



**CONCEPTION ET ÉVALUATION DE LIGANDS
BIOTECHNOLOGIQUES POUR LES RÉCEPTEURS B₁ ET B₂
DE LA BRADYKININE ET POUR LE RÉCEPTEUR PTH₁R DE
LA PARATHORMONE**

Mémoire

Xavier Charest-Morin

Maîtrise en médecine expérimentale
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Xavier Charest-Morin, 2015

RÉSUMÉ

En se basant sur les modèles de liaison de certaines hormones peptidiques à leur récepteur, nous avons suggéré que ces hormones pourraient être modifiées avec un cargo protéique fonctionnel. Nous avons généré des ligands biotechnologiques pour les récepteurs B₁ et B₂ de la bradykinine (B₁R et B₂R; BK) et pour le récepteur PTH₁R de la parathormone (PTH). Pour le récepteur PTH₁R, nous avons créé une protéine recombinante formée du tériparatide (PTH(1-34)) fusionné par son extrémité C-terminale à la protéine fluorescente verte (GFP). Pour le récepteur B₂R, la GFP a été fusionnée à l'extrémité N-terminale de la maximakinine (un analogue de la BK). Pour le récepteur B₁R, nous avons testé 7 protéines de fusion afin d'en identifier une avec une affinité d'ordre nanomolaire. Cette protéine, EGFP-S4P1, est basée sur la Lys-des-Arg⁹BK fusionné par son extrémité N-terminale à un *spacer* formé d'un dimère d'asparagine-glycine (NG)_n lié à la GFP.

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
TABLES DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES	ix
ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
INTRODUCTION	1
1. Les récepteurs couplés aux protéines G	1
1.1 Historique	1
1.2 Les protéines G	2
1.3 Structure des GPCR.....	4
1.4 Familles de GPCR.....	5
1.4.1 GPCR de classe A	5
1.4.2 GPCR de classe B	5
1.4.3 GPCR de classe C, D, E, F et O	5
1.5 Désensibilisation des GPCR	6
1.5.1 Désensibilisation homologue	6
1.5.2 Désensibilisation hétérologue	7
2. Les récepteurs de la bradykinine	8
2.1 Le système kinine-kallikréine.....	8
2.1.1 Les kininogènes	9
2.1.2 Les kallikréines	9
2.1.3 Les kinines	10
2.2 Le récepteur B ₁ de la bradykinine.....	10
2.2.1 Ligands du récepteur B ₁ R	11
2.2.2 Régulation du B ₁ R	11
2.2.3 Signalisation par le récepteur B ₁	13
2.2.4 Localisation du récepteur B ₁	13
2.3 Le récepteur B ₂ de la bradykinine.....	14
2.3.1 Ligands du récepteur B ₂	14
2.3.2 Régulation du récepteur B ₂	15
2.3.3 Signalisation par le B ₂ R	16
2.3.4 Localisation du récepteur B ₂	16
3. Le récepteur de la parathormone 1 (PTH₁R)	17
3.1 La parathormone (PTH).....	17
3.1.1 Effets de la parathormone.....	17
3.1.2 Régulation de la sécrétion de la PTH.....	19
3.2 Le récepteur de la parathormone PTH ₁ R	19
3.2.1 Les ligands du récepteur PTH ₁ R.....	20
3.2.2 Régulation du récepteur PTH ₁ R.....	21
3.2.3 Signalisation par le PTH ₁ R.....	22
3.2.4 Localisation du récepteur PTH ₁ R.....	22
4. La génération de ligands biotechnologiques	22
5. Objectifs du projet de recherche	24
MATÉRIEL ET MÉTHODES	25

1. Matériel	25
1.1 Cellules et production des ligands biotechnologiques	25
1.2 Vecteurs	26
1.2.1 Construction du vecteur PTH(1-34)-EGFP	26
1.2.2 Construction du vecteur EGFP-MK.....	29
1.2.3 Construction des vecteurs exprimant des protéines de fusion ligands du..	29
1.2.4 Construction du vecteur B ₂ R-CherryFP	33
1.2.5 Construction du vecteur ACE-CherryFP	34
1.3 Agents pharmacologiques	34
2. Méthodes	35
2.1 Immunobuvardage.....	35
2.2 Dosage des protéines de fusion	35
2.3 Microscopie	35
2.4 Cytométrie en flux (FACS).....	36
2.5 Détermination de l'affinité des peptides et de EGFP-S4P1 pour B ₁ R.....	36
2.6 Analyse statistique.....	36
RÉSULTATS	39
1. Caractérisation de la protéine de fusion agoniste du récepteur PTH₁R	39
1.1 Validation de l'expression de la protéine PTH(1-34)-EGFP.....	39
1.2 Caractérisation de l'activité agoniste de PTH(1-34)-EGFP.....	41
1.3 Internalisation de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP par PTH ₁ R	44
1.4 Étude de colocalisation de la protéine de fusion avec des marqueurs du système endosomal	47
2. Caractérisation de la protéine de fusion agoniste du récepteur B₂R	49
2.1 Validation de l'expression des protéines de fusion s-EGFP-MK et EGFP-MK .	49
2.2 Caractérisation des propriétés agonistes de EGFP-MK	51
2.3 Études sur l'internalisation de EGFP-MK via le récepteur B ₂ R.....	54
2.4 Étude de colocalisation de la protéine de fusion avec des marqueurs du système endosomal	56
2.5 Vérification de la spécificité des protéines de fusion EGFP-MK et PTH(1-34)-EGFP.....	56
3. Conception et caractérisation des protéines de fusions ligand du récepteur B₁ de la BK	59
3.1 Affinité pour le B ₁ R des peptides candidats pour la génération de la protéine de fusion ligand du B ₁ R.....	59
3.2 Validation de l'expression des différentes protéines de fusion ligand du récepteur B ₁ R.....	61
3.3 Évaluation en microscopie des différentes protéines de fusion ligand du récepteur B ₁ R.....	61
3.4 Évaluation de la spécificité de la protéine de fusion EGFP-S4P1 pour le récepteur B ₁ R.....	64
DISCUSSION	67
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	73
BIBLIOGRAPHIE	75
ANNEXE I	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Affinité des kinines pour le récepteur B ₁ de la BK.....	12
Tableau 2. Affinité des kinines pour le récepteur B ₂ de la BK.....	14
Tableau 3. Affinité de différents ligands du récepteur PTH ₁ R humain	21

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Récepteurs couplés aux protéines G et protéines G hétérotrimériques.....	3
Figure 2. Le système kinine-kallikréine	8
Figure 3. Les effets de la parathormone	18
Figure 4. Séquence du vecteur codant pour la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP27	
Figure 5. Représentation schématique des protéines de fusion agonistes des récepteur B ₂ R et PTH ₁ R	28
Figure 6. Séquence du vecteur codant pour les protéines de fusion s-EGFP-MK et EGFP-MK.	30
Figure 7. Représentation schématique des protéines de fusion évaluées en tant que ligand potentiel du récepteur B ₁	32
Figure 8. Immunobuvardage de PTH(1-34)-EGFP	40
Figure 9. Induction de l'expression du facteur de transcription c-Fos par PTH(1-34)-EGFP.....	42
Figure 10. Production d'AMP _c par PTH(1-34)-EGFP.....	43
Figure 11. Endocytose de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP (microscopie).....	45
Figure 12. Endocytose de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP (FACS)	46
Figure 13. Colocalisation de PTH(1-34)-EGFP avec les GTPase Rab ₅ et Rab ₇	48
Figure 14. Production des protéines codées par les vecteurs sEGFP-MK et EGFP-MK	50
Figure 15. Induction de c-Fos par EGFP-MK.....	52
Figure 16. Étude de colocalisation entre EGFP-MK et arrestine ₁	53
Figure 17. Spécificité de EGFP-MK pour le B ₂ R.....	55
Figure 18. Colocalisation de EGFP-MK avec les petite GTPase Rab ₅ et Rab ₇	57
Figure 19. Absence d'internalisation des protéines de fusion fluorescentes par des cellules exprimant le récepteur non-correspondant.....	58
Figure 20. Évaluation de l'affinité des combinaisons <i>spacer</i> -peptide pour la conception d'une protéine de fusion ligand du B ₁ R	60
Figure 21. Propriétés des protéines de fusion ligand du récepteur B ₁ R	62
Figure 22. Test pour le marquage des membranes de cellules HEK293a exprimant transitoirement le récepteur B ₁ R-FLAG par les protéines de fusion ligand du récepteur B ₁	63
Figure 23. Caractérisation de la liaison de EGFP-S4P1 à différentes cibles moléculaires reliées au système kinine-kallikréine	65

