cincinnati, OH) a été utilisé à la moitié de la vitesse maximale : 2 x 15 sec pour l'obtention d'un mélange homogène. Ce mélange a ensuite été centrifugé à 500g pendant 15 min afin de retirer le plus de débris possible. Le surnageant (fraction 1), a été conservé et incubé 10 min sur glace et centrifugé à 2000g, pendant 15 min. Le surnageant résultant de cette séparation correspond à la fraction membranaire enrichie (fraction 2) qui a été aliquotée et conservée à -80°C. Le culot (fraction 3) faisant référence à la fraction nucléaire brute est resuspendu dans 5 mL de tampon B (tampon A + 0,1% (v/v) Triton X-100), incubé sur glace 10 min et centrifugé à 2000g pendant 15 min. Le surnageant est retiré et le culot (fraction 4), correspondant à la fraction enrichie en noyaux, est resuspendu dans 1 mL de tampon C. Les aliquots sont placés dans des vials cryogéniques, gelés dans l'azote liquide et entreposés à -80°C.

2.3.3 Dosage des protéines des fractions membranaires et nucléaires

Chacune des fractions obtenues a été dosées pour son contenu en protéine selon la méthode de Lowry à l'aide de la trousse «*DC protein assay*» obtenue de la compagnie Bio-Rad (Hercules, CA). Les directives du fabricant ont été appliquées sans modification via l'utilisation de deux réactifs, soit une solution alcaline de tartare de cuivre (réactif A) ainsi que le réactif de Folin prédilué (réactif B). Une courbe standard préparée à l'aide d'une solution commerciale de BSA est utilisée pour calculer la concentration protéique des échantillons dosés. La réaction a été effectuée en duplicata dans une microplaque-UV de 96 puits à l'intérieur de 15 min et l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 750 nm à partir d'un lecteur de plaque multipuits Power Wave_x Bio-Tek Instruments (Winooski, VT) associé au logiciel KC Junior.

2.3.4 Marquage des peptides au Na¹²⁵I

La sonde choisie pour le radiomarquage et pour la suite des expérimentations a été le N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-*hU-II*) étant donné qu'elle possède une activité biologique équivalente à celle du peptide natif *hU-II*. Les peptides à radiomarquer (*hU-II* et N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³-Tyr(¹²⁵I)⁹]-*hU-II*) ont donc été solubilisés dans du tampon phosphate 0,05M (pH 7,4) à une concentration de 1 mg/mL. La réaction de marquage a été réalisée avec 25µg de peptide, 1 mCi Na¹²⁵I et 5 µg de chloramine-T dans un volume réactionnel de 40µL. Grâce à l'action de la chloramine-T, l'iode est oxydé et il réagit avec le groupement phénol de la chaîne latérale de la tyrosine située en position 9 de la séquence du peptide. La réaction entre le Na¹²⁵I et la chloramine-T est arrêtée après 45 sec par l'ajout de 200µg de bisulfite de sodium dissous dans 100µl de tampon phosphate 0,05M (pH 7,4). Le Na¹²⁵I a été acheté de la compagnie GE Healthcare (Montréal, QC), la chloramine-T de Fischer Scientific (Montréal, QC) et le bisulfite de sodium a été obtenu de Sigma (St-Louis, MO).

Le peptide radiomarqué est immédiatement purifié sur une cartouche de type Sep-Pack C₁₈ de 1 mL/100mg (Resprep, Bellefonte, PA). La cartouche est initialement conditionnée avec 3 mL de méthanol puis 3 mL d'une solution 10% d'ACN/H₂O-0,06% TFA. Suite à l'injection du peptide radiomarqué dans la cartouche, des lavages sont effectués : 3x 500µL de solution 10% d'ACN/H₂O- 0,06% TFA. L'élution a été obtenue selon un gradient allant de 10% à 50% ACN/H₂O-0,06% TFA en 40 min, à un débit constant de 1 mL/min. Des fractions de 500 µL ont été récoltées aux 30 sec et analysées à l'aide d'un compteur gamma de la compagnie Packard (Downers Grove, IL). Les fractions les plus radioactives sont conservées et diluées 1 : 2 dans le tampon phosphate 0,05M (pH 7,4) puis gardées à -20°C. La concentration peptidique contenue dans chaque fraction a été établie en fonction de l'activité spécifique de ¹²⁵I soit 2200 mCi/mmol.

2.3.5 Électrophorèse, transfert et immunobuvardage de type Western

La technique d'immunobuvardage de type Western a été nécessaire afin d'évaluer le niveau d'enrichissement des fractions nucléaires et membranaires ainsi que pour vérifier la présence du récepteur UT dans les différentes fractions cellulaires. La séparation des protéines sur gel a été réalisée par électrophorèse de type SDS-PAGE. Ce type d'électrophorèse permet la séparation des molécules protéiques selon leur poids moléculaire. Pour ce faire, les protéines doivent d'abord être dénaturées, par une molécule fortement chargée négativement, le dodécylsulfate de sodium (SDS). La vitesse de migration des molécules enrobées de SDS dépend alors principalement de la taille de la chaîne protéique.

Les échantillons ont préalablement été chauffés à 95°C pendant 5 min pour assurer la dénaturation des protéines. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés *Precision Plus Protein*[®], ont été obtenus de la compagnie Bio-Rad (Hercules, CA). La quantité de protéines chargée sur un mini gel de polyacrylamide 10% (8cm x 7,3 cm) dans chacun des puits était d'environ 100µg/puits. Suite à la séparation, un transfert sur membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) a été accompli au moyen d'un système de transfert obtenu de la compagnie Bio-Rad. Le transfert a été effectué à un voltage de 100V pendant 1 h.

Les protéines transférées sur la membrane ont ensuite été incubées à température de la pièce pendant 1 h, sous agitation dans une solution de blocage composée de 5% de lait en poudre dans un tampon TBST, décrit à l'appendice A. Des lavages successifs (3 x 10 min) effectués avec du tampon TBST ont permis de nettoyer la membrane avant d'y ajouter la solution d'anticorps primaire. Différents types d'anticorps de lapin polyclonaux ont été utilisés selon une dilution qui leur est propre (voir appendice A) afin de détecter la présence de protéines spécifiques à certains compartiments cellulaires. Les étapes de l'immunobuvardage demeurent les mêmes peu importe le type d'anticorps utilisé. La membrane a donc été incubée toute la nuit dans une solution d'anticorps primaire à 4°C, en maintenant une légère agitation. Des lavages ont été

effectués après cette première étape de réaction et l'anticorps secondaire a ensuite été incubé avec la membrane, pendant 1 h à température de la pièce avec une agitation continue.

L'anticorps secondaire utilisé pour reconnaître l'anticorps primaire était un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase et dilué 1 : 2000 dans la solution de blocage (voir appendice A). Après cette dernière incubation, la membrane a été lavée et soumise à une solution de chimioluminescence (SuperSignal[®]WestPico) fournie par la compagnie Pierce (Rockford, IL). La révélation a été effectuée selon les directives du fabricant en utilisant un mélange des substrats selon un ratio 1 : 1 (2 mL/membrane de 6cm x 9cm) suivi d'une exposition de 5 min à l'abri de la lumière. La membrane a ensuite été exposée à une pellicule radiographique (UXR, Dorval, QC) pour une période de temps allant de 1 à 10 min selon le type d'anticorps utilisé et l'intensité du signal recherchée. Le développement des pellicules radiographiques a été réalisé à l'aide d'un développeur automatique de marque Kodak X-OMAT 1000A processor, (Maranda Lauzon, Laval, QC).

2.3.6 Évaluation de l'affinité de hU-II pour les fractions membranaires vs nucléaires

La méthode de saturation permet de quantifier l'affinité d'un ligand pour son récepteur en déterminant la valeur de K_D . Pour ce faire, des quantités croissantes de ligands radiomarqués sont mises en présence d'une quantité fixe de récepteurs afin de déterminer la liaison totale. Ensuite, l'expérience est reprise, cette fois en ajoutant une quantité fixe mais en excès du ligand froid. Cette démarche permet d'évaluer la liaison non-spécifique. Pour chaque concentration de ligand radiomarqué utilisée, la différence entre les deux valeurs obtenues détermine la liaison spécifique. Normalement, on obtiendra une saturation des sites de liaison et le K_D correspond à la concentration de ligands radiomarqués nécessaire pour occuper 50% des récepteurs. Malheureusement, cette méthode nécessite une quantité importante de ligand radiomarqué. Dans le cadre de cette étude, nous avons donc choisi d'utiliser le déplacement d'un ligand

radiomarqué par le ligand froid afin d'avoir une appréciation de l'affinité de liaison. Les résultats obtenus seront donc exprimés en termes de IC_{50} , une valeur exprimant la concentration nécessaire pour déplacer 50% d'une quantité arbitraire de ligand radiomarqué. Donc, afin d'évaluer l'affinité du peptide envers les fractions membranaires des cardiomyocytes comparativement aux fractions nucléaires, nous avons donc effectué des essais de liaison avec le peptide radiomarqué $[Tyr^{(125}I)^9]hU-II$ et le peptide froid ($hU-II$). Le radiomarquage du peptide $hU-II$ a été obtenu selon les étapes décrites à la section 2.3.4.

La réaction de liaison a été réalisée dans un tube conique Eppendorf de 2mL en combinant une concentration constante ($10^{-10}M$) de $[Tyr^{(125}I)^9]hU-II$ (une concentration voisine de la valeur de K_D de plusieurs peptides) et des concentrations croissantes de $hU-II$ froid allant de $10^{-11}M$ à $10^{-6}M$, cette dernière concentration étant bien supérieure à la valeur de K_D d'une vaste majorité de peptides.

Les peptides ont d'abord été solubilisés dans un tampon de liaison composé de : 50 mM Tris-base pH 7,4; 100mM NaCl; 10mM $MgCl_2$; 0,1% (p/v) BSA; 1mM PMSF (Sigma, St-Louis, MO) à une concentration initiale de 1mg/mL. La masse molaire de $hU-II$ est de 1388g/mol, donc une solution de 1mg/mL correspond à $7,2 \times 10^{-4}M$. C'est à partir de cette solution que des dilutions en série ont été réalisées. La quantité de protéines utilisée pour ces essais a été de 150 μg et le volume réactionnel total a été complété à 500 μL avec du tampon de liaison.

Tableau IV : Protocole employé pour les essais de liaison.

	Concentration finale					
$[Tyr^{(125}I)^9]hU-II$	$1 \times 10^{-10}M$	$1 \times 10^{-10}M$	$1 \times 10^{-10}M$	$1 \times 10^{-10}M$	$1 \times 10^{-10}M$	$1 \times 10^{-10}M$
$hU-II$	$1 \times 10^{-11}M$	$1 \times 10^{-10}M$	$1 \times 10^{-9}M$	$1 \times 10^{-8}M$	$1 \times 10^{-7}M$	$1 \times 10^{-6}M$
Protéines	150 μg	150 μg	150 μg	150 μg	150 μg	150 μg
Tampon liaison	Compléter pour un volume total de 500 μL					

L'incubation de chacun des mélanges réactionnels a été effectuée à température de la pièce pendant 2 h sous agitation (rotation). Une fois l'incubation terminée, la réaction de liaison a été arrêtée en filtrant rapidement le contenu de chacun des tubes sur des filtres en microfibrilles de verre de 25 mm (Whatman, Kent, UK) à l'aide d'un appareil de filtration couplé à une pompe à succion mécanique (Millipore Corporation, Billerica, MA). Chacun des filtres a été lavé avec 4 x 5 mL de tampon de lavage (25 mM Tris-HCl) gardé sur glace. Les filtres avaient préalablement été incubés pendant 2 h, dans une solution de lait 5% (p/v) dissous dans un tampon 50mM Tris-HCl afin de réduire les risques de liaison non-spécifique sur le filtre.

Suite aux lavages, les filtres ont été récupérés soigneusement et la radioactivité émise par chacun des filtres a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma de la compagnie Packard (Downers Grove, IL). Le pourcentage de liaison spécifique a ensuite été calculé avec le logiciel Graph Pad Prism 4,0.

2.3.7 Évaluation du déplacement du peptide [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II

Le pourcentage de déplacement de liaison de [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II face aux fractions membranaires et nucléaires a été mesuré en effectuant des essais de compétition contre différents peptides soient l'hU-II froid, l'urantide [Pen⁵,DTrp⁷,Om⁸]hU-II(4-11), un antagoniste du récepteur UT, et [Ala⁴]-PACAP 38 utilisé comme contrôle étant donné que le récepteur de ce peptide ne fait pas partie de la même famille de RCPGs que celui de l'U-II. En effet, le PACAP est un neuropeptide membre de la famille des récepteurs VIP/sécrétine/glucagon (Bockaert *et.al*, 1999; Laburthe *et al.* 2007).

Le protocole choisit pour cette évaluation est basé sur celui décrit par l'équipe de Boivin (2003) pour l'étude de la liaison de l'endothéline-1 à ces récepteurs situés aux niveaux nucléaire et membranaire dans des cellules cardiaques. Ainsi, la réaction de liaison a été effectuée dans un tube conique Eppendorf de 2 mL où ont été incubés conjointement la même concentration de peptide radiomarqué (4×10^{-11} M) et d'un autre

peptide avec qui il y a une possibilité d'entrer en compétition pour les sites de liaison au niveau des fractions membranaires et nucléaires (tableau V). Les peptides ont été solubilisés dans un tampon de liaison (50mM Tris-base pH 7,4 ; 100mM NaCl; 10mM MgCl₂; 0,1% (p/v) BSA; 1mM PMSF), et la quantité de protéines utilisée a été de 150µg dans un volume total de 500µL.

Tableau V : Protocole employé pour les tests de compétition.

	Concentration finale			
	Liaison totale	Compétition <i>h</i> UII	Compétition Urantide	Compétition Ala ⁴ -PACAP-38
[Tyr(¹²⁵ I) ⁹] <i>h</i> U-II	4x10 ⁻¹¹ M	4x10 ⁻¹¹ M	4x10 ⁻¹¹ M	4x10 ⁻¹¹ M
<i>h</i> UII	-----	1x10 ⁻⁶ M	-----	-----
Urantide	-----	-----	1x10 ⁻⁶ M	-----
Ala ⁴ -PACAP-38	-----	-----	-----	1x10 ⁻⁶ M
Protéines	150 µg	150 µg	150 µg	150 µg
Tampon liaison	Compléter pour un volume total de 500 µL			

Dès que l'incubation a été terminée, les étapes de filtration, de lavage et de mesure de la radioactivité, détaillées à la section 2.3.6, ont été effectuées. Le pourcentage de déplacement du peptide radiomarqué a ensuite été calculé avec le logiciel Graph Pad Prism 4.0.

