Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

DÉCOUVERTE DE SÉQUENCES PEPTIDIQUES LIANT L'ENDOTHÉLINE-1 ET INHIBANT SON ACTION

Par
Josée Frappier

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

Jury d'évaluation

Examinateur externe :	Alain Cadieux, Université de Sherbrooke, département de pharmacologie
Examinateur interne :	Cathy Vaillancourt, INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche :	Alain Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier

©Droits réservés de *Josée Frappier*, 2007

Résumé

Suite à sa découverte en 1988 par Yanagisawa, l'endothéline-1 (ET-1) a été rapidement considérée comme l'un des agents vasoconstricteurs les plus puissants et comme un facteur important de l'hypertension. La recherche universitaire et l'industrie pharmaceutique ont donc amorcé prioritairement des travaux afin de mettre au point des antagonistes des récepteurs de l'ET.

L'objectif visé par cette étude est de développer une nouvelle approche pharmacologique par la découverte de peptides liant l'ET-1 et inhibant son action. Pour ce faire, la technique de criblage de banque de phages (CBP) a été utilisée. Cette stratégie permet de sélectionner les peptides ayant une affinité significative pour une cible à l'aide d'une librairie de phages exprimant de 10^6 à 10^9 peptides distincts.

Une expérience de CBP effectuée précédemment au laboratoire avait permis d'obtenir une séquence consensus. Par conséquent, les travaux présentés débutent par la construction d'une première librairie peptidique. L'affinité de celle-ci pour l'ET-1 est statistiquement supérieure à celle d'un peptide utilisé comme contrôle négatif. Ces résultats ont mené à la synthèse d'une librairie de phages partiellement aléatoire dont le titre était de $1,6 \times 10^5$ clones. Cette librairie de phages a été construite selon le système T7Select 10-3b de Novagen puis a été exposée à l'ET-1 afin de sélectionner les clones exprimant les peptides ayant le plus d'affinité pour l'ET-1. Suite aux tours de sélection, 21 clones ont été séquencés. L'étape suivante a été de synthétiser une librairie de peptides correspondant aux séquences trouvées et de tester leur affinité relative. L'affinité des peptides de cette dernière librairie peptidique s'est avérée être similaire ou supérieure au meilleur peptide de la première librairie peptidique. De plus, deux peptides ont été testés quant à leur potentiel d'inhibition de la vasoconstriction de l'ET-1 sur des aortes de rat et ils ont été capables de provoquer une augmentation de l'EC_{50} de l'ET-1, donc de réduire l'activité du peptide.

En plus de conduire à l'identification de deux peptides liant l'ET-1 et inhibant son action vasoconstrictrice, la comparaison des séquences obtenues avec le protéome humain a permis de trouver des séquences analogues dans des protéines se liant à l'ADN, dans des protéines dont l'action est reliée à l'ADP/ATP ainsi que dans des protéases à sérine. La famille des protéases à sérine dont notamment l'hepsine et la chymase offre un intérêt particulier. L'hepsine est une protéase à sérine dont l'action est impliquée dans la coagulation. Elle possède 11 acides aminés correspondant à une des séquences de notre banque. Également, l'ET-1 est connue pour interagir avec différentes protéases à sérine comme par exemple la chymase qui possède la capacité de cliver la Big ET-1 en ET-1(1-31) de même que la thrombine qui est impliquée dans le processus de la coagulation.

Josée Frappier

Étudiant

Directeur de recherche

Remerciements

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Alain Fournier qui m'a accueillie dans le laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides afin de participer à ce projet basé sur la stratégie du *phage display*.

Je tiens également à remercier l'assistante de recherche, Myriam Létourneau, pour ses précieux conseils ainsi que les membres présents et passés du laboratoire, soit Duc Ngoc Doan, Eugène Francoeur, Jacinthe Aubin, Kathy Turcotte, Stéphane Boivin, Steve Bourgault et Yan Fu.

Je tiens à souligner l'aide de Julie Dufresne, Diane Barriault, Philippe Garneau et Philippe Nadeau qui m'ont prodigué leurs précieux conseils et qui ont partagé leurs bagages scientifiques concernant la synthèse de la librairie de phages et l'analyse des résultats du séquençage.

Aussi je désire exprimer toute ma gratitude à ma mère, Francine Richard, et à mes grands-parents, Annette Richard et feu Omer Richard, qui m'ont supportée tout au long de mes études. De plus, je tiens à remercier mon copain Maxime Bordeleau-Gariépy pour son support et sa compréhension.

Finalement, je tiens à saluer Annie Lamoussenerie qui prend en main la suite de mon projet de maîtrise.

Table des matières

Résumé.....iii
Remerciements.....v
Table des matières.....vi
Liste des figures.....ix
Liste des tableaux.....x
Liste des abréviations.....xi
Préambule.....1
Chapitre 1 : L'endothéline.....3
1.1 Découverte, synthèse et structure de l'endothéline-1 (ET-1).....3
1.2 Les récepteurs et rôles biologiques de l'ET-1.....6
1.2.1 Voie de signalisation générale.....6
1.2.2 Les récepteurs de l'ET.....7
1.2.2.1 Localisation.....7
1.2.2.2 Expression des gènes des récepteurs de l'ET.....8
1.2.3 Synthèse et rôles biologiques de l'ET-1.....8
1.2.3.1 Localisation des endothélines.....8
1.2.3.2 Expression des gènes de l'endothéline.....9
1.3 Pathologies reliées à l'ET-1.....9
1.3.1 ET-1, cible pharmacologique actuelle.....10
1.3.2 Principales cibles pharmacologiques actuelles.....10
Chapitre 2 : Le criblage de banques de phages (CBP).....12
2.1 Description du criblage de banques de phages et de ses dérivés.....12
2.2 Applications du CBP.....14
2.2.1 Principaux phages utilisés.....15
2.2.1.1 Le bactériophage T7.....16
2.2.2 Librairies peptidiques.....18
2.2.3 Méthodes de criblage.....18
2.3 Objectifs de recherche.....20
Section 3 : Matériel et Méthodes.....22

3.1 Choix des peptides synthétisés 22
3.2 Synthèse de peptides liant l'endothéline-1 23
3.2.1 Réactifs utilisés 23
3.2.2 Protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc 24
3.2.3 Clivage des peptides 25
3.2.4 Purification par CLHP préparative 26
3.2.5 Caractérisation des peptides par CLHP analytique 26
3.2.6 Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF 26
3.3 Test de liaison 27
3.4 Synthèse de la librairie de phages 28
3.4.1 Amplification de la librairie 29
3.4.2 Clivage des sites de restriction 29
3.4.3 Production d'une librairie de phages T7 mutants 31
3.4.4 Calcul du titre de la librairie 31
3.4.5 Amplification des phages 32
3.4.6 Tours de sélection 32
3.4.6.1 Préparation des plaques 32
3.4.6.2 Sélection des phages 33
3.5 Séquençage des inserts du phage T7Select 10-3b 33
3.6 Essais pharmacologiques 34
Section 4 : Résultats 36
4.1 Évaluation des séquences obtenues lors des travaux précédents 36
4.1.1 Synthèse des peptides liant l'endothéline-1 (EBP) 36
4.1.2 Tests de liaison 36
4.2 Obtention de nouvelles séquences liant l'ET-1 38
4.2.1 Production d'une nouvelle librairie de phages 38
4.2.2 Séquençage des phages issus des tours de sélection 40
4.3 Évaluation de l'intérêt des nouvelles séquences 43
4.3.1 Analyse des motifs 43
4.3.2 Synthèse de la seconde librairie peptidique 43

4.3.3 Liaison de la seconde librairie peptidique à l'ET-1 44
4.3.4 Inhibition de l'action de l'ET-1 par les EBPs 45
4.3.5 Correspondance des EBPs chez l'humain.....46
4.3.6 Présentation de la structure de protéines liant possiblement l'ET-1 50
Section 5 : Discussion.....54
5.1 Affinité de la première librairie peptidique pour l'ET-1.....54
5.2 Production de la librairie et sélection pour l'ET-1.....55
5.3 Analyse des séquences obtenues par séquençage 56
5.3.1 Motifs observés par analyse des séquences.....56
5.3.2 Évaluation de la liaison des peptides à l'ET-1 57
5.3.3 Analogie des séquences avec le protéome humain (BLAST) 60
5.4 Perspectives.....62
Section 6 : Conclusion 63
Appendice A 64
Liste des références.....66

Liste des figures

Figure 1 : Structure des trois isoformes de l'endothéline retrouvées chez l'humain 5

Figure 2 : Étapes d'un cycle de criblage de banques de phages 13

Figure 3 : Carte génétique du phage T7 17

Figure 4 : Schéma du test de liaison ELISA 27

Figure 5 : Test de liaison de la première librairie peptidique avec l'ET-1 38

Figure 6 : Quantité de phages récupérés après chaque tour de sélection 40

Figure 7 : Tests de liaison de la seconde librairie peptidique avec l'ET-1 44

Figure 8 : Inhibition de la contraction induite par l'ET-1 en présence des peptides EBP-P10A1 et EBP-P100C2 46

Figure 9 : Structure tridimentionnelle de l'hepsine et emplacement de la séquence analogue 50

Figure 10 : Structure tridimentionnelle de l'α-trypsine porcine ayant 48,9 % de similarité avec la kallikréine 10 51

Figure 11 : Structure tridimentionnelle de BAG-4 et comparaison des séquences 52

Figure 12 : Structure tridimentionnelle de l'*ADP-ribosylation protein factor like 2* et alignement de sa séquence avec la séquence 81 53

Liste des tableaux

Tableau I : Peptides synthétiques issus des première et seconde librairies 23
Tableau II : Cycle de couplage des acides aminés.....25
Tableau III : Composition des mélanges de nucléotides.....28
Tableau IV : Digestion des inserts et des contrôles.....30
Tableau V : Mélange réactionnel de la ligation 31
Tableau VI : Séquences des peptides exposés à la surface des phages sélectionnés 41
Tableau VII : Alignement des séquences obtenues par CBP.....42
Tableau VIII : Principales protéines analogues des séquences 24, 37, 81 et 100.....48
Tableau IX : Résumé des séquences obtenues d'intérêt majeur au cours des travaux.....57
Tableau X : Comparaison entre la séquence 100 et le contenu de diverses protéases à sérine.....61

Liste des abréviations

A.C.S.	*American Chemical Standard*
ACN	Acétonitrile
Big ET	Big Endothéline
BLAST	*Basic Local Alignment and Search Tool*
Boc	Tert-butyloxycarbonyle
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino)-phosphonium
BSA	Albumine sérique bovine *(bovine serum albumin)*
CaMKII	Kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline
CBP	Criblage de banques de phages
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CML	Cellule musculaire lisse
CTGF	Facteur de croissance des tissus conjonctifs
DAG	Diacylglycérol
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-diméthylformamide
dNTP	Désoxynucléotides
DO	Densité optique
E. coli	*Escherichia coli*
EBP	Peptide liant l'ET-1 *(ET-1 Binding Peptide)*
EC_{50}	Concentration provoquant 50 % de l'activité maximale *(Effective concentration)*
ECE	Enzyme de conversion de l'ET
EDNRA/EDNRB	Gène des récepteurs A et B de l'endothéline
EDT	Éthanedithiol
EDTA	Éthylènediaminetétraacétate *(ethylenediaminetetraacetic acid)*

EGF	Facteur de croissance de l'endothélium *(endothelium derived growth factor)*
ELISA	Dosage enzymatique par immuno-adsorption *(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)*
ERK:	Kinases régulées par signal extracellulaire (*extracellular signal-regulated kinases*)
ET	Endothéline
ET_A	Isoforme A du récepteur de l'endothéline
ET_B	Isoforme B du récepteur de l'endothéline
Fab	Fragment liant l'antigène (*fragment antigen binding*)
FDA	*Food and Drug Administration*
Fmoc	9-fluorènylméthyloxycarbonyle
HRP	Peroxydase de raifort *(horseradish peroxydase)*
IC_{50}: *concentration)*	Concentration inhibant l'effet de 50 % *(Inhibitoty*
IP_3	Inositol 1, 4, 5-triphosphate
IPTG	*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*
K_d	Coefficient de dissociation
LB	Milieu Luria-Bertani
MALDI-TOF	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight*
NEP	Néprilysine *(neutral endopeptidase)*
NFAT	Facteur de transcription nucléaire des cellules-T activées
NO	Oxyde nitrique
NPY	Neuropeptide Y
OtBu	Ester de tert-butyle
Pb	Paire de bases
Pbf	Pentafluorophényle
PBS	Tampon phosphate-NaCl
PBST	Tampon phosphate-NaCl avec Tween 0,1 % v/v
PCR	Réaction en chaîne par la polymérase *(Polymerase Chain Reaction)*

PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes *(Platelet-derived growth factor)*
PEG	Polyéthylèneglycol
Pfu	*Plaque forming unit*
PIP_2	Phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
scFv	Simple chaîne Fv
SEM	Erreur type sur la moyenne *(Standard error of mean)*
SEP	Endopeptidase sécrétée
SERCA	Calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique endoplasmique
STE	Tampon Sel-Tris-EDTA
TBE	Tampon Tris-Borate-EDTA
TBS	Tampon salin avec Tris *(Tris buffered saline)*
TBST	Tampon salin avec Tris et Tween 0,1 % v/v
tBu	Tert-butyloxycarbonyle
TFA	Acide trifluoroacétique
TGHβ	*Transforming growth factor-β*
TMB	3,3', 5,5' - tétraméthylbenzidine
TNFα	*Tumor necrosis factor-α*
Trt	Triphénylméthyle (aussi appelé trityle)

Préambule

Les maladies cardiovasculaires et notamment l'hypertension sont une cause importante de mortalité au pays. En particulier, l'endothéline-1 (ET-1) est impliquée dans plusieurs pathologies associées au système cardiovasculaire, entre autre parce qu'elle induit l'inflammation, le remodelage et l'hypertrophie du tissu cardiaque et des vaisseaux sanguins. Quelques antagonistes des récepteurs de l'ET ont donc été développés à des fins thérapeutiques.

Les stratégies thérapeutiques sont fréquemment basées sur le blocage de la liaison de l'agoniste par un antagoniste agissant au niveau du récepteur. Toutefois, nous avons repensé cette approche et notre objectif a plutôt été de développer des peptides liant l'ET-1 (EBP) dans le but d'inhiber son action. Cette approche a pour avantage la spécificité l'action comparativement aux approches ciblant le récepteur qui a plusieurs sous-types. Afin d'identifier des EBP, nous avons utilisé la technique de criblage de banques de phages (CBP). Il s'agit d'une technique permettant d'obtenir rapidement des peptides ayant une affinité et sélectivité pour une cible. Le CBP consiste à introduire une librairie d'ADN complètement ou partiellement aléatoire dans un des gènes de la capside du phage. La librairie se trouve ainsi exprimée sous forme peptidique à la surface des phages et ceux dont la capside présente les peptides ayant le plus d'affinité pour l'ET-1 peuvent être sélectionnés puis séquencés.

Tout d'abord, dans le chapitre I, une revue de la littérature relative à l'endothéline présente les voies de signalisation ainsi que les rôles de celles-ci en situation pathologique. Comme mentionné précédemment, nous avons utilisé la technique de CBP afin d'atteindre notre objectif. Par conséquent, le second chapitre porte donc sur la technique de CBP ainsi que sur ses diverses applications.

Les sections suivantes portent sur les expériences effectuées. Tout d'abord la section Matériel et Méthode décrit les procédures nécessaires pour produire des peptides liant

l'ET-1 et inhibant son action. La section suivante présente les résultats obtenus qui sont ensuite mis en perspective dans les sections Discussion et Conclusion.

Chapitre 1 :
L'endothéline

1.1 Découverte, biosynthèse et structure de l'endothéline-1 (ET-1)

Depuis que Yanagisawa a découvert l'ET-1 en 1988, celle-ci figure toujours comme l'une des substances vasoconstrictrices les plus puissantes à avoir été décrites à ce jour (Yanagisawa *et al.*, 1988).

L'ET-1 fait partie d'une famille contenant trois membres : ET-1, ET-2 et ET-3. Leurs précurseurs sont codés par des gènes distincts (Inoue *et al.*, 1989). Ces peptides de 21 acides aminés ont été isolés de divers tissus et ils sont entre autre caractérisés par la présence de deux ponts disulfures entre les Cys^1-Cys^{15} et Cys^3-Cys^{11}. Les trois isoformes de l'endothéline sont présentées à la Figure 1. Les peptides ET-2 et ET-3 diffèrent de l'ET-1 respectivement par deux acides aminés (positions 6 et 7) et six acides aminés (positions 2, 4 à 7 et 14). L'ET-1 est la plus importante des endothélines par son abondance et par la puissance de son pouvoir vasoconstricteur.

Le précurseur pré-proendothéline-1 est composé de 212 acides aminés. L'action de la furine, une convertase, transforme celui-ci par clivage pour donner la Big ET-1 qui compte 38 acides aminés. La conversion de la Big ET-1 en ET-1 est d'une grande importance physiologique étant donné que le produit a une action vasoconstrictrictrice environ 140 fois supérieure à celle du substrat (Kimura *et al.,* 1989). Cette conversion s'effectue principalement par une métalloendopeptidase zinc-dépendante, l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 (ECE-1). L'ECE-1 possède une affinité nettement supérieure pour la Big ET-1 que pour la Big ET-2 et la Big ET-3 (Ohnaka *et al.,* 1993). Deux autres isoformes de cette enzyme ont été décrites soit l'ECE-2 et l'ECE-3. De plus, l'ECE-1 et l'ECE-2 ont aussi des sous-isoformes dont la section N-terminale varie (Valdenaire *et al.,* 1995, Ikeda *et al.,* 2002, D'Orléans-Juste *et al.,* 2003). En ce qui concerne les isoformes ECE-2 et ECE-3, la première isoforme clive les trois isoformes de Big ET alors que la seconde clive uniquement la Big ET-3. En plus de cliver les Big ETs,

l'ECE-1 agit sur la pression artérielle en inactivant divers peptides comme l'angiotensine I, la bradykinine, la neurotensine et la substance P (Johnson *et al.,* 1999). La métalloprotéase neprilysine (NEP), tout comme l'ECE-1, serait aussi importante dans le clivage de la Big ET-1 en ET-1 (Tirapelli *et al.,* 2006).

La Big ET-1 est clivée principalement par l'ECE-1 et la NEP. D'autres enzymes, de moindre importance, clivent la Big ET-1 dont certaines métalloprotéases comme la SEP (endopeptidase sécrétée). Celle-ci hydrolyse plusieurs peptides participant à l'homéostasie vasculaire comme l'angiotensine I et la bradykinine (Ikeda *et al.,* 1999). La chymase, une protéase à sérine, est aussi une enzyme clivant la Big ET-1 pour former l'ET-1(1-31). Ce dernier produit est également vasoconstricteur et il agit via l'un des récepteurs de l'ET-1, ET_A. L'ET-1(1-31) peut être transformée par la NEP en ET-1 (Tirapelli *et al.,* 2006).

Les poumons constituent le principal site d'élimination de l'ET-1. Les parois alvéolaires et le parenchyme pulmonaire sont riches en récepteurs ET_B. Ceux-ci sont internalisés et dégradés dans les lysosomes alors que les récepteurs ET_A sont recyclés dans les endosomes (Dupuis *et al.,* 1996 et Brunner *et al.,* 2006).