ABRÉVIATIONS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme; Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADNdb	Acide déoxyribonucléique double brin
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Arg	Arginine
ARN _m	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
B ₁ R	Récepteur B ₁ de la bradykinine
B ₂ R	Récepteur B ₂ de la bradykinine
BK	Bradykinine
CherryFP	Cherry fluorescent protein
Ct	C-terminal
DAG	Diacylglycerol
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Foetal Bovine Serum; sérum de veau foetal
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanosine exchange factor
GFP	Green Fluorescent Protein; Protéine verte fluorescente
Gly	Glycine
GPCR	G-Protein Coupled Receptor; Récepteur couplé aux protéines G
GRK	G-Protein Coupled Receptor Kinase
GTP	Guanosine triphosphate
HAE	Hereditary Angioedema; Angioedème héréditaire
HEK293a	Homo Sapiens Embryonic Kidney cells 293a
HMWK	High Molecular Weight Kininogen; Kininogène de haut poids moléculaire
HSA	Human Serum Albumine; Albumine sérique humaine
Hyp	Hydroxyproline
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
Igl	Indanylglycine
IL-1 β	Interleukine-1 β
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
KKS	Kinin-Kallikrein System; Système kinine-kallikréine
LMWK	Low Molecular Weight Kininogen; Kininogène de bas poids moléculaire
Lys-BK	Kallidine
MC	Milieu conditionné
MCC	Milieu conditionné concentré
MK	Maximakinine
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NG	Asparagine-Glycine
NO	Oxyde Nitrique
NOs	NO synthase

Nt	N-terminal
Oic	Octahydroindole-2-carboxylic acid
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Polyethylimine
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
Phe	Phénylalanine
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PK	Plasma Kallikrein; Kallikréine plasmatique
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
Pro	Proline
PTH	Parathormone
PTH(1-34)	Tériparatide
PTH ₁ R	Récepteur de la parathormone 1
PTHrP	Parathormone related Peptide
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B</i>
Ser	Sérine
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Thi	β-(2-Thienyl)-alanine
Tic	Tetrahydro-isoquinoline-3-carboxylic acid
TIP39	<i>Tuberoinfundibular peptide of 39 residues</i>
TK	Tissue Kallikrein; Kallikréine tissulaire
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
μCi	microcurie

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr François Marceau, de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes études graduées dans son laboratoire. Je le remercie aussi pour ses conseils et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais aussi remercier les membres de l'équipe du Dr Marceau avec qui j'ai eu un grand plaisir à travailler jour après jour. Tout d'abord, un énorme merci à Mme Johanne Bouthillier pour sa patience, son sens de l'organisation et son altruisme. Je n'aurais jamais accompli la moitié de ce que j'ai accompli sans son aide et ses conseils. Je voudrais aussi remercier les autres étudiants qui ont travaillé sur mon projet mais avec qui je n'ai pas eu la chance de collaborer directement. Tout d'abord, la Dr Marie-Thérèse Bawolak pour sa contribution sur le projet portant sur la protéine de fusion agoniste du récepteur B₂ de la bradykinine. Ensuite, le Dr Jean-Phillipe Fortin pour sa collaboration sur le projet portant sur la protéine de fusion agoniste du récepteur PTH₁R de la parathormone.

Je veux aussi remercier les Dr Guillaume Morissette et Louis Flamand pour m'avoir introduit au monde de la biologie moléculaire.

Je remercie aussi le Dr Robert Lodge pour tous les vecteurs qu'il nous a donné et qui se sont révélés très utiles.

INTRODUCTION

1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Chez l'homme, près de 865 gènes correspondent à des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Il s'agit de la plus grande famille de récepteurs transmembranaires chez l'humain, représentant 3,4% du génome codant pour des protéines. L'étude de ces récepteurs est de la plus haute importance car plus de 30% des médicaments sur le marché agissent via ceux-ci (Hopkins et Groom, 2002). En effet, le prix Nobel de chimie 2012 fut attribué à Lefkowitz et Kobilka pour leurs travaux sur la compréhension des fonctions des GPCR. En plus de cela, 7 autres prix Nobel ont été attribués pour des travaux impliquant ces récepteurs. Les GPCR sont impliqués dans la réception et l'analyse de stimuli extracellulaires. Ces récepteurs sont impliqués dans des processus aussi divers que la neurotransmission, le métabolisme cellulaire, la différenciation cellulaire la sécrétion et la réponse inflammatoire (Hebert et Bouvier, 1998). La diversité de ces stimuli activant les GPCR est étonnante. Ceux-ci peuvent être des hormones, des ions, des neurotransmetteurs et même des odeurs et de la lumière. L'activation d'un GPCR entraîne une réponse intracellulaire via une protéine G hétérotrimérique permettant l'adaptation de la cellule à son environnement. Des dérèglements dans la signalisation ou l'expression de ces récepteurs sont en causes dans de nombreuses maladies.

1.1 Historique

La découverte de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP_c) et de l'adénylate cyclase par Sutherland marque le début des recherches sur les GPCR (Robinson et coll., 1967). Ces travaux ont démontrés que la lipolyse causée par les catécholamines était due à l'action de l'AMP_c généré par l'adénylate cyclase. Plus tard, grâce à la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), on a découvert que c'était la guanosine triphosphate (GTP) qui avait un rôle crucial à jouer dans le processus d'activation des récepteurs. Cette découverte fut suivie par la

proposition qu'un intermédiaire reliait des récepteurs de natures diverses à un effecteur commun, l'adénylate cyclase. Cela entraîna l'identification de la protéine G hétérotrimérique G_s (Birnbaumer et Rodbell, 1969; Rodbell et coll., 1971; Ross et Gillman, 1977). L'hydrolyse de la GTP, donc de la présence d'une activité GTPase, fut décrite comme une étape importante de ce processus suite à une étude portant sur la production d'AMP_c par des érythrocytes aviaires stimulés par un agoniste (Cassel et Sellinger, 1976). L'activité GTPase de la protéine G hétérotrimérique fut associée à la capacité de cette dernière de lier l'activation du récepteur à l'activation ou l'inhibition de cibles cellulaires (enzymes, canaux ioniques) en réponse à des agents extracellulaires tels des hormones, des peptides, des ions ou des lipides (Northup et coll., 1980; Codina et coll., 1983; Bokoch et coll., 1984). Des études extensives sur les mécanismes moléculaires portant entre autres sur la liaison au récepteur ainsi que sur l'activation et l'expression de ceux-ci ont permis d'augmenter considérablement notre connaissance sur ces protéines au cours de 15-20 dernières années.

1.2 Les protéines G

Les protéines G sont des hétérotrimères formés des sous-unités alpha (α), bêta (β) et gamma (γ). Au repos, cette protéine existe sous la forme hétérotrimérique ($G_{\alpha\beta\gamma}$) et est liée à la surface intracellulaire du récepteur. De plus, au repos, G_α est lié à une molécule de guanosine diphosphate (GDP). L'activation du récepteur par un agoniste entraîne un changement conformationnel permettant au récepteur de s'associer de manière plus efficace à la protéine G et ainsi d'agir comme un *GEF* (*Guanine Exchange Factor*). Cela permet à G_α de remplacer son GDP par un GTP, ayant comme effet de l'activer. G_α va se dissocier de $G_{\beta\gamma}$ pour aller activer ou inhiber différentes protéines cibles, ou seconds messagers. Les seconds messagers sont soit des enzymes ou des canaux ioniques. Après un temps, l'activité GTPase intrinsèque de G_α va hydrolyser le GTP en GDP, inactivant du coup G_α qui va reformer un hétérotrimère avec $G_{\beta\gamma}$.