2.4 Purification des complexes photomarqués et méthodes de détection

2.4.1 Photomarquage du peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³-Tyr(¹²⁵I)⁹]-hU-II

Le photomarquage est permis grâce à la présence du groupement chimique photoactivable (Bpa) introduit dans la séquence du peptide. Sous un rayonnement UV ($\lambda \approx 320\text{nm}$) ce groupement prend la forme d'un intermédiaire réactif capable de créer un lien covalent irréversible entre le ligand et son récepteur. Des réactions de liaison ont été effectuées indépendamment entre le peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³-Tyr(¹²⁵I)⁹]-hU-II et les fractions membranaires et nucléaires, isolées à partir du myocarde de rat (section 2.3.2). Le marquage au Na¹²⁵I du peptide biotinylé photoactivable a été accompli selon les procédures décrites à la section 2.3.4.

La liaison entre le peptide et les différents types de fractions cellulaires a été effectuée dans un tube conique Eppendorf de 1,5 mL. L'incubation, d'une durée de 90 min s'est déroulée à température de la pièce sous agitation dans un tampon de liaison constitué de 50mM Tris-base pH 7,4 ; 100mM NaCl; 10mM MgCl₂; 1% (p/v) BSA; 1mM PMSF et 0.01% (v/v) cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le protocole utilisé pour exécuter la réaction de liaison est décrit dans le tableau VI.

Tableau VI : Protocole employé pour la réaction de liaison avant le photomarquage.

	Concentration finale
N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ³ -Tyr(¹²⁵ I) ⁹]-hU-II	5x10 ⁻⁹ M
Protéines membranaires/nucléaires	200 µg
Tampon liaison	Compléter pour un volume total de 200 µL

Une fois la réaction de liaison terminée, le contenu de chaque tube Eppendorf a été transféré à l'intérieur de tubes Microcon® YM-10 (Millipore Corporation, Billerica,

MA) munis d'une membrane de filtration de cellulose régénérée pouvant retenir les éléments de poids moléculaire de 10 kDa et plus. Des lavages peuvent ainsi être effectués par centrifugation pour éliminer les peptides non liés aux fractions cellulaires. Une solution tampon (50mM Tris-HCl pH 7,4, 5mM MgCl₂, 100mM NaCl) gardée à 4°C a été utilisée pour effectuer les lavages (4 x 500µL). Les centrifugations ont également été exécutées à 4°C sur une centrifugeuse de table Desaga, de modèle MC 2 (Sarstedt-Gruppe, Wiesloch, DL) à une vitesse de 10000 rpm. Les complexes ligand-récepteurs formés suite à la réaction entre le peptide biotinylé photoactivable radiomarqué et les fractions membranaires et/ou nucléaires ont un poids moléculaire plus grand que 10 kDa et sont retenus par le filtre du tube Microcon®. Ces complexes ont donc été récupérés et distribués à l'intérieur des puits d'une plaque de 96 puits, dans un volume final de 100µL complété avec du tampon de lavage, afin de subir un rayonnement UV (365nm) pendant 1 h, sur glace. L'irradiation est effectuée avec une lampe UV de marque UVP (Fisher Scientific, Montréal, QC),

Le contenu irradié de chacun des puits est ensuite lysé en ajoutant 150µL de tampon de lyse (50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 0,5% (v/v) Igepal, 0,1% (p/v) SDS, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (v/v) cocktail d'inhibiteur de protéases). Afin de bien solubiliser les protéines en suspension suite à la réaction de lyse, le contenu des puits est récolté dans un tube conique Eppendorf de 2,0 mL et placé sous agitation pour une incubation de 30 min à 4°C. Finalement, les tubes sont centrifugés pendant 45 min à 4°C, à 13 000 rpm avec la centrifugeuse de table Desaga MC 2, afin de bien séparer le matériel insoluble qui est retrouvé dans le culot. Le surnageant est conservé et un échantillon de 10µL est prélevé en vue de faire le calcul de radioactivité. Le résultat obtenu est par la suite extrapolé à l'échantillon total. Ces échantillons sont maintenant prêts à être purifiés sur la colonne d'avidine monomérique.

2.4.2 Purification sur colonne d'avidine monomérique

Afin d'effectuer la purification des complexes biotinylés, une colonne d'avidine monomérique provenant de la compagnie Pierce (Rockland, IL) a été utilisée. Les instructions du fabricant ont été suivies. Ce type de colonne renferme un volume de 2mL d'avidine monomérique immobilisée sur des billes d'agarose. La particularité de ce type de colonne tient du fait que les monomères d'avidine possèdent une plus faible affinité envers la biotine comparativement à l'avidine sous sa forme native de tétramère. Ainsi, la dissociation des molécules biotinylées peut s'effectuer dans des conditions qui n'altéreront pas les molécules à éluer. Par contre, lors de l'immobilisation, des polymères d'avidine à haute affinité peuvent aussi se produire dans la colonne et c'est pourquoi il faut d'abord bloquer ces sites irréversibles de liaison à la biotine. Le blocage s'effectue avec 6 mL d'un tampon de blocage/élution contenant 2mM D-biotine dans du PBS. Les molécules de biotine liées de façon réversible aux monomères sont détachées avec 12 mL de tampon de régénération fait de 0,1M glycine pH 2,8. La prochaine étape est de laver la colonne avec 8 mL de PBS, ce qui rend la colonne propice à accueillir les complexes biotinylés prêts à être purifiés. Le PBS utilisé a été obtenu de la compagnie Pierce. Une fois reconstitué dans 500 mL d'eau ultrapure sa composition est de 0,1M Na₃PO₄ et de 0,15M NaCl à pH 7,2.

Afin de procéder à la purification, 150µL de l'échantillon obtenu suite au photomarquage (section 2.4.1) ont été transférés dans la colonne et 1,8 mL de PBS ont été ajoutés afin de forcer le volume à pénétrer à l'intérieur de la résine. Une incubation d'une heure à température de la pièce a été effectuée.

Par la suite, des lavages ont été réalisés avec 3 x 4mL de PBS pour détacher toute liaison non-spécifique à la résine. L'élution a lieu en ajoutant 6 x 2mL de tampon d'élution constitué de 2mM D-biotine/PBS, ceci permet de détacher les complexes biotinylés qui sont restés attachés de façon spécifique à l'avidine. Environ 8 à 10 fractions de 2mL ont ensuite été récoltées (figure 8). La colonne est finalement régénérée en ajoutant 2 x 4mL de tampon de régénération et elle est maintenant prête à

être utilisée pour une autre purification ou à être entreposée. Dans ce dernier cas, il suffit de laver avec 5 mL de PBS contenant 0,01 % de sodium azide comme agent de conservation. L'entreposage de la colonne se fait à 4°C jusqu'à la prochaine utilisation.

La radioactivité de chacune des fractions d'élution obtenues est mesurée au compteur gamma. Les fractions qui démontrent les plus hauts taux d'émission de radioactivité (cpm) ont été lyophilisées et conservées à -20°C.

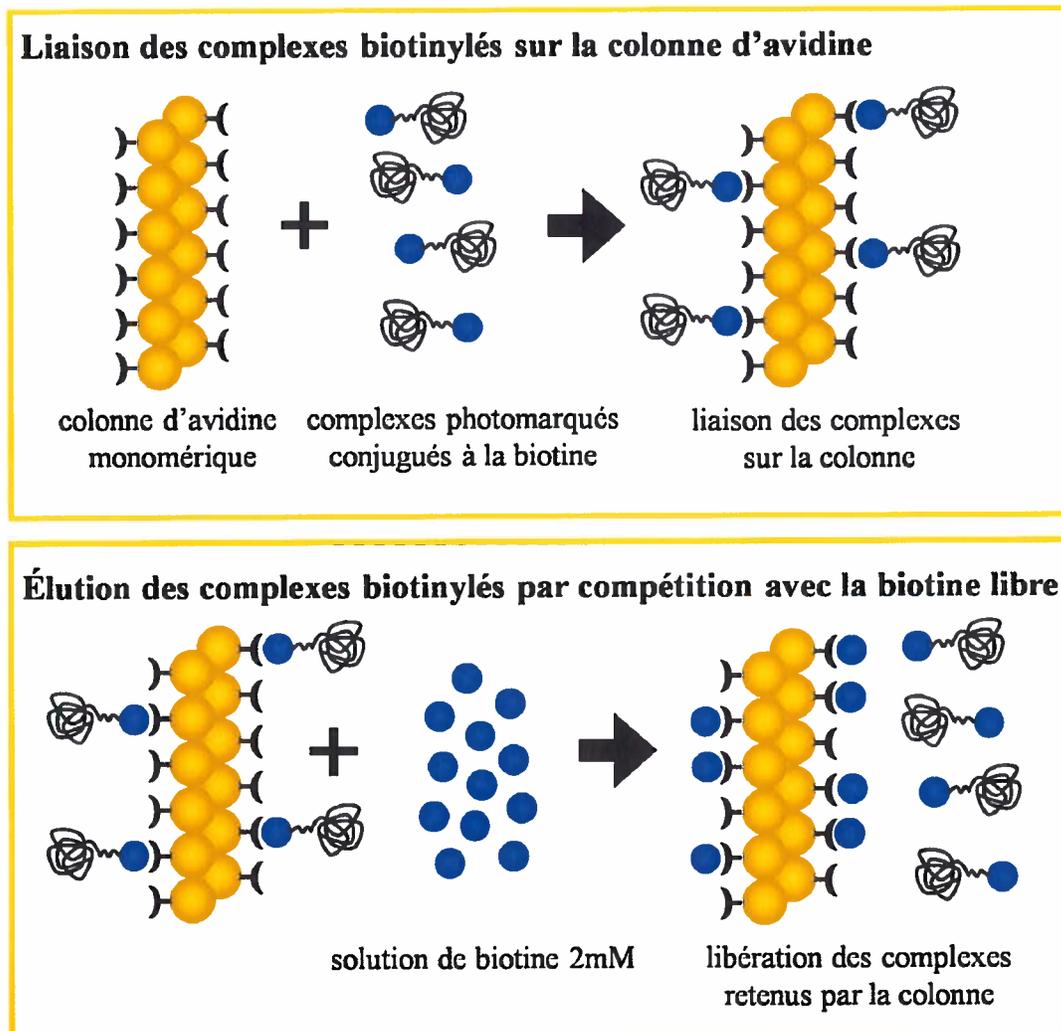


Figure 8 : Schéma expérimental illustrant la purification de complexes biotinylés.

2.4.3 Électrophorèse et autoradiographie des fractions d'élution

Les échantillons lyophilisés obtenus suite à la purification sur colonne d'avidine ont d'abord été solubilisés dans 1,5 mL d'H₂O déionisée afin de réduire la quantité de sel présente dans les échantillons. Ce volume a ensuite été transféré dans des tubes Microcon® YM-10 (Millipore Corporation, Billerica, MA) et centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse de table Desaga, de modèle MC 2 (Sarstedt-Gruppe, Wiesloch, DL) à une vitesse de 10000 rpm jusqu'à réduction du volume à $\approx 150 \mu\text{L}$. Les protéines présentes dans les échantillons ont été séparées par électrophorèse de type SDS-PAGE.

Un gel dénaturant de polyacrylamide 10% (8cm x 7,3cm) formé de 10 puits a été utilisé. Dans chacun des puits, un volume maximal de 65 μL a été déposé en s'assurant que chacun des échantillons contienne une quantité semblable de radioactivité selon les comptes en cpm. Les échantillons ont préalablement été chauffés à 95°C pendant 5 min pour assurer la dénaturation des protéines. Le marqueur de poids moléculaire utilisé *Precision Plus Protein*® a été acheté de la compagnie Bio-Rad (Hercules, CA).

La migration électrophorétique des protéines s'est déroulée pendant 2 h à un voltage constant de 100V sur un système MiniProtean III de Bio-Rad selon les recommandations du fournisseur. Par la suite, le gel a été séché entre 2 feuilles de cellophane, pendant 2 h, sur un séchoir automatique à air chaud «Gel Air Dryer» fourni par Bio-Rad. Dès que la période de séchage a été terminée, le gel a été placé dans une cassette pour autoradiographie achetée chez Fisher Biotech (Pittsburgh, PA) contenant une pellicule radiographique fournie par la compagnie UXR (Dorval, QC). La cassette et son contenu ont été gardés à -80° pour une période de temps variant selon l'intensité du signal émis par la radioactivité. Le développement des pellicules radiographiques a été obtenu à l'aide d'un développeur automatique de marque Kodak X-OMAT 1000A processor, (Maranda Lauzon, Laval QC).

3. RÉSULTATS

3.1 Développement de sondes biotinylées photoactivables

Synthèse des sondes N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-hU-II et N-biotine-[Ahx⁰-Bpa⁴]-hU-II

La synthèse des deux sondes a été amorcée à partir d'un sel de césium qui fut couplé à 4g de résine chlorométhylée Merrifield. Selon les résultats du test à l'acide picrique, le taux de substitution du premier acide aminé le Boc-Val, avec la résine, a été évalué à 0,758mmol/g. À partir de la totalité de la résine préparée, 2g ont servi à la synthèse de chacune des sondes. Après avoir procédé au clivage à l'acide fluorhydrique, les peptides bruts dont la séquence est représentée à la figure 9, ont été évalués par CLHP analytique.

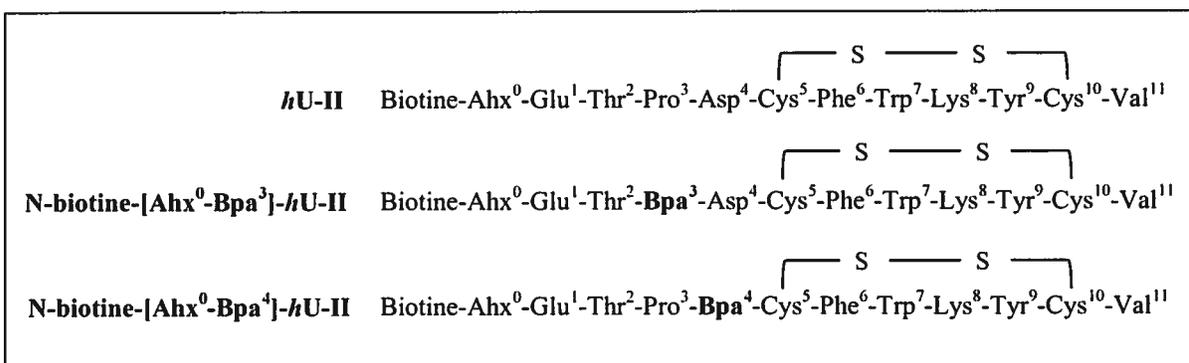


Figure 9: Structure primaire de l'urotensine humaine et des analogues biotinylés photoactivables.