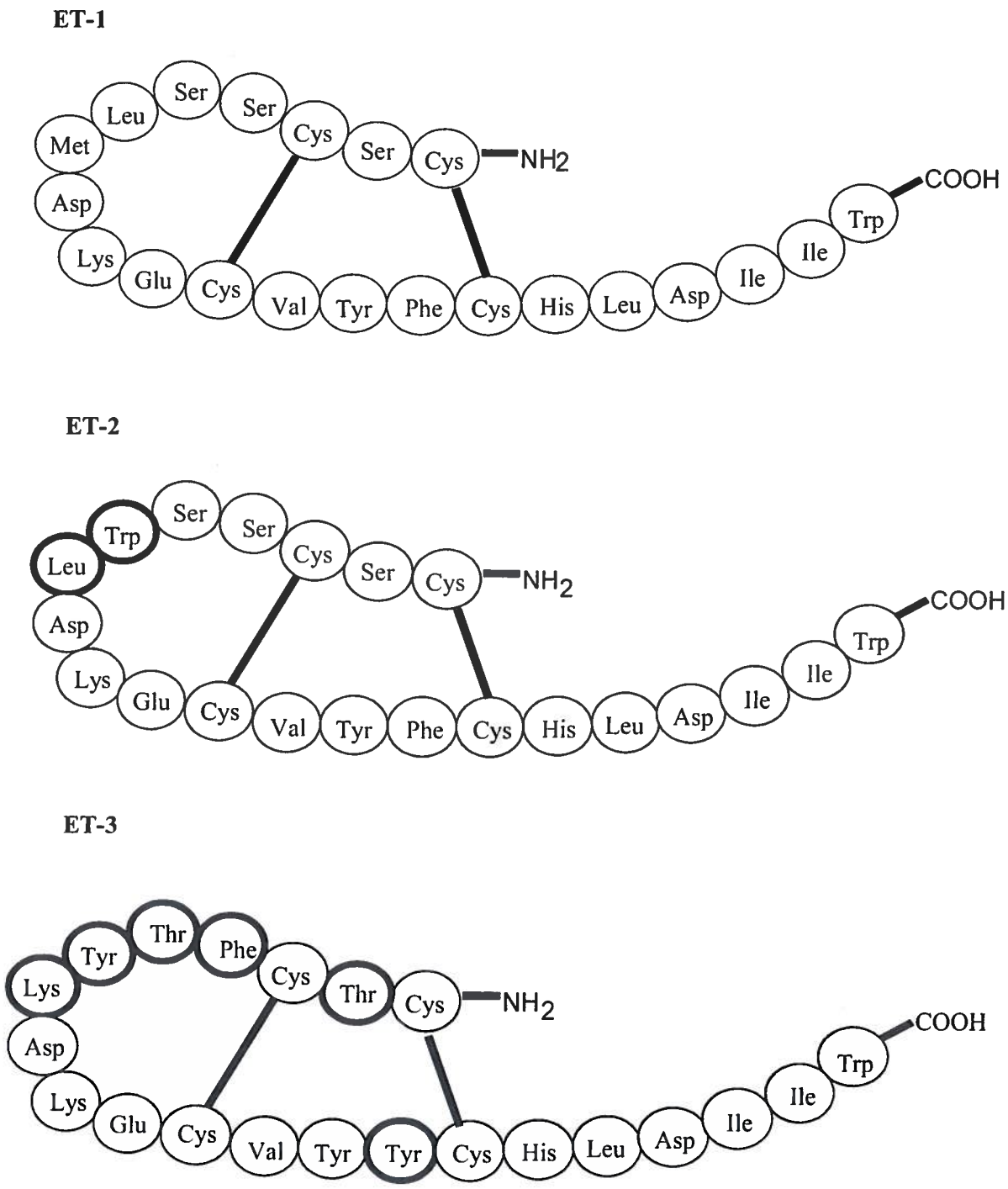


Figure 1 : Structure des trois isoformes de l'endothéline retrouvées chez l'humain. Les cercles en gras identifient les acides aminés qui diffèrent de l'ET-1.

1.2 Les récepteurs et rôles biologiques de l'ET-1

1.2.1 Voie de signalisation générale

L'action de l'ET-1 au cours du développement embryonnaire est essentielle. L'importance de l'ET-1 a été mise en évidence par Kurihara *et al* en 1994 via leurs modèles de souris *knock-outs* homozygotes de l'ET-1. Celles-ci meurent de troubles respiratoires à la naissance. Ils ont aussi prouvé que l'absence d'ET-1 nuit au développement du pharynx provenant du tissu craniofacial. Étonnamment, malgré l'intérêt qu'a suscité l'ET-1 au cours des 20 dernières années, son rôle exact dans l'homéostasie cardiovasculaire reste à définir. En contrepartie, l'implication de l'ET-1 est bien documentée pour son implication dans plusieurs physiopathologies du système cardiovasculaire dont l'hypertension artérielle et pulmonaire, l'athérosclérose, etc. (Touyz et Schiffrin 2003).

Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins sécrètent l'ET-1 par leur extrémité basolatérale. Le peptide-hormone agit de façon paracrine sur les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires via des récepteurs couplés aux protéines G (Wagner *et al.*,1992).

L'ET-1 induit l'inflammation, le remodelage et l'hypertrophie du myocarde via une protéine Gαq couplée au récepteur ET_A. Les récepteurs couplés aux protéines Gαq, lorsqu'activés par leur ligand, recrutent et activent la phospholipase Cβ (PLCβ). Celle-ci hydrolyse le PIP_2 (phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate) en DAG (diacylglycérol) et en IP_3 (inositol 1, 4, 5-triphosphate) (Salazar *et al.*, 2007). Le DAG ainsi produit active les PKCα, β, ε, et σ (protéines kinases C) dont la forme la plus abondante dans le myocarde est la PKCα. Celle-ci agit sur la contractilité par le phospholamban et par la phosphorylation de SERCA (réticulum sarcoplasmique endoplasmique calcium ATPase). D'un autre côté, suite à l'hydrolyse du PIP_2, l'IP_3 se lie aux récepteurs à canaux calciques

du réticulum sarcoplasmique. Cette liaison provoque le relargage de Ca^{2+} dans le cytoplasme de façon continue et entraîne l'activation de la calcineurine et de la CaMKII (Kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline). Celles-ci provoquent dans les cellules du myocarde la translocation au noyau du NFAT (facteur de transcription nucléaire des cellules-T activées) qui engendre une hypertrophie cardiaque (Salazar *et al.*, 2007).

En plus de contribuer au remodelage tissulaire en entraînant la translocation du NFAT, l'ET-1 stimule la production du CTGF (facteur de croissance des tissus conjonctifs). L'ET-1 agit via le récepteur ET_A et ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) pour augmenter la production du CTGF par les CML vasculaires (Rodriguez-Vita *et al.*, 2005).

L'ET-1 se lie aux récepteurs ET_A et ET_B dont la stimulation provoque la prolifération des CML des artères pulmonaires (Davie *et al.*, 2002). Tout d'abord, le récepteur ET_A induit la vasoconstriction, la mitogenèse et l'inotropisme positif. De plus, son affinité pour l'ET-1 est supérieure à celle pour l'ET-2 et l'ET-3. D'un autre côté, il y a deux sous-types de récepteurs ET_B : ET_{B1} (endothélial) et ET_{B2} (musculaire). Alors que ET_{B1} est vasodilatateur, ET_{B2} induit la vasoconstriction. ET_{B1} favorise la formation d'agents vasodilatateurs en activant la synthase d'oxyde nitrique (NO) et la cyclooxygénase. Celles-ci produisent respectivement les agents vasodilatateurs oxyde nitrique (NO) et les prostacyclines (Moreira *et al.*, 2004). Le NO possède un effet inotrope négatif par l'activation de la guanylate cyclase et par l'inhibition de la synthèse de l'ARNm de l'ET-1 (Kourembanas *et al.*, 1993).

1.2.2 Les récepteurs de l'ET

1.2.2.1 Localisation

La répartition des récepteurs à sept domaines transmembranaires ET_A et ET_B varie selon les tissus. Dans les vaisseaux sanguins, les récepteurs ET_A se trouvent dans les CML

alors que les récepteurs ET_{B1} et ET_{B2} se trouvent respectivement dans les cellules endothéliales et les CML. De façon similaire, dans le tissu cardiaque, les récepteurs ET_{B1} se trouvent dans les cellules épithéliales et les récepteurs ET_{B2} dans les cardiomyocytes (Moreira *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Expression des gènes des récepteurs de l'ET

Les gènes EDNRA et EDNRB codent respectivement pour les récepteurs ET_A et ET_B. Dans une situation physiologique normale, les récepteurs ET_A sont exprimés principalement dans la média et faiblement dans l'intima des vaisseaux sanguins. L'expression des récepteurs ET_A est modifiée parallèlement au remodelage tissulaire chez les patients hypertendus. Il y a augmentation des récepteurs ET_A dans la zone sous-endothéliale et diminution de leur expression dans la média (Hasegawa *et al.*, 1994)

L'action vasoconstrictrice de l'ET-1 est bloquée tant par les antagonistes des récepteurs ET_A que ET_B ce qui suggère que les récepteurs ET_B induiraient la vasoconstriction chez les patients hypertendus comparativement à leur rôle vasodilatateur en situation physiologique normale. Il se peut que l'expression des sous-types de récepteurs ET_B soit modifiée en situation physiopathologique. De plus, l'ET-1 induit davantage de vasoconstriction chez les patients hypertendus (Cardillo *et al.*, 1999).

1.2.3 Synthèse et rôles biologiques de l'ET-1

1.2.3.1 Localisation des endothélines

L'ET-1 est produite principalement par les cellules endothéliales et agit sur celles-ci ainsi que sur les cellules musculaires lisses vasculaires. La distribution de l'ET-2 et de l'ET-3 dans l'organisme diffère de celle de l'ET-1. Il a été démontré que les glandes surrénales sont l'un des principaux sites de liaison de l'ET-2 alors que l'ET-3 est retrouvée dans le système nerveux central et dans le système gastrointestinal. Contrairement aux deux autres isoformes, l'ET-3 n'est pas produite par les cellules endothéliales (D'Orléans-Juste *et al.*, 2003, Ortega Mateo et Artiñano, 1997, Agapitov et Haynes, 2002).

1.2.3.2 Expression des gènes de l'endothéline

La synthèse du précurseur pré-proendothéline est accrue par la participation de plusieurs voies de signalisation. Les cytokines TNFα (*tumor necrosis factor-α*) et TGHβ (*transforming growth factor-β*) ainsi que plusieurs agents vasoactifs tels l'angiotensine II, la norépinéphrine, la vasopressine et la bradykinine sont impliquées dans l'augmentation de pré-proendothéline en situation physiopathologique, notamment dans l'hypertension. Les facteurs de croissance PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) et EGF (facteur de croissance de l'endothélium) sont aussi impliqués dans la synthèse de pré-proendothéline ainsi que des stimuli physiques comme les forces de cisaillement et l'hypoxie (Touyz et Schiffrin, 2003).

Ergul et ses collaborateurs (1998) ont démontré, via une étude de cohorte incluant des hommes ayant une moyenne d'âge de 26 ans, qu'il existe une corrélation positive entre la concentration d'ET-1 présente dans le plasma d'un individu et sa pression sanguine. Lors du traitement de patients hypertendus, la concentration plasmatique d'ET-1 diminue en fonction de la diminution de la pression artérielle. La présence d'une grande quantité d'ET-1 dans le sang chez les hypertendus peut être reliée aux dommages de l'endothélium vasculaire (Ergul *et al.*, 1998 et Elijovich *et al.*, 2001). Toutefois, les dommages causés à l'endothélium ne sont pas l'unique cause de l'augmentation de la concentration plasmatique d'ET-1 puisque ce phénomène est aussi observé dans les premiers stades de développement de l'hypertension (Schneider *et al.*, 2000).

1.3 Pathologies reliées à l'ET-1

La modulation de la concentration de l'ET-1 est bien documentée dans plusieurs pathologies du système cardiovasculaire telles l'hypertension, l'artérosclérose, la fibrose pulmonaire et l'insuffisance rénale (Touyz et Schiffrin, 2003).

Dans une situation physiologique normale, la circulation pulmonaire est un site majeur de production et de dégradation de l'endothéline (Dupuis *et al.*, 1996). Dans l'hypertension artérielle pulmonaire, l'équilibre est débalancé puisque la synthèse d'ET-1 augmente alors que la dégradation du peptide diminue (Ortega Mateo et Artiñano, 1997).

1.3.1 ET-1, cible pharmacologique actuelle

L'endothéline joue un rôle significatif dans l'hypertension essentielle et pulmonaire. Depuis 2002, Santé Canada a accepté l'usage du Bosentan. Il s'agit du premier agent antagoniste mixte des récepteurs ET_A et ET_B approuvé contre l'hypertension artérielle pulmonaire. Le Bosantan améliore la résistance des patients à l'exercice ainsi que leurs caractéristiques hémodynamiques. Cependant, cette amélioration n'est marquée qu'au cours des 3 premiers mois de traitement. En effet, les recherches portant sur l'administration du Bosentan et d'autres antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B pour une période de 6 mois et plus ne montrent pas d'amélioration significative chez les patients recevant les antagonistes comparativement aux patients recevant le placebo (Badesch *et al.*, 2002 et Motte *et al.*, 2006). Les résultats de ces dernières études suggèrent qu'il serait probablement préférable de combiner l'usage d'antagonistes des récepteurs de l'ET-1 avec l'usage de médicaments ayant d'autres cibles pharmacologiques.

1.3.2 Principales cibles pharmacologiques actuelles

Parmi les médicaments utilisés actuellement, les diurétiques tels que le furosémide et l'hydrochlorothiazine forment la première ligne offensive contre l'hypertension. Les diurétiques ont l'avantage d'agir localement sur les pompes rénales. Ceci réduit le volume sanguin et, par conséquent, la pression artérielle. Par la suite les β-bloqueurs comme l'atenolol et le bisoprolol sont utilisés afin de diminuer le rythme et la force des contractions cardiaques. Parmi la liste des cibles pharmacologiques contre l'hypertension, on retrouve aussi les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ex : captopril) ainsi que des antagonistes du récepteur de l'angiotensine

(ex : valsartan). On retrouve également des bloqueurs de canaux calciques comme la félodipine. Finalement, les anticoagulants, les glycosides cardiaques et les α-bloqueurs sont aussi utilisés actuellement pour lutter contre l'hypertension. En fait, de plus en plus de patients contrôlent leur hypertension en inhibant simultanément plusieurs voies de signalisation cellulaires (Badesh *et al.*, 2002 et Ishikawa *et al.*, 2005). Étant l'importance de l'ET-1 dans l'hypertension, il est nécessaire de poursuivre la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques capables de mieux contrôler les effets de l'ET-1.

Chapitre 2 : Le criblage de banques de phages (CBP)

2.1 Description du criblage de banques de phages et de ses dérivés

La technique de criblage de banques de phages, aussi appelée *phage display*, permet de trouver des séquences peptidiques liant une molécule cible. Pour ce faire, une vaste librairie de peptides est exprimée à la surface de phages en insérant une librairie d'ADN partiellement ou totalement aléatoire dans le gène de la capside du phage. Certaines librairies permettent d'effectuer rapidement une sélection parmi plus de 10^9 (Filpula, 2007) phages différents. Comme décrit à la Figure 2, la librairie est tout d'abord présentée à la cible qui a préalablement été immobilisée sur un support solide. Les phages ne liant pas la cible sont éliminés par lavages tandis que ceux ayant adhérés à la cible sont élués de façon relative et amplifiés. Généralement, trois à quatre tours de sélection sont effectués. Suite aux sélections, le génotype des peptides d'intérêt est obtenu par séquençage.

Georges P. Smith a publié en 1985 le premier article concernant la technique *de phage display*. Il a inséré le gène de l'endonucléase EcoRI dans le gène codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine pIII de la capside du phage filamenteux M13. En exposant un mélange de phages non-modifiés et de phages contenant le gène de l'endonucléase EcoRI sur des plaques recouvertes d'anticorps spécifiques à cette enzyme, il lui a été possible d'augmenter le ratio de phages contenant l'enzyme par un facteur de 1000. En plus d'observer que les phages obtenus demeuraient infectieux, il a démontré qu'il est possible de sélectionner les phages liant une cible sur support solide.

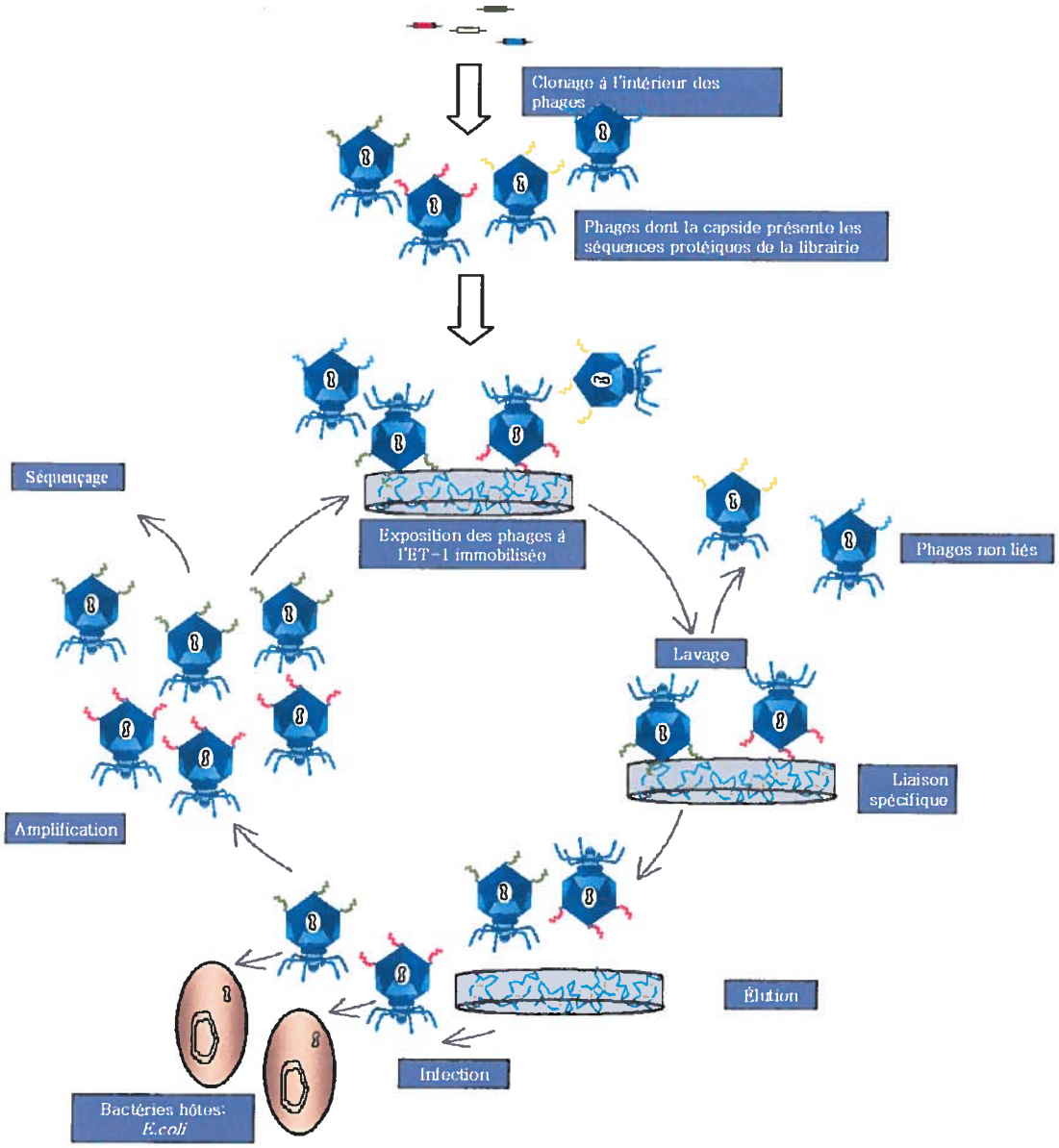


Figure 2. Étapes d'un cycle de criblage de banques de phages

Le criblage de banques de phages est actuellement la technique la plus utilisée parmi les diverses techniques de criblage par présentation de librairies peptidiques. Plusieurs techniques de criblage ont été développées au cours des 10 dernières années. Aussi, *in vivo* on retrouve le criblage de cellules (bactériennes, de levures et de mammifères). Cette technique a l'avantage de permettre l'expression de librairies intégrées dans les gènes de protéines transmembranaires. De plus, comparativement aux phages, les levures et les cellules de mammifères ont l'avantage d'effectuer des modifications post-transcriptionnelles et de permettre le repliement des peptides de la librairie (Sergeeva *et al.*, 2006).