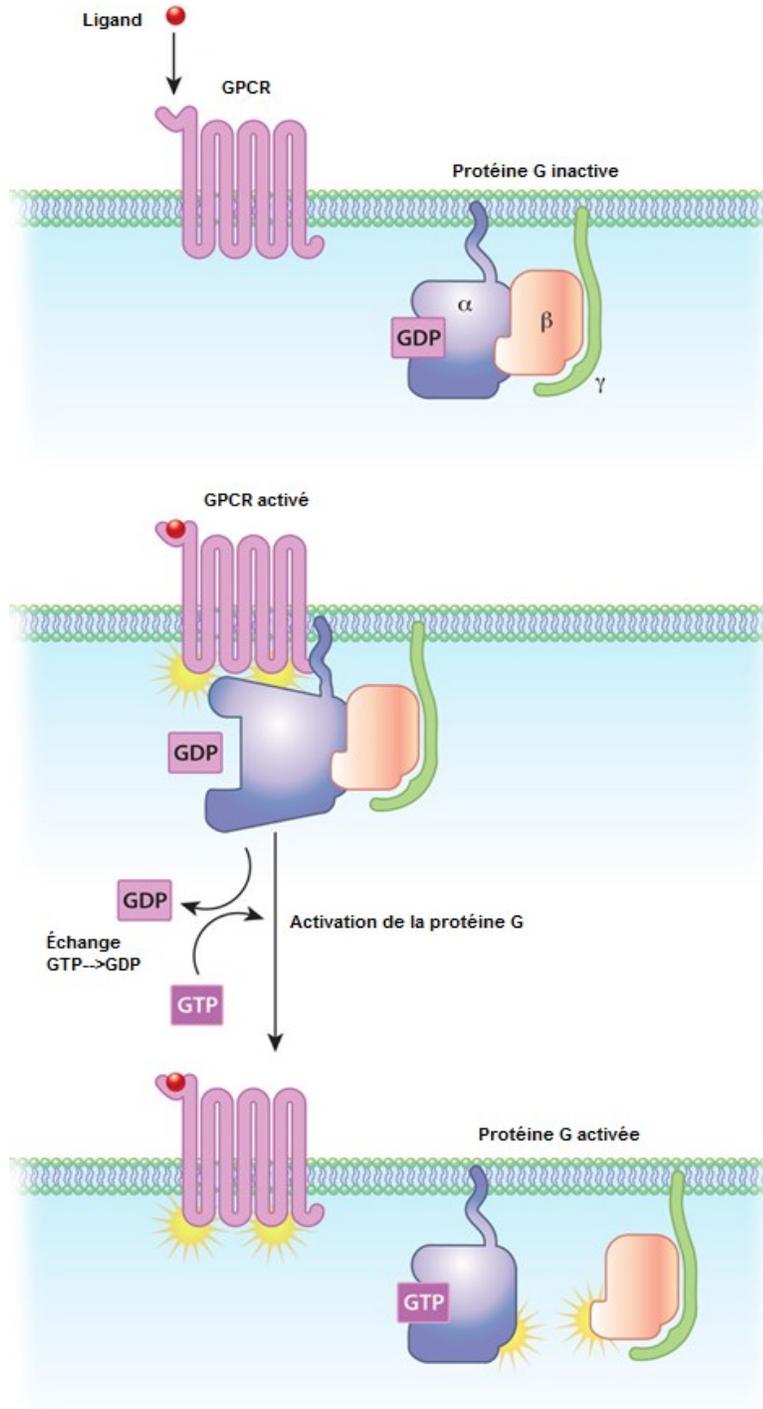


Figure 1. Récepteurs couplés aux protéines G et protéines G hétérotrimériques. Adapté de Nature Education.

Bien que les effets intracellulaires des GPCR soient généralement attribués à G_{α} , le complexe $G_{\beta\gamma}$ peut lui aussi stimuler de nombreux seconds messagers. Il existe 35 gènes codant pour les protéines G hétérotrimériques dont 16 pour les sous-unités G_{α} , 5 pour les sous-unités G_{β} et 14 pour les sous-unités G_{γ} (Milligan et Koustenis, 2006). En prenant en compte l'isolement alternatif, il existe au moins 20 différentes sous-unités G_{α} , séparé en 4 familles : G_i , G_s , G_q et $G_{12/13}$. La famille G_i est généralement associée à l'inhibition de l'adénylate cyclase ou à l'activation de phosphodiésterases, enzymes responsables de la dégradation de l'AMP_c. La famille G_s est associée à l'activation de l'adénylate cyclase alors que la famille G_q est activatrice de la phospholipase C (PLC). La famille $G_{12/13}$ active diverses cibles notamment les GTPase de la famille rho. Certaines sous-unités G_{α} sont ubiquitaires (ex : $G_{\alpha s}$) alors que d'autres ne s'expriment que dans des tissus particuliers (ex : $G_{\alpha 15/16}$ dans les cellules hématopoïétiques). Il existe donc une multitude d'hétérotrimères possibles formés de l'une ou l'autre forme des sous-unités G_{α} , G_{β} et G_{γ} . Cela permet de générer une abondance de réponses suite à l'activation des GPCR (Milligan et Koustenis, 2006).

1.3 Structure des GPCR

Les récepteurs couplés aux protéines G sont aussi connus sous le nom de récepteurs à sept domaines transmembranaires. Comme leur nom le laisse entendre, ce sont des protéines dont la chaîne peptidique traverse la membrane à sept reprises. Les domaines transmembranaires sont des hélices α reliés entre elles par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires (Bockaert, 2012). La surface extracellulaire du récepteur est impliquée dans la reconnaissance et la liaison du ligand, alors que l'extrémité intracellulaire est surtout impliquée dans l'interaction et l'activation de la protéine G. Les récepteurs subissent de nombreuses modifications post-translationnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation ou la palmitoylation. Par exemple, la queue C-terminale est souvent palmitoylée, ce qui lui permet de s'ancrer dans la membrane plasmique (Goddard et Watts, 2012).

1.4 Familles de GPCR

Vu le grand nombre de GPCR, il a été nécessaire de les séparer en familles afin de mieux pouvoir les caractériser. Un système de classification basé sur l'homologie entre les différents GPCR fut proposé par Kolakowski (Kolakowski, 1994). Dans ce système, les récepteurs sont distribués dans 7 groupes soit les groupes A, B, C, D, E, F et O.

1.4.1 GPCR de classe A

Ce sont les récepteurs de la famille de la rhodopsine et il s'agit de la plus grande famille de récepteurs comprenant environ 80% de l'ensemble des GPCR connus. Les récepteurs de classe A lient majoritairement des peptides, des amines biogènes ou des lipides. Même si les ligands des récepteurs de cette famille sont très divers, il y a une forte homologie de séquence entre les récepteurs membres de cette famille (Fridmanis et coll., 2006).

1.4.2 GPCR de classe B

Les récepteurs de classe B lient des peptides de grandes tailles comme la sécrétine ou la parathormone. Contrairement aux ligands des récepteurs de classe A, il y a beaucoup d'homologie entre les divers ligands de cette famille (Cardoso et coll., 2006). Ces récepteurs sont organisés en deux domaines : un domaine extracellulaire impliqué dans l'affinité et la spécificité de la liaison du ligand et un domaine transmembranaire requis pour l'activation du récepteur. L'extrémité C-terminale du ligand va d'abord interagir avec le domaine extracellulaire du récepteur ce qui va ensuite permettre à l'extrémité N-terminale du ligand d'interagir avec le domaine transmembranaire pour activer le récepteur (Pal et coll., 2011).

1.4.3 GPCR de classe C, D, E, F et O

Les récepteurs de classe C ou récepteurs de la famille des récepteurs métabotropiques du glutamate se distinguent par un massif domaine extracellulaire

hydrophile contenant de nombreuses cystéines. Dans cette famille on retrouve principalement les récepteurs métabotropiques du glutamate mais aussi certains récepteurs du goût ou du neurotransmetteur GABA (Das et Banker, 2006). Les récepteurs de classe D sont des récepteurs répondant aux phéromones et sont utilisés par certains organismes pour communiquer chimiquement entre eux (Nakagawa et coll., 2005). Les récepteurs de classe E, aussi appelés récepteurs de l'AMP_c, sont des constituants de la signalisation chimiotactique des myxomycètes (Prabhu et Eichinger, 2006). La classe F des GPCR correspond aux récepteurs *Frizzled* et *Smoothed*, deux récepteurs nécessaires à la liaison de *Wnt* en plus de jouer un rôle majeur dans la voie de signalisation *Hedgehog* (Foord et coll., 2002). Les récepteurs de classe O sont des récepteurs orphelins; c'est-à-dire que l'on ne connaît pas leur ligand endogène. Il est possible que plusieurs de ces récepteurs aient des propriétés ligand-indépendantes (Gloriam et coll., 2005).