Purification et caractérisation des sondes synthétisées

À la suite de la déformylation du tryptophane, les sondes ont été purifiées par CLHP préparative et chacun des pics majoritaires a été caractérisé par CLHP analytique et spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les fractions correspondant à la masse moléculaire souhaitée et démontrant >85 % de pureté ont été regroupées et lyophilisées.

Tableau VII : Masse moléculaire et pourcentage de pureté des sondes après déformylation du tryptophane.

<i>Sondes</i>	<i>MALDI-TOF</i>	
	<i>Masse moléculaire (Da)</i>	
	<i>expérimentale</i>	<i>théorique</i>
N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ³]-hU-II	1880	1879
N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ⁴]-hU-II	1864	1862

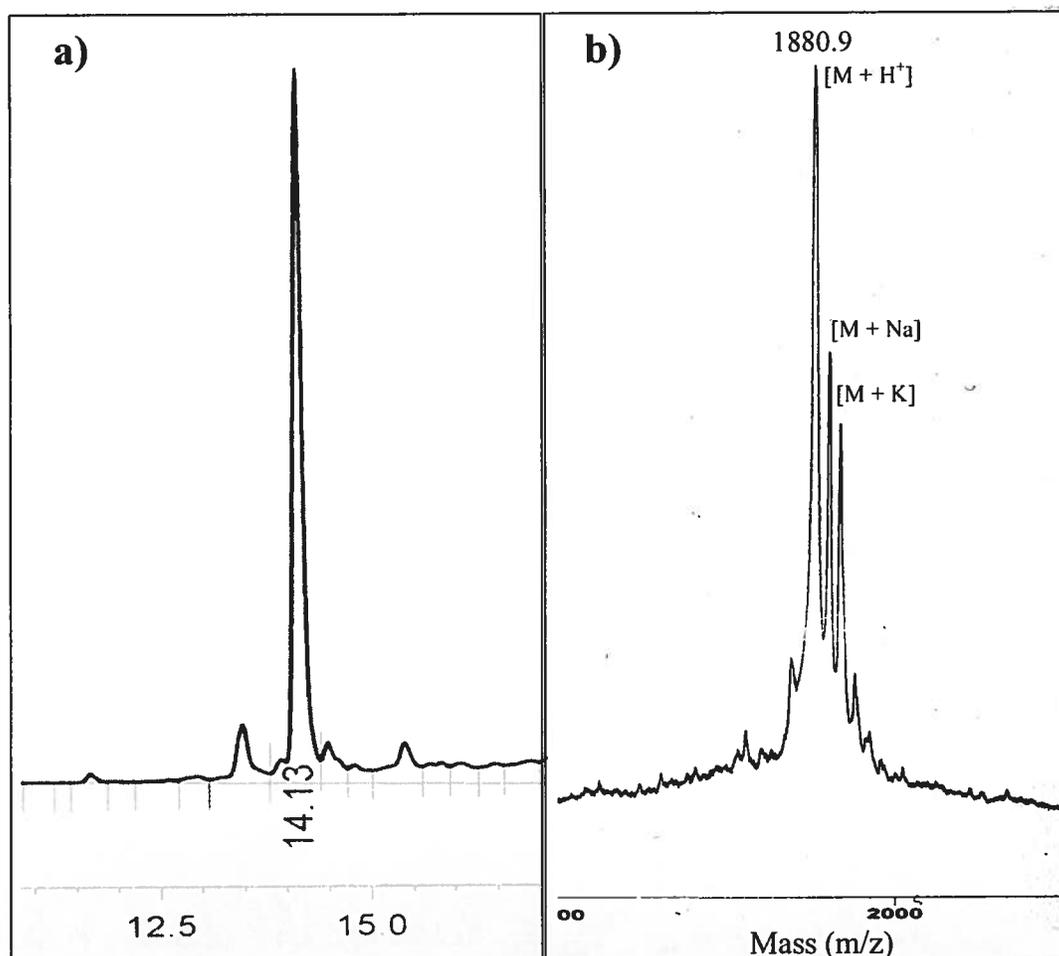


Figure 10 : Caractérisation de la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-hU-II après purification par CLHP analytique. a) évaluation de la pureté et b) identification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

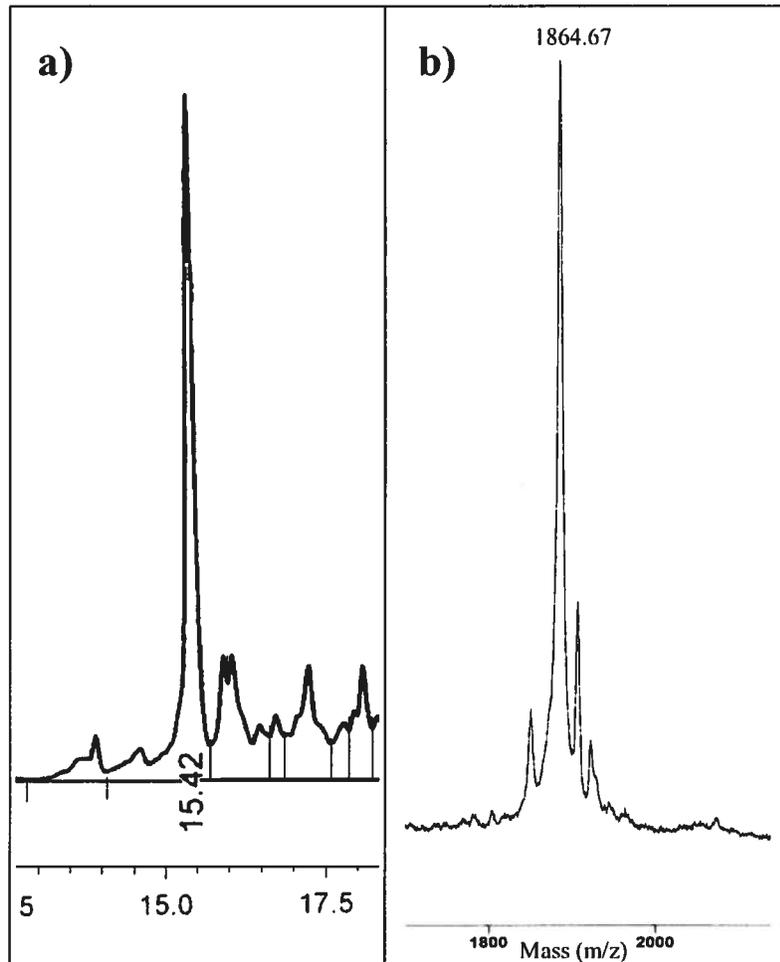


Figure 11 : Caractérisation de la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa⁴]-hU-II après purification par CLHP analytique. a) évaluation de la pureté et b) identification de la masse moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

À la figure 10, on retrouve un exemple des profils obtenus suite à la caractérisation du peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-hU-II. Ces spectres sont utilisés afin d'évaluer la pureté ainsi que la masse moléculaire des peptides contenus dans les fractions recueillies suite à la purification préparatoire. Au niveau du spectre de masse (figure 10 b), on observe 2 pics minoritaires correspondant à la présence d'adduits normalement présents lors d'analyse MALDI-TOF. La figure 11 nous montre les profils du peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa⁴]-hU-II. Ce peptide n'a cependant pas été retenu pour la suite des expériences étant donné sa faible activité biologique.

3.2 Évaluation de l'activité biologique des peptides

L'activité biologique des peptides biotinylés et photoactivables a été évaluée *in vitro* à l'aide d'une souche cellulaire CHO-K1 surexprimant à la fois le récepteur humain UT et la protéine aequorine responsable de la bioluminescence. Les peptides analogues de l'*hU*-II qui auront conservé leur activité biologique malgré les modifications apportées à leur séquence, seront en mesure de lier et d'activer le récepteur UT, entraînant ainsi la libération de Ca^{2+} intracellulaire. Les ions Ca^{2+} qui se lieront aux sites de haute affinité sur l'aequorine, permettront d'initier un phénomène de bioluminescence concentration-dépendant.

Ainsi, les courbes concentration-réponse de l'activité biologique de ces analogues ont démontré que les deux peptides biotinylés photoactivables peuvent agir comme agoniste du récepteur UT mais, à des puissances distinctes. En effet, le peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-*hU*-II ne semble pas être affecté par les modifications apportées à la structure primaire de l'*hU*-II. Le pourcentage de bioluminescence émis par la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-*hU*-II est comparable à celui obtenu par l'*hU*-II alors que le peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa⁴]-*hU*-II est beaucoup moins puissant. Une régression non linéaire des courbes obtenues a permis de calculer la valeur des EC₅₀ c'est-à-dire, la concentration de peptides à laquelle l'activation du récepteur est à 50 % d'efficacité (figure 12; tableau VIII).

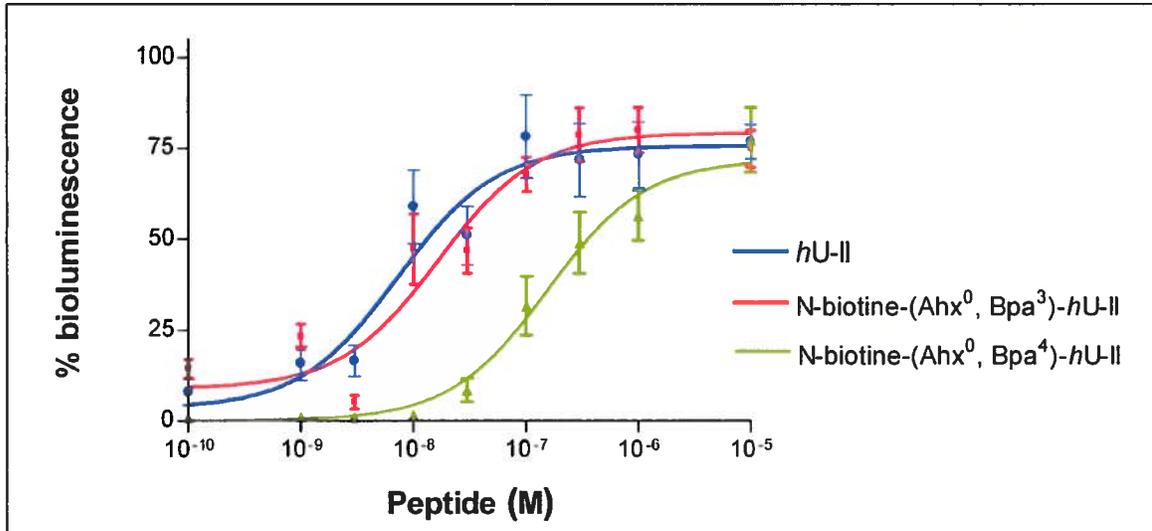


Figure 12: Courbe concentration-réponse : pourcentage de bioluminescence en fonction de la concentration des peptides. La digitonine (50µM) est utilisé comme contrôle positif (100 % bioluminescence).

Tableau VIII : Activité biologique des analogues biotinylés photoactivables et de l'hU-II sur le récepteur hUT.

<i>Peptides</i>	<i>EC₅₀ (nM)</i>
<i>hU-II</i>	7 ± 2
N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ³]-hU-II	16 ± 4
N-biotine-[Ahx ⁰ -Bpa ⁴]-hU-II	155 ± 34

3.3 Évaluation de l'enrichissement des fractions membranaires et nucléaires isolées à partir de cardiomyocytes et évaluation de l'affinité de l'hU-II pour ces fractions cellulaires.

3.3.1 Iodation des peptides au Na¹²⁵I

Les peptides *hU-II* et N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-*hU-II* ont subi un marquage à l'iode sur la chaîne latérale de leur résidu tyrosine. Le radiomarquage des peptides est nécessaire entre autres pour mesurer l'affinité de la liaison au récepteur ainsi que pour visualiser, selon le poids moléculaire, la présence du récepteur UT ou de toutes autres protéines qui seront liées de façon covalente à la sonde peptidique suite au photomarquage.

Après avoir effectué le marquage à l'iode-125, les peptides ont été purifiés sur une cartouche de filtration de phase inverse Sep-Pack C₁₈. La figure 13 est un exemple du profil d'élution obtenu avec le peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-*hU-II*. Le pic de radioactivité se trouve à environ 41% d'ACN lors d'un gradient 10% à 50% ACN/H₂O-0,06% TFA en 40 min, à un débit constant de 1 mL/min. Des fractions de 500 µL ont été récoltées aux 30 sec.

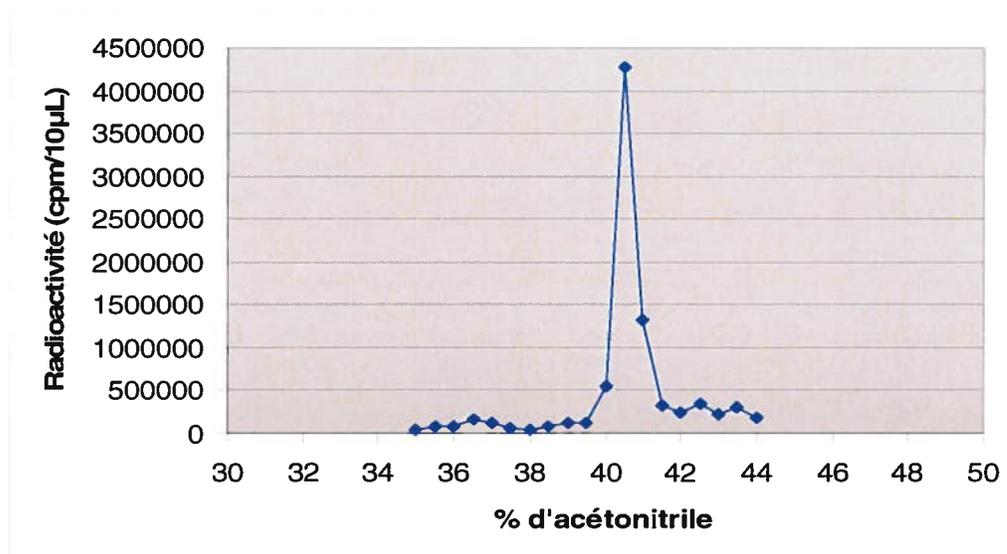


Figure 13: Profil d'élution du peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-*hU-II* sur cartouche Sep-Pack C₁₈, suite à la réaction d'iodation. Élué obtenu avec un gradient linéaire de 10-50 % ACN/H₂O- TFA (0,06 %), en 40 min, à un débit de 1 mL/min. Fractions de 0,5mL recueillies aux 30 sec.