Il existe également des techniques de criblage *in vitro*. Trois techniques se démarquent. Ces techniques ont toutes l'avantage de présenter moins d'encombrement stérique autour des peptides exposés à la cible. Le criblage de banques de ribosomes permet de former des complexes ARNm-ribosome-peptide. Il y a aussi la technique de criblage d'ARNm qui est très similaire à la technique précédente mais dont le complexe est constitué seulement de l'ARNm et du peptide correspondant. La synthèse des peptides arrête lorsque le ribosome atteint un segment comprenant une puromycine. Celle-ci forme alors un lien amide avec le peptide néosynthétisé dans le site A du ribosome. Finalement, la technique de criblage de banques peptidiques formant un lien covalent avec leur ADN utilise une propriété du coliphage P2 qui lie la protéine de l'insert à l'ADN codant pour celui-ci (Sergeeva *et al.*, 2006).

2.2 Applications du CBP

De nos jours, la technique de CBP est utilisée à plusieurs fins. L'un des principaux usages de cette technique est la découverte d'anticorps à l'aide de librairies contenant les fragments Fab (*fragment antigen binding*; fragment liant l'antigène) et scFv (simple chaîne Fv). La chaîne scFv est la structure minimale pouvant lier l'antigène. Elle origine de la fusion de la chaîne variable lourde et de la chaîne variable légère. Par clonage, les séquences des fragments sélectionnés sont intégrées aux séquences des anticorps. Les

anticorps ainsi créés sont utilisés notamment pour développer des antagonistes, pour stimuler l'apoptose via les récepteurs, pour diminuer l'expression des récepteurs ainsi que pour cibler la distribution dans l'organisme de médicaments ou d'isotopes conjugués (Filpula 2007).

Par exemple, ces études ont mené la FDA et Santé Canada à approuver respectivement en 2002 et 2004 l'usage du Humira, un anticorps monoclonal liant le TNFα utilisé pour le traitement de maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde. Il s'agissait du premier anticorps humain commercialisé. L'Humira a tout d'abord été découvert par *phage display* sous forme scFv par la société Cambridge Antibody Technology puis cette structure a été incorporée dans un IgG1 : κ (Filpula, 2007 et Osbourn *et al.*, 2005).

Le *phage display* peut aussi être utilisé pour trouver le site de liaison d'un ligand ou le récepteur pour un ligand à l'aide de banques d'ADNc. Plusieurs équipes tentent d'identifier les protéines membranaires surexprimées dans diverses pathologies pour distribuer des médicaments vers l'organe cible. Pour ce faire, il est possible d'administrer de façon intraveineuse des librairies de phages à un modèle animal sous anesthésie. Les organes-cibles peuvent ainsi être récupérés et les phages qui s'y sont liés peuvent alors être amplifiés et caractérisés. (Sergeeva *et al.*, 2006). En couplant les médicaments à des molécules ayant une forte affinité pour le tissu visé par le traitement, il est possible de diminuer les effets systémiques. Cela permet d'utiliser des médicaments cytotoxiques et pro-apoptotiques. Un autre usage de la technique du *phage display* est l'identification des sites de clivage d'une enzyme. Ces sites peuvent être déterminés en liant des phages à un support solide. Les phages détachés du support solides par l'enzyme peuvent être analysés par séquençage (Paschke, 2006).

2.2.1 Principaux phages utilisés

Le phage filamenteux non lytique M13 demeure le plus utilisé. La librairie peut être intégrée dans l'ADN génomique simple brin du phage pour former des protéines de fusion avec la protéine de la capside PIII (Cwirla *et al.*, 1990). Deux méthodes peuvent

être utilisées. La première consiste à intégrer la librairie seule ou avec une copie du gène de la capside. La seconde utilise un phagemide contenant la librairie et requiert un phage produisant toutes les enzymes et les protéines nécessaires à la duplication de l'ADN du phagemide et à son encapsidation. Le phage utilisé doit avoir une origine de réplication ou un signal d'encapsidation du phage déficient. Ceci permet d'atteindre un ratio de phage par phagemide de 1 :1000 (Paschke *et al.*, 2006).

Plusieurs phages lytiques sont utilisés comme, par exemple, T4, T7, P4 et λ. Comparativement au phage M13 qui traverse la membrane de E. coli par un mécanisme de sécrétion, les phages lytiques sont libérés par la lyse de la cellule hôte. L'utilisation de phages lytiques offre donc l'avantage de pouvoir exprimer des protéines qui ne pourraient l'être par le phage M13, notamment les protéines cytosoliques qui ne peuvent être exprimés en raison de leur difficulté à traverser la membrane cellulaire (Sergeeva *et al.*, 2006).

2.2.1.1 Le bactériophage T7

Ce phage fait partie des coliphages puisqu'il infecte la bactérie E. coli. Le génome du phage T7 est composé d'ADN double brin. Celui-ci se trouve dans la tête du phage mesurant 55 nm de diamètre.

Puisque le phage T7 est un phage lytique, il est facile de calculer le rendement des tours de sélection en comptant les plages de lyse aussi appelées pfu (*plaque forming unit*).

Le phage T7Select™10-3 de Novagen est une variante du bactériophage T7 qui permet l'expression de 5 à 15 copies d'une séquence protéique pouvant comporter jusqu'à 1200 acides aminés. Une carte génétique du phage T7 est présentée à la Figure 3. Contrairement au phage M13, l'insert se trouve à l'extrémité C-terminale du gène codant pour la protéine 10B de la capside. Ainsi l'extrémité C-terminale de T7 est libre alors que l'extrémité N-terminale de M13 est libre. Une autre différence est que les inserts comprenant des codons stop empêchent la transcription des protéines de la capside dans

le phage M13 alors que T7 permet la formation de phages ayant des inserts plus courts. Le nombre de phages est amplifié grâce à la souche BLT5615, une souche de E. coli produisant la protéine 10A de la capside du phage. L'enveloppe protéique formant la capside de T7Select™10-3 est constituée essentiellement de protéines 10A et de 5-15 copies de la protéine 10B modifiée par la fusion de l'insert.

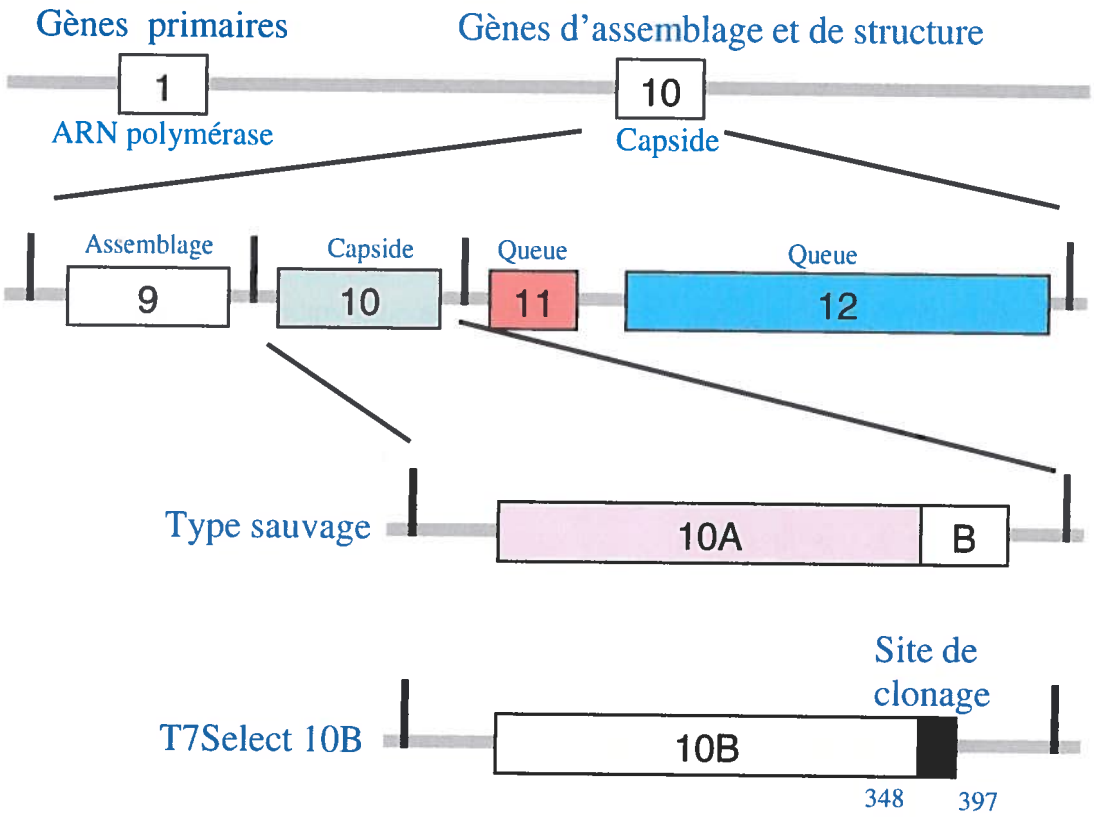


Figure 3. Carte génétique du phage T7. L'insert est intégré dans le site de clonage à la protéine de la capside 10B. La librairie se trouvera en position C-terminale de la forme protéique du gène 10B.

2.2.2 Librairies peptidiques

Différentes stratégies sont appliquées lors de la synthèse des librairies pour favoriser la sélection de phages ayant certaines caractéristiques. Les librairies utilisées sont complètement ou partiellement aléatoires et leur taille varie généralement entre 7 et 1200 acides aminés. Les librairies peptidiques comparativement aux anticorps ont l'avantage d'une meilleure distribution, d'une demie-vie plus courte, d'être plus faciles à synthétiser et le contrôle de qualité lors des essais cliniques est plus facile. Plusieurs approches augmentent la possibilité d'obtenir des peptides ayant une meilleure affinité et spécificité pour la cible. Des espaceurs de glycine sont juxtaposés à la librairie afin d'éloigner le peptide de la capside réduisant ainsi l'encombrement stérique. Pour obtenir une structure plus stable qui résiste mieux à la protéolyse, de nombreuses équipes utilisent des librairies contenant des cystéines. Les peptides ainsi obtenus ont une rigidité accrue par la formation de ponts disulfures. Une autre stratégie pour stabiliser les inserts est de les intégrer dans des protéines de structures de type baril-β comme la protéine de fluorescence verte (*GFP : green fluorescent protein*) (Sergeeva *et al.*, 2006). Selon la séquence de la cible, la synthèse d'oligonucléotides partiellement aléatoire favorisant l'expression de résidus chargés ou aromatiques est aussi utilisée.

2.2.3 Méthodes de criblage

Lors de tests *in vitro*, les librairies sont présentées à la cible liée à un support solide. Ainsi, la cible purifiée peut être immobilisée dans des plaques de polystyrène (Marks *et al.*, 1991) ou sur une membrane de nitrocellulose (Dyson *et al.*, 1995). Les cibles peuvent aussi êtres liées à des billes paramagnétiques (Fowlkes *et al.*, 1992). D'autre part, les librairies peuvent également être présentées à des cellules en culture ou à des tissus (Cai et Garen, 1995 et Pasqualini et Ruoslahti, 1996).

Suite à la présentation des phages à la cible, une étape de lavages est effectuée afin d'éliminer les phages n'ayant pas d'affinité pour la cible. Les phages ayant lié la cible

peuvent être élués de diverses façons. Lorsque les phages sont liés sur un support solide comme des plaques ou des billes, les phages peuvent être récupérés à l'aide de solutions dénaturantes acides ou basiques ou contenant de l'urée ou du SDS (dodécylsulfate de sodium). Il est également possible de récupérer les phages en infectant une culture de bactéries.

Le groupe de Giordano a mis au point la technique BRASIL : *biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands*. Il s'agit d'une technique de séparation utilisant une phase aqueuse et une phase organique. Les phages ne s'étant pas liés ont une affinité supérieure pour le milieu aqueux tandis que les phages s'étant liés aux cellules sont récupérés dans la phase organique (Giordano *et al.*, 2001).

Généralement la sélection de phages nécessite de trois à quatre tours de sélection afin d'obtenir une bonne affinité.

2.3 Objectifs de recherche

L'endothéline-1 participe de façon significative au processus étiologique de l'hypertension artérielle essentielle et pulmonaire. Avec cette information en perspective, notre étude avait pour objectif de développer des peptides ayant une forte affinité et sélectivité pour l'ET-1 afin d'inhiber sa liaison à ses récepteurs. Il s'agit d'une approche pharmacologique qui n'a pas été étudiée jusqu'à présent dans le domaine de l'hypertension. En effet, une molécule inhibant la liaison du peptide-hormone à son récepteur, en se liant au ligand plutôt qu'au récepteur lui-même, offrirait un outil supplémentaire à la lutte contre l'hypertension et pourrait même présenter des avantages comparativement aux approches utilisées comme celles de l'usage des antagonistes et des bloqueurs des récepteurs ET_A et ET_B, lesquels présentent toujours des risques d'effets secondaires.

La technique de *phage display* a été utilisée pour parvenir à cette fin. À notre connaissance, il n'existe encore aucun médicament ayant pour cible une hormone peptidique comme l'ET-1. Dans cette optique, le *phage display* a beaucoup de potentiel pour le développement de nouveaux médicaments.

Dans le laboratoire du Dr. Alain Fournier, une première expérience de CBP a préalablement permis d'effectuer une sélection envers l'ET-1 (Louimaire et coll., non encore publié). Le séquençage des phages sélectionnés avait donné une douzaine de séquences différentes. L'analyse des séquences peptidiques des clones avait ensuite permis l'identification d'une séquence peptidique consensus pour la liaison avec l'ET-1 soit : LXXFXVSISXFXXA. Cette étude en deux volets porte sur l'analyse des séquences obtenues précédemment ainsi que sur la sélection et l'analyse de nouvelles séquences liant l'ET-1.

Les séquences peptidiques obtenues ont également été analysées par l'outil de recherche BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) pour déterminer si l'ET-1 agissait sur

des sites autres que les récepteurs ET_A et ET_B. La découverte de protéines liant l'ET-1 pourrait aussi conduire à la découverte de nouvelles voies de signalisation.

Section 3 : Matériel et Méthodes

3.1 Choix des peptides synthétisés

Au laboratoire, une première expérience de CBP avait permis d'effectuer une sélection envers l'ET-1 parmi $3x10^7$ phages exprimant une librairie entièrement aléatoire (Louimaire et coll., non encore publié). Le séquençage des phages sélectionnés avait donné une douzaine de séquences différentes. L'analyse des séquences peptidiques des clones avait ensuite montré que la majorité d'entre eux possédaient le motif SIS. De plus, cette analyse avait mené à l'identification d'une séquence peptidique consensus pour la liaison avec l'ET-1 soit : LXXFXVSISXFXXA. Un tableau comprenant les abréviations des acides aminés est fourni à l'appendice A.

Parmi les séquences obtenues, le peptide EBP-P7O (ALVSFKDSISPTRPA) possédait une analogie avec 10 des 12 séquences en main alors que l'EBP-P2O (FASMWSLGANPCIASISTFPR) se distinguait des autres séquences obtenues. En plus des séquences EBP-P7O et EBP-P2O, nous avons synthétisé six autres peptides, variant en fait du peptide EBP-P7O par un à deux acides aminés (voir Tableau I). Ainsi, toutes les séquences ayant le motif SIS ont été alignées par rapport à celui-ci et les résidus modifiés ont été obtenus à des positions correspondantes dans d'autres séquences que EBP-P7O. Par exemple, le peptide EBP-P7E5, visait à de déterminer l'importance du résidu phénylalanine dans la séquence consensus laquelle contient plutôt une thréonine à cette position. Les peptides EBP-P7V3, EBP-P7F3F4 et EBP-P7T3F4 contenaient quant à eux des éléments de la séquence consensus qui sont absents de la séquence EBP-P7O. Aussi, les séquences EBP-P7F3F4 et EBP-P7T3F4 variaient de 2 acides aminés par rapport à la séquence EBP-P7O puisque les phénylalanines n'étaient jamais précédées de proline dans les séquences obtenues. Finalement, les séquences EBP-P7H7 et EBP-P7G4 devaient permettre de vérifier si la présence de résidus chargés à ces positions était favorable.

Tableau I. Peptides synthétiques issus des première et seconde librairies. La première librairie synthétisée est située dans la colonne de gauche et la seconde dans la colonne de droite. Les peptides soulignés ont été synthétisés mais n'ont pas été utilisés pour les tests de liaison.

Nom des peptides	Séquences	Nom des peptides	Séquences
EBP-P2O	FASMWSLGANPCIASISTFPR	EBP-P10A1	RRSSR
EBP-P7O	ALVSFKDSISPTRPA	EBP-P2A2	SACV
EBP-P7H7	AL**H**SFKDSISPTRPA	EBP-P81B1	KGGALLLELDSIS
EBP-P7E5	ALVS**E**KDSISPTRPA	EBP-P81B2	GGALLLELDSIS
EBP-P7G4	ALVSF**G**DSISPTRPA	EBP-P81B3	LELDSIS
EBP-P7V3	ALVSFK**V**SISPTRPA	EBP-P81B4	ELDSIS
EBP-P7F3F4	ALVSFKDSIS**FF**RPA	EBP-P100C1	VCDRDSISRPSG
EBP-P7T3F4	ALVSFKDSIS**TF**RPA	EBP-P100C2	CDRDSISRPSG
		EBP-P100C3	DRDSISRPSG

3.2 Synthèse de peptides liant l'endothéline-1

3.2.1 Réactifs utilisés

Les dérivés d'acides aminés suivants ont été utilisés : Ala, Asp (OtBu), Glu (OtBu), Gly, Ile, Leu, Phe, Ser (tBu), Val, Arg (Pbf), Lys (Boc) de Matrix Innovation (Montreal, QC) et Asn (Trt), Cys (Trt), His (Trt), Met, Pro, Thr (tBu) et Trp (Boc) de Chem-Impex International Inc. (Wood Dale, IL). Les acides aminés étaient tous de configuration L et l'amine *a* a été protégée par le groupement 9-fluorènylméthyloxycarbonyle (Fmoc).