1.5 Désensibilisation des GPCR

Une propriété importante des GPCR est que leur expression n'est pas constante et que les systèmes qui les expriment possèdent une mémoire des activations antérieures. Cela signifie qu'une forte activation d'un récepteur conduira à une diminution de la capacité de celui-ci à être stimulé dans le futur; c'est la désensibilisation. Il s'agit d'une propriété régulatrice importante qui prévient la sur-stimulation d'un système. On distingue deux phénomènes : la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue.

1.5.1 Désensibilisation homologue

Ce phénomène se produit lorsqu'un GPCR est stimulé par son agoniste. Ce processus est pris en charge par deux familles de protéines soit les *GRKs* (*G-protein coupled Receptor Kinases*) et les arrestines. Lorsqu'un récepteur est stimulé, il s'ensuit un changement de conformation qui permet à la sous-unité G_α d'activer diverses voies de signalisation. Ce changement de conformation expose des sites de phosphorylation auparavant inaccessibles qui pourront être phosphorylés par les kinases GRKs. Ensuite, les arrestines peuvent se lier aux

récepteurs phosphorylés empêchant temporairement leur association avec d'autres protéines G (Krupnic et Benovic, 1998). La désensibilisation est un processus rapide et réversible. Toutefois, si la stimulation est puissante ou persistante, le récepteur sera «down-régulé». La «down-régulation» des récepteurs est un processus plus lent que la désensibilisation. Les arrestines seront d'abord déphosphorylées puis ubiquitinylées par la E3 ubiquitin ligase MDM2 ce qui marque les récepteurs pour l'endocytose. Les récepteurs pénétreront dans des puits revêtus de clathrine via une interaction entre les arrestines et AP₂, une protéine adaptatrice. Tout le complexe est ensuite internalisé grâce à l'activité de la dynamine, une GTPase cytoplasmique (Kelly et coll., 2008). L'environnement acide de l'endosome permet la séparation du ligand et du récepteur. Le récepteur peut soit être dégradé via une fusion de l'endosome avec un lysosome ou recyclé à la membrane plasmique.

Une forte proportion des GPCR emprunte la voie des arrestines mais il existe d'autres possibilités. Une voie alternative de l'endocytose des GPCR nécessite l'association de ces derniers avec les cavéoles dans un phénomène indépendant des arrestines (Anderson, 1998).

1.5.2 Désensibilisation hétérologue

La désensibilisation hétérologue est, contrairement à la désensibilisation homologue, un processus indépendant du ligand. La désensibilisation hétérologue se produit lorsque la stimulation d'un récepteur prévient la stimulation subséquente d'un autre récepteur (Kelly et coll., 2008). Ce processus implique des changements au niveau des composantes de la signalisation en aval du GPCR. En effet, ce type de désensibilisation fait intervenir les protéines kinases A et C (Lohse et coll., 1990; Zhang et coll., 1996).

2. Les récepteurs de la bradykinine

2.1 Le système kinine-kallikréine

Le système kinine-kallikréine (KKS) est un important système impliquant de nombreuses protéines sanguines et endothéliales, qui une fois activées cause l'hydrolyse enzymatique des kininogènes et l'activation de la voie intrinsèque de coagulation (Kashuba et coll., 2013). Ce système joue un rôle clé dans l'inflammation, la vasodilatation, la contraction du muscle lisse, la perméabilité vasculaire, le contrôle de la pression sanguine, la cardioprotection, la coagulation et dans la perception de la douleur (Bossi et coll., 2011; Colman, 2006; Colman et Schmaier, 1997; Marcondes et Antunes, 2005).

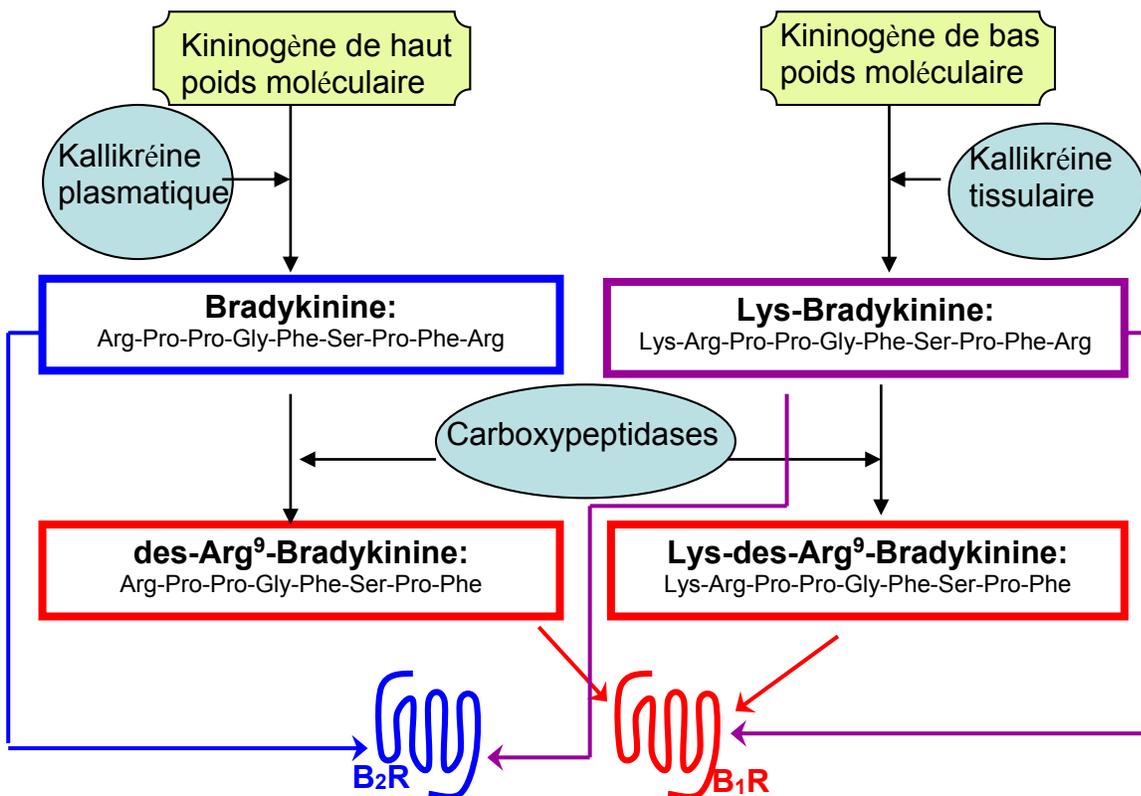


Figure 2. Le système kinine-kallikréine.

2.1.1 Les kininogènes

Chez l'homme, on retrouve deux formes du kininogène, soit le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK) ou le kininogène de bas poids moléculaire (LMWK). Ces deux protéines plasmatiques proviennent de l'épissage alternatif d'un unique gène et sont principalement produites dans le foie (Campbell, 2003).

Le kininogène de haut poids moléculaire est une protéine de 120 kDa appartenant à la famille des β -globuline exprimée à une concentration plasmatique moyenne de 80 mg/ml (Sainz et coll., 2007). Elle est composée de 626 acides aminés et est divisée en 6 domaines. Les domaines D1-D3 correspondent à des chaînes lourdes, le D4 contient la séquence de la bradykinine (BK), le D5 est une chaîne légère et le D6 contient un domaine d'interaction avec le facteur XII et la pré-kallikréine (Colman, 2006; Moreau et coll., 2005a). Le kininogène de bas poids moléculaire ressemble à peu de chose près au HMWK. En fait, elle contient les 4 premiers domaines du HMWK. Toutefois, elle exprime une chaîne légère tronquée et n'exprime pas le domaine D6 (Colman, 1996). Les kininogènes, ont comme rôle principal de servir de précurseur à la génération de kinines. Plusieurs études ont toutefois démontrées que ces protéines sont impliquées dans divers processus tels que l'inhibition enzymatique, la coagulation, l'angiogénèse et l'apoptose (Colman, 2006; Hasan et coll., 1996; Colman et coll., 2010)

2.1.2 Les kallikréines

Les enzymes productrices de kinines sont des sérines protéases nommées kallikréines. On en trouve deux formes; soit la kallikréine plasmatique (PK) et la kallikréine tissulaire (TK). La kallikréine plasmatique est une protéine plasmatique sécrétée par le foie sous la forme inactive pré-kallikréine. Une fois activée, généralement par le système de contact, elle hydrolyse le HMWK pour générer la bradykinine. La BK est un nonapeptide composé des acides aminés suivants : $\text{NH}_2\text{-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH}$. La kallikréine plasmatique est aussi impliquée dans la coagulation via l'activation du facteur XII (Colman, 2006). La kallikréine tissulaire est une protéase présente dans de nombreux tissus comme les reins, les vaisseaux sanguins, le système nerveux central, la rate,

l'intestin, le pancréas et les glandes salivaires (MacDonald et coll., 1988; Marcondes et Antunes, 2005). Son rôle physiologique principal est la génération de Lys-BK, aussi appelée kallidine, en hydrolysant le LMWK.