3.3.2 Électrophorèse, transfert et immunobuvardage de type Western

Afin de déterminer la nature des fractions cellulaires isolées à partir des cardiomyocytes de rats, différents anticorps ont été utilisés selon leur spécificité envers certaines protéines de la membrane plasmique ou du noyau des cellules.

D'abord, l'anticorps dirigé contre le facteur de transcription nucléaire Sp3 a été utilisé afin de vérifier l'enrichissement nucléaire des fractions. Ce facteur est exprimé de façon ubiquiste dans les cellules des mammifères (Lin *et al.*, 2004). À la figure 14, on note la présence au niveau nucléaire (puits #2) de protéines de 60 et 100 kDa, qui ne sont pas retrouvées dans les fractions membranaires. Ce résultat confirme l'efficacité de la méthode pour l'isolation des noyaux.

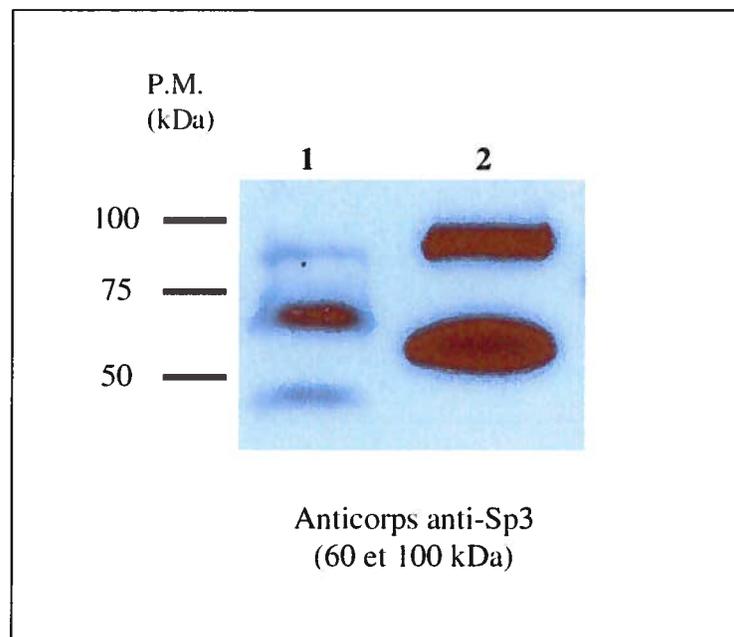


Figure 14: Immunobuvardage de type Western : localisation de la protéine Sp3 au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat. 1: fraction membranaire (contenant une espèce immunoréactive non-spécifique) ; 2: fraction nucléaire. (Ross *et.al.*, 2002)

Ensuite, afin de confirmer l'isolation des fractions membranaires par rapport aux fractions nucléaires, des anticorps dirigés indépendamment contre les protéines VE-

cadhérine et connexine 43 (Cx43) ont été utilisés. La VE-cadhérine fait partie d'une superfamille de glycoprotéines exprimées à la surface des cellules endothéliales jouant un rôle important au niveau de l'adhésion cellulaire (Dejana *et al.*, 2008). La connexine 43 est une protéine retrouvée au niveau des jonctions communicantes des cellules. Ce sous-type de connexines est retrouvé de façon prédominante au niveau des ventricules cardiaques (Liu *et al.*, 2002). Les figures 15 et 16 montrent bien que les fractions membranaires (puits #1) sont enrichies de ces protéines contrairement aux fractions nucléaires.

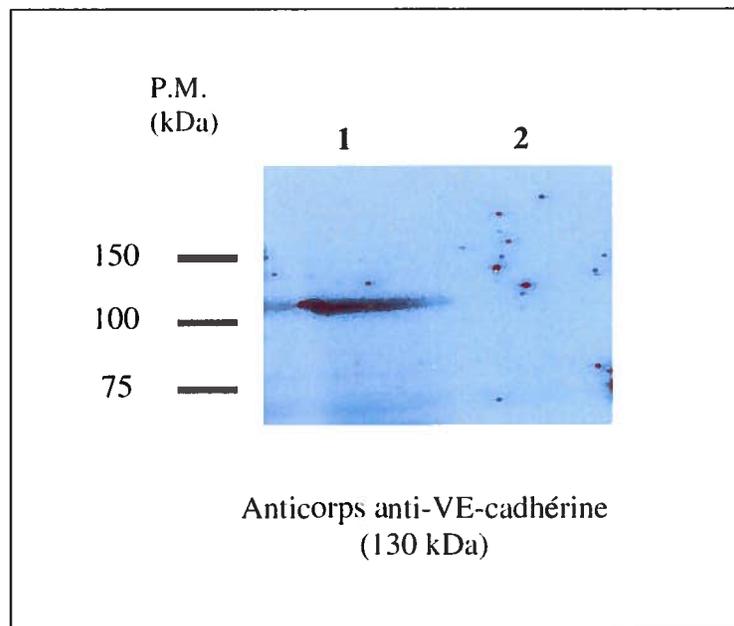


Figure 15: Immunobuvardage de type Western : localisation de la protéine VE-cadhérine au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat. 1: fraction membranaire; 2: fraction nucléaire. (Gao *et al.*, 2000).

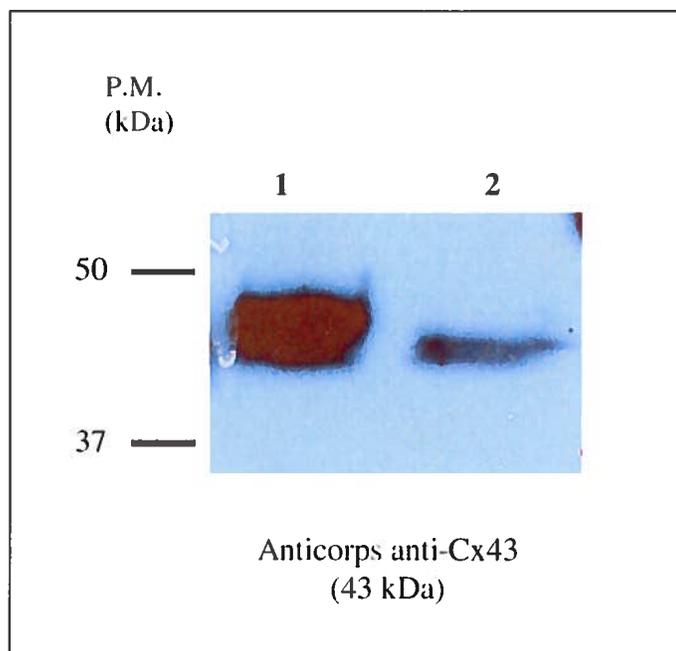


Figure 16: Immunobuvardage de type Western : localisation de la protéine Cx43 au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat. 1: fraction membranaire; 2: fraction nucléaire. (Kotula-Balak *et al.*, 2007).

Finalement, un immunobuvardage de type Western a été effectué en utilisant un anticorps dirigé contre le 3^e domaine cytoplasmique du récepteur *hUT*. Les résultats (figure 17) montrent la présence du récepteur au niveau membranaire (puits #2) alors qu'au niveau nucléaire l'anticorps semble reconnaître le récepteur mais, avec une intensité beaucoup plus faible. On observe également au niveau nucléaire des espèces immunoréactives de haut et de bas poids moléculaire. Ceci soulève un questionnement à savoir si elles sont associées ou non au système urotensinergique.

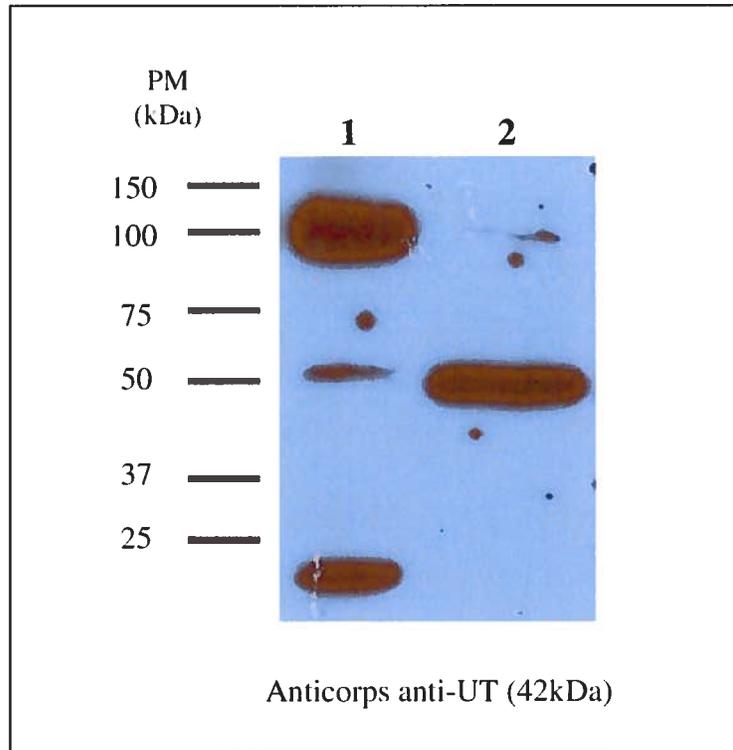


Figure 17: Immunobuvardage de type Western : localisation du récepteur UT au niveau des fractions nucléaires et membranaires isolées à partir de cardiomyocytes de rat. 1: fraction nucléaire; 2: fraction membranaire. (Qi *et al.*, 2005)

3.3.3 Évaluation de l'affinité de l'hU-II pour les fractions membranaires vs nucléaires

La figure 18 nous montre des courbes de compétition révélant l'affinité de l'hU-II pour chacune des fractions cellulaires isolées. La compétition pour les sites de liaison à l'hU-II sur les différentes fractions a été effectuée en présence d'une concentration constante de peptide radiomarqué ($1 \times 10^{-10} \text{M}$) et de concentrations croissantes de peptide froid (entre $1 \times 10^{-11} \text{M}$ et $1 \times 10^{-6} \text{M}$). Le tableau IX nous indique les valeurs de IC_{50} du ligand pour les 2 types de fractions cellulaires. Ces valeurs expriment la concentration de peptide froid requise pour inhiber 50% de la liaison du peptide radiomarqué au niveau du récepteur UT ou de toutes autres protéines capables de liaison spécifique avec le ligand.

En d'autres mots, au niveau membranaire, l'hU-II déplace 50% de la liaison de $[\text{Tyr}(^{125}\text{I})^9]\text{hU-II}$ à une concentration de $161 \pm 99 \text{ nM}$, alors qu'au niveau nucléaire, une concentration beaucoup plus faible ($3 \pm 2 \text{ nM}$) est nécessaire pour effectuer le même pourcentage de déplacement. Les valeurs IC_{50} illustrent la puissance relative de la liaison du ligand radiomarqué par rapport à celle de l'hU-II. Ces résultats semblent indiquer que l'hU-II a une plus forte affinité pour son site de liaison situé au niveau des fractions nucléaires comparativement à celui des fractions membranaires. Par contre, il faut tenir compte que l'évaluation a été effectuée sur des fractions cellulaires de nature différente sans connaître préalablement la densité de récepteurs de chacune d'entre elles.

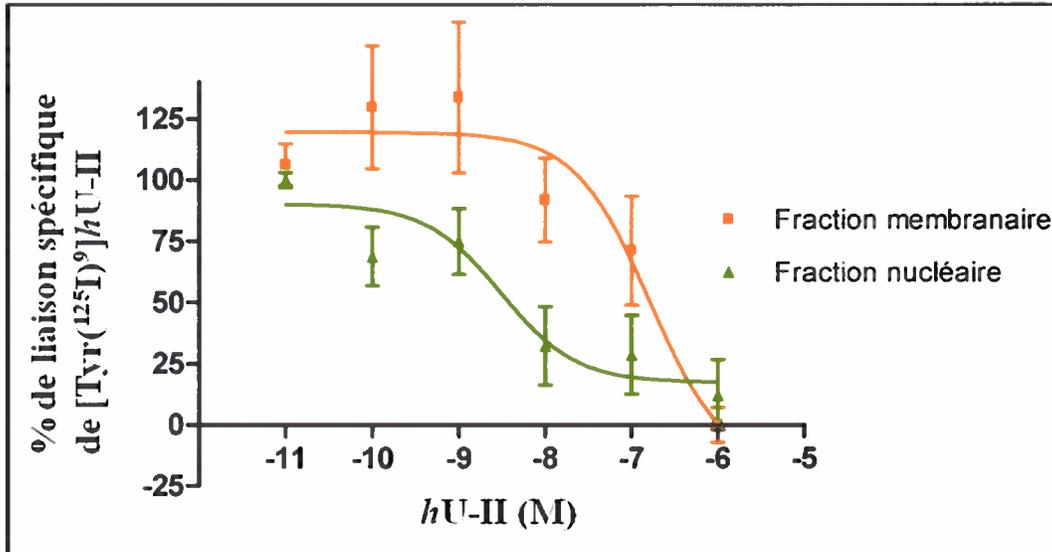


Figure 18: Courbe de compétition de la liaison de l'hU-II en présence du peptide [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II sur les fractions membranaires et nucléaires. Des concentrations constantes de peptide radiomarqué (1×10^{-10} M) ont été incubées pendant 2h à température pièce, en présence de concentrations croissantes de peptide froid (1×10^{-11} M - 1×10^{-6} M).

Tableau IX : Affinité de la liaison de l'hU-II sur les fractions membranaires vs les fractions nucléaires en présence de 1×10^{-10} M de peptide [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II.