La résine Rink amide AM (4-(2',4'diméthoxyphényl-Fmoc-aminométhyl)-phénoxyacétamido-norleucylaminométhyle) de Chem-Impex International, Inc. a été utilisée comme support solide. La substitution de la résine était de 6 mmol/g. Le BOP

(hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino)-phosphonium) de Matrix Innovation (Montréal, QC), a été utilisé comme agent de couplage en présence de la base DIEA (diisopropyléthylamine, Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON)).

Les solvants de synthèse étaient tous de grade A.C.S. L'acide chlorhydrique, le toluène et l'éther éthylique, l'éthanol, le dichlorométhane (DCM), le diméthylformamide (DMF) et l'acétonitrile étaient de Fisher Scientific (Montréal, QC). Le dichlorodiméthylsilane et l'éthanedithiol provenaient de Sigma-Aldrich Canada, la pipéridine de A&C American Chemicals Ltd (St-Laurent, QC), l'acide trifluoroacétique (TFA) de PSIG (Polycentric Services Inc. (Montréal, QC)) alors que l'acide acétique a été acheté de la compagnie JT Baker (Phillipsburg, NJ).

3.2.2 Protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc

La synthèse des peptides a été effectuée à l'aide d'un système manuel comprenant six réacteurs. Ceux-ci doivent être préalablement silanisés afin de réduire l'adsorption de la résine. Pour ce faire, les réacteurs ont été lavés successivement avec de l'acide chlorhydrique, de l'eau distillée et du méthanol. Après séchage au four, ils ont été silanisés au moyen d'un traitement avec une solution 10 % v/v dichlorodiméthylsilane/toluène, suivi d'un rinçage au méthanol et d'un séchage au four.

Les étapes de la synthèse sont présentées au Tableau II. La synthèse des peptides a été effectuée de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Les déprotections ont été obtenues par l'action de la pipéridine dans du DMF et les lavages subséquents ont été réalisés par l'usage alterné de DMF et d'éthanol. Les acides aminés ont ensuite été couplés à la résine en présence de BOP. Suite au lavage de l'étape 4) avec du DCM, un test à la ninhydrine a été effectué afin de s'assurer que l'acide aminé était intégré dans la chaîne.

Tableau II. Cycle de couplage des acides aminés

Étapes	Réactifs	Temps de réaction
1) Déprotection	DMF/pipéridine (ratio 4 :1)	1 x 2 min
		1 x 15 min
2) Lavages	DMF	2 x 2 min
	EtOH	1 x 2 min
	DMF	2 x 2 min
3) Couplage	3 équiv d'acide aminé	Minimum de 30 min
	3 équiv de BOP	
	3 équiv de DIEA	
4) Lavages	DMF	2 x 2 min
	DCM	2 x 2 min
	DMF	2 x 2 min

3.2.3 Clivage des peptides

Lorsque la synthèse fut complétée, les peptides ont été clivés de la résine à l'aide d'une solution de clivage composée de 3 % p/v de phénol, 2,5 % v/v d'eau, de 2,5 % v/v d'éthanedithiol (EDT) dans de l'acide trifluoroacétique (TFA). La réaction de clivage s'est poursuivie sur une période de 2 h puis le mélange réactionnel a été filtré sous vide avant d'être partiellement évaporé. La filtration permet d'écarter la résine. La solution peptidique obtenue a été précipitée avec de l'éther diéthylique puis centrifugée. Le culot obtenu a été séché puis dissous dans une solution aqueuse contenant 10 % d'acide acétique, cette solution fut gelée rapidement avec de l'azote liquide puis mise à lyophiliser.

3.2.4 Purification par CLHP préparative

Suite au clivage, les peptides ont été purifiés par CLHP (chromatographie liquide à haute performance). Approximativement 200 mg du peptide ont été dissous dans du TFA aqueux (0,06 %) avant d'être injectés sur une colonne Gemini de type C_{18}, 5 µm, 110 Å, de dimension 250 x 21,2 mm (Phenomenex, Torrance, CA). Le débit du système Prep LC500A de Waters a été ajusté à 20 mL/min et la longueur d'onde du détecteur (Modèle 441 a été fixée à 229 nm. Un gradient linéaire croissant d'acétonitrile dans de l'eau contenant du TFA (0,06 %) a été utilisé pour éluer les peptides. Les fractions contenant le peptide désiré a été réunies et évaporées partiellement afin de retirer l'ACN. La solution aqueuse a été ensuite lyophilisée.

3.2.5 Caractérisation des peptides par CLHP analytique

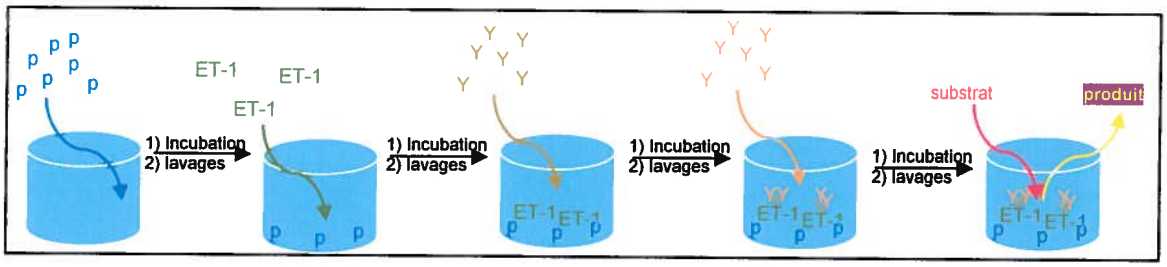
Les fractions récupérées ont été analysées par CLHP analytique pour en déterminer la pureté. Un aliquot des fractions a été injecté sur colonne de type C_{18}, 5 µm, 300 Å et de dimension 250 x 4,6 mm (Vydac, Deerfield, IL). Le débit de l'appareil analytique Beckman (Fullerton, CA) a été programmé à 1 mL/min et le détecteur à 230 nm. Le gradient fut de 0 à 50 % ACN/TFA aqueux (0,06 %) en 50 min.

3.2.6 Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les fractions obtenues suite à la purification ont aussi été analysées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight*). Un spectromètre Voyager-DE de Applied Biosystem (Foster City, CA) a été utilisé afin de déterminer la masse moléculaire des peptides obtenus. Le voltage d'accélération était de 25 kV, le laser était ajusté à 337 nm avec une fréquence de 20 pulses/sec. La matrice utilisée était l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (Sigma-Aldrich Canada).

3.3 Test de liaison

Le test ELISA a été employé afin de déterminer les peptides ayant le plus d'affinité pour l'endothéline-1. Cette technique est présentée à la Figure 4. Tout d'abord, les plaques ont été recouvertes du peptide dont l'affinité pour l'ET-1 était à déterminer. Une solution de 10 µg/100 µL PBS (*phosphate buffered saline*; tampon phosphate salin) des peptides synthétisés ainsi que du peptide contrôle, le neuropeptide Y (NPY), ont été incubées à 4°C durant environ 20 h dans des plaques de 96 puits NUNC™ de VWR (Missisauga, ON). Les solutions de peptides ont ensuite été remplacées par 100 µL de solution de concentrations croissantes de 2,5 à 1500 ng d'ET-1/mL de PBS à 4°C, pour une période de 16 h. Entre chacune des étapes subséquentes, 3 lavages au PBST (0,1 % v/v Tween) ont été effectués. Les puits ont été bloqués avec de la gélatine 1 % durant 1 heure, puis l'ET-1 restante a été détectée à l'aide de deux anticorps incubés successivement durant une heure. Premièrement, les anticorps primaires polyclonaux de lapins spécifiques à l'ET-1 se lient au peptide hormone. Par la suite, la peroxydase de raifort (HRP) couplée aux anticorps secondaires anti-lapin transforme le substrat 3,3', 5,5' - tétraméthylbenzidine (TMB). Les anticorps primaires et secondaires ainsi que le TMB étaient de Sigma-Aldrich Canada. La réaction enzymatique a été arrêtée avec une solution aqueuse de 1 % H_2SO_4. Le produit de la réaction a été détecté à 450 nm (spectrophotomètre PowerWaveX, BioTek Instruments, Winooski, VT). Finalement, le signal obtenu a permis de déterminer l'affinité relative par rapport au peptide contrôle.



P: peptide
ET-1:Endothéline-1
Anticorps primaires polyclonaux
Anticorps secondaires couplés à la peroxydase
Substrat: Le TMB est transformé par la peroxydase en un produit détectable à 450nm

Figure 4. Shéma du test de liaison ELISA.

3.4 Synthèse de la librairie de phages

La librairie partiellement aléatoire synthétisée par AlphaDNA (Montréal, QC) comprenait 93 nucléotides: **5'**-CAG TAG AGG AAT TCA $(GGA)_4$ JFN FLN JLN LOP JEN NNN GEP TCN ATT TCN $(NNN)_5$ TAG AAG CTT GAG CAG AGA TAG-**3'**. Le Tableau III présente la correspondance entre les lettres et les mélanges de nucléotides utilisés pour la synthèse de la librairie. Chaque groupe de trois lettres correspond à un codon.

Tableau III. Composition des mélanges de nucléotides

Symbole	Pourcentage des nucléotides
N	Mélange équimolaire : A / C / G / T
E	79 A + 7 C + 7 G + 7 T
F	7 A + 79 C + 7 G + 7 T
J	7 A + 7 C + 79 G + 7 T
L	7 A + 7 C + 7 G + 79 T
O	10 A + 40 C + 40 G + 10 T
p	10 A + 40 C + 10 G + 40 T

Les nucléotides aux extrémités ont été ajoutés pour que les enzymes reconnaissent leur site de restriction. Par conséquent, ce ne sont pas tous les codons qui seront exprimés à la surface de la librairie de phages. Les sites soulignés correspondent respectivement aux sites de restriction de EcoRI (GAATTC) et de HindIII (AAGCTT). Le site EcoRI est suivi d'une séquence d'espacement composé de quatre glycines (codon :GGA) et le site HindIII est précédé d'un codon stop (TAG) surligné en gris ci-dessus. Le peptide correspondant aux codons de la librairie était : Gly_ Gly_ Gly_ Gly_ Ala_ Leu_ Val_ Ser/Cys_ Asp/Glu_ X_ Asp_ Ser_ Ile_ Ser_ $(X)_5$. À l'exception de la séquence d'espacement et du motif SIS, les codons correspondants au peptide ont été synthétisés avec des mélanges. Par conséquent, le pourcentage d'alanine juxtaposé à la dernière glycine de l'espaceur était donc 0,79 x 0,79 x 1 = 62 %.

3.4.1 Amplification de la librairie

La librairie simple brin a été doublée et amplifiée par PCR. Les séquences des amorces 5' et 3' de la librairie (AlphaDNA, Montréal, QC) étaient respectivement 5'-CAGTAGAGGAATTCAGGAGG-3' et 5'-CTATCTCTGCTCAAGCTTCTA-3'. La température d'hybridation varie en fonction de la longueur de l'amorce et du pourcentage de GC. L'amorce 5' contenait 50 % de nucléotides GC et avait une Tm (*melting temperature*; température d'hybridation) de 68°C alors que l'amorce 3' était composée de 43 % de nucléotides GC et avait une Tm de 67°C. À l'exception de la librairie et des amorces, les réactifs du PCR provenaient tous de Sigma-Aldrich. La première étape a été d'activer la polymérase Jumpstart™ à 94°C durant 15 min. Ceci a été suivi de 35 cycles, où il y a eu dénaturation à 94°C durant 30 sec suivi de l'appariement des brins à un Tm de 66,5°C durant 45 sec puis la température a été augmentée à 72°C durant 30 sec pour l'étape d'élongation. Une élongation finale de 60 sec à 72°C a complété le cycle.

3.4.2 Clivage des sites de restriction

La librairie amplifiée par PCR a été clivée par les enzymes EcoRI et HindIII de New England Biolabs (Ipswich, MA). La double digestion fut effectuée à 37°C durant 2 h puis les enzymes ont été inactivées à 65°C durant 20 min. Les volumes de chacun des éléments nécessaires à la réaction sont présentés au Tableau IV.

Tableau IV. Digestion des inserts et des contrôles.

	EcoRI	EcoRI+HindII I	HindIII
Volume de PCR (µL)	5	50	5
Tampon 2 NEB (µL)	0,55	5,5	0,55
Enzyme (s) NEB (µL)	0,2	2+2	0,2

La vérification de la taille du produit (pb) de PCR avant et après les digestions a été effectuée sur gel d'acrylamide 12 %. Le gel a migré à 85 V durant 1h30 dans un appareil *mini-PROTEAN 3 cell* de Biorad (Hercules, CA). L'échelle (pb) utilisée fut le *DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder* de Sigma-Aldrich. Le tampon de migration TBE (Tris-borate-EDTA), l'acrylamide et le bis-acrylamide étaient aussi de Sigma Aldrich. Le gel fut coloré avec du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL de TBE) puis photographié à l'aide du Fluor-S MultiImager (BioRAD, Hercules, CA).

Le produit de la digestion a été purifié au moyen de la trousse *Genelute PCR clean-up* de Sigma-Aldrich. Celle-ci utilise une membrane de silice pour retenir l'ADN et débarrasser l'échantillon des enzymes, des amorces, des dNTP et des extrémités clivées. L'élution a été effectuée à l'aide de 50 µL d'eau distillée exempte d'ADNase et d'ARNase (Gibco, Carlsbad, CA). Pour concentrer les échantillons et les débarrasser des sels, les échantillons ont été passés sur Microcon comme spécifié par le manufacturier (Milipore, Bedford, MA). Une membrane de cellulose fut utilisée pour récupérer l'ADN double brin ayant plus de 50 pb.

La quantité d'ADN présente dans les échantillons fut déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre au moyen de la formule suivante :

$(DO_{260} - DO_{320}) \times 25$ = Concentration d'ADN en µg/ µL

3.4.3 Production d'une librairie de phages T7 mutants

Afin d'exprimer la librairie à la surface du phage T7, la trousse *T7Select® cloning* de Novagen (Madison,WI) a été utilisée. La trousse inclue notamment les bras prédigérés du vecteur T7Select 10-3b, les extraits d'encapsidation *(T7 Packaging Extracts)* et la souche de bactérie E. coli BLT5615.

La ligation a été effectuée avec un ratio 1 : 300 entre le vecteur T7Select 10-3b et l'insert synthétisé. La réaction dont les réactifs sont présentés au Tableau V fut effectuée à 16°C, durant 15 h.

Tableau V. Mélange réactionnel de la ligation.

	Librairie	ADN contrôle
Vecteur (µL)	0,33	0,33
Insert (µL)	0,76	0,33
H2O (µL)	0,33	0,76
Tampon pour ligase (NEB) (µL)	0,167	0,167
Ligase (NEB) (µL)	0,083	0,083

Les extraits d'encapsidation (25 µL) ont été ajoutés à la réaction de ligation (5 µL). Tel que décrit dans le guide de Novagen, le mélange réactionnel a été incubé à la température de la pièce pour 2 h puis la réaction fut arrêtée en ajoutant du milieu Luria Bertoni (LB). Finalement, du chloroforme a été ajouté pour la conservation à 4°C.

3.4.4 Calcul du titre de la librairie

Afin de calculer le titre de la librairie, 100 µL d'une série de dilution de phage (facteur de 10) ont été ajoutés à des tubes contenant une culture bactérienne de souche BLT5615.

Une solution d'agarose avec de l'IPTG (isopropyle β-D-1-thiogalactopyranoside) a été ajoutée à la série de dilutions de phages et coulée sur gélose d'agar avec ampicilline. L'IPTG induit la transcription des protéines de la capside alors que l'ampicilline permet de sélectionner les bactéries BLT5615 qui y sont résistantes. Les géloses ont été inversées et mises à 37°C pour 3-4 h. Le titre fut établi ainsi :

Nombre de plages de lyse x facteur de dilution x 10 = titre en pfu/mL

3.4.5 Amplification des phages

La librairie a été amplifiée par infection de culture de bactéries BLT5615 ayant 50 μg d'ampicilline/mL de LB. La culture bactérienne a été incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une lecture d'absorbance à 600 nm variant entre 0,5 et 0,6. Les phages ont été ajoutés et la culture fut agitée à 37°C jusqu'à l'obtention d'un lysat. Ce lysat a été centrifugé à 8000 rpm durant 10 min. Le surnageant a été précipité avec une solution de polyéthylène glycol (PEG) 8000 à 20 %. La proportion de PEG et de lysat était de 1 : 6. La solution fut conservée sur glace minimalement 30 min avant d'être centrifugée à 11000 rpm, 20 min à 4°C. Le culot a été resuspendu dans un tampon sel-tris-EDTA (STE).

3.4.6 Tours de sélection

3.4.6.1 Préparation des plaques

Les plaques NUNC™ de VWR ont été lavées avec de l'eau déionisée avant d'ajouter une solution de 10 μg d'ET-1/mL de *Tris-Buffered Saline* (TBS) pour 4h à la température de la pièce. Les puits ont ensuite été lavés avec du TBST (0,1 % Tween) et la solution de blocage 5 % a été ajoutée. La caséine et la BSA (albumine sérique bovine) ont été utilisées en alternance pour éviter de sélectionner des peptides liant l'une des deux protéines. Le blocage dure 60 min à température ambiante. Finalement, les plaques ont été rincées avec de l'eau déionisée puis rangées à 4°C.

3.4.6.2 Sélection des phages

Le volume de la solution de phages à ajouter aux plaques fut calculé ainsi :

$$\frac{\text{Titre de la librairie (pfu)} \times 100}{\text{Titre de la librairie amplifiée (pfu/mL)}} = \text{Volume en mL}$$

Les phages ont été incubés dans les plaques durant la nuit à 4°C au premier tour puis à la température de la pièce durant 2 h, 1 h et 30 min respectivement pour les tours subséquents.

Les plaques ont ensuite été lavées 3 fois au TBST pour le premier tour et 5 fois pour les tours suivants. Les phages ont été récupérés en incubant durant 1h un volume de 200 µL de culture bactérienne (DO_{600} de 0,5-0,6) dans les plaques à 37°C. La moitié du volume récupéré fut utilisée pour calculer le titre et la seconde moitié pour l'amplification.

Suite aux quatre tours de sélection, le titre a été évalué de deux façons. La première fut la façon traditionnelle, soit la détermination du nombre de phages élués. Le nombre de phages obtenus devrait augmenter suite à chaque tour de sélection. Puisque dans cette expérience les phages ont été amplifiés par la culture bactérienne, une seconde approche a été utilisée pour évaluer l'affinité pour l'ET-1 des phages après chaque tour. Une dilution contenant 10^7 phages de chacun des tours ont été utilisés pour effectuer un tour de sélection où les échantillons ont été élués avec une solution d'urée 4 M. L'affinité de la solution de phages devrait être proportionnelle au nombre de phages récupérés.