2.1.3 Les kinines

Chez l'homme on retrouve 4 peptides apparentés à la BK : la BK, la Lys-BK, la des-Arg⁹BK et la Lys-des-Arg⁹BK. Les deux premiers peptides correspondent aux produits de l'hydrolyse des kininogènes par l'une ou l'autre des kallikréines alors que la des-Arg⁹BK et la Lys-des-Arg⁹BK sont des métabolites de ceux-ci produits par l'action d'enzymes nommées arginine carboxypeptidases. Ces peptides possèdent des affinités différentes pour l'un ou l'autre des récepteurs de la bradykinine. Ce sont des peptides extrêmement fragiles, en effet ils ont une très courte demi-vie plasmatique; moins de trente secondes pour la BK (Décarie et coll., 1996). Toutefois, il s'agit de peptides très efficaces car des concentrations nanomolaires suffisent pour produire un effet biologique (Moreau et coll., 2005b).

Ces hormones partagent un même modèle d'interaction ligand-récepteur, indépendamment de leur récepteur-cible. Il a été prédit que c'est l'extrémité C-terminale du ligand qui interagit avec les domaines transmembranaires alors que l'extrémité N-terminale interagit avec une boucle extracellulaire (Leeb-Lundberg et coll., 2005).

2.2 Le récepteur B₁ de la bradykinine

Le récepteur B₁ de la bradykinine (B₁R) fut caractérisé pharmacologiquement vers la fin des années 70 par le groupe du Dr Regoli (Regoli et Barabé, 1980). Il s'agit d'un récepteur couplé aux protéines G formé de 353 acides aminés. L'homologie de séquence entre les récepteurs B₁ et B₂ de la BK est très faible; seulement de 36% (Menke et coll., 1994). En effet, ce sont deux récepteurs ayant des propriétés très distinctes qui seront abordées plus tard dans ce texte. Ce récepteur est encodé par le gène BDKRB1 présent sur le chromosome 14q32 (Leeb-Lundberg et coll., 2005).

2.2.1 Ligands du récepteur B₁R

L'affinité des différentes kinines pour le récepteur B₁ est présentée dans le tableau 1. Pour le récepteur humain, les agonistes préférentiels sont la Lys-des-Arg⁹BK et la Lys-BK. La présence d'une lysine en position C-terminale du peptide est donc très importante pour l'affinité de celui-ci pour le B₁R. De plus, l'absence de l'arginine N-terminale augmente l'affinité des peptides métabolisés par les carboxypeptidases de plus de 10 fois comparativement aux peptides possédant cet acide aminé. L'affinité des différentes kinines semble varier de manière importante en fonction de l'espèce. Il faut toutefois faire attention à l'interprétation de ces résultats, car ces données proviennent de différents laboratoires et les conditions expérimentales peuvent varier entre les expériences. De nombreux agonistes et antagonistes ont été développés pour ce récepteur. Des milliers de ligands peptidiques ont été synthétisés et évalués pharmacologiquement. Parmi ceux-ci notons l'antagoniste Lys-des-Arg⁹[Leu⁸]BK. Il s'agit de la Lys-des-Arg⁹BK dans laquelle la phénylalanine en position 8 a été remplacée par une leucine. L'affinité de cet antagoniste pour le récepteur B₁ humain a été évaluée à 0,6 nM et à plus de 30 000 nM pour le récepteur B₂ (Bastian et coll., 1997). Il s'agit donc d'un antagoniste très spécifique. Par la suite de nombreux ligands non-peptidiques ont vu le jour tel que le B-9858 (Lys-Lys-[Hyp³, Igl⁵, D-Igl⁷, Oic⁸] BK). Ce peptide possède une affinité de 0,04 nM pour le récepteur B₁ et son affinité pour le récepteur B₂ est plus de 250 fois plus faible (MacNeil et coll., 1997). Tous les agonistes et antagonistes d'affinité subnanomolaire du récepteur B₁ possèdent une lysine N-terminale et ne possèdent pas l'arginine C-terminale de la BK ou de la Lys-BK.

2.2.2 Régulation du B₁R

Le récepteur B₁ est un récepteur inductible; c'est-à-dire qu'il est pratiquement absent en condition physiologique. L'induction du B₁R est induite par l'exposition aux lipopolysaccharides (LPS) et par la présence de dommages tissulaires. La régulation transcriptionnelle de ce récepteur est sous le contrôle du facteur de transcription *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) et est influencée par diverses

cytokines telles que l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'interféron γ ou le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) (Schanstra et coll., 1998; Medeiros et coll., 2004; Leeb-Lundberg et coll., 2005; Bawolak et coll., 2007; Koumbadinga et coll., 2010).

Tableau 1 : Affinité des kinines pour le récepteur B₁ de la BK¹

Ligands	Affinité (nM)		
	B ₁ R humain	B ₁ R souris	B ₁ R lapin
Bradykinine	>10 000	200	>5000
Lys-BK	2,54	510	19
des-Arg⁹BK	1930	0,7	32
Lys-des-Arg⁹BK	0,12	1,7	0,23

Son induction compense pour la désensibilisation rapide du récepteur B₂ de la bradykinine (Bhoola et coll., 2001). Le B₁R, dont l'expression est finement régulée, n'est pas désensibilisé suite à sa stimulation par un agoniste. En effet, il n'est pas phosphorylé par les GRKs et ne recrute pas les arrestines. Puisqu'il ne recrute pas les arrestines, il n'est donc pas internalisé, mais il serait redistribué au niveau des radeaux lipidiques lors de son activation (Sabourin et coll., 2002) suivant en cela la distribution de G α_q . Bien qu'il ne soit pas désensibilisé par un mécanisme ligand dépendant, le B₁R est rapidement dégradé et éliminé de la membrane ce qui suggère un mécanisme de désensibilisation ligand indépendant (Fortin et coll., 2003). Certaines données suggèrent que le récepteur B₁ possède une activité constitutive; c'est-à-dire qu'il peut signaler en l'absence de son agoniste. L'activité constitutive du récepteur B₁ exprimé dans des cellules HEK293a est plus forte que l'activité du B₂R induite par un agoniste (Leeb-Lundberg, et coll., 2001). Toutefois, l'activité constitutive de récepteur n'a pas été confirmée dans un système physiologique, car il n'existe aucun agoniste inverse du B₁R. L'absence d'une boucle de régulation négative, que l'on retrouve dans la quatrième boucle intracellulaire du récepteur B₂, expliquerait cette activité (Leeb-Lundberg et coll., 2001).

¹ Leeb-Lundberg et coll., 2005

2.2.3 Signalisation par le récepteur B₁

Le B₁R, de par sa nature de GPCR, est couplé avec des protéines G. Ses effecteurs principaux sont les protéines G_{αq} et G_{αi} (Austin et coll., 1997). Le principal second messager activé par ces protéines G est la phospholipase C. Celle-ci une fois activée va hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycerol (DAG). L'IP₃ va lier le récepteur de l'IP₃ et cela va entraîner une augmentation de la concentration de calcium dans le cytosol, entraînant l'activation d'un vaste éventail de protéines comme la calmoduline. Le DAG de son côté est impliqué dans l'activation de la protéine kinase C (Mignery et Südhof, 1990). La stimulation du récepteur B₁ entraîne la production d'oxyde nitrique (NO; un puissant vasodilatateur) via l'activation des *Nitrogen Oxyde Synthase* (NOS) ainsi que la sécrétion de prostacyclines (PGI₂; vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire) via l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Higashida et coll., 1986; Burch et Axelrod, 1987; Palmer et coll., 1987)

2.2.4 Localisation du récepteur B₁

Étant donné son caractère inductible, on ne retrouve pas le B₁R dans les tissus en condition physiologique. Toutefois, il est possible de le retrouver dans certaines conditions physiopathologiques au niveau de l'endothélium vasculaire, du muscle lisse vasculaire, des fibroblastes, des macrophages, des neurones sympathiques et des terminaisons nociceptives primaires (Chen et coll., 2007). Le récepteur B₁ pourrait avoir des applications comme biomarqueur, comme c'est le cas du récepteur de la dopamine D₃, dont l'ARNm est régulé à la hausse chez les patients schizophréniques au niveau des leucocytes. En effet, le B₁R a été détecté à la surface de cellules sanguines périphériques mononucléaires chez des patients atteints de sclérose en plaque (Prat et coll., 2005), laissant croire que ce récepteur pourrait être utile comme biomarqueur représentatif des états inflammatoires.