	Peptide	IC ₅₀ hU-II (nM)
Fraction membranaire	[Tyr(¹²⁵ I) ⁹]hU-II	161 ± 99
Fraction nucléaire	[Tyr(¹²⁵ I) ⁹]hU-II	3 ± 2

3.3.4 Évaluation du déplacement du peptide [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II

Dans le but d'obtenir des informations supplémentaires sur la présence d'un récepteur spécifique et de pouvoir comparer la différence de réponse au niveau membranaire et nucléaire, des essais de liaisons ont été effectués. Afin d'évaluer le déplacement de la liaison, chacune des fractions cellulaires isolées a été incubée indépendamment avec 40 pM de [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II en présence et en absence de différents peptides froids (1 μM) soit l'hU-II, l'urantide, qui est un antagoniste du récepteur UT et [Ala⁴]-PACAP38, un

peptide contrôle dont le récepteur ne fait pas partie de la même famille de RCPGs que UT (Bockaert *et al.*, 1999; Laburthe *et al.*, 2007). La figure 19 montre qu'au niveau membranaire, l'urantide est le peptide qui est le plus fortement déplacé par le radioligand, alors qu'au niveau nucléaire, c'est la liaison de l'hU-II qui est davantage déplacée.

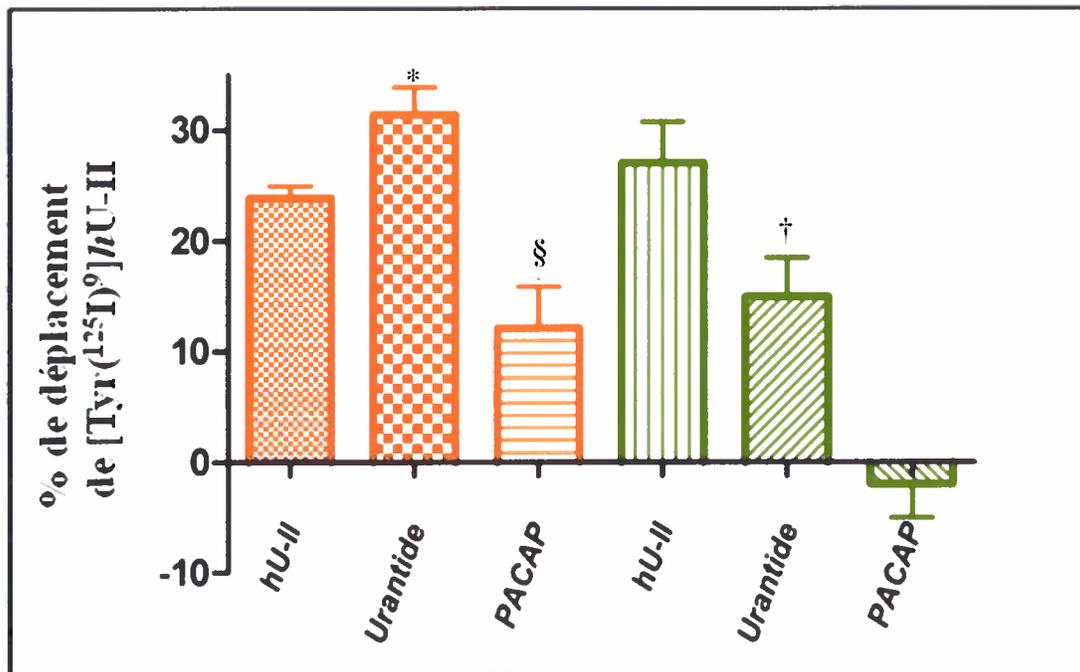


Figure 19: Pourcentage de déplacement du peptide [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II en présence de différents peptides froids. Une concentration constante (40 pM) de peptide radiomarqué a été incubée pendant 2 h à température pièce, en présence de peptide froid (1 μM). *, $p < 0,05$ comparé avec hU-II de la fraction membranaire. §, $p < 0,01$ comparé avec hU-II de la fraction membranaire. †, $p < 0,05$ comparé avec hU-II de la fraction nucléaire

Tableau X : Pourcentage de déplacement du peptide [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II en présence de peptide froid au niveau des fractions membranaires et nucléaires.

<i>Pourcentage de déplacement du peptide Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II</i>			
<i>(%)</i>			
	<i>hU-II</i>	<i>Urantide</i>	<i>[Ala⁴]-PACAP38</i>
<i>Fraction membranaire</i>	24 ± 1	31 ± 2	12 ± 4
<i>Fraction nucléaire</i>	27 ± 4	15 ± 4	-2 ± 3

3.4 Purification des complexes photomarqués et méthodes de détection

Électrophorèse et autoradiographie des fractions d'élution

Les fractions d'élution obtenues suite à la purification des complexes photomarqués sur la colonne d'avidine monomérique ont été séparées par électrophorèse de type SDS-PAGE. Le puits #1 constitue le contrôle positif, contenant les fractions d'élution formées suite au photomarquage entre la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³-Tyr(¹²⁵I)⁹]-hU-II) et les cellules CHO-K1 surexprimant le récepteur hUT. Les puits #2 et #3 contiennent respectivement les complexes élués, formés préalablement entre cette même sonde peptidique et les fractions nucléaires et membranaires. Lorsqu'on observe la figure 20, on aperçoit que les cellules transfectées utilisées comme contrôle émettent un signal radioactif correspondant au poids moléculaire du récepteur UT. Il en est de même en ce qui concerne les fractions nucléaires et membranaires. Il semble donc, qu'il y ait présence de protéines, capables de réagir avec la sonde peptidique N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³-Tyr(¹²⁵I)⁹]-hU-II) et que les complexes obtenus suite au photomarquage soit de même poids moléculaire que le récepteur hUT. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par le groupe de Boucard où le récepteur UT chez le rat a été identifié après photomarquage à 60 kDa (Boucard *et al.* 2003).

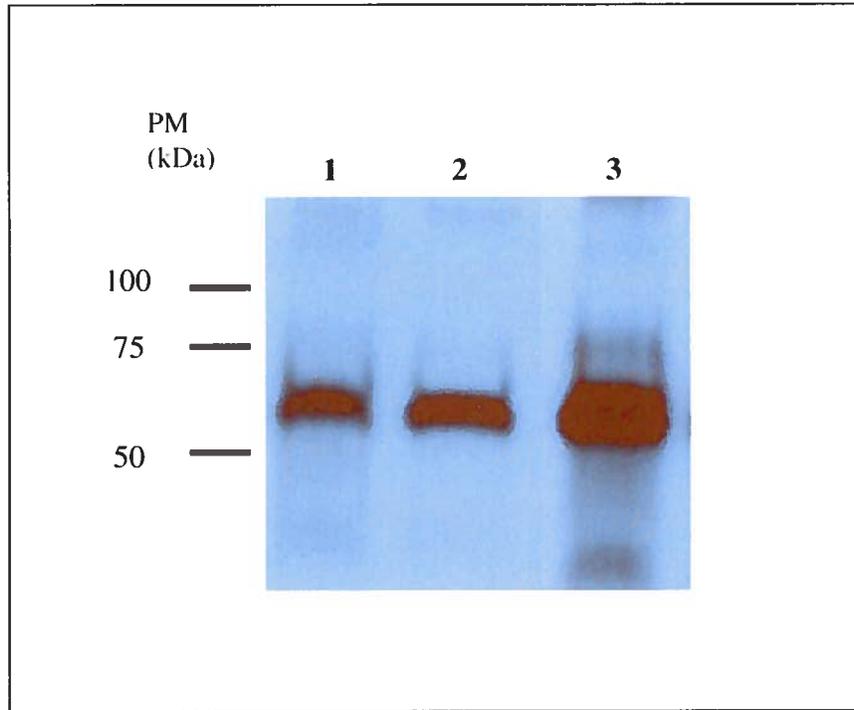


Figure 20: Autoradiographie des fractions d'élution obtenues suite à la purification sur colonne d'avidine monomérique. 1: CHO-UT contrôle; 2: fraction nucléaire, 3: fraction membranaire.

4. DISCUSSION

4.1 Développement de sondes biotinylées photoactivables

Dans le présent projet, la technique de photomarquage fut employée afin d'étudier les interactions ligand-récepteur. Conjointement à cette stratégie, nous avons exploré les avantages offerts par l'utilisation de la biotine, considérant la forte affinité de cette molécule pour l'avidine. Pour ce faire, nous avons procédé à la synthèse de deux sondes peptidiques biotinylées et photoactivables. À partir de la séquence primaire de l'*hU-II*, une molécule de biotine ainsi qu'un espaceur aliphatique ont été ajoutés en position N-terminale alors que les résidus en position 3 (Pro) et 4 (Asp) ont été substitués successivement par le groupement photosensible Bpa (*p*-benzoyl-L-phénylalanine). Le choix du lieu d'introduction du Bpa a été étudié avant le début de la synthèse des analogues afin de conserver l'activité biologique et la sélectivité du peptide pour le récepteur UT. Les positions ont donc été choisies en tenant compte du rôle important du segment cyclique : [Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys], impliqué au niveau de l'activité biologique. En effet, selon les analyses Ala-scan effectuées dans notre laboratoire, la substitution des résidus en position 3 et 4 de la séquence de l'*hU-II* n'affecterait pas l'activité agoniste des analogues au niveau du récepteur. La majorité des analogues ayant subi une modification à l'extérieur du motif hexapeptidique cyclique ont conservé leur potentiel d'activation du récepteur UT, alors que toutes substitutions avec l'alanine au niveau des acides aminés endocycliques ont mené à une perte d'activité du peptide (Brkovic *et al.*, 2003).

Suite à la synthèse, les peptides ont été clivés à l'acide fluorhydrique, déformylés, purifiés et analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF afin d'identifier leur poids moléculaire respectif soit 1880 Da pour le peptide N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-*hU-II* et 1864 Da pour N-biotine-[Ahx⁰-Bpa⁴]-*hU-II*. La spectrométrie de masse nous a permis de confirmer l'introduction du groupement photosensible, le départ des groupements protecteurs et l'absence de réaction secondaire au niveau des peptides synthétisés.

4.2 Évaluation de l'activité biologique des sondes biotinylées photoactivables

L'impact concernant l'ajout de la biotine, de l'acide aminohexanoïque et du groupement Bpa sur les propriétés pharmacologiques des sondes peptidiques a été évalué à l'aide d'un système *in vitro* utilisant une lignée de cellules CHO-K1, transfectées de manière à surexprimer le récepteur UT ainsi que la photoprotéine aequorine. Cette protéine est responsable de bioluminescence, lorsque mis en présence de calcium intracellulaire, libéré proportionnellement selon le degré de l'activation du récepteur par son ligand.

Grâce à ce système *in vitro* on peut déterminer l'activité biologique et évaluer la portée des modifications apportées aux peptides biotinylés photoactivables en comparant leurs profils de bioluminescence à celui de l'*hU-II* sans modification. L'aequorine est un outil de choix afin de mesurer l'activité biologique des peptides étant donné qu'elle offre une très grande sensibilité face aux ions calcium et un bruit de fond extrêmement faible. Cependant ce genre de photoprotéines naturelles est également sensible aux variations de température qui peuvent parfois dénaturer leur pouvoir d'émission de lumière. D'où l'importance d'utiliser un luminomètre à injection rapide. De plus, l'utilisation des cellules CHO-K1 transfectées permet d'éviter l'usage d'animaux de laboratoire et d'ainsi restreindre les variations de réponses pouvant survenir d'un animal à l'autre.

Les courbes concentration-réponse présentées à la figure 12 expriment le pourcentage de bioluminescence émis par les cellules en fonction de la concentration des peptides à l'étude. Ces pourcentages sont calculés par rapport à la bioluminescence induite par 50µM de digitonine qui constitue la bioluminescence totale (100%). La digitonine est un glycoside utilisé comme détergent pour perméabiliser les membranes cellulaires et solubiliser les lipides membranaires. Il y aura donc, lyse des cellules et libération de calcium provenant des compartiments calciques.

Les valeurs des EC_{50} , obtenues expérimentalement varient selon la position du Bpa dans la structure des analogues peptidique N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-hU-II (16 ± 4), N-biotine-[Ahx⁰-Bpa⁴]-hU-II (155 ± 34). Si l'on compare avec la valeur de l'hU-II (7 ± 2) on est en mesure de dire que la sonde avec le groupement Bpa en position 3 est presque aussi puissante que le peptide natif pour l'activation du récepteur UT. En ce qui concerne la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa⁴]-hU-II, on observe une activité agoniste au récepteur, par contre la puissance de l'activation est près de 10 fois plus faible. Ces résultats semblent montrer que la substitution du résidu proline par le Bpa est celle qui affecte le moins les propriétés pharmacologiques du peptide. Le groupement Bpa est de nature hydrophobe, contient deux noyaux aromatiques et est assez volumineux. La position 3 de hU-II s'accommode donc de ces caractéristiques mais pas la position 4, peut-être parce que la juxtaposition du Bpa à la structure cyclique cause des changements conformationnels au niveau de la boucle hexapeptidique. Donc, selon les résultats obtenus, c'est la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³]-hU-II qui a été utilisée pour la suite des expérimentations.

4.3 Évaluation de l'enrichissement des fractions membranaires et nucléaires

Le tissu cardiaque de rat a été ciblé pour ce projet étant donné que l'équipe de Gong a démontré que les cardiomyocytes de rat exprimaient le récepteur UT, suggérant ainsi que l'U-II peut réguler certaines fonctions cardiaques ainsi que la croissance cellulaire en stimulant son récepteur, présent au niveau du myocarde (Gong *et al.*, 2004).

C'est également à partir d'évidences sur la fonctionnalité et la localisation de certains RCPGs au noyau des cellules que nous avons exploré la présence du récepteur UT ou de toutes autres protéines capables de lier l'U-II au niveau nucléaire. Par exemple, les récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline ont été localisés à la membrane nucléaire des cellules du myocarde ventriculaire de rat (Boivin *et al.*, 2003).

Suite à l'isolation des fractions membranaires et nucléaires, différents types d'anticorps ont été utilisés afin de vérifier le taux d'enrichissement de ces fractions cellulaires. Les

résultats d'immunobuvardage retrouvés à la figure 14, montrent la présence de la protéine Sp3 (un facteur de transcription nucléaire), à l'intérieur des fractions nucléaires. Le niveau d'enrichissement des fractions membranaires a été confirmé par la présence de protéines localisées à la membrane plasmique des cellules soit la VE-cadhérine et la connexine 43 (figures 15 et 16). À la figure 16, on remarque la présence d'un faible signal au niveau nucléaire mis en évidence avec l'anticorps dirigé contre la connexine 43. La Cx43 est un constituant important des jonctions communicantes au niveau cardiaque et il a été démontré que l'extrémité C-terminale de la Cx43 est retrouvée normalement dans le noyau des cardiomyocytes (Xitong *et al.*, 2003). C'est à la lumière de ces informations que nous avons décidé d'utiliser la VE-cadhérine comme deuxième marqueur pour vérifier l'enrichissement de nos fractions.