3.5 Séquençage des inserts du phage T7Select 10-3b

Un échantillon des plages de lyse a été récolté dans 100 µL de solution 10 mM d'EDTA, pH 8. Les échantillons ont été mélangés, chauffés 20 min à 65°C et centrifugés avant d'être utilisés pour amplifier la zone contenant les inserts par PCR. Les séquences des amorces 5' et 3' (AlphaDNA, Montréal, QC) étaient respectivement 5'-

GGAGCTGTCGTATTCCAGTC-3' et 5'-AACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'. La température d'hybridation a varié en fonction de la longueur de l'amorce et du pourcentage de GC. L'amorce 5' contenait 55 % de nucléotides GC et possédait une Tm de 70°C alors que l'amorce 3' était composée de 50 % de nucléotides GC et était caractérisée par une Tm de 68°C. À l'exception des amorces, les réactifs du PCR provenaient tous de Sigma-Aldrich. La première étape a été d'activer la polymérase Jumpstart™ à 94°C durant 15 min. Ceci a été suivi de 35 cycles, où il y a eu dénaturation à 94°C durant 30 sec suivi de l'appariement des brins à une Tm de 67°C durant 45 sec. La température fut ensuite augmentée à 72°C durant 30 sec pour une étape d'élongation. Une élongation finale de 60 sec à 72°C a complété la réaction de PCR.

Les produits de PCR ont été séquencés par le Centre d'innovation Génome Québec et l'Université McGill. Les amorces utilisées pour le séquençage ont été les mêmes que celles utilisées pour l'amplification par PCR des inserts qui étaient contenus dans les phages sélectionnés. Les séquences reçues ont été analysées à l'aide du logiciel Align Plus version 3.0.

Afin de vérifier si l'ET-1 n'avait pas d'autres ligands que ses récepteurs, les séquences obtenues ont été recherchées sur BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*).

Une seconde librairie peptidique a été synthétisée et testée pour son affinité relative pour l'ET-1. Les procédures ont été les mêmes que pour la première librairie.

3.6 Essais pharmacologiques

L'inhibition de l'action de l'ET-1 par les peptides EBP-P10A1 et EBP-P100C2 a été testée sur des anneaux d'aorte de rat (Charles Rivers, St-Constant, QC). Les animaux ont été traités selon les normes du Comité canadien pour les soins aux animaux (CCAC). Les rats ont été euthanasiés avec du CO_2 et saignés par rupture de la veine cave. L'aorte fut ensuite prélevée et conservée tout au long de l'expérience dans un tampon Krebs (NaCl 120 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, glucose 5 mM, KCl 4,7 mM, $MgSO_4$ 2,4 mM,

KH_2PO_4 1,2 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM). Le tissu conjonctif et l'endothélium ont été retirés délicatement de l'aorte. Celle-ci fut coupée en anneaux de 4 mm de long qui ont été installés dans des bains d'organe de 5 mL maintenus à 37°C et oxygénés (mélange gazeux : 95 % O_2, 5 % CO_2). La contraction des aortes a été mesurée à l'aide de transducteurs de force de modèle FT03 provenant de Grass Instruments (Quincy, MA), reliés à un polygraphe Grass 7E. Une tension de 1 g fut appliquée sur les aortes lors du montage.

Suite au montage, les aortes ont été laissées 1h dans les bains afin que le tissu se stabilise. En ajoutant 80 mM de KCl dans les bains nous avons obtenu une valeur de référence pour la contractilité de chacun des anneaux d'aorte utilisés.

Les aortes ont été mises en contact avec des concentrations croissantes d'ET-1 ($3x10^{-9}$ à 10^{-6} M). Afin d'évaluer l'inhibition de l'action de l'ET-1 par les peptides EBP-P10A1 et EBP-P100C2, une grande quantité de ceux-ci (10^{-4} M) fut ajoutée aux solutions d'ET-1 minimalement 30 min avant de produire la courbe concentration-réponse de l'ET-1.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Prism 4 de GraphPad software (San Diego, Ca). Les peptides EBP-P10A1 et EBP-P100C2 ont été testés minimalement sur trois échantillons d'aorte obtenus d'animaux différents.

Section 4. Résultats

4.1 Évaluation des séquences obtenues lors des travaux précédents

4.1.1 Synthèse des peptides liant l'endothéline-1 (EBP)

Les séquences obtenues par une expérience précédente de criblage de banques de phage ont été utilisées pour synthétiser une librairie de peptides liant l'ET-1 (tableau I). Les séquences choisies et le cheminement ayant mené à la synthèse des EBP (*endothelin binding peptide*) ont été présentés dans la section Matériel et Méthodes. La synthèse d'une librairie de huit peptides a été effectuée en chimie Fmoc. Les peptides synthétisés ont été purifiés par CLHP préparative et leur pureté a été confirmée par CLHP analytique. Les peptides ont été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF afin de confirmer que la masse obtenue correspondait à la masse théorique.

4.1.2 Tests de liaison

L'affinité relative des peptides de synthèse pour l'ET-1 a été déterminée par la technique ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). En ajoutant des quantités croissantes d'ET-1 sur des plaques de 96 puits préalablement couvertes des peptides synthétiques, il a été possible de détecter l'affinité relative des peptides pour l'ET-1 à l'aide d'anticorps primaires et secondaires couplés à la peroxydase de raifort. Le neuropeptide NPY a été choisi comme contrôle négatif parce qu'il ne fait pas parti de la même famille que l'ET-1 et qu'il n'est pas vasoconstricteur. De plus, il se solubilise bien en milieu aqueux. Le choix des concentrations de 100 et 250 ng d'ET-1/mL fut basé sur les constatations suivantes : l'utilisation de concentrations inférieures à celles-ci augmentait le bruit de fond alors que les concentrations supérieures saturaient la peroxydase. Les valeurs de densité optique des différents peptides testés ont été rapportées en fonction de celles obtenues pour le peptide P7O afin de faciliter la comparaison des différentes substitutions. En effet, il est difficile de comparer directement les valeurs brutes de

densité optiques puisque celles-ci varient d'une expérience à l'autre. Cette variabilité rend l'utilisation de tests statistiques difficile. Toutefois, l'intensité relative obtenue par le ratio des valeurs de densité optique entre les différents peptides et le peptide contrôle est reproductible. Tous les peptides ont été testés au moins trois fois et l'incertitude a été déterminée par le calcul de l'erreur type sur la moyenne (SEM; *standard error of mean*).

Nos résultats ont relevé que l'ET-1 possédait une affinité supérieure pour toutes les séquences de la librairie comparativement au peptide contrôle NPY (Figure 5). Le peptide EBP-P2O a montré moins d'affinité pour l'ET-1 que EBP-P7O de même que pour la majorité des peptides dérivés de celui-ci.

Le test de liaison nous a permis de constater que la présence de la valine (EBP-P70) était plus favorable en position -5 par rapport au motif SIS que l'histidine (EBP-P7H7). Parmi les peptides dont la séquence était dérivée de EBP-P70, le remplacement de la phénylalanine en -3 par rapport au motif SIS par le glutamate (EBP-P7E5) a augmenté très nettement l'affinité pour l'ET-1, ainsi que le remplacement de la lysine en -2 par rapport au motif SIS par une glycine (EBP-P7G4). Aussi, la présence du résidu valine (EBP-P7V3) de la séquence consensus en position -1 par rapport au motif SIS n'a pas résulté en plus d'affinité qu'avec l'acide aspartique (EBP-P7O). Par contre, comme démontré par les tests de liaison des peptides EBP-T3F4 et EBP-F3F4, les différentes substitutions en C-terminal du motif SIS n'ont pas semblé avoir d'impact significatif sur l'affinité du peptide de référence envers l'ET-1.

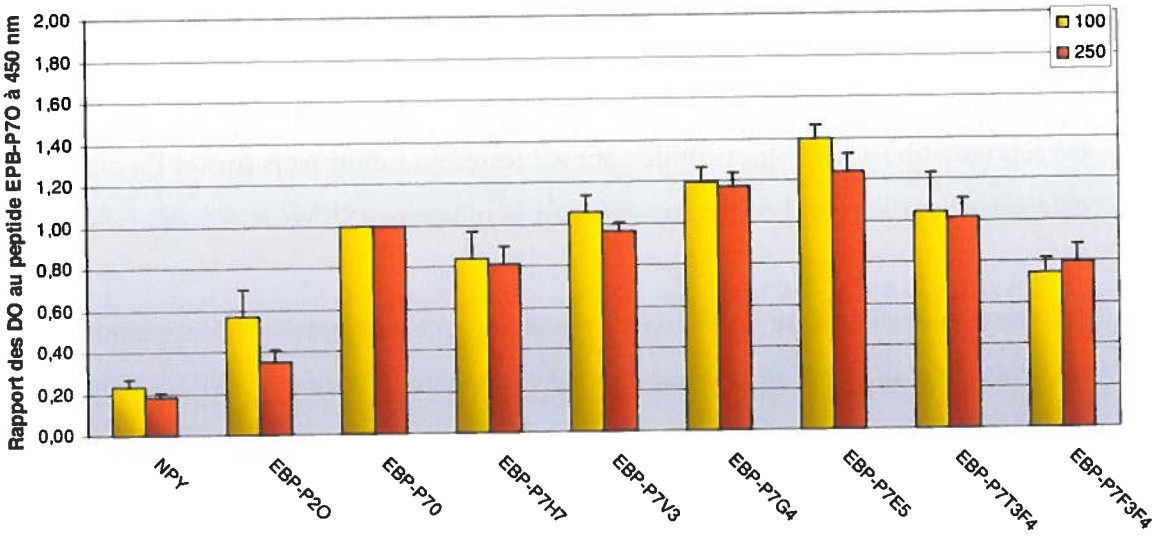


Figure 5. Test de liaison de la première librairie peptidique avec l'ET-1. Quantité relative d'ET-1 liée aux différents peptides évalués en comparaison avec le peptide EBP-P7O. Les concentrations d'ET-1 utilisées pour le test de liaison ont été de 100 et 250 ng/mL.

4.2 Obtention de nouvelles séquences liant l'ET-1

4.2.1 Production d'une nouvelle librairie de phages

Suite aux résultats des tests de liaison pour les peptides issus de la première librairie, une nouvelle librairie partiellement aléatoire a été élaborée en se basant sur le motif suivant : A_L_V_C/S_E/D_X_E/D_S_I_S_$(X)_5$. D'une part, la librairie reprend la séquence de P7O (ALVSFKDSISPTRPA) et, d'autre part, elle conserve les modifications ayant accru l'affinité ou dont la modification diminue l'affinité et randomise les sections dont on ne peut tirer de conclusion à partir des tests de liaison.

Les oligonucléotides correspondants à ce motif ont été synthétisés par AlphaDNA et doublés par PCR. L'ADN double brins ainsi généré a été clivé par les enzymes EcoRI et HindIII et une ligation a été effectuée avec le vecteur T7Select 10-3b. La librairie a été

produite en incorporant l'ADN phagique aux extraits d'encapsidation. La diversité de la librairie a été déterminée à partir du nombre total de phages obtenus. Le titre obtenu pour la librairie de phages était de : 1,6 x 10^5 phages. Le titre a été amplifié jusqu'à 10^{10} phages/mL.

De façon générale, suite à chacun des tours de sélection pour la cible, un pourcentage du volume récupéré a été utilisé pour quantifier le nombre de phages obtenus. Normalement, le nombre de phages récupérés augmente avec le nombre de tour puisque le pourcentage de phages ayant une bonne affinité pour la cible augmente dans la librairie. Au cours de nos expériences, les phages liés à l'ET-1 ont été récupérés en ajoutant 100 µL de culture bactérienne durant 1h à 37°C. Par conséquent, le nombre de phages obtenus après chaque tour de sélection était déjà amplifié suite à l'infection des bactéries, restreignant ainsi la validité de l'observation de l'augmentation du nombre de phages liés aux puits en fonction du nombre de tour. Pour palier à cette difficulté, les solutions de phages amplifiés après chaque tour de sélection ont été conservées et leur affinité relative a été déterminée par un tour de sélection avec un nombre équivalent de phages élués avec de l'urée, un agent dénaturant. Entre le premier tour de sélection et le deuxième il y a eu perte d'affinité entre la librairie et l'ET-1. Cette affinité s'est par contre accrue suite au 4e tour de sélection (Figure 6).

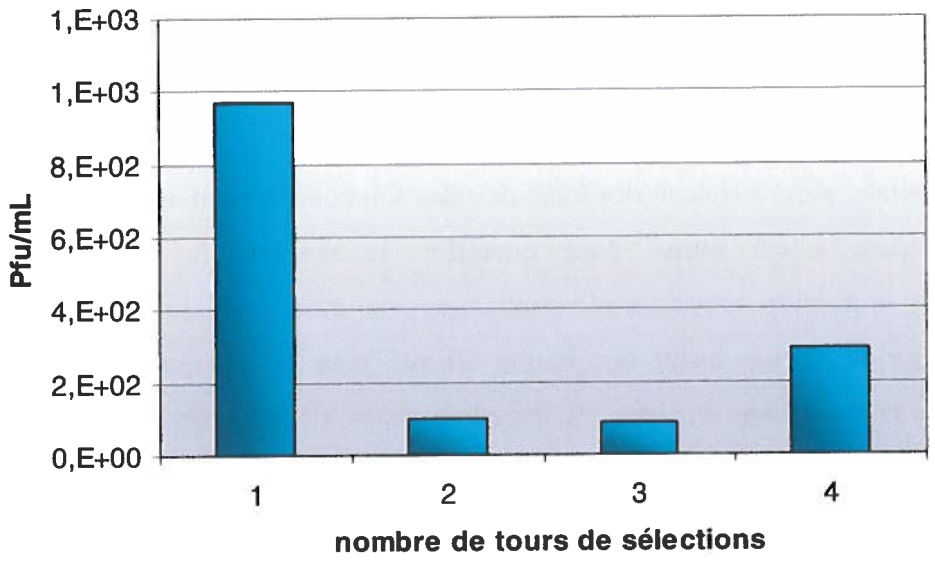


Figure 6. Quantité de phages récupérés après chaque tour de sélection. Un nombre constant de phages des tours de sélection 1 à 4 a été incubé dans des puits préalablement recouverts d'ET-1. Suite à des lavages, les phages liés à l'ET-1 ont été élués avec une solution d'urée. La quantité de phages récupérés au 4e tour est supérieure à celles des 2e et 3e tours.

4.2.2 Séquençage des phages issus des tours de sélection

L'ensemble des 21 séquences obtenues se trouve dans le Tableau VI. Toutes les séquences sont précédées par les acides aminés MLGDPNS qui proviennent du vecteur T7Select 10-3b. Les deux premiers G correspondent à la séquence d'espacement entre le phage et les séquences. Pour une raison inconnue, des acides aminés se sont glissés après ces deux glycines. Le cadre de lecture attendu était Gly-Gly-Ala. Lorsque le cadre de lecture est décalé on peut obtenir Arg-Arg-Ser ainsi que Glu-Glu-Leu/Pro/His/Arg en début de séquence. Le cadre de lecture Arg-Arg-Ser s'est retrouvé dans plusieurs séquences alors que le cadre Glu-Glu-Leu/Pro/His/Arg ne faisait pas partie des produits séquencés.

L'analyse des séquences obtenues a mené à la synthèse d'une seconde librairie peptidique

Tableau VI. Séquences des peptides exposés à la surface des phages sélectionnés.

Clone	Séquences des peptides	Fréquence
1	MLGDPNSGGRRSTRI	2/21
7	MLGDPNSGGKEELLL	3/21
10	MLGDPNSGGRRSSR	1/21
16	MLGDPNSGGIQEEGGALLFDIDSISCTATS	1/21
24	MLGDPNSGGGGAWLSILNQFH (séquence incomplète)	1/21
25	MLGDPNSGGRRSSGM (séquence incomplète)	1/21
34	MLGDPNSGGEGGALL	1/21
36	MLGDPNSGGIQEEGGALLFDISISCTATS	1/21
37	MLGDPNSGGGGAVVVEQDSISTSLVG	1/21
48	MLGDPNSGGSACV	4/21
60	MLGDPNSGGRRNARL	1/21
70	MLGDPNSGGRRSSRM	
78	MLGDPNSGGRRSTRV	1/21
81	MLGDPNSGGKGGALLLELDSIS	1/21
100	MLGDPNSGGGGALVCDRDSISRPSG	1/21

Tableau VII. Alignement des séquences obtenues par CBP. Les acides aminés en bleus sont chargés positivement, les acides aminés en rose sont chargés négativement, les acides aminés en vert sont polaires et les acides aminés en jaune sont aliphatiques.

Clones	Alignement des séquences	Fréquences
10	R R S T R I	2
1	R R S S R	1
25	R R S S G M	1
70	R R S S R M	1
78	R R S T R V	1
48	S A C V	4
7	K E E L L L	3
34	E G G A L L	1
60	R R N A R L	1
24	G G A W L S I L N Q F H	1
16	I Q E E G G A L L F D I D S I S C T A T S	1
36	I Q E E G G A L L F D I S I S C T A T S	1
37	G G A V V V E Q D S I S T S L V G	1
81	K G G A L L L E L D S I S	1
100	G G A L V C D R D S I S R P S G	1
Librairie	A L V S/C D/E X D S I S X X X X X	

4.3 Évaluation de l'intérêt des nouvelles séquences

4.3.1 Analyse des motifs

Les séquences ont été alignées dans le Tableau VII afin de mieux observer les différents motifs obtenus. Les séquences 16, 36, 37, 48, 81 et 100 ont des motifs composés d'un acide aminé aliphatique (jaune) entouré par deux acides aminés polaires non chargés (vert). De plus, parmi ces six séquences, trois ont des motifs acide aminé polaire non chargé - acide aminé aliphatique - acide aminé polaire non chargé différents du motif SIS de la librairie.

Nous avons observé également quatre courtes séquences constituées d'acides aminés polaires non chargés entourés d'arginines. Il s'agit des séquences 1, 10, 70 et 78 qui sont présentées au Tableau VII.

Ces deux motifs, qui ressortent de l'alignement des séquences, seront évalués via une librairie peptidique.

4.3.2 Synthèse de la seconde librairie peptidique

Les séquences obtenues par cette deuxième expérience de criblage de banques de phages ont été utilisées pour synthétiser une nouvelle librairie de peptides.

Puisque le motif RRSSR et ses dérivés ont été retrouvés dans 6 des 21 clones séquencés, nous avons focalisé sur celui-ci. Le clone 48 (SACV) se trouvant dans 4 des 21 clones a aussi été synthétisé. Cette séquence a permis d'observer l'affinité d'un court peptide constitué d'une séquence dont les propriétés physico-chimiques des acides aminés (polaire-aliphatique-polaire) étaient similaires au motif SIS.

Afin de vérifier quelles modifications de la séquence partiellement aléatoire permettaient d'augmenter l'affinité pour l'ET-1, les séquences 81 et 100 ont été retenues. Ainsi des peptides correspondant aux séquences complètes et à des sections tronquées ont été synthétisés. La synthèse de séquences plus ou moins longues avait pour objectif de déterminer l'importance de certains segments dans ces séquences. Les peptides synthétisés se trouvent dans la section Matériel et Méthode (Tableau I).