2.3 Le récepteur B₂ de la bradykinine

L'existence du récepteur B₂ de la bradykinine (B₂R) fut postulé, vers la fin des années 70, par le groupe du Dr Regoli (Regoli et Barabé, 1980). Toutefois, ce n'est qu'en 1985 que ce récepteur a pu être caractérisé suite à la synthèse des premiers antagonistes de ce récepteur (Vavrek et Stewart, 1985). Il s'agit d'un récepteur couplé aux protéines G formé d'une chaîne polypeptidique de 391 acides aminés. Ce récepteur est encodé par le gène BDKRB2 présent sur le chromosome 14q32, le même locus encodant pour le récepteur B₁ (Leeb-Lundberg et coll., 2005).

2.3.1 Ligands du récepteur B₂

Le récepteur B₂ possède un profil pharmacologique différent de celui du récepteur B₁. Le Tableau 2 nous permet de tirer les conclusions suivantes en ce qui regarde l'affinité des kinines pour ce récepteur : BK=Lys-BK>>>des-Arg⁹BK=Lys-des-Arg⁹BK. Les agonistes optimaux du B₂R sont la Lys-BK et la BK ce qui permet de conclure que la présence de l'arginine C-terminal est d'une importance cruciale pour l'affinité des kinines pour ce récepteur.

Tableau 2 : Affinité des kinines pour le récepteur B₂ de la BK²

Ligands	Affinité (nM)		
	B ₂ R humain	B ₂ R souris	B ₂ R lapin
Bradykinine	0,54	0,48	4,5
Lys-BK	0,63	0,52	2
des-Arg⁹BK	8100	6400	>1000
Lys-des-Arg⁹BK	>30000	25000	>1000

Tout comme pour le récepteur B₁, une panoplie d'agonistes et d'antagonistes peptidiques ou non-peptidiques ont été synthétisés. Parmi ceux-ci, on retrouve l'icatibant (HOE 140; D-Arg-[Hyp³,Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]BK), un peptide antagoniste du récepteur B₂. Celui-ci a récemment été l'objet d'études cliniques qui ont

² Leeb-Lundberg et coll., 2005

démontrées son efficacité dans la prévention et la gestion des crises d'angioœdème héréditaire (HAE) (Malbrán et coll., 2014). L'icatibant est un antagoniste spécifique du récepteur B₂ avec une affinité 1000 fois supérieure pour celui-ci que pour le B₁R (Hess et coll., 1994). La forme des-Arg de l'icatibant (des-Arg⁹HOE 140) est un antagoniste mixte des récepteurs B₁ et B₂ (Bastian et coll., 1997). De nombreux agonistes et antagonistes non-peptidiques ont été développés tel l'anatibant (LF-16-0687; 1-[[2,4-dichloro-3-[(2,4-diméthylquinolin-8-yl)oxy]méthyl]phényl]-sulfonyl] - N-[3-[[4-(aminoimino-méthyl)-phényl]carbonylamino]propyl]-2(S)-pyrrolidine-carboxamide, mesylate salt), un antagoniste spécifique du récepteur B₂ (Pruneau et coll., 1999).

2.3.2 Régulation du récepteur B₂

Contrairement au récepteur B₁, l'expression du B₂R est constitutive; c'est-à-dire qu'il est exprimé en tout temps au niveau de la membrane plasmique. Son expression est nettement moins régulée que celle du B₁R. Toutefois, l'expression du B₂R peut être amplifiée par une stimulation avec un agoniste, ou par l'action des phorbol esters (Pesquero et coll., 1994). Par contre, le récepteur B₂ est rapidement désensibilisé par un processus ligand dépendant. Ce récepteur subit une rapide phosphorylation de sa queue C-terminale par les GRKs, mais aussi par d'autres kinases telle que la PKC (Blaukat et coll., 2001). Les sites de phosphorylation proposés sont les sérine 339, 346 et 348 et les tyrosines 342 et 345. La phosphorylation différentielle de l'un ou l'autre ou d'une combinaison de ces acides aminés entraîne possiblement différentes conséquences pour le récepteur (Leeb-Lundberg et coll., 2005). Le B₂R, après avoir recruté les arrestines sur sa queue C-terminale, va ensuite être endocytosé par un processus probablement clathrine dépendant (Enquist et coll., 2007) bien que l'on retrouve certaines données suggérant que ce ne soit pas le cas (de Weerd et Leeb-Lundberg, 1997; Haasemann et coll., 1998). La désensibilisation du B₂R passe par un cycle d'endocytose et de recyclage bien documenté (Marceau et coll., 2002). Une fois internalisé, le récepteur B₂ voyagera sur les microtubules dans des endosomes positifs pour la GTPase Rab₅ vers un site périnucléaire. Les

récepteurs emprunteront ensuite les fibres d'actines dans des endosomes Rab₁₁ et/ou Rab₄ positifs afin d'être recyclés à la membrane où ils pourront être à nouveau stimulés (Charest-Morin et coll., 2013). Le récepteur B₂ possède une faible activité constitutive tel que démontré par l'effet des agonistes inverses NPC17731 et NPC 567 sur la production basale d'IP₃ chez des cellules myométriales de rat (Leeb-Lundberg et coll., 1994). Il a été proposé que le récepteur B₂ puisse être activé directement par la kallikérine plasmatique (Hecquet et coll., 2000), mais les données plus récentes semblent proposer une activation dépendante de la génération de BK et non de l'action directe de cette enzyme sur le B₂R (Charest-Morin et coll., 2015).

2.3.3 Signalisation par le B₂R

Le récepteur B₂ permet la transduction de signal via le recrutement et l'activation de protéines G hétérotrimériques. Il interagit notamment avec les protéines G_{αq}, G_{αi}, G_{αs} et G_{α12/13} (Gutowski et coll., 1991; Ewald et coll., 1989; Liebmann et coll., 1996; Gohla et coll., 1999). Les voies de signalisation empruntées ressemblent beaucoup à celles utilisées par le B₁R. En effet, suite à la stimulation du récepteur B₂, la PLC, la PLA₂ et l'eNOS sont activées (Leeb-Lundberg et coll., 2005). La principale différence entre la signalisation du B₁R et du B₂R réside dans la durée et dans l'intensité de celle-ci. La signalisation du B₁R est nettement plus durable et intense que celle du B₂R (Mathis et coll., 1996; Faussner et coll., 1998). Toutefois, étant donné le caractère inductible du B₁R et l'expression constitutive du B₂R, la majorité des effets des kinines en situation physiologique dépend du récepteur B₂.

2.3.4 Localisation du récepteur B₂

Le récepteur B₂ a la propriété d'être exprimé de manière ubiquitaire; c'est-à-dire que l'on peut le retrouver dans la vaste majorité des tissus et types cellulaires. En effet, celui-ci a été détecté dans les cellules vasculaires tant de l'endothélium que du muscle lisse ainsi qu'au niveau des fibroblastes, des cellules épithéliales et des cellules nerveuses sensorielles afférentes (Ricupero, et coll., 2000; Bhoola et coll., 1997; Wu et coll., 2002). En effet, l'ARN_m du B₂R a été détecté dans 36 des 39

tissus testés par Ma (Ma et coll., 1994). La rate, les glandes salivaires et la veine mésentérique sont les seuls tissus qui n'exprimaient pas l'ARN_m du B₂R.

3. Le récepteur de la parathormone 1 (PTH₁R)

3.1 La parathormone (PTH)

La parathormone ou hormone parathyroïde est une hormone peptidique formée de 84 acides aminés. Toutefois, celle-ci est synthétisée sous la forme d'une protéine précurseur. Elle contient en effet une préséquence de 25 acides aminés et une pro séquence de 6 acides aminés, qui sont toutes les deux hydrolysées lors des processus de synthèse et de sécrétion. La PTH est le principal régulateur de l'homéostasie calcique chez l'homme. Cette hormone est sécrétée par la parathyroïde, une glande endocrine située à proximité de la glande thyroïde, soit au niveau du cou. La parathormone a été décrite pour la première fois par Collip en 1925 (Collip, 1925) et celle-ci fut purifiée et isolée pour la première fois en 1959 (Rasmussen et Craig, 1959).