La présence du récepteur UT a également été détectée avec un anticorps dirigé contre la 3^e boucle cytoplasmique de cette protéine de 42 kDa. On observe au niveau des fractions membranaires, la présence d'une protéine au poids moléculaire attendu, correspondant au récepteur UT. Cette bande d'environ 50 kDa, concorde avec ce qui est observé dans la littérature. En effet, l'équipe de Gong (2004) a obtenu des résultats similaires lors de l'évaluation de l'expression du récepteur UT dans le tissu myocardique de rat (Gong *et al.*, 2004). Il en est de même pour le groupe de Castel (2006), qui a porté son étude sur les astrocytes de rat (Castel *et al.*, 2006). Cette différence de poids moléculaire peut être expliquée par la présence de sites de glycosylation. En effet, le récepteur UT chez le rat, possède deux résidus potentiels à la N-glycosylation Asn²⁹ et Asn³³ (Marchese *et al.*, 1995) et une étude récente utilisant le photomarquage a montré l'existence de deux formes distinctes de récepteurs, dont l'une répondait aux traitements de déglycosylation (Boucard *et al.*, 2003).

À l'intérieur de la fraction nucléaire il y a présence d'espèces immunoréactives de haut et de bas poids moléculaire, alors qu'un faible signal correspondant au récepteur UT est observé. Le faible signal observé peut être simplement dû au fait que le récepteur UT soit présent en plus petite quantité au niveau nucléaire comparativement à ce qui est obtenu au niveau membranaire. Afin d'avoir une idée plus précise de la quantité de

récepteur dans chacune des fractions, il est préférable d'exprimer l'intensité d'une bande par une comparaison avec celle correspondant à une protéine dont la concentration devrait être semblable d'un échantillon à l'autre. La β -actine est une protéine couramment utilisée à cette fin. Mais, dans le cas présent, la difficulté réside dans la nécessité de trouver une protéine dont le taux d'expression est semblable à la membrane cellulaire et au noyau afin de pouvoir effectuer une évaluation de la quantité relative de récepteurs UT dans ces deux fractions cellulaires. Par contre, une autre technique, soit une étude de saturation aurait permis de déterminer la valeur de Bmax. Cette dernière représente la densité de sites de liaison spécifique. Cependant, tel qu'expliquer précédemment dans la section 2.3.6, cette technique aurait nécessité de grandes quantités de peptides radiomarqués.

Les espèces immunoréactives de haut poids moléculaire proviennent peut-être d'une agrégation/dimérisation des récepteurs au niveau nucléaire ce qui expliquerait la présence de cette bande à 100 kDa qui équivaut au double du poids moléculaire du récepteur UT. On peut également soupçonner que les récepteurs puissent avoir subi des transformations post-transcriptionnelles. En effet, la palmitoylation est un phénomène observé chez certains RCPGs au niveau des résidus Cys hautement conservés (O'Dowd *et al.*, 1989). De plus, on peut observer un phénomène de phosphorylation à l'extrémité C-terminale du récepteur provenant de l'action de kinases (GRKs) (Carman *et al.*, 1998). De nouveaux rôles ont été démontrés en ce qui concerne l'action des GRKs. En effet, GRK5 pourrait être présente au niveau nucléaire chez différentes lignées cellulaires dont les myocytes cardiaques (Yi *et al.*, 2002, 2005; Johnson *et al.*, 2004). Cette nouvelle localisation nucléaire pour ces kinases associées aux RCPGs pourrait expliquer la présence de protéines de haut poids moléculaire retrouvées dans nos fractions nucléaires.

Finalement, afin de vérifier la présence de liaison non-spécifique il aurait été judicieux d'ajouter un contrôle négatif et ce pour chacun des immunobuvardages effectués (figures 14 à 17) en utilisant un anticorps préabsorbé au peptide immunogénique. Ainsi, l'absence des bandes observées aurait confirmée la spécificité de l'anticorps pour

la protéine recherchée. Cette étape pourrait être effectuée éventuellement pour la suite du projet et permettrait d'obtenir des informations supplémentaires sur la présence de ces espèces immunoréactives. On peut toutefois supposer que le récepteur UT situé à la membrane nucléaire puisse être sous une forme différente au niveau de sa séquence ou de sa morphologie, comparativement au récepteur localisé à la membrane plasmique. Ainsi, il est possible que l'anticorps développé pour le récepteur membranaire reconnaisse plus difficilement l'isoforme nucléaire. Le signal présent à 50 kDa, suppose malgré tout la présence du récepteur UT au noyau.

4.4 Évaluation de l'affinité de l'hU-II pour les fractions membranaires et nucléaires

Avant de procéder au photomarquage avec l'analogue biotinylé photoactivable de l'hU-II, la spécificité de la liaison de l'hU-II envers les fractions membranaires et nucléaires a été évaluée. D'une part, nous avons comparé la compétition pour les sites de liaison, en présence d'une concentration constante de peptide radiomarqué [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II (1x10⁻¹⁰M) et de concentrations croissantes d'hU-II (1x10⁻¹¹M à 1 x 10⁻⁶M). La radioactivité a été mesurée puis représentée sur une courbe concentration-réponse.

Les courbes de compétition ainsi que les valeurs des IC₅₀ obtenues, semble indiquer que l'hU-II a une plus forte affinité pour les fractions nucléaires comparativement aux fractions membranaires. Ce phénomène est également observé en ce qui concerne les récepteurs du NPY, de l'Ang II et de l'ET-1 situés au niveau nucléaire (Booz *et al.*, 1992; Bkaily *et al.*, 2000, 2002 et 2003). Ces récepteurs démontrent une plus grande affinité (jusqu'à 10 fois) envers leurs ligands respectifs, comparativement à leurs homologues localisés à la membrane plasmique (Bkaily *et al.*, 2003). Il faut toutefois tenir compte du fait que la densité de récepteurs présents dans chacune des préparations n'a pas été évaluée au préalable. On peut par contre affirmer, par l'allure des courbes obtenues, qu'il y a bel et bien une liaison spécifique de l'hU-II. En effet, on observe un déplacement de la radioactivité directement lié à l'augmentation de la concentration de peptide froid et ce, pour les deux types de fractions cellulaires.

D'autre part, des essais de liaison compétitifs utilisant le radioligand [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II ont été effectués sur des préparations membranaires (suite à l'extraction des noyaux présents dans ces fractions) ainsi que sur les fractions de noyaux isolés provenant de cellules du myocarde de rat. La liaison qui a lieu entre chacune des fractions et le peptide radiomarqué a été déplacée en présence de l'hU-II froid, le pourcentage de déplacement alors mesuré constitue le taux de liaison spécifique totale. À prime abord, le faible pourcentage de déplacement du peptide radiomarqué en présence d'un grand excès de peptide non-marqué peut paraître surprenant. Toutefois, lors de tests de liaison, il faut tenir compte du fait que la liaison non-spécifique d'un ligand est de caractère non-saturable. Elle augmente donc toujours avec l'augmentation de la concentration du ligand radiomarqué. Voilà pourquoi il est judicieux de ne pas choisir une concentration de peptide radiomarqué qui soit trop élevée. À l'opposé, la liaison spécifique sous-entend la présence de récepteurs dont le nombre, dans une préparation, est limité, ce qui confère un caractère saturable à cette liaison. Or, la saturation de ces récepteurs est généralement atteinte à une concentration de 1µM. Ceci explique pourquoi cette concentration a été choisie dans le cadre de cette étude de déplacement. De plus, le pourcentage de déplacement spécifique obtenue lors de cette étude est comparable à ce qui est retrouvé dans la littérature (Abel *et al.*, 1997). Afin d'avoir plus d'informations sur les sites de liaison du récepteur, le déplacement de [Tyr(¹²⁵I)⁹]hU-II a été mesuré lorsque mis en compétition avec l'urantide et le [Ala⁴]-PACAP38.

Premièrement, le peptide [Ala⁴]-PACAP38 ne démontre aucun déplacement du peptide radiomarqué au niveau nucléaire et un faible pourcentage de déplacement de [12 ± 2] est observé au niveau membranaire. Cette valeur constitue un taux de liaison non-spécifique normalement observé dans ce type d'essai. Sachant que les récepteurs du PACAP, ne sont pas de la même famille de récepteurs que celui de l'U-II (Bockaert *et al.* 1999; Laburthe *et al.* 2007), ce peptide a été utilisé comme contrôle et nous informe que la liaison observée en ce qui concerne l'hU-II et l'urantide est bel et bien spécifique.

Par la suite, les résultats exprimés à la figure 19 nous indiquent que l'*hU-II* est en mesure de déplacer le peptide radiomarqué dans un ordre de grandeur similaire autant au niveau des préparations membranaires que nucléaires. Cependant, l'urantide, un antagoniste du récepteur UT montre un profil différent. En ce qui a trait à la fraction membranaire, l'urantide déplace de manière significative, le peptide radiomarqué avec un pourcentage de $[31 \pm 2]$ comparativement à l'*hU-II* $[24 \pm 1]$. Au niveau de la fraction nucléaire, si l'on compare avec l'*hU-II*, l'urantide déplace moins fortement le peptide radiomarqué. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que cet antagoniste formé de 8 résidus d'AA, a été caractérisé pour son action envers le récepteur membranaire. Donc, si l'isoforme du récepteur présent à la membrane nucléaire est quelque peu différent, il se peut que l'affinité de la liaison soit moindre comparativement à celle observée au niveau plasmique, ce qui supporte l'hypothèse émise au sujet du faible signal correspondant au récepteur UT obtenu suite à l'immunobuvardage de type Western (figure 17). D'ailleurs, les courbes de déplacements obtenues pour l'*hU-II* sur les deux préparations cellulaires ont données des valeurs de IC_{50} différentes ce qui appuie le fait que le récepteur nucléaire puisse avoir des caractéristiques de liaison qui diffèrent de celles du récepteur membranaire.

De plus, le mode d'action de l'urantide peut également différer selon la localisation du récepteur. Il est possible que cet antagoniste puisse lier la forme active et inactive du récepteur lorsqu'il est situé à la membrane plasmique alors qu'à la membrane nucléaire la liaison ne soit limitée qu'à la forme active du récepteur. Ceci expliquerait le plus fort pourcentage de déplacement observé au niveau de la fraction membranaire.

Finalement, à partir de différentes études répertoriées dans la littérature au sujet de la localisation nucléaire des peptides NPY, Ang II et ET-1 et de leurs RCPGs respectifs, plus précisément Y_1 , AT_2 et ET_B (Bkaily *et al.*, 2003; Jacques *et al.*, 2003a, 2003b et 2005), nos expérimentations nous permettent de croire en la présence du récepteur UT dans les fractions de noyaux isolés, étant donné les évidences face à la liaison à l'*hU-II* et à son antagoniste peptidique.

4.5 Purification des complexes photomarqués sur colonne d'avidine et autoradiographie

À partir des résultats obtenus grâce à l'autoradiographie provenant de la purification sur colonne d'avidine, on peut dire que les protéines de haut et bas poids moléculaire observées suite à l'immunobuvardage utilisant l'anticorps anti-UT ne sont probablement pas associées au système urotensinergique. Il s'agit sûrement de protéines nucléaires possédant une séquence capable de réagir avec l'anticorps anti-UT, mais qui ne sont pas capables de lier l'*hU-II*.

En effet, ces protéines ne sont pas retrouvées sur l'autoradiographie à la figure 20. Sur cette figure on observe le signal de radioactivité émis par la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³-Tyr(¹²⁵I)⁹]-*hU-II* liée de façon covalente au récepteur UT autant au niveau des cellules CHO-UT qui surexpriment ce récepteur, qu'au niveau des fractions nucléaires et membranaires. Ces observations viennent confirmer la présence d'une protéine de poids moléculaire correspondant à celui du récepteur UT, qui serait liée de façon covalente à la sonde biotylée photoactivable. Un séquençage éventuel permettrait de déterminer la nature de ces protéines et de confirmer la présence du récepteur UT au noyau des cardiomyocytes.

5. CONCLUSION

L'urotensine-II, est un peptide vasoactif, qui fait maintenant l'objet de plusieurs études étant donné son implication probable dans diverses pathologies. L'action de ce peptide est médiée par le récepteur UT localisé à la membrane plasmique, lequel fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Depuis quelques années un intérêt grandissant a été porté sur la localisation de RCPGs au niveau de la membrane nucléaire des cellules. De ce fait, le présent projet propose d'abord le développement de sondes peptidiques biotinylées photoactivables permettant d'explorer certaines interactions peptide-protéines au niveau nucléaire. L'activité biologique de ces sondes sur le récepteur UT a été mesurée par une nouvelle méthode permettant de quantifier la bioluminescence produite par la photo-protéine aequorine, en réaction à une libération de calcium intracellulaire. Les résultats obtenus nous révèlent que l'ajout d'une molécule de biotine et d'un espaceur aliphatique ainsi que la substitution du résidu proline par un groupement photoactivable (Bpa) ont permis de créer une sonde peptidique capable de lier et d'activer le récepteur UT de façon similaire à celle de l'*hU-II*.

D'autre part, les valeurs des IC_{50} obtenues suite aux essais de liaison effectués sur des préparations membranaire et nucléaire ont révélé que l'*hU-II* avait davantage d'affinité envers la fraction nucléaire des cardiomyocytes comparativement à la fraction membranaire. De plus, les pourcentages de déplacement de l'*hU-II* radiomarqué nous informe d'une liaison spécifique de l'*hU-II* au niveau de chacune des fractions cellulaires, avec cependant un profil de déplacement différent en ce qui concerne l'antagoniste urantide.

Finalement, nous avons mis au point une méthode utilisant l'affinité biotine-avidine afin de purifier des complexes peptide-protéine liés de façon covalente grâce à la technique de photomarquage. En effet, les complexes biotinylés formés suite au photomarquage de la sonde N-biotine-[Ahx⁰-Bpa³-Tyr(¹²⁵I)⁹]-*hU-II* avec les fractions membranaire et nucléaire provenant de cardiomyocytes de rat ont pu être isolés grâce à une purification

sur colonne d'avidine. Les complexes obtenus suite à la purification ont ensuite été retracés via le signal de radioactivité émis par la présence de l'iode 125 au niveau du résidu tyrosine de la sonde peptidique.