La synthèse d'une librairie de huit peptides a été effectuée en chimie Fmoc. Les peptides synthétiques ont été purifiés par CLHP préparative et leur pureté a été confirmée par CLHP analytique. Les peptides de la seconde librairie ont été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF.

4.3.3 Liaison de la seconde librairie peptidique à l'ET-1

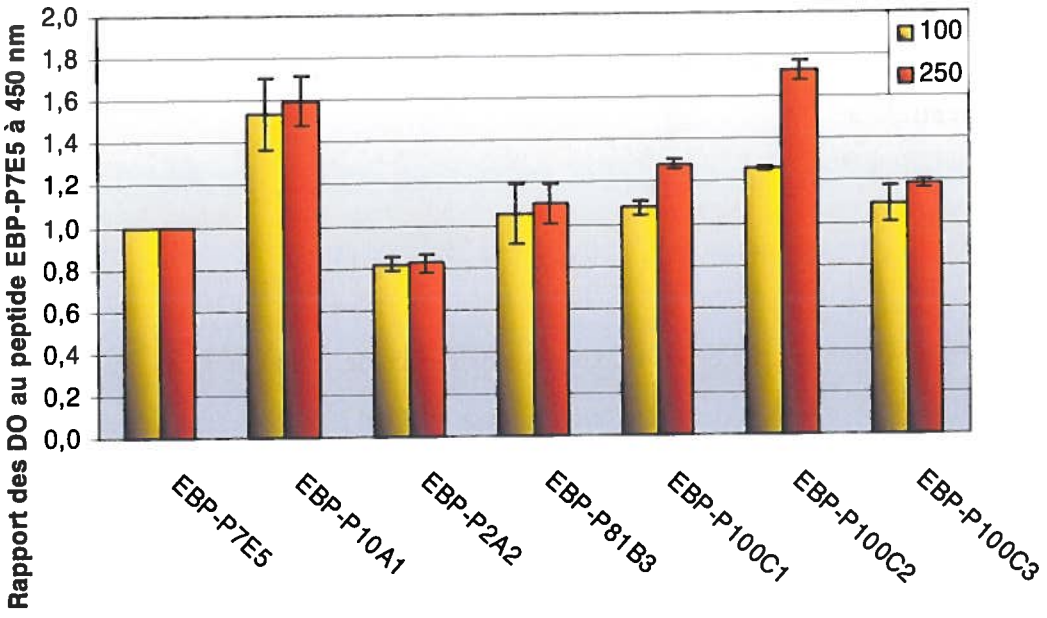


Figure 7. Tests de liaison de la seconde librairie peptidique avec l'ET-1. Quantité relative d'ET-1 liée aux différents peptides évalués en comparaison avec le peptide de la première librairie ayant la meilleure affinité soit EBP-P7E5. Les concentrations d'ET-1 utilisées pour le test de liaison ont été de 100 et 250 ng/mL.

L'affinité relative des peptides pour l'ET-1 a été déterminée selon le même protocole que pour la première librairie peptidique. Puisque l'objectif de l'expérience de criblage de banques de phages était de synthétiser des peptides ayant davantage d'affinité pour l'ET-1, le meilleur peptide de la première librairie a été utilisé comme contrôle. Tout comme pour la première librairie, les peptides ont tous été testés au moins trois fois et l'erreur type sur la moyenne (SEM) a été déterminée (Figure 7).

La liaison des peptides EBP-P10A1, EBP-P100C1 et EBP-P100C2 à l'ET-1 s'est avéré supérieure à celle de l'EBP-P7E5. Le résidu de la librairie situé en position -2 par rapport au motif SIS, entre deux acides aminés chargés négativement, était aléatoire. Il a été intéressant de constater que la séquence du EBP-P100C2 possédait en position -2 un résidu chargé positivement tout comme l'EBP-P7E5. L'ajout d'un acide aminé aliphatique ainsi que le retrait du résidu polaire Cys en N-terminal du peptide EBP-P100C2, comme observé avec EBP-P100C3, s'est avéré défavorable à la liaison de l'ET-1.

Nous avons pu également observer au moyen du peptide EBP-P2A2 qu'une courte chaîne alternant acide aminé polaire non chargé et acide aminé aliphatique n'était pas suffisante pour obtenir une aussi grande affinité pour l'ET-1 que les séquences plus longues basées sur les motifs de la librairie partiellement aléatoire.

4.3.4 Inhibition de l'action de l'ET-1 par les EBPs

L'inhibition de l'activité vasoconstrictrice de l'ET-1 a été évaluée pour les deux peptides ayant la meilleure affinité envers l'ET-1. Donc, des courbes concentration-réponse ont été obtenues sur des anneaux d'aorte thoracique de rat montés dans des bains d'organes pour l'ET-1 seule ou préincubée en présence d'une forte concentration (10^{-4} M) d'EBP (Figure 8). Les peptides inhibiteurs évalués ont été l'EBP-P10A1 et l'EBP-P100C2. Un déplacement vers la droite de la courbe concentration-réponse a été observé en présence de ces peptides. En effet, l'ET-1 seule a contracté les tissus avec une valeur d'EC_{50} de

7 ± 1 nM alors que nous avons observé des valeurs d'EC_{50} de 18 ± 5 nM et de 23 ± 8 nM en présence respectivement d'EBP-P10A1 et d'EBP-P100C2. Les barres d'erreurs ont été calculées par SEM et la valeur de P était inférieure à 0,01 pour d'EBP-P10A1 et de 0,05 pour EBP-P100C2. La valeur de P pour EBP-P10A1 a été calculée avec une variance de 12 alors que la variance pour EBP-P100C2 était de 9.

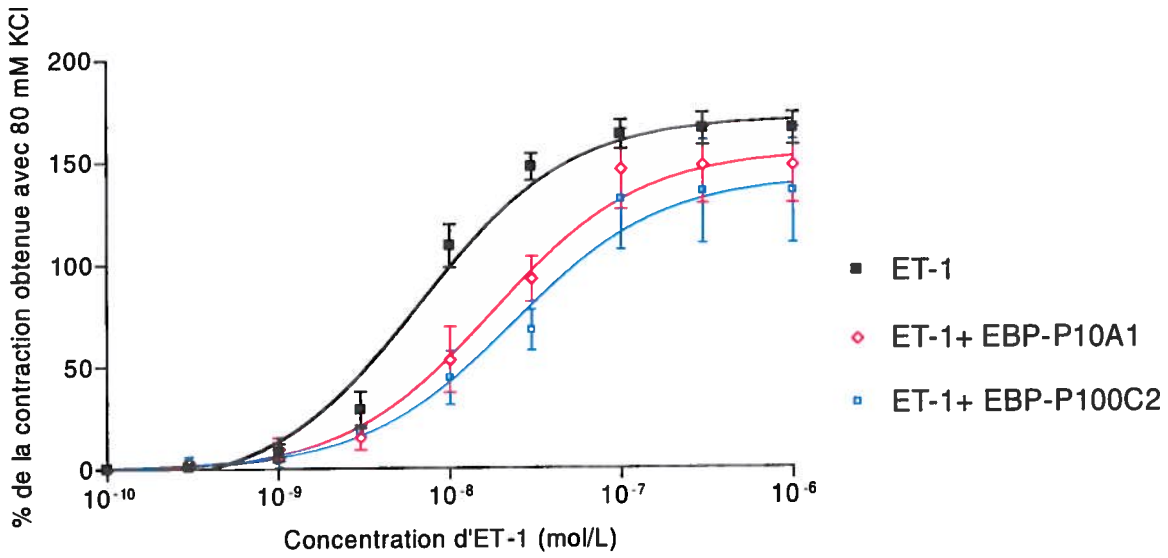


Figure 8. Inhibition de la contraction induite par l'ET-1 en présence des peptides EBP-P10A1 et EBP-P100C2. Courbes concentration-réponse de l'ET-1 seule ou en présence de 10^{-4} M des peptides.

Lors des tests d'inhibition de l'action de l'ET-1 par les EBP aucune activité agoniste ou antagoniste n'a été décelée.

4.3.5 Correspondance des EBPs chez l'humain

Il est connu que l'ET-1 lie les récepteurs ET_A et ET_B. L'analogie de séquences obtenues par criblage de banques de phages avec le protéome humain pourrait mener à la découverte de nouvelles interactions du peptide avec des protéines. Les séquences analysées ont toutes été choisies parmi les plus longues séquences. Les séquences 24, 37,

81 et 100 ont été comparées au protéome humain au moyen de l'outil BLAST. Il était intéressant d'inclure les séquences 81 et 100 parmi les séquences analysées car elles ont été synthétisées respectivement en tout et en partie dans la seconde librairie peptidique. Plusieurs types de protéines analogues ont été identifiés et retenues. Notamment des protéines liant l'ADN, des protéines dont l'action était reliée à l'ADP et à l'ATP et des protéases à sérine. Les protéines ayant le plus d'analogie avec les séquences mentionnées ci-dessus et des séquences dont les fonctions pourraient être reliées à l'ET-1 ont été présentées au Tableau VIII.

Tableau VIII. Principales protéines analogues des séquences 24, 37, 81 et 100.

Séquence 24 : GGAWLSILNQFH		
ATPase lysosomale V0, sous-unité d1, transport de H+ *(ATPase, H+ transporting, lysosomal, V0 subunit d1)*	Seq24 BLAST	LSILNQFH L--LNQFH LAFLNQFH
Protéine à pochette de liaison de l'ATP, membre 13 de la sous-famille A *(ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13)*	Seq24 BLAST Seq24 BLAST	LSILN LS-LN LSSLN SILNQFH SIL--FH SILDHFH
Séquence 37: GGAVVVEQDSISTSLVG		
Protéine liant l'ADN : Doigts de zinc, boîte homéotique 3 *(Zinc fingers and homeoboxes 3)*	Seq37 BLAST Seq37 BLAST	VVVEQDSI__STS VVVEQ_SI__STS VVVEQ_SIPESTS VVEQD VV-QD VVLQD
Protéine liant l'ADN : Protéine à motif FYVE et domaine superhélicoïdal *(FYVE and coiled-coil domain containing 1)*	Seq37 BLAST	EQDSISTSL EQD+-STSL EQDTTSTSL
Séquence 81: KGGALLLELDSIS		
Protéine liant la protéine $P58^{IPK}$: $P52^{rIPK}$	Seq81 BLAST Seq81 BLAST	LLLELDS_IS LLLELD-_IS LLLELDNVIS ALLLELDSI AL+L-LD-I ALVLCLDGI
Protéine liant l'ADN :	Seq81	ALLLELDSI

Protéine liant l'ADN : Protéine 6 à doigts de zinc contenant le motif CCHC *(Zinc finger, CCHC domain containing 6)*	Seq81 BLAST	ALLLELDSIS ALL+EL--IS ALLVELNKIS
Protéine régulatrice de chaperones: BAG-4 *(BCL2-associated athanogene 4)*	SEQ81 BLAST	LLELDSI LLELDS+ LLELDSV
Protéine membranaire de type I Vasorine	Seq81 BLAST Seq81 BLAST	LLLELD LLLELD LLLELD LLEL LLEL LLEL
GTPase : Protéine 2 similaire au facteur d'ajout du ribose de l'ADP *(ARL2: ADP-ribosylation factor-like protein 2)*	Seq81 BLAST Seq81 BLAST	LELDSI LELDSI LELDSI LDSIS LD-IS LDDIS
Séquence 100: GGALVCDRDSISRPSG		
Protéase à sérine: Hepsine	Seq100 BLAST	GGALVCDRDSISR GG__VC+_DSISR GGPFVCE_DSISR
Protéase à sérine : kallikréine 10	Seq100 BLAST	GGALVCD GG LVCD GGPLVCD

4.3.6 Présentation de la structure de protéines liant possiblement l'ET-1

La structure de certaines protéines a été analysée afin de vérifier si certaines d'entre elles avaient des structures similaires. L'hepsine et la kallikréine 10 (KLK10) sont des protéases à sérine qui ont une section analogue à la séquence 100 (voir Figures 9 et 10). Il est intéressant de constater que la sérine du site actif est juxtaposée au feuillet β mauve dans les deux cas. L'hepsine est impliquée dans la coagulation par l'activation du facteur VII qui est clivé en facteur VIIa (Kazama *et al.*, 1995). D'un autre côté, la KLK10 fait partie d'une famille d'enzymes impliquées dans la coagulation via la voie des kinines. Toutefois, la KLK10 est connue principalement pour son rôle d'inhibiteur de croissance tumorale (Petraki *et al.*, 2002).

Séquence 100	1	SGGALVCDRDSISR	13
		SGG__VC+_DSISR	
hepsine	309	SGGPFVCE-DSISR	320

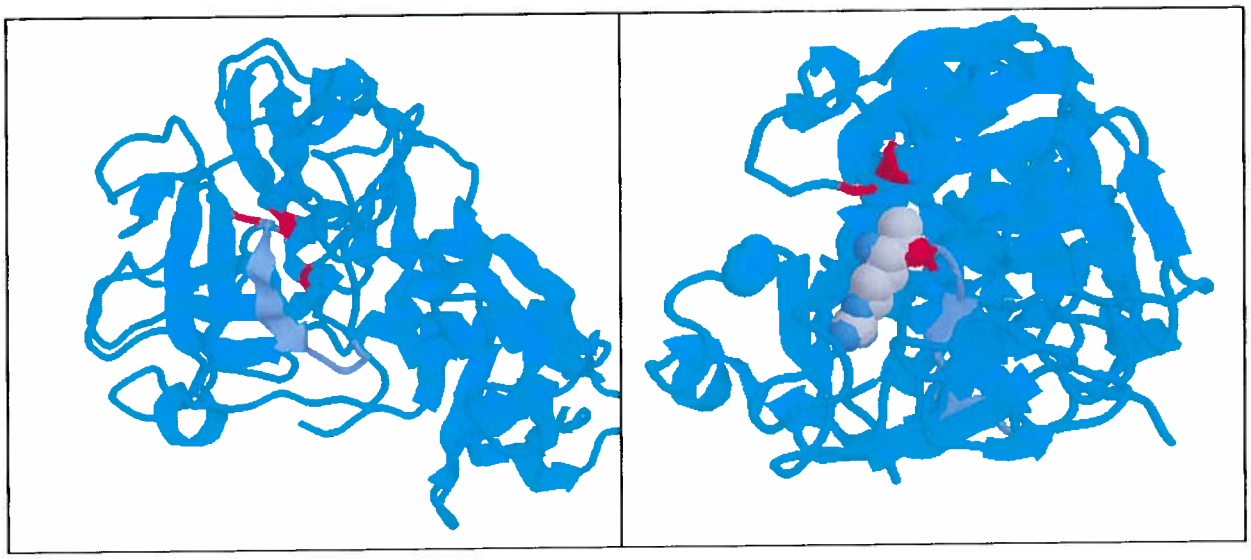


Figure 9. Structure tridimentionnelle de l'hepsine et emplacement de la séquence analogue. Deux vues de l'arrangement spatial de l'hepsine. Les trois acides aminés du site actif sont en rouge et la séquence analogue à la séquence 100 est en mauve. Le ligand endogène est représenté en gris dans l'image de droite.

Séquence 100	1	GGALVCD	7
		GG-LVCD	
Kallikréine 10	230	GGPLVCD	236

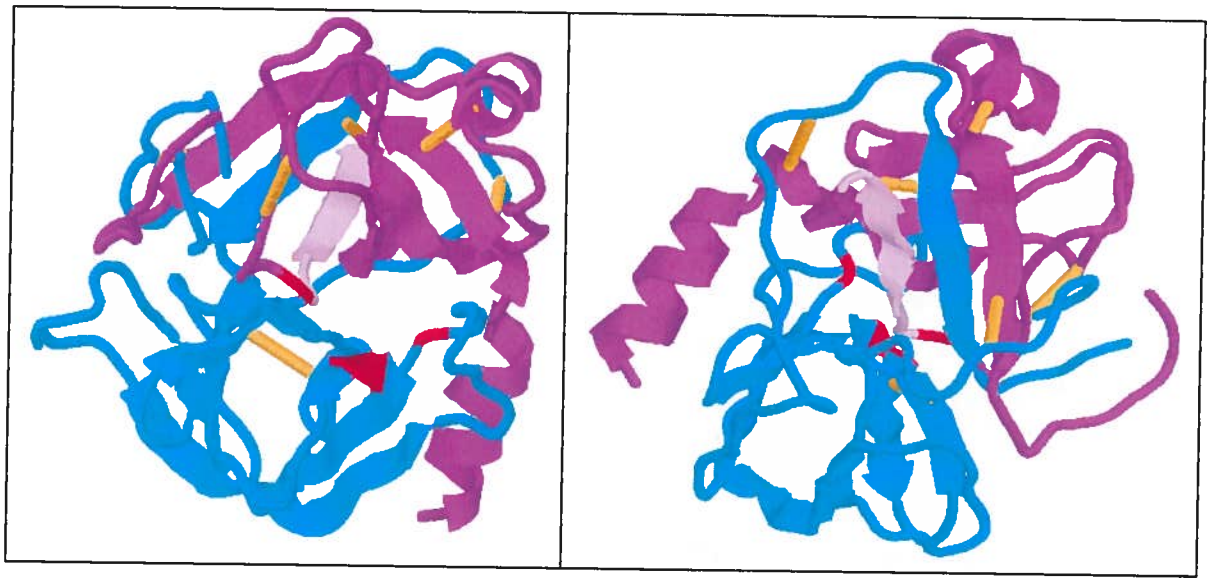


Figure 10. Structure tridimentionnelle de l'α-trypsine porcine ayant 48,9 % de similarité avec la kallikréine 10. Deux vues de l'arrangement spatial de la kallikréine 10. Le site en mauve correspond à la séquence GGPLVCD. Les trois acides aminés en rouge composent le site actif. Dans la structure présentée, les deux acides aminés du site actif non juxtaposé à la séquence liant potentiellement l'ET-1 sont décalés d'une à trois positions par rapport à la séquence de la kallikréine 10.