3.1.1 Effets de la parathormone

La parathormone permet l'augmentation de la concentration sanguine de calcium en agissant sur les récepteurs de la parathormone à trois endroits dans le corps. La PTH agit d'abord au niveau des os où elle peut causer un relâchement rapide de calcium à partir de la matrice osseuse (Quinn et coll., 1998; Yasuda et coll., 1998). Toujours au niveau des os, la PTH peut aussi agir de manière plus lente en stimulant la résorption osseuse, ce qui a comme effet de libérer le calcium emprisonné dans les os. La résorption osseuse est le processus de destruction normal des os par les ostéoclastes, cellules indirectement stimulées par la PTH. On dit qu'elles sont indirectement stimulées, car elles ne possèdent pas de récepteur pour cette hormone. La PTH va donc stimuler les ostéoblastes à sécréter le *Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B Ligand* (RANKL), une cytokine qui stimule les précurseurs des ostéoclastes à se différencier en

ostéoclastes matures. Ceux-ci vont pouvoir libérer plus de calcium en augmentant la résorption osseuse. La parathormone agit aussi au niveau des reins en stimulant la réabsorption du calcium au niveau des tubules distaux et de la branche ascendante large de l'anse de Henlé.

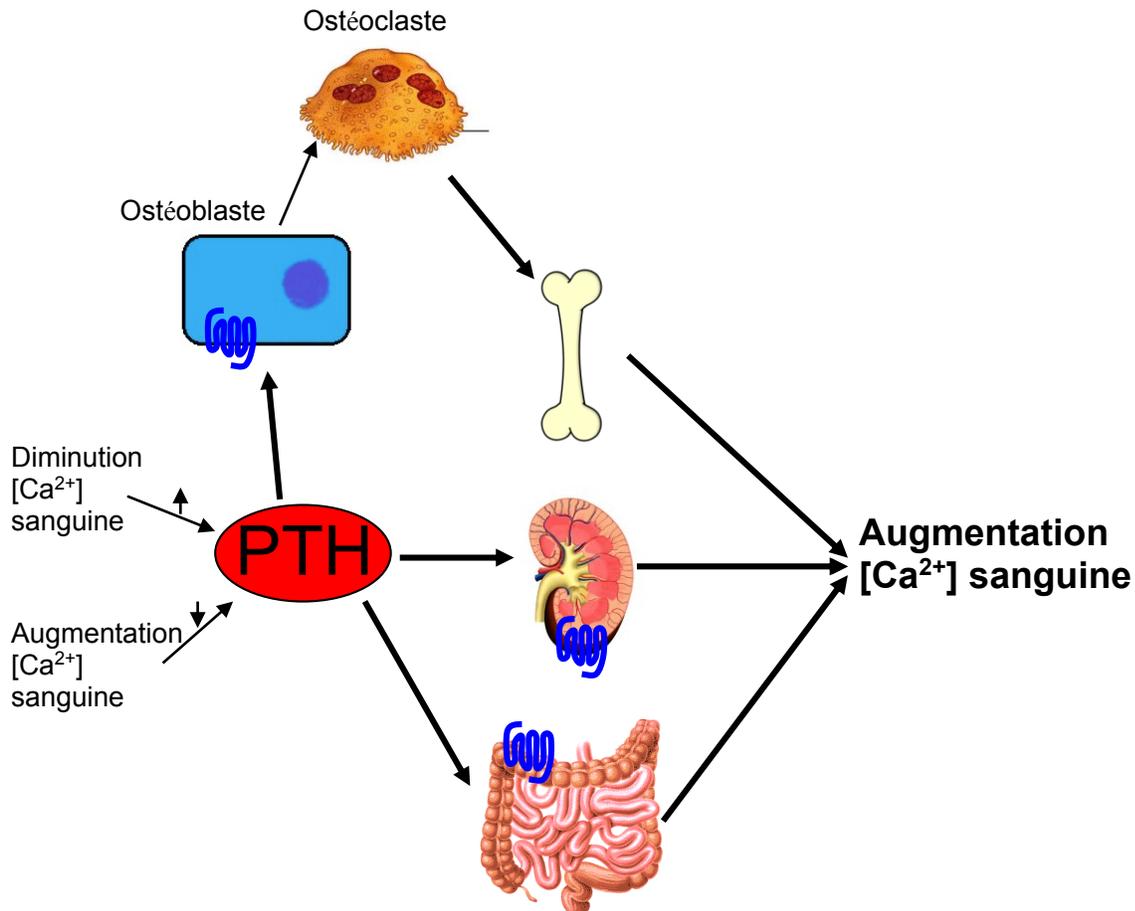


Figure 3. Les effets de la parathormone.

Finalement, cette hormone agit au niveau des intestins, endroit où elle agit en stimulant l'expression et l'activité de l'enzyme 1- α -hydroxylase. Il s'agit de l'enzyme responsable de l'activation de la vitamine D par l'hydroxylation de la 25-hydroxy-vitamine D en 1,25-hydroxy-vitamine D. La vitamine D activée va stimuler une meilleure absorption du calcium au niveau des intestins en induisant la production de calbindin, une famille de protéine liant le calcium.

L'hormone parathyroïde joue aussi un rôle secondaire dans l'homéostasie du phosphate sanguin en inhibant la réabsorption de cet ion au niveau des tubules contournés proximaux et distaux dans le rein. La PTH agit en diminuant l'expression du cotransporteur Npt2 (Cheng et coll., 1981; Bringhurst, 1989).

3.1.2 Régulation de la sécrétion de la PTH

La sécrétion de cette enzyme est contrôlée par une boucle de régulation négative dépendante des concentrations de calcium sériques. Lorsque la concentration de calcium est élevée, le Ca^{2+} extracellulaire stimule les récepteurs du calcium couplés aux protéines G (CaR). Cela va entraîner la mobilisation intracellulaire du calcium via la génération d' IP_3 (Nemeth et Scarpa, 1987). Les hautes concentrations de calcium cytosolique inhibent la sécrétion de la parathormone. Dans le cas où il y a une diminution de la concentration sanguine de Ca^{2+} , les CaR ne seront plus stimulés et la PTH pourra à nouveau être sécrétée. De très petites variations dans la concentration sanguine de calcium va immédiatement stimuler l'absorption (par la PTH) ou l'excrétion (via l'action de la calcitonine, hormone produite par les cellules parafolliculaires de la thyroïde) de Ca^{2+} . En effet, la concentration de calcium dans les conditions physiologique est sujette à peu de variation dans une journée et est maintenue dans une fourchette de 2.25 à 2.65 mM (Malette, 1989).

3.2 Le récepteur de la parathormone PTH_1R

PTH_1R est un récepteur couplé aux protéines G formé d'une seule chaîne peptidique de 593 acides aminés. C'est un GPCR de classe B cloné pour la première fois en 1994 (Schneider et coll., 1994). Comme tout les récepteurs de cette classe, PTH_1R possède un très vaste domaine N-terminal et C-terminal (Chorev, 2002). C'est une protéine encodée par le gène *PTH1R* présent dans chromosome 3. Il existe un second récepteur de la parathormone chez l'homme, le récepteur PTH_2R . Celui-ci possède une distribution et des ligands différents de ceux de PTH_1R . Il est particulièrement abondant dans le cerveau et n'est pas impliqué dans l'homéostasie calcique. En effet, les ligands de PTH_2R , dont le

Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39), agissent comme des neurotransmetteurs (Dobolyi et coll., 2010).

3.2.1 Les ligands du récepteur PTH₁R

Le récepteur PTH₁R possède deux ligands agonistes endogènes soit la parathormone ou le *parathormone related peptide* (PTHrP). PTHrP est surtout impliqué dans le développement embryonnaire des os et du cartilage (Strewler, 2000; Kronenber et coll., 2001). On retrouve trois formes de PTHrP chez l'homme soit PTHrP-139, PTHrP-141 et PTHrP-173. Ce sont les produits de l'épissage alternatif d'un seul gène et ils ne partagent que très peu d'homologie avec la parathormone (51% d'homologie). Toutefois, il y a une forte homologie dans les résidus formant le domaine d'activation du PTH₁R, 8 résidus sur les 13 le composant sont conservés (Usdin et coll., 1995). L'activité pharmacologique de ces deux peptides est conservée lorsque l'on stimule le PTH₁R avec les 34 premiers résidus de chacun (PTH(1-34) ou PTHrP(1-34)). L'activité pharmacologique classique de la parathormone lui est conférée par son extrémité C-terminale alors que l'extrémité N-terminale de l'hormone est très importante pour l'affinité de celle-ci pour le récepteur PTH₁R. La délétion des résidus 31 à 34 de la PTH(1-34) cause une perte d'affinité de 100 fois et la délétion des résidus 28 à 34 de la PTH(1-34) cause une perte d'affinité de plus de 5000 fois. La liaison de la parathormone à son récepteur est donc consistante avec le modèle de liaison « *two domain* » des GPCR de classe B. L'extrémité N-terminale de la PTH va d'abord interagir avec le domaine extracellulaire du PTH₁R ce qui va ensuite permettre à l'extrémité C-terminale de la PTH d'interagir avec le domaine transmembranaire pour activer le récepteur (Chorev, 2002). Des modifications post-translationnelles ou des clivages par des endopeptidases génèrent des fragments N-terminal de la PTH possédant des activités biologiques diverses (Segre et coll., 1981; Bringham et coll., 1988; Wu et coll., 1996). Ces fragments, tels que PTH(7-84), PTH(35-84) et PTH(69-84), stimuleraient le récepteur PTH₁R en se liant à un site différent de la PTH. En effet, la liaison de ces fragments n'est

pas compétitionnée par la PTH lors d'un essai de liaison avec radioligand (Nguyen-Yamamoto et coll., 2001).

Tableau 3 : Affinité de différents ligands du récepteur PTH₁R humain³

Ligands	Affinité pour le récepteur (nM)	
	PTH ₁ R humain	PTH ₂ R humain
Parathormone intacte (1-84)	2,8	1,7
PTHrP	0,59	660
PTH(1-34)	3	_____
PTH(1-30)	300	_____
PTH(1-27)	22000	_____
TIP39	59	0,59

Finalement, le peptide TIP39 est un antagoniste endogène du récepteur PTH₁R. C'est aussi un agoniste de haute affinité du récepteur PTH₂R (Voir Tableau 3).

3.2.2 Régulation du récepteur PTH₁R

L'expression rénale et osseuse de ce récepteur est augmentée chez les rats avec une carence en vitamine D et par les endotoxines, l'interleukine-2, la dexaméthasone, l'hormone thyroïdienne T₃ et le *Transforming Growth Factor beta* (TGF-β). L'expression de ce récepteur peut être diminuée par la PTH, la PTHrP, l'angiotensine II, la prostaglandine E₂, la vitamine D et par l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) (Ureña, 2003). Le récepteur PTH₁R est rapidement désensibilisé suite à sa stimulation par la PTH ou PTHrP. Celui-ci est phosphorylé sur sa queue C-terminale par les protéines kinases A et C en plus des GRKs (Blind et coll., 1995; Qian et coll., 1998). Selon certains groupes, l'internalisation du récepteur suite à sa stimulation serait indépendante de la phosphorylation (Malecz et coll., 1998) alors que pour d'autres il s'agit d'une étape cruciale pour l'endocytose (Tawfeek et coll., 2002). Une fois internalisé par un mécanisme clathrine

³ Hoare et Usdin, 2001

dépendant, le récepteur va progresser dans le système endosomal pour être soit recyclé à la surface ou dégradé dans les lysosomes (McDonald et coll., 2001).

3.2.3 Signalisation par le PTH₁R

Lorsque stimulé par la PTH ou la PTH(1-34), le PTH₁R interagit avec les protéines G_{αs} et G_{αq}. La protéine G_{αs} va stimuler la production d'AMP_c via l'activation de l'adénylate cyclase (Schwindinger et coll., 1998). PTH₁R peut aussi activer G_{αq} qui induit une augmentation du calcium intracellulaire via l'action de la PLC et de l'IP₃ (Schneider et coll., 1994). Fait intéressant, différents agonistes recrute différentes protéines G ou dans certains cas, favoriser une signalisation arrestine dépendante. Par exemple, PTH(7-34) génère une réponse arrestine dépendante qui inhibe la production d'AMP_c, réponse cellulaire contraire à celle engendrée par PTH(1-34) (van der Lee et coll., 2013).

3.2.4 Localisation du récepteur PTH₁R

Le récepteur PTH₁R est distribué dans presque tout les tissus mais principalement au niveau des os (ostéoblastes), des reins et du foie (Urena et coll., 1993; Tian et coll., 1993). La vaste distribution de ce récepteur expliquerait les effets non-classiques qui lui sont associé via l'action de PTHrP.

4. La génération de ligands biotechnologiques

La description en 1970 de la première enzyme de restriction de type II (Smith et Wilcox, 1970), a permit l'éclosion d'un tout nouveau domaine, celui du génie génétique. En combinant ces enzymes avec les plasmides (Lederberg, 1952) et l'ADN ligase (Weiss et Richardson, 1967), il était dorénavant possible de couper un gène et de le coller dans un plasmide afin d'exprimer celui-ci dans le système désiré. D'autres avancées comme le développement de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et de la mutagenèse dirigée par oligonucléotides ont fait de ce domaine l'un des domaines les plus effervescents des 60 dernières années. L'un

des premier succès du génie génétique fut la production d'insuline humaine non antigénique par la bactérie *E. coli* en 1979 (Goeddel et coll., 1979). L'insuline d'origine bactérienne est utilisée chez des patients diabétiques et contribua grandement à l'amélioration de la qualité de vie de ceux-ci. Depuis, l'industrie biopharmaceutique a pris énormément d'ampleur avec la production de nombreux médicaments très efficaces. La biopharmaceutique se définit comme la production d'un composé pharmaceutique par un organisme vivant. Tout cela a aussi permit l'éclosion d'un autre domaine, la biologie moléculaire. Les techniques de clonage, baséesw sur les plasmides et les enzymes de restrictions, ont permis l'étude du rôle des protéines. Il était dorénavant possible d'exprimer spécifiquement une protéine dans un système et d'en étudier les fonctions. S'ensuivirent de nombreuses nouvelles techniques visant l'étude des protéines. Parmi ces techniques, la génération des protéines de fusion a, entre autre, permit l'étude de la localisation des protéines. Une protéine de fusion se définit comme une protéine artificielle obtenue par la recombinaison de l'ADN de plusieurs gènes dans une seul cadre de lecture. La protéine résultante combinera les séquences de toutes les protéines fusionnées. Grâce aux protéines de fusion, on peut étudier la localisation des récepteurs en fusionnant notre hormone d'intérêt avec une protéine fluorescente. Des protéines de fusion ont été générées pour toutes sortes de protéines tant pour les protéines cytosoliques (Hodgson et coll., 2000), nucléaires (Shiga et coll., 2003), membranaires (Abraham et coll., 1997) que plasmatiques (Schulte, 2008). Outre les études de localisation, on peut se servir de cette technique pour purifier et isoler une protéine. Par exemple, l'étiquette (tag) histidine permet la purification de la protéine l'exprimant car ce tag possède une forte affinité pour le nickel (Hochuli coll., 1988). Aussi, la découverte de la protéine fluorescente verte (GFP; Shimomura et coll., 1962) a permis la production de protéines de fusion fluorescente, donc facile à détecter optiquement. La génération de protéines de fusion agonistes ou antagonistes des récepteurs couplés aux protéines G est une approche très efficace pour étudier leur distribution, leur signalisation et leur internalisation. La génération de telles protéines se basent sur la connaissance des modèles de liaison des ligands à leurs récepteurs.

5. Objectifs du projet de recherche

L'objectif de ce projet de maîtrise était la conception de ligands biotechnologiques pour les récepteurs couplés aux protéines G B₂R, B₁R et PTH₁R. Ces récepteurs ont été choisis car ils représentent des membres des deux plus grandes classes de GPCR (Classe A : B₂R et B₁R, Classe B : PTH₁R). Aussi, les récepteurs B₂ et B₁ sont activés par l'extrémité C-terminale de leurs ligands alors que le récepteur PTH₁R est activé par l'extrémité N-terminale de la PTH. Il faudra donc tenir compte de ces particularités