En conclusion, les résultats autoradiographiques confirment la présence d'une protéine de poids moléculaire correspondant au poids du récepteur UT, au niveau des cellules CHO qui surexpriment le récepteur UT, ainsi qu'à l'intérieur de la fraction membranaire et nucléaire. On peut souligner, en terminant, que ce projet a contribué à l'approfondissement des connaissances sur la caractérisation d'une localisation nucléaire du récepteur UT.

6. PERSPECTIVES

Ce sujet nécessite toutefois encore beaucoup d'exploration. Pour ce faire, différents types d'expérience peuvent être proposés. Entre autres, il sera utile de vérifier quels sont les sous-types de protéine G impliqués suite à l'activation du récepteur par son ligand. La réponse à cette question pourra être trouvée au moyen d'expériences d'immunoprécipitation à partir des protéines nucléaires de cellules myocardiques, en utilisant des anticorps dirigés contre les différentes protéines G. La nature des protéines ainsi précipitées et associées au récepteur UT, serait par la suite caractérisée par immunobuvardage de type Western avec l'anticorps dirigé contre le récepteur UT.

Dans le but d'obtenir plus d'informations sur le fonctionnement du récepteur UT au niveau nucléaire, il serait pertinent de;

-déterminer les niveaux de calcium libérés au niveau cytosolique et nucléoplasmique suite à l'activation des cellules du myocarde.

-comparer la cascade de signalisation moléculaire sous-jacente aux récepteurs membranaires versus nucléaires, ainsi que l'expression des gènes impliqués suite à l'activation du récepteur par son ligand.

-vérifier par des expériences d'immunofluorescence la densité de récepteurs localisés au noyau des cellules comparativement à la membrane plasmique.

APPENDICE

Appendice A

Immunobuvardage

Gel SDS-PAGE ; séparation 10% :

3,3 mL acrylamide/Bis 30%
4,0 mL eau distillée
2,5 mL Tris-HCl 1,5M, pH 8,8
100 µL SDS 10% (p/v)
50 µL ammonium persulfate (APS) 10% (p/v)
10 µL TEMED

Gel SDS-PAGE ; compression 4% :

1,3 mL acrylamide/Bis 30%
6,1 mL eau distillée
2,5 mL Tris-HCl 0,5M, pH 6,8
100 µL SDS 10% (p/v)
50 µL ammonium persulfate (APS) 10% (p/v)
10 µL TEMED

Tampon de migration 5X :

25mM Tris-base (30g)
192mM glycine (144g)
0,1% (p/v) SDS (10g)
Eau distillée (compléter à 2L)

Tampon de transfert 1X :

25mM Tris-base (3g)
192mM glycine (14,4g)
20% (v/v) méthanol (200 mL)
Eau distillée (compléter à 1L)

Tampon d'échantillon réducteur :

1,0 mL Tris-HCl 0,5M pH 6,8
3,0 mL eau distillée
1,6 mL glycérol
1,6 mL SDS 10% (p/v)
0,4 mL β-mercaptoethanol
0,4 mL bleu de bromophénol 0,5% (p/v) dans l'eau.

Tampon de lavage :

TBS 10X :

24,2g Tris-HCl pH 7,6
80,0g NaCl
Eau distillée (compléter à 1L)

TBST :

TBS 1x
0,1% Tween-20

Tampon pour les anticorps :

Anticorps primaire :

TBST-0,5%
1% BSA
0,05% NaN₃

Anticorps secondaire :

TBST-0,5%
5% lait en poudre

La majorité des produits ont été fournis par la compagnie Sigma (St-Louis, MO), à l'exception de la glycine, le méthanol et le glycérol qui provenaient de Fisher Scientific (Montréal, QC).

Anticorps utilisés pour les immunobuvardages :

Anticorps primaires (IgG lapins) :

-Anticorps dirigé contre le 3^e domaine cytoplasmique du récepteur de l'urotensine II :
GenWay (San Diego, CA). **Dilution 1 :200.**

-Anticorps dirigé contre le facteur de transcription Sp3 (D-20) :
Santa Cruz Biotechnology, INC (Santa Cruz, CA). **Dilution 1 :1000.**

-Anticorps dirigé contre la protéine connexine 43 (H-150) :

Santa Cruz Biotechnology, INC (Santa Cruz, CA). **Dilution 1 :300.**

-Anticorps dirigé contre la protéine VE-cadhérine :

Cell Signaling Technology, INC (Danvers, MA). **Dilution 1 :500.**

Anticorps secondaire :

-IgG anti-lapin développé chez la chèvre et conjugué à l'enzyme HRP «*horseradish peroxidase*»

Sigma (St-Louis, MI). Dilution 1 :**2000**

Solution de révélation

-Substrat de chimiluminescence utilisé selon le protocole du fournisseur Pierce (Rockford, IL). Ratio 1 :1 «*stable peroxide solution : luminol-enhancer solution*».

RÉFÉRENCES

ABEL, P.W., Waugh, D. et Jeffries, W.B. 1997. Radioligand Binding Using ¹²⁵I-Labeled Peptides. Methods in Molecular Biology: Neuropeptide Protocols, vol.73, p.323-329.

AMES, R.S., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Willette, R.N., Aiyar, N.V., Romanic, A.M., Loudon, C.S., Foley, J.J., Sauermelch, C.F., Coatney R.W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S.D., Stadel, J.M., Martin, J.D., Liu, W.S., Glover, G.I., Wilson, S., McNulty, D.E., Ellis, C.E., Elshourbagy, N.A., Shabon, U., Trill, J.J., Hay, D.W., Ohlstein, E.H., Bergsma, D.J. et Douglas, S.A. 1999. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. Nature, vol. 401, p.282-286.

BALDWIN, J.M. 1993. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. The EMBO journal, vol.12, p.1693-1703.

BHATTACHARYA, M., Peri, K.G., Almazan, G., Ribeiro-da-Silva, A., Shichi, H., Durocher, Y., Abramovitz, M., Hou, X., Varma, D.R. et Chemtob, S. 1998. Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. vol. 95, p.15792-15797.

BHATTACHARYA, M., Peri, K.G., Ribeiro-da-Silva, A., Almazan, G., Shichi, H., Hou, X., Varma, D.R. et Chemtob, S. 1999. Localization of functional prostaglandin E₂ receptors EP₃ and EP₄ in the nuclear envelope. Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p.15719-15724.

BKAILY, G., Choufani, S., Hassan, G., El-Bizri, N., Jacques, D. et D'Orlean-Juste, P. 2000. Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells. Journal of cardiovascular pharmacology, vol. 36, p.S414-S417.

BKAILY, G., Massaad, D., Choufani, S., Jacques, D. et D'Orlean-Juste, P. 2002. Role of endothelin-1 receptors in the sarcolemma membrane and the nuclear membrane in the modulation of basal cytosolic and nuclear calcium levels in heart cells. Clinical Science, vol.103, p.S141-S147.

BKAILY, G., Jacques, D., D'Orlean-Juste, P., Gobeil, F., Jr., Chemtob, S., Choufani, S. et Nader, M. 2003. Nuclear membranes channels, exchangers and G-protein coupled receptors: a new target for drug action. Current Topics in Pharmacology, vol. 7, p.269-278.

BENNETT, R.T., Jones, R.D., Morice, A.H., Smith, C.F. et Cowen, M.E. 2004. Vasoconstrictive effects of endothelin-1, endothelin-3, and urotensin II in isolated perfused human lungs and isolated human pulmonary arteries. Thorax, vol. 59, p.401-407.

- BERN, H.A. et Lederis, K. 1969. A reference preparation for study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. Journal of Endocrinology, vol. 45, p.11-12.
- BERN, H.A., Pearson, D., Larson, B.A. et Nishioka, R.S. 1985. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. Recent Progress in Hormone Research, vol.41, p. 533-552.
- BOCKAERT, J. et Pin J.P. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. The EMBO journal, vol.18, p.1723-1729.
- BÖHM, F., et Pernow, J. 2002. Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. British Journal of Pharmacology, vol. 135, p.25-27.
- BOIVIN, B., Chevalier, D., Villeneuve L.R., Rousseau, E. et Allen, B.G. 2003. Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. The Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p.29153-29163.
- BOOZ, G.W., Conrad, K.M., Hess, A.L., Singer, H.A. et Baker, K.M. 1992. Angiotensin-II-binding sites on hepatocytes nuclei. Endocrinology, vol.130, p.3641-3649.
- BOTTRILL, F.E., Douglas, S.A., Hiley, C.R. et White, R. 2000. Human urotensin-II is an endothelium-dependant vasodilator in rat small arteries. British Journal of Pharmacology, vol. 130, p.1865-1870.
- BOUCARD, A.A, Sauvé, S.S., Guillemette, G., Escher, E. et Leduc, R. 2003. Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. The Biochemical journal, vol.370, p.829-838.
- BRKOVIC, A., Hattenberger, A., Kostenis, E., Klabunde, T., Flohr, S., Kurz, M., Bourgault, S. et Fournier, A. 2003. Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 306, p.1200-1209.
- CAMARDA, V., Rizzi, A., Calò, G., Gendron, G., Perron, S.I., Kostenis, E., Zamboni, P., Mascoli, F. et Regoli, D. 2002. Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, vol. 365, p.141-149.
- CAMARDA, V., Song, W., Marzola, E., Spagnol, M., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., Behm, D.J., Douglas, S.A., Calò, G. et Lambert, D.G. 2004. Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. European Journal of Pharmacology, vol. 498, p.83-86.
- CARMAN, C., Som, T., Kim, C. et Benovic, J. 1998. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. The Journal of Biological Chemistry, vol.73, p.20308-20316.

CASTEL, H., Diallo, M., Chatenet, D., Leprince, J., Desrues, L., Schouft, M.T., Fontaine, M., Dubessy, C., Lihmann, I., Scalbert, E., Malagon, M., Vaudry, H., Tonon, M.C. et Gandolfo, P. 2006. Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. Journal of Neurochemistry, vol.99, p.582-595.

CHEN, R., Mukhin, Y.V., Garnovskaya, M.N., Thielen, T.E., Iijima, Y., Huang, C., et al. 2000. A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependant nuclear translocation. American Journal of Physiology. Renal physiology, vol.279, p.F440-F448.

CHRISTOPHE, D., Christophe-Hobertus, C. et Pichon, B. 2000. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? Cellular Signalling, vol. 12, p.337-341.

CLOZEL, M., Hess, P., Qiu, C., Ding, S.S. et Rey, M. 2006. The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 316, p.1115-1121.

CONKLIN, B.R. et Bourne, H.R. 1993. Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. Cell, vol.73, p.631-641.

CONLON, J.M., O'Harte, F., Smith, D.D., Tonon, M.C. et Vaudry, H. 1992. Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 188, p.578-583.

CONLON, J.M., Yano, K., Waugh, D. et Hazon, N. 1996. Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. The Journal of Experimental Zoology, vol. 275, p.226-238.

COULOUARN, Y., Lihmann, I., Jegou, S., Anouar, Y., Tostivint, H., Beauvillain, J.C., Conlon, J.M., Bern, H.A. et Vaudry, H. 1998. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. vol.95, p.15803-15808.

COULOUARN, Y., Jegou, S., Tostivint, H., Vaudry, H. et Lihmann, I. 1999. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. FEBS Letters, vol. 457, p.28-32.

DAVENPORT, A.P. et Maguire, J.J. 2000. Urotensin II: fish neuropeptide catches orphan receptor. Trends Pharmacology Sciences, vol. 21, p.80-82.

DEJANA, E., Orsenigo, F. et Lampugnani, M.G. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. Journal of Cell Science, vol. 121, p.2115-2122.

DOUGLAS, S.A. 2003. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? Current Opinion in Pharmacology, vol. 3, p.159-167.

DOUGLAS, S.A. et Ohlstein, E.H. 2000. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. Trends in Cardiovascular Medicine, vol. 10, p.229-237.

DOUGLAS, S.A., Tayara, L., Ohlstein, E.H., Halawa, N. et Giaid, A. 2003. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. Lancet, vol. 359, p.1990-1997.

DOUGLAS, S.A., Sulpizio, A.C., Piercy, V., Sarau, H.M., Ames, R.S., Aiyar, N.V., Ohlstein, E.H., et Willette, R.N. 2000. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. British Journal of Pharmacology, vol. 131, p.1262-1274.

FILMORE, D., 2004. It's a GPCR world. Modern drug discovery, vol. 11, p.24-28.

GAO, X., Kouklis, P., Xu, N., Minshall, R.D., Sandoval, R., Vogel, S.M. et Malik, A.B. 2000. Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, vol. 279, p.1218-1225.

GARDINER, S.M., March, J.E., Kemp, P.A., Davenport, A.P. et Bennett, T. 2001. Depressor and regionally-selective vasodilator effects on human and rat urotensin II in conscious rats. British Journal of Pharmacology, vol. 132, p.1625-1629.

GARDINER, S.M., March, J.E., Kemp, P.A., Maguire, J.J., Kuc, R.E., Davenport, A.P. et Bennet, T. 2006. Regional heterogeneity in the haemodynamic responses to urotensin II infusion in relation to UT receptor localization. British Journal of Pharmacology, vol. 147, p.612-621.

GHERSI, G., Chen, W., Lee, E.W. et Zukowska, Z. 2001. Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. Peptides, vol. 22, p.453-458.

GOBEIL, F., Jr., Dumont, I., Marrache, A.M., Vazquez-Tello, A., Bernier, S.G., Abran, D, Hou, X., Beauchamp, M.H., Quiniou, C., Bouayad, A., Choufani, S., Bhattacharya, M., Molotchnikoff, S., Ribeiro-da-Silva, A., Varma, D.R., Bkaily, G. et Chemtob, S. 2002. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP₃ receptors. Circulation Research, vol. 90, p.682-689.

GOBEIL, F., Jr., Vazquez-Tello, A., Marrache, A.M., Bhattacharya, M., Checchin, D., Bkaily, G., Lachapelle, P., Ribeiro-da-Silva, A. et Chemtob, S. 2003a. Nuclear prostaglandin signaling system: biogenesis and actions via heptahelical receptors. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol.81, p.196-204.

GOBEIL, F., Jr., Bernier, S.G., Vazquez-Tello, A., Brault, S., Beauchamp, M.H., Quiniou, C., Marrache, A.M., Checchin, D., Sennlaub, F., Hou, X., Nader, M., Bkaily, G., Ribeiro-da-Silva, A., Goetzl, E.J. et Chemtob, S. 2003b. Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p.38875-38883.