Selon les résultats du BLAST, l'ET-1 pourrait potentiellement lier BAG-4 par analogie à la séquence 81 (Figure 11). Cette protéine fait partie de la famille des protéines BAG (*BCL2-associated athanogene 4*) qui est connue pour son rôle anti-apoptotique. Les BAGs se lient à la protéine HSP 70 pour inhiber son action ATPase (Lau et Chan, 2003).

```
Séquence 81    6  LLELDSI  12
                  LLELDS+
     BAG-4   206  LLELDSV  212
```

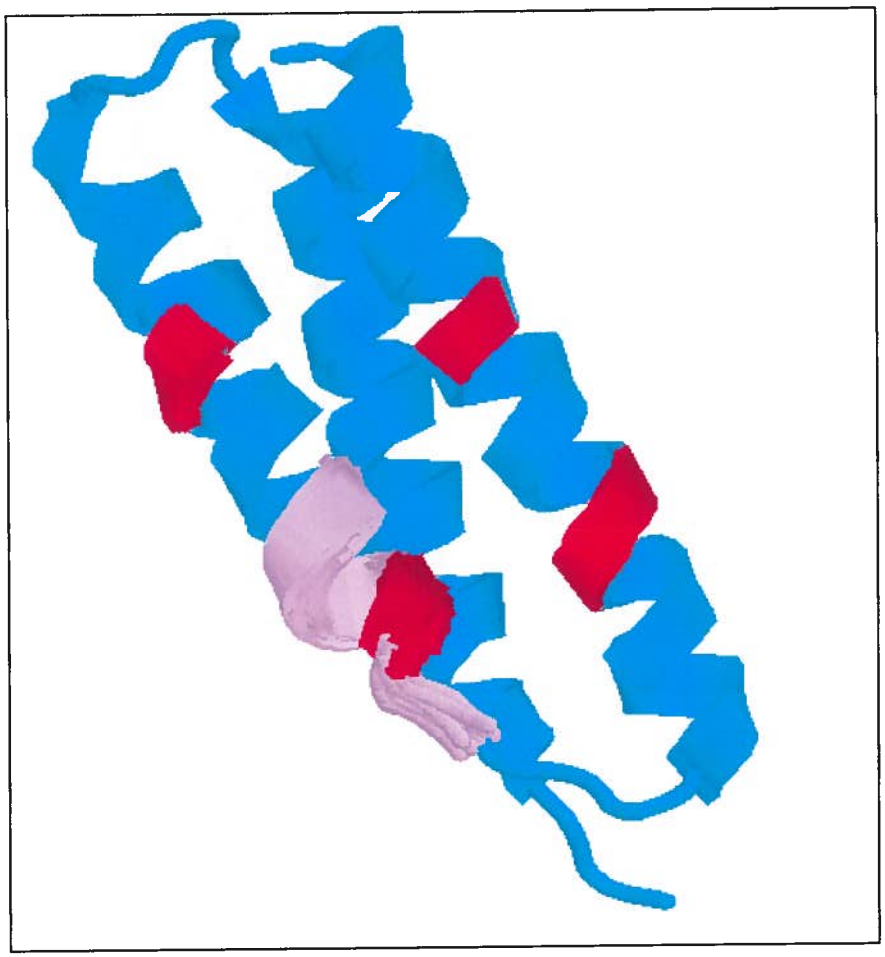


Figure 11. Structure tridimentionnelle de BAG-4 et comparaison des séquences. Les quatre sites en rouges sont nécessaires à la liaison de HSP 70. Le site en mauve est analogue à la séquence 81.

Les structures des protéines liant l'ATP et l'ADP relevées par le BLAST ne sont pas définies. La Figure 12 présente l'*ADP-ribosylation protein factor like 2* (Arl2) qui fait partie de la famille des GTPases. Les sites de liaison au GTP semblent loin de la section analogue à la séquence 81 (Kahn *et al.*, 2005).

```
Séquence 81    3  GAL_______LLELDSI  12
                  GAL_______+LELDSI
     ARF     131  GALSSNAIREVLELDSI  147
Séquence 81    9  LDSIS       13
                  LD-IS
     ARF     173  LDDIS       177
```

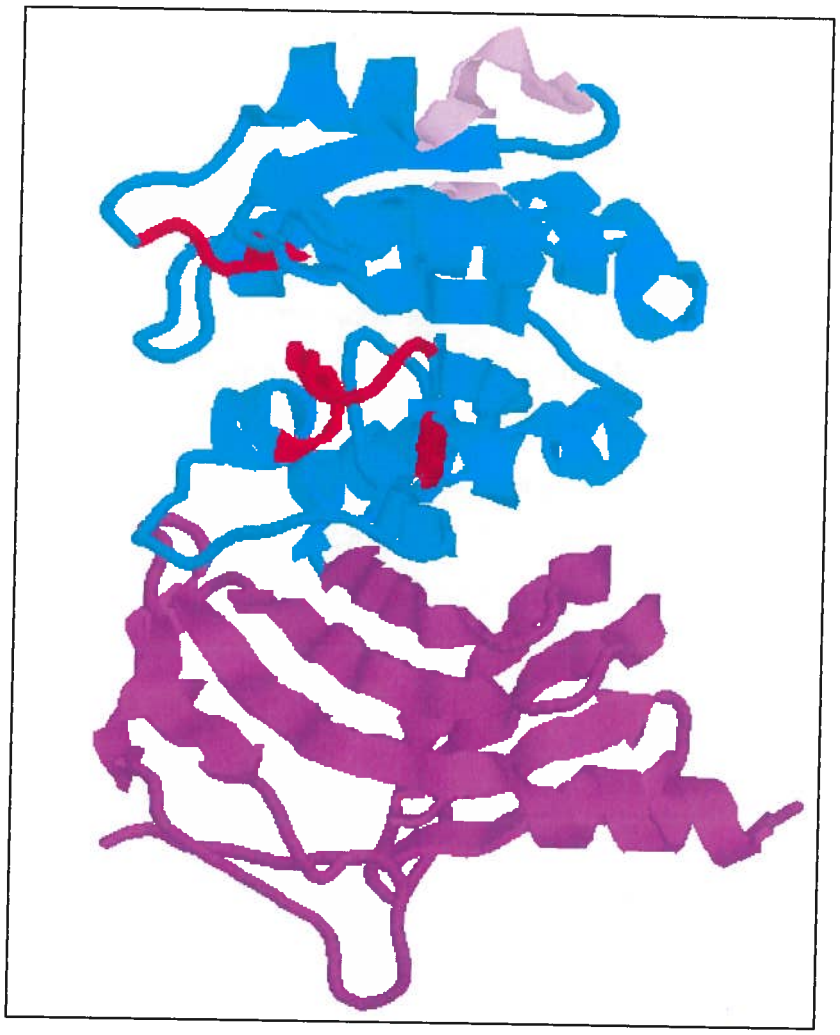


Figure 12. Structure tridimentionnelle de l'*ADP-ribosylation protein factor like 2* et alignement de sa séquence avec la séquence 81. Les sites en rouge représentent le site actif et les sections analogues à la séquence 81 sont en mauve pâle.

5. Discussion

Le rôle clef du peptide vasoconstricteur ET-1 dans l'hypertension en fait une cible de choix tant pour la recherche fondamentale que clinique. Quelques études ont d'ailleurs évalué diverses approches pharmacologiques visant à bloquer une action de l'ET-1 associée à plusieurs pathologies dont l'hypertension artérielle pulmonaire et l'hypertension essentielle. À cet égard, des antagonistes sélectifs ou non sélectifs des récepteurs de l'ET-1 et des bloqueurs de l'ECE ont fait l'objet de plusieurs études (Schiffrin, 2005, Agapitov et Haynes, 2002 et Motte *et al.*, 2006). Nos travaux visaient, dans un premier temps, à évaluer une nouvelle approche pharmacologique ayant pour objectif de trouver une molécule capable de se lier au peptide ET-1 et ainsi inhiber son action via ses récepteurs. La technique de CBP permet d'obtenir rapidement des peptides liant une cible. Le CBP est fréquemment utilisé pour trouver des peptides liant des protéines transmembranaires comme des récepteurs. À notre connaissance, aucune étude de CBP n'a permis d'obtenir un peptide liant une hormone peptidique. En plus de démontrer qu'il est possible de trouver des peptides liant un autre peptide, la découverte de telles substances inhibant la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs pourrait ouvrir la porte à une nouvelle approche pharmacologique par opposition à l'usage des antagonistes actuels. De plus, les résultats du CBP pourraient indiquer l'existence de nouvelles interactions peptide-protéine par analogie des séquences obtenues avec le protéome humain.

5.1 Affinité de la première librairie peptidique pour l'ET-1

Afin de déterminer l'intérêt des séquences obtenues au laboratoire par une première expérience de CBP, une librairie de six peptides a été synthétisée et testée pour déterminer leurs affinités respectives envers l'ET-1. Le test d'affinité relative utilisé a permis de démontrer que les EBPs ont tous une affinité supérieure à celle du peptide contrôle (NPY) pour l'ET-1. En comparant l'affinité des différents EBPs dérivés d'EBP-P70 avec celui-ci et avec la séquence consensus de la librairie peptidique (LXXFXVSISXFXXA), il a été possible d'identifier quelques résidus clefs et d'analyser

leurs propriétés. Par rapport au motif SIS, la présence d'une glycine en position -2 s'est avérée plus favorable qu'une lysine et, en position -3, la présence d'un glutamate a amélioré les capacités de liaison par rapport à une phénylalanine. En position -5, une valine s'est montré plus favorable qu'une histidine tandis qu'en position -1, la substitution de l'acide aspartique par la valine n'a pars influencé la liaison.

Les affinités sont principalement caractérisées en établissant la constante de dissociation (Kd). Selon la littérature, ces valeurs sont souvent de l'ordre du μM pour une première expérience de CBP et peuvent atteindre 10^{-10} M suite à des expériences subséquentes (Ladner *et al.*, 2004). Ainsi, afin d'obtenir des peptides ayant une affinité supérieure, une seconde librairie partiellement aléatoire a été développée. En partant d'EBP-P7O, la synthèse de la seconde librairie a donc été basée sur la séquence suivante : ALVSEGDSISXXXXX.

5.2 Production de la librairie et sélection pour l'ET-1

Les résultats des tests de liaison pour les peptides de la première librairie nous ont conduits à l'élaboration d'une nouvelle banque de phages exprimant une séquence partiellement aléatoire. Le titre de cette librairie de phages était de 1,6 x 10^5 phages. À titre comparatif, dans la littérature, d'autres groupes de recherche ont obtenu environ 10^8 phages alors que les librairies commerciales ont généralement des titres oscillant généralement entre 10^7 et 10^9 phages (Arap *et al.*, 2002, Cwirla *et al.*, 1990 et Fairbrother *et al.*, 1998). Le titre obtenu, bien qu'inférieur à ceux présentés dans la littérature, offrait tout de même une diversité intéressante.

En général, il est admis que le rendement des tours de sélection permet de constater l'augmentation de l'affinité de la librairie pour la cible. En effet, le pourcentage de phages ayant une grande affinité pour la cible augmente avec le nombre de tour de sélection. Par conséquent, puisque le nombre de phages utilisés à chaque tour demeure le même, le nombre de phages recueillis devrait s'accroître avec le nombre de tours de sélection.

Les phages ayant lié la cible peuvent être récupérés de deux façons : avec un tampon dénaturant ou par infection d'une culture bactérienne. Or, si les phages sont récupérés par l'infection d'une culture bactérienne comparativement à la méthode basée sur l'élution des phages à l'aide de tampons dénaturants, l'évaluation de l'affinité des peptides exposés à la surface des obtenus à chacun des tours est biaisée. En effet, le nombre de phages ayant adhéré à la cible suite aux tours de sélection ne peut être déterminé exactement puisque les phages se multiplient en infectant la culture bactérienne. Toutefois, la méthode utilisée pour récupérer les phages a l'avantage d'assurer que les meilleurs phages ne demeurent pas collés dans les puits.

Afin de palier à la perte de précision du rendement établi habituellement avec les phages récupérés directement après les tours de sélection, nous avons calculé le rendement avec un nombre constant de phages amplifiés. Le rendement du premier tour fut supérieur à ceux du 2e et du 3e tour pour ensuite augmenter au 4e tour. L'augmentation du nombre de phages au 4e tour suggérait une augmentation de l'affinité des peptides exposés à la surface des phages de la librairie.

5.3 Analyse des séquences obtenues par séquençage

5.3.1 Motifs observés par analyse des séquences

Les séquences obtenues ont pu être subdivisées en deux groupes selon leur taille. À cet égard, 15 des 21 séquences possédaient 5 à 6 acides aminés alors que 6 des 21 séquences avaient plus de 12 acides aminés. Parmi les petites séquences, nous avons constaté que 6 d'entre elles débutaient par Arg-Arg-Ser suivi d'un autre acide aminé polaire non chargé et se poursuivaient généralement par une arginine suivie d'un résidu aliphatique. À l'intérieur du groupe des petites séquences, la séquence SACV, obtenue quatre fois, fut intéressante parce que les propriétés des acides aminés S, A et C étaient similaires à celles du motif SIS obtenu par la première expérience de CBP. De plus, cette séquence ainsi que six autres avaient au moins un motif où un acide aliphatique était entouré par

des acides aminés polaires non chargés. Du côté des séquences plus longues, nous avons retrouvé les motifs de la librairie initiale. Un résumé des principales séquences est présenté dans le Tableau IX. D'après les résultats du séquençage, les propriétés de l'acide aminé situé entre les deux résidus chargés positivement précédant en N-terminal le motif SIS ne semblait pas avoir une grande importance. En comparant les séquences d'EBP-P7E5 et d'EBP-P100C2 on constate du côté N-terminal que le motif SIS est précédé d'un motif constitué dans l'ordre d'un résidu polaire, d'un résidu chargé négativement, d'un résidu chargé positivement, et d'un résidu chargé négativement. Il est à noter que les résultats des tests de liaison avec l'EBP-P7G4 provenant de la première librairie peptidique indiquaient qu'il est préférable d'avoir un résidu aliphatique au lieu d'un résidu chargé positivement en position -2 avant le motif SIS. Toutefois, la glycine d'EBP-P7G4 était précédée d'une phénylalanine ce qui n'était pas le cas avec la séquence EBP-P100C2. Le motif SIS était généralement suivi du côté C-terminal de résidus aliphatiques et de résidus polaires dépourvus de charge.

Tableau IX. Résumé des séquences obtenues d'intérêt majeur au cours des travaux.

Nom des séquences	Séquences														
Séquence consensus de départ		L	X	X	F	X	V	S	I	S	X	F	X	X	A
EBP-P7G4	A	L	V	S	F	G	D	S	I	S	P	T	R	P	A
EBP-P7E5	A	L	V	S	E	K	D	S	I	S	P	T	R	P	A
Première séquence optimisée		L	V	S	E	G	D	S	I	S	X	X	X	X	X
EBP-P100C2				C	D	R	D	S	I	S	R	P	S	G	
Seconde séquence optimisée				C	D	R	D	S	I	S	X	X	X	X	

5.3.2 Évaluation de la liaison des peptides à l'ET-1

Des six peptides de la seconde librairie, l'EBP-P10A1, l'EBP-P100C1 et l'EBP-P100C2 se distinguaient par une affinité accrue pour l'ET-1 comparativement au meilleur peptide de la première librairie (EBP-P7E5). Le peptide EBP-P2A2 affichait environ 20 % moins d'affinité pour l'ET-1 que EBP-P7E5 ce qui élimine l'hypothèse qu'un motif

composé d'une alternance entre des acides aminés polaires non chargés et des acides aminés aliphatiques soit suffisant pour établir une forte liaison à l'ET-1. D'un autre côté, l'EBP-P81B3 et l'EBP-P100C3 montraient une affinité semblable à celle de l'EBP-P7E5. L'évaluation de l'affinité pour l'ET-1 de la série de peptides EBP-P100 indique aussi que la présence d'une cystéine en N-terminal est importante.

En comparant la composition des séquences EBP-P7E5, EBP-P81B3, et EBP-P100C2 entre elles, on constate que toutes possèdent deux acides aminés chargés négativement à proximité du motif SIS. Également, l'EBP-P7E5 et l'EBP-P100C2 contiennent deux acides aminés chargés positivement et le nombre d'acides aminés aliphatiques et polaires fluctue parmi ces séquences. L'ET-1, quant à elle possède deux charges positives : la Lys 9 et l'extrémité N-terminale. La Lys 9 est importante dans l'activation du récepteur ET_A (Langlois *et al.*, 2003). Il est possible que le déplacement de l'EC_{50} de l'ET-1 soit causé par les Glu et Asp des EBPs en formant des liens ioniques avec la Lys 9. Ainsi, les trois charges négatives de l'ET-1 (Asp^8, Glu^{10} et Asp^{18}) seraient disponibles pour former des interactions ioniques avec les deux charges positives des peptides EBP-P7E5 et EBP-P100C2. Puisque l'EBP-P81B3, qui ne possède pas de charge positive, montre une affinité semblable à celle l'EBP-P7E5, on peut supposer que les charges négatives sont responsables de la spécificité de la liaison des EBPs. Aussi, les acides aminés polaires non-chargés des EBPs pourraient former, via des molécules d'eau, des liens hydrogène avec les nombreux acides aminés polaires de l'ET-1. Les acides aminés polaires des EBPs pourraient aussi interagir avec le squelette peptidique de l'ET-1. Finalement les EBP ne contiennent pas de résidus aromatiques ce qui suggère que la liaison entre les deux peptides serait favorisée avec des résidus hydrophiles. Similairement, le peptide RRSSR pourrait former des liens ioniques avec les résidus chargés négativement de l'ET-1 ou des liens hydrogènes avec les fonctions polaires de la molécule.

La seconde séquence optimisée suite aux tests de liaison effectués avec la deuxième librairie peptidique était CDRDSISXXXX. La séquence suivant le motif SIS n'a pu être déterminée car aucune variation de cette section n'était présente dans la librairie peptidique. Les résultats du séquençage suggèrent qu'une séquence composée de résidus

polaires et aliphatiques serait favorable ainsi que la présence d'une arginine juxtaposée à une proline.

Il faut noter que l'affinité des peptides pour l'ET-1 se reflète dans les tests d'inhibition de l'action de l'endothéline. Les peptides les plus prometteurs, sont l'EBP-P10A1 et l'EBP-P100C2. Ainsi, lorsqu'ils ont été préincubés avec des concentrations croissantes d'ET-1, ils ont inhibé significativement l'action de cette dernière sur les aortes de rat. L'aorte contient essentiellement l'isoforme ET_A. En effet, nous avons observé un déplacement vers la droite de la courbe concentration-réponse de l'ET-1 en présence de ces deux peptides (100 μM). Les EC_{50} obtenus pour l'ET-1, EBP-P10A1 et P100C2 étaient respectivement de 7 ± 1 nM, 18 ± 5 nM et 23 ± 8 nM. La valeur de P était inférieure à 0,01 pour d'EBP-P10A1 et de 0,05 pour EBP-P100C2. La valeur de P pour EBP-P10A1 a été calculée avec une variance de 12 alors que la variance pour EBP-P100C2 était de 9. Par conséquent, en présence des peptides testés une plus grande quantité d'ET-1 est nécessaire pour obtenir une contraction équivalente.

En 2004, Desjobert *et al* ont caractérisé des peptides bloquant l'action de l'intégrase du VIH de type I. Le peptide FHNHGKQ avait une affinité (IC_{50}) de 1 μM pour l'intégrase alors que le peptide HLEHLLF affichait une affinité de 100 nM. Il a été constaté que l'activité de l'intégrase était diminuée de moitié en présence de 70 μM de FHNHGKQ mais que le HLEHLLF n'avait qu'une très faible activité inhibitrice de l'enzyme. En plus d'avoir une bonne affinité, il est important que les peptides inhibiteurs empêchent la liaison au site actif. Il faut donc être prudent lors de la recherche de peptides inhibiteurs car l'affinité n'est pas nécessairement synonyme d'inhibition. Nous avons confirmé qu'en plus de lier l'ET-1, les peptides testés inhibent l'action de celle-ci. Toutefois, malgré le déplacement de l'EC_{50}, les dérivés ne présentent pas les caractéristiques nécessaires à la comparaison entre notre approche pharmacologique et l'usage d'antagonistes des récepteurs de l'ET-1. Il s'agit de composés de départ pouvant mener à cette comparaison.

5.3.3 Analogie des séquences avec le protéome humain (BLAST)

Les séquences obtenues par criblage de banques de phages pourraient mener à la découverte de nouvelles interactions peptide-protéine. C'est pourquoi les séquences 24, 37, 81 et 100 ont été comparées au protéome humain au moyen de BLAST. Plusieurs types de protéines avec des analogies de séquences ont été identifiées. Notamment des protéases à sérine, des protéines liant l'ADN et des protéines dont l'action est reliée à l'ADP et à l'ATP.

Au moins trois protéases à sérine sont connues pour moduler l'action de l'ET-1. L'une d'entre elles est la chymase. Bien que son site de liaison à la Big ET-1 ne soit pas connu, la chymase clive la Big ET-1 pour la transformer en ET-1(1-31) (Tirapelli *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré récemment que la kallidinogénase de la famille des protéases à sérine inhibe l'action de l'ET-1 par un mécanisme qui reste à identifier (Nagano *et al.*, 2007). Une troisième protéase à sérine, la thrombine aussi appelée facteur IIa est impliquée dans la coagulation. Les protéases à sérine sont caractérisées par un site actif constitué de trois acides aminés : His, Asp, et Ser. De plus, les premiers acides aminés qui suivent Ser au début des séquences données au Tableau X sont relativement bien conservés. Les acides aminés soulignés sont ceux qui correspondent à la séquence 100. Une autre de ces protéases, l'hepsine, laquelle comprend 11 acides aminés qui peuvent être associée à la séquence 100. L'ensemble des analogies et homologies converge vers la possibilité que les acides aminés suivant la sérine du site actif des protéases à sérine soient favorables à la liaison de l'ET-1. Fait à noter, tout comme la thrombine, l'hepsine est impliquée dans la coagulation. Il est également utile de mentionner que les dommages causés par une injection d'ET-1 dans des modèles d'ischémie cérébrale peuvent être réduits par une injection préalable de thrombine, une protéase à sérine (Henrich *et al,* 2006). De plus, alors que la thrombine protège de l'action de l'ET-1 dans des modèles d'ischémie cérébrale, il faut souligner que l'hepsine est impliquée dans la coagulation en clivant le facteur VII en facteur VIIa (Kamaza *et al.*, 1995). L'ensemble de ces éléments suggère que l'hepsine jouerait un rôle en parallèle avec la thrombine en interagissant entre autre avec l'ET-1.

La séquence 100 possède une analogie avec la kallikréine 10 (KLK10), une protéase à sérine faisant partie de la famille des kallidinogénases. Il est possible de formuler l'hypothèse que la KLK10 pourrait inhiber l'action de l'ET-1 tout comme la kallidinogénase, non seulement en se basant sur le site d'interaction potentiel trouvé grâce à la séquence 100 ou en se basant sur l'action inhibitrice de la kallidinogénase, mais aussi en effectuant des parallèles avec des actions décrites dans la littérature. En effet, l'action mitogène de l'ET-1 est montrée du doigt dans de nombreux types de cancer alors que l'expression de la KLK10 est inhibée dans divers types de cancers (Petraki *et al.*, 2002). Donc, ces observations supportent l'hypothèse qu'en situation physiologique normale la KLK10 pourrait être capable d'inactiver l'ET-1, ce qui expliquerait l'action mitogène de l'ET-1 dans divers cancers alors que la KLK10 est sous-exprimée.

Tableau X. Comparaison entre la séquence 100 et le contenu de diverses protéases à sérine. Les acides aminés soulignés correspondent à la séquence 100. Des tirets ont été ajoutés à la séquence de l'hepsine et de la chymase pour les aligner avec la séquence 100.

	Séquences
Séquence 100	SGGALVCDRDSISR
Kallikréine 10	SGGPLVCDETLQGI
Hepsine	SGGPFVCE-DSISR
Thrombine (facteur IIa)	SGGPFVMKSPFNNR
Chymase	SGGPL-CLAGVAQG

De nombreuses protéines liant l'ADN sont incluses dans les séquences obtenues par BLAST. Aucun rôle n'a encore été démontré pour l'endothéline dans le nucléole. Toutefois, Jacques *et al.* (2006) ainsi que Hunter et Turner (2006) ont observé respectivement la présence d'ET-1 et de certaines sous-isoformes de l'ECE-1 dans le nucléole.

Bien que plusieurs protéines ayant un rôle relié à l'action de l'ATP et de l'ADP aient été identifiées, l'absence de structures et de similarité des fonctions *in vivo* restreint toute extrapolation sur la possibilité que l'ET-1 ait un rôle avec des protéines dont l'action est reliée à l'ATP et à l'ADP.

Finalement, en plus de ces trois groupes de protéines, la protéine transmembranaire vasorine est particulièrement intéressante puisqu'elle est impliquée dans la cicatrisation et le remodelage des vaisseaux sanguins. Cette protéine exprimée principalement dans les CML vasculaires a été découverte en 2004 par Ikeda *et al.* La séquence 81 possède une analogie avec une région extracellulaire riche en leucine (*LLR : leucine rich region*) de la protéine transmembranaire vasorine. Suggérant que celle-ci puisse être modulée par l'ET-1.

5.4 Perspective

Les expériences effectuées débouchent sur plusieurs avenues. Au point de vue cardiovasculaire, la découverte de deux peptides inhibant l'action de l'ET-1 en liant celle-ci ouvre la porte à la comparaison entre cette approche pharmacologique et l'usage d'antagonistes ET_A, ET_B et ET_A/ET_B. L'usage de molécules liant l'ET-1 tel que l'EBP-P10A1 et l'EBP-P100C2 pourrait éviter de bloquer les récepteurs ET_B qui sont responsables de la clairance de l'ET-1 (Dupuis *et al.*, 1996).

Puisque le test d'affinité relative des peptides EBP-P10A1 et EBP-P100C2 indiquait que ceux-ci ont une affinité relative environ 50 % plus élevée que le meilleur peptide de la première librairie, il serait intéressant de quantifier ces liaisons en déterminant les valeurs d'IC_{50} respectives pour ces peptides. À partir des résultats obtenus, une nouvelle librairie de phages pourrait être utilisée afin d'obtenir des peptides ayant une affinité supérieure.

Finalement, étant donné l'analogie de la séquence 100 avec plusieurs protéases à sérine et étant donné l'interaction connue de protéases à sérine avec l'ET-1, l'hepsine

semblerait un modèle de choix pour entamer l'étude de la liaison de l'ET-1 aux protéases à sérine.

6. Conclusion

Le rôle de l'ET-1 est bien défini dans plusieurs pathologies du système cardiovasculaire. Plusieurs antagonistes des récepteurs de l'ET-1 ont été développés. Les résultats mitigés des derniers tests cliniques d'antagonistes augmentent l'intérêt pour le développement d'une nouvelle approche pharmacologique ciblant l'ET-1.

Notre étude a permis la synthèse de peptides liant l'ET-1 et inhibant l'action de celle-ci. Une concentration de 100 μM de peptide a permis de déplacer significativement la courbe concentration-réponse de l'ET-1 qui était de 7 nM, à 18 nM pour l'EBP-P10A1, et à 23 nM pour l'EBP-P100C2.

Traditionnellement, les enzymes et les récepteurs ont été ciblés pour la synthèse de médicament. L'usage du CBP nous a permis de synthétiser plusieurs peptides liant le peptide vasoconstricteur ET-1. Ainsi, nous avons amorcé l'exploration de l'usage du criblage de banques de phages à titre d'outil pour développer des peptides inhibant l'action d'hormones peptidiques.

Finalement, nos travaux ouvrent la porte à l'étude de l'interaction potentielle entre des protéases à sérine telle l'hepsine et l'ET-1. De nouveaux rôles pour l'ET-1 par rapport à la famille des protéases à sérine pourraient ainsi être explorés.

Appendice A

Liste des acides aminés et leur code à une lettre et à trois lettres

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

Liste des références

AGAPITOV, A.V. et W.G. Haynes. 2002. "Role of endothelin in cardiovascular disease." Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System, vol. 3, p. 1-15.

ARAP, W., M.G. Kolonin, M. Trepel, J. Lahdenranta, M. Cardo-Vila, R.J. Giordano, P.J. Mintz, P.U. Ardelt, V.J. Yao, C.I. Vidal, L. Chen, A. Flamm, H. Valtanen, L.M. Weavind, M.E. Hicks, R.E. Pollock, G.H. Botz, C.D. Bucana, E. Koivunen, D. Cahill, P. Troncoso, K.A. Baggerly, R.D. Pentz, K.A. Do, C.J. Logothetis, et R. Pasqualini. 2002. "Steps toward mapping the human vasculature by phage display." Nature Medicine, vol, 8, p. 121-7.

BADESCH, D.B., F. Bodin, F.N. Channick, A. Frost, M. Rainisio, I. M. Robbins, S. Roux, L. J. Rubin, G. Simonneau, O. Sitbon, et V.F. Tapson. 2002. "Complete results of the first randomized, placebo-controlled study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, in pulmonary arterial hypertension." Current Therapeutic Research, vol. 63 p. 228-246.

BRUNNER, F., C. Bras-Silva, A.S. Cerdeira, et A.F. Leite-Moreira. 2006. "Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis." Pharmacology and Therapeutics, vol. 111, p. 508-31.

CAI, X. et A. Garen. 1995. "Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries." Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, vol. 92, p. 6537-41.

CARDILLO, C., C.M. Kilcoyne, M. Waclawiw, R.O. Cannon 3rd, et J.A. Panza. 1999. "Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension." Hypertension, vol. 33, p. 753-8.

CWIRLA, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, et W.J. Dower. 1990. "Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands." Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, vol. 87, p.6378-82.

DAVIE, N., S.J. Haleen, P.D. Upton, J.M. Polak, M.H. Yacoub, N.W. Morrell, et J. Wharton. 2002."ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 165, p. 398-405.

DESJOBERT, C., V.R. de Soultrait, A. Faure, V. Parissi, S. Litvak, L. Tarrago-Litvak, et M. Fournier. 2004. "Identification by phage display selection of a short peptide able to inhibit only the strand transfer reaction catalyzed by human immunodeficiency virus type 1 integrase." Biochemistry, vol. 43, p. 13097-105.

DYSON, M.R., V. Germaschewski, et K. Murray. 1995. "Direct measurement via phage titre of the dissociation constants in solution of fusion phage-substrate complexes." Nucleic Acids Research, vol. 23, p. 1531-5.

D'ORLEANS-JUSTE, P., M. Plante, J.C. Honore, E. Carrier, et J. Labonte. 2003. "Synthesis and degradation of endothelin-1." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 81, p. 503-10.

DUPUIS, J., C.A. Goresky, et A. Fournier. 1996. "Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors." Journal of Applied Physiology, vol. 81, p. 1510-5.

ERGUL, S., A. Ergul, J.A. Hudson, D. Puett, B.M. Wieman, M.D. Durham, et D.C. Parish. 1998. "The effect of regulation of high blood pressure on plasma endothelin-1 levels in blacks with hypertension." American Journal of Hypertension, vol. 11, p. 1381-5.

ELIJOVICH, F., C.L. Laffer, E. Amador, H. Gavras, M.R. Bresnahan, et E.L. Schiffrin. 2001. "Regulation of plasma endothelin by salt in salt-sensitive hypertension." Circulation, vol. 103, p. 263-8.

FAIRBROTHER, W.J., H.W. Christinger, A.G. Cochran, G. Fuh, C.J. Keenan, C. Quan, S.K. Shriver, J.Y. Tom, J.A. Wells, et B.C. Cunningham. 1998. "Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site." Biochemistry, vol. 37, p. 17754-64.

FILPULA, D. 2007. "Antibody engineering and modification technologies." Biomolecular Engineering, vol. 24, p. 201-15.

FOWLKES, D.M., M.D. Adams, V.A. Fowler, B.K. Kay. 1992. "Multipurpose vectors for peptide expression on the M13 viral surface." Biotechniques, vol.13(3), p. 422-428.

GIORDANO, R.J., M. Cardo-Vila, J. Lahdenranta, R. Pasqualini, et W. Arap. 2001. "Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands." Nature Medicine, vol. 7, p. 1249-53.

HASEGAWA, K., H. Fujiwara, K. Doyama, T. Inada, S. Ohtani, T. Fujiwara, K. Hosoda, K. Nakao, et S. Sasayama. 1994. "Endothelin-1-selective receptor in the arterial intima of patients with hypertension." Hypertension, vol. 23, p. 288-93.

HENRICH-NOAK, P., F. Striggow, G. Reiser, et K.G. Reymann. 2006. "Preconditionning with thrombin can be protective or worsen damage after endothelin-1-induced focal ischemia in rats." Journal of Neuroscience Research, vol. 83, p. 469-75.

HUNTER, A.R. et A.J. Turner. 2006. "Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms in human endothelial cells." Experimental Biology and Medicine (Maywood), vol. 231, p. 718-22.

IKEDA, K., N. Emoto, S.B. Raharjo, Y. Nurhantari, K. Saiki, M. Yokoyama, et M. Matsuo. 1999. "Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides." The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 32469-77.

IKEDA, S., N. Emoto, H. Alimsardjono, M. Yokoyama, et M. Matsuo. 2002. "Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2." Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 293, p. 421-6.

IKEDA, Y., Y. Imai, H. Kumagai, T. Nosaka, Y. Morikawa, T. Hisaoka, I. Manabe, K. Maemura, T. Nakaoka, T. Imamura, K. Miyazono, I. Komuro, R. Nagai, et T. Kitamura. 2004. "Vasorin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, vol. 101, p. 10732-7.

INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto, et T. Masaki. 1989. "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, vol. 86, p. 2863-7.

ISHIKAWA, J., K. Kario, S. Hoshide, K. Eguchi, M. Morinari, R. Kaneda, Y. Umeda, S. Ishikawa, T. Kuroda, Y. Hojo, et K. Shimada. 2005. "Determinants of exaggerated difference in morning and evening blood pressure measured by self-measured blood pressure monitoring in medicated hypertensive patients: Jichi Morning Hypertension Research (J-MORE) Study." American Journal of Hypertension, vol. 18, p. 958-65. Notes: CORPORATE NAME: J-MORE Study Group

JACQUES, D., S. Sader, C. Perreault, D. Abdel-Samad, F. Jules, et C. Provost. 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.

JOHNSON, G.D., T. Stevenson, et K. Ahn. 1999. "Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin." Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 4053-8.

KAHN, R.A., L. Volpicelli-Daley, B. Bowzard, P. Shrivastava-Ranjan, Y. Li, C. Zhou, et L. Cunningham. 2005. "Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics." Biochemical Society Transactions, vol. 33, p. 1269-72.

KAZAMA, Y., T. Hamamoto, D.C. Foster, et W. Kisiel. 1995. "Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation." Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 66-72.

KIMURA, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinimi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto, et T. Masaki. 1989. "Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1." Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5:S5-7; discussion S18.

KOUREMBANAS, S., L.P. McQuillan, G.K. Leung, et D.V. Faller. 1993. "Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia." The Journal of Clinical Investigation, vol. 92, p. 99-104.

KURIHARA, Y., H. Kurihara, H. Suzuki, T. Kodama, K. Maemura, R. Nagai, H. Oda, T. Kuwaki, W.H. Cao, N. Kamada, et a.l. et. 1994. "Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1." Nature, vol. 368, p. 703-10.

LADNER, R.C., A.K. Sato, J. Gorzelany, et M. de Souza. 2004. "Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies." Drug Discovery Today, vol. 9, p. 525-9.

LANGLOIS, C., M. Letourneau, P. Lampron, V. St-Hilaire, and A. Fournier. 2003. "Development of agonists of endothelin-1 exhibiting selectivity towards ETA receptors." British Journal of Pharmacology, vol. 139, p. 616-22.

LAU, P.P. et L. Chan. 2003. "Involvement of a chaperone regulator, Bcl2-associated athanogene-4, in apolipoprotein B mRNA editing." Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 52988-96.

MARKS, J.D., H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, and G. Winter. 1991. "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." Journal of Molecular Biology, vol. 222, p. 581-97.

MOREIRA, F.A., M.L. Molchanov, et F.S. Guimaraes. 2004. "Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats." Psychopharmacology (Berl), vol. 171, p. 199-203.

MOTTE, S., K. McEntee, et R. Naeije. 2006. "Endothelin receptor antagonists." Pharmacology and Therapeutics, vol. 110, p. 386-414.

NAGANO, H., P.Z. Wei, C.Q. Wen, T. Jomori, H. Oku, T. Ikeda, Y. Saito, et Y. Tano. 2007. "Effects of kallidinogenase on ischemic changes induced by repeated intravitreal injections of endothelin-1 in rabbit retina." Current Eye Research, vol. 32, p. 113-22.

OHNAKA, K., R. Takayanagi, M. Nishikawa, M. Haji, et H. Nawata. 1993. "Purification and characterization of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in porcine aortic endothelium. OFF." Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 26759-66.

ORTEGA MATEO, A. et A.A. de Artinano. 1997. "Highlights on endothelins: a review." Pharmacological Research, vol. 36, p. 339-51.

OSBOURN, J., M. Groves, et T. Vaughan. 2005. "From rodent reagents to human therapeutics using antibody guided selection." Methods, vol. 36, p. 61-8.

PASCHKE, M. 2006. "Phage display systems and their applications." Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 70, p. 2-11.

PASQUALINI, R. et E. Ruoslahti. 1996. "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." Nature, vol. 380, p. 364-6.

PETRAKI, C.D., V.N. Karavana, L.Y. Luo, et E.P. Diamandis. 2002. "Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry." The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society, vol. 50, p. 1247-61.

RODRIGUEZ-VITA, J., M. Ruiz-Ortega, M. Ruperez, V. Esteban, E. Sanchez-Lopez, J.J. Plaza, et J. Egido. 2005. "Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells." Circulation Research, vol. 97, p. 125-34.

SALAZAR, N.C., J. Chen, et H.A. Rockman. 2007. "Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts." Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1768, p. 1006-18.

SCHNEIDER, M.P., K.F. Hilgers, A.U. Klingbeil, S. John, R. Veelken, et R.E. Schmieder. 2000. "Plasma endothelin is increased in early essential hypertension." American Journal of Hypertension, vol. 13, p. 579-85.

SCHIFFRIN, E.L. 2005 "Vascular endothelin in hypertension." Vascular Pharmacology, vol. 43, p. 19-29.

SERGEEVA, A., M.G. Kolonin, J.J. Molldrem, R. Pasqualini, et W. Arap. 2006. "Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents." Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 58, p. 1622-54.

SMITH, G.P. 1985. "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science, vol. 228, p.1315-7.

TIRAPELLI, C.R., M.H. Fecteau, J.C. Honore, E. Legros, F. Gobeil, et P. D'Orleans-Juste. 2006. "Enzymatic pathways involved in the generation of endothelin-1(1-31) from exogenous big endothelin-1 in the rabbit aorta." British Journal of Pharmacology, vol. 148, p. 527-35.

TOUYZ, R.M. et E.L. Schiffrin. 2003. "Role of endothelin in human hypertension." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 81, p. 533-41.

VALDENAIRE, O., E. Rohrbacher, et M.G. Mattei. 1995. "Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1)." Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 29794-8.

WAGNER, O.F., G. Christ, J. Wojta, H. Vierhapper, S. Parzer, P.J. Nowotny, B. Schneider, W. Waldhausl, et B.R. Binder. 1992. "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells." Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 16066-8.

YANAGISAWA, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, et T. Masaki. 1988. "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature, vol. 332, p. 411-5.