GOBEIL, F., Jr., Zhu, T., Brault, S., Geha, A., Vazquez-Tello, A., Fortier, A., Barbaz, D., Checchin, D., Hou, X., Nader, M., Bkaily, G., Gratton, J.P., Heveker, N., Ribeiro-da-Silva, A., Peri, K., Bard, H., Chorvatoya, A., D'Orléans-Juste, P., Goetzl, E.J. et Chemtob, S. 2006. Nitric oxide signaling via nuclearized e-NOS in the expression of immediate early genes i-NOS and mPGES-1. Journal of Biological Chemistry, vol.281, p.16058-16067.

GONG, H., Wang, Y.X., Zhu, Y.Z., Wang, W.W., Wang, M.J., Yao, T. et Zhu, Y.C. 2004. Cellular distribution of GPR14 and the positive inotropic role of urotensin II in the myocardium in adult rat. Journal of Applied Physiology, vol. 97, p. 2228-2235.

GRAY, G.A., Jones, M.R. et Sharif, I. 2001. Human urotensin II increases coronary perfusion pressure in the isolated rat heart: potentiation by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition. Life Sciences, vol. 69, p.175-180.

HARRIS, D.M., Cohn, H.I., Pesant, S. et Eckhart, A.D. 2008. GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. Clinical Science, vol. 115, p.79-89.

HEIST, E.K. et Schulman, H. 1998. The role of Ca²⁺/calmodulin-dependant protein kinases within the nucleus. Cell Calcium, vol.23, p.103-114.

HILLIER, C., Berry, C., Petrie, M.C., O'Dwyer, P.J., Hamilton, C., Brown, A. et McMurray, J. 2001. Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber. Circulation, vol. 103, p.1378-1381.

ISHIHATA, A., Sakai, M. et Katano, Y. 2006. Vascular contractile effect of urotensin II in young and aged rats : influence of aging and contribuutuion of endothelial nitric oxide. Peptides, vol. 27, p.80-86.

JACQUES, D., Sader, S., Perreault, C., Fournier, A., Pelletier G., Beck-Sickinger, A.G. et Descorbeth, M. 2003a. Presence of neuropeptide Y and Y₁ receptor in the plasma membrane ans nuclear envelope of human endocardial endothelial cells : modulation of intracellular calcium. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 81, p. 288-300.

JACQUES, D., Abdel-Malak, N.A., Sader, S. et Perreault, C. 2003b. Angiotensin II and its receptors in human endocardial endothelial cells: role in modulating intracellular calcium. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 81, p.259-266.

- JACQUES, D., Descorbeth, M., Abdel-Samad, D., Provost, C. et Jules, F. 2005. The distribution and density of ET-1 and its receptors are different in human right and left ventricular endocardial endothelial cells. Peptides, vol. 26, p.1427-1435.
- JACQUES, D., Sader, S., Perreault, C., Abdel-Samad, D., Jules, F. et Provost, C. 2006. NPY, ET-1, and Ang II nuclear receptors in human endocardial endothelial cells. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 84, p.299-307.
- JOHNS, D.G., Ao, Z., Naselsky, D., Herold, C.L., Maniscalco, K., Sarov-Blat, L., Steplewski, K., Aiyar, N. et Douglas, S.A. 2004. Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, vol. 370, p.238-250.
- JOHNSON, L.R., Scott, M.G. et Pitcher, J.A. 2004. G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. Molecular and Cellular Biology, vol.24, p.10169-10179.
- KATANO, Y., Ishihata, A., Aita, T., Ogaki, T. et Horie, T. 2000. Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. European Journal of Pharmacology, vol. 402, p.5-7.
- KOTULA-BALAK, M., Hejmej, A., Sadowska, J. et Bilinska, B. 2007. Connexin 43 expression in human and mouse testes with impaired spermatogenesis. European Journal of Histochemistry, vol.51, p.261-268.
- LABURTHE, M., Couvineau, A. et Tan, V. 2007. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. Peptides, vol. 28, p.1631-1639.
- LAM, M.H., Thomas, R.J., Martin, T.J., Gillespie, M.T. et Jans, D.A. 2000. Nuclear and nucleolar localization of parathyroid hormone-related protein. Immunology and Cell Biology, vol. 78, p.395-402.
- LEE, D.K., Lanca, A.J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X.D., Gobeil, F, Jr., Chemtob, S., George, S.R. et O'Dowd B.F. 2004. Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT₁, and bradykinin B₂ receptors. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p.7901-7908.
- LI, L., He, S., Sun, J.M. et Davie, J.R. 2004. Gene regulation by Sp1 and Sp3. Biochemistry and cell biology, vol.82, p.460-471.
- LIU, F. et Gutstein, D.E. 2002. The cardiac gap junction: a potential therapeutic target in the treatment of heart disease. The Mount Sinai Journal of Medicine, vol. 29, p.421-424.
- LIU, Q., Pong, S.S., Zeng, Z., Zhang, Q., Howard, A.D., Williams, D.L.Jr., Davidoff, M., Wang, R., Austin, C.P., McDonald, T.P., Bai, C., George, S.R., Evans, J.F. et Caskey, C.T. 1999. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-

protein-coupled receptor GPR14. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 266, p.174-178.

LU, D., Yang, H., Shaw, G., et Raizada, M.K. 1998. Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. Endocrinology, vol. 139, p.365-375.

MACLEAN, M.R., Alexander, D., Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Morecroft, I. et Pollard, K. 2000. Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. British Journal of Pharmacology, vol. 130, p.201-204.

MAGUIRE, J.J., Kuc, R.E. et Davenport, A.P. 2000. Orphan-receptor ligand human urotensin II : receptor localisation in human tissues and comparison of vascular responses with endothelin-1. British Journal of Pharmacology, vol. 131, p.441-446.

MAGUIRE, J.J., Kuc, R.E. Wiley, K.E., Klein, M.J. et Davenport, A.P. 2004. Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. Peptides, vol. 25, p.1767-1774.

MALVIYA, A.N. et Rogue, P.J. 1998. Tell me where is calcium bred: clarifying the roles of nuclear calcium. Cell, vol.92, p.17-23.

MARCHESE, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H.H., Saldivia V.R., Cheng, R., Murphy, P.M., Tsui, L.C., Shi, X., Gregor, P., George, S.R., O'Dowd, B. et Docherty, J.M. 1995. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10 and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. Genomics, vol. 29, p.335-344.

MARRACHE, A.M., Gobeil, F, Jr., Bernier, S.G., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Choufani, S., Bkaily, G., Bourdeau, A., Sirois, M.G., Vazquez-Tello, A., Fan, L., Joyal, J.S., Filep, J.G., Varma, D.R., Ribeiro-da-Silva, A. et Chemtob, S. 2002. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. The Journal of Immunology, vol. 169, p.6474-6481.

MARRACHE, A.M., Gobeil, F., Jr. et Chemtob, S. 2004. Intracrine signaling of phospholipid mediators via cognate nuclear G protein-coupled receptors. Gene Therapy and Molecular Biology. vol.8, p.115-124

MATSUSHITA, M., Shichiri, M., Imai, T., Iwashina, M., Tanaka, H., Takasu, N., Hirata, Y. 2001. Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. Journal of Hypertension, vol. 19, p.2185-2190.

MORI, M., Sugo, T., Abe, M., Shimomura, Y., Kurihara, M., Kitada, C., Kikuchi, K., Shintani, Y., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O. et Fujino, M. 1999. Urotensin-II is

the endogenous ligand of a G-protein coupled orphan receptor, SENR (GPR14). Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 265, p.123-129.

NEER, E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. Cell, vol. 80, p.249-257.

NOTHACKER, H.P., Wang, Z., McNeill, A.M., Saito, Y., Merten, S., O'Dowd, B., Duckles, S.P. et Civelli, O. 1999. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. Nature Cell Biology, vol. 1, p.383-385.

O'DOWD, B.F., Hnatowitch, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J et Bouvier, M. 1989. Palmitoylation of the human B2-adrenergic receptors. Mutation of Cys341 in carboxy tail leads to an uncoupled non-palmitoylation form of the receptor. The Journal of Biological Chemistry, vol.264, p.7564-7569.

PAYSANT, J., Rupin, A., Simonet, S., Fabiani, J.N. et Verbeuren T.J. 2001. Comparison of the contractile responses of human coronary bypass grafts and monkey arteries to human urotensin-II. Fundamental and Clinical Pharmacology, vol. 15, p.227-231.

PEARSON D., Shively, J.E., Clark, B.R., Geschwind, I.I., Barkley, M., Nishioka R.S. et Bern, H.A. 1980. Urotensin II: A somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., vol. 77, p.5021-5024.

PROTOPOPOV, A., Kashuba, V., Podowski, R., Gizatullin, R., Sonnhammer, E., Wahlestedt, C. et Zabarovsky, E.R. 2000. Assignment of the GPR14 gene coding for the G-protein-coupled receptor 14 to human chromosome 17q25.3 by fluorescent in situ hybridization. Cytogenetics and Cells Genetics, vol. 88, p.312-313.

QI, J.S., Minor, L.K., Smith, C., Hu, B., Yang, J., Andrade-Gordon, P. et Damiano, B. 2005. Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. Peptides, vol.26, p.683-690.

ROSS, S., Best. J.L, Zon, L.I. et Gill, G. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. Molecular Cell, vol 10, p.831-842.

RUSSELL, F.D., Meyers, D., Galbraith, A.J., Bett, N., Toth, I., Kearns, P. et Molenaar, P. 2003. Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, vol.285, p.H1576-1581.

RUSSELL, F.D., Kearns, P., Toth, I. et Molenaar, P. 2004. Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells in vitro. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 310(1), p.209-214.

SAUZEAU, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P. et Loirand, G. 2001. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. Circulation Research, vol.88, p1102-1104.

SILVESTRE, R.A., Rodriguez-Gallardo J., Egido, E.M. et Marco, J. 2001. Inhibition of insulin release by urotensin II – a study on the perfused rat pancreas. Hormone and Metabolic Research, vol.33, p.379-381.

SONDERMEIJER, B., Komp, A., Komesaroff, P. et Krum, H. 2005. Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension. American Journal of Hypertension, vol.18, p.1195-1199.

SPANO, J.P., Andre, F., Morat, L., Sabatier, L., Besse, B., Combadiere, C., Deterre, P., Martin, A., Azorin, J., Valeyre, D., Khayat, D., Le Chevalier, T. et Soria, J.C. 2004. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. Annals of Oncology, vol. 15, p.613-617.

STIRRAT, A., Gallagher, M., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., Berry, C., Kirk, A., Richardson, M. et MacLean, M.R. 2001. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, vol. 280, p.925-928.

TAL, M., Ammar, D.A., Karpuj, M., Krizhanovsky, V., Naim, M. et Thompson, D.A. 1995. A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 209, p.752-759.

TAN, C.M, Brady A.E., Nickols, H.H. Wang, Q. et Limbird, L.E. 2004. Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 44, p.559-609.

TEASDALE, R.D., et Jackson, M.R. 1996. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. Annual Review of Cell and Developmental Biology, vol.12, p.27-54.

TOTSUNE, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Satoh, F., Ito, S., Kimura, Y., Sasano, H. et Murakami, O. 2001. Role of urotensin II in patients on dialysis. Lancet, vol. 358, p.810-811.

TOTSUNE, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Ito, S. et Murakami, O. 2003. Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. Clinical Science, vol.104, p.1-5.

TZANIDIS, A., Hannan, R.D., Thomas, W.G., Onan, D., Autelitano, D.J., See, F., Kelly, D.J., Gilbert, R.E. et Krum, H. 2003. Direct actions of urotensin II on the heart:

implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. Circulation Research, vol. 93, p.246-253.

WATANABE, T., Pakala, R., Katagiri, T. et Benedict, C.R. 2001a. Synergistic effect of urotensine II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. Circulation, vol. 104, p.16-18.

WATANABE, T., Pakala, R., Katagiri, T. et Benedict, C.R. 2001b. Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. Journal of Hypertension, vol.19, p.2191-2196.

WATSON, P.H., Fraher, L.J., Hendy, G.N., Chung, U.I., Kisiel, M., Natale, B.V. et Hodsman, A.B. 2000. Nuclear localization of type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. Journal of Bone and Mineral Research, vol.15, p-1033-1044.

WENYI, Z., Suzuki, S., Hirai, M., Hinokio, Y., Tanizawa, Y., Matsutani, A., Satoh, J. et Oka, Y. 2003. Role of urotensin II gene in genetic susceptibility to Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. Diabetologia, vol.46, p.972-976.

WILKINSON, I.B., Affolter, J.T., de Haas, S.L., Pellegrini, M.P., Boyd, J., Winter, M.J., Balment, R.J., et Weeb, D.J. 2002. High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. Cardiovascular Research, vol. 53, p.341-347.

WILLARD, F.S. et Crouch, M.F. 2000. Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins. Immunology and Cell Biology. vol.78, p.387-394.

XITONG, D., Bradley, W.D., et Kardami, E. 2003. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 242, p.35-38.

YANG, S.H., Lu, D., Vinson, G.P. et Raizada, M.K. 1997. Involvement of MAP kinase in angiotensin II-induced phosphorylation and intracellular targeting of neuronal AT₁ receptors. Journal of Neuroscience. vol.17, p.1660-1669.

YI, X.P., Gerdes, A.M. et Li, F. 2002. Myocyte redistribution of GRK2 and GRK5 in hypertensive, heart-failure-prone rats. Hypertension, vol. 39, p.1058-1063.

YI, X.P., Zhou, J., Baker, J., Wang, X., Gerdes, A.M. et Li, F. 2005. Myocardial expression and redistribution of GRKs in hypertensive hypertrophy and failure. The Anatomical Record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology, vol. 282, p.13-23.

YONEDA, Y., Hieda, M., Nagoshi, E. et Miyamoto, Y. 1999. Nucleoplasmic protein transport and recycling of Ran. Cell Structure and Function, vol. 24, p.425-433.

ZHANG, A.Y., Chen, Y.F., Zhang, D.X., Yi, F.X., Qi, J., Andrade-Gordon, P., de Garavilla, L., Li, P.L. et Zou, A.P. 2003. Urotensin II is a nitric oxide-dependant vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. American Journal of Physiology. Renal physiology, vol. 285, p .F792-F798.

ZHU, Y.C., Zhu, Y.Z. et Moore P.K. 2006. The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases. British Journal of Pharmacology, vol. 148, p.884-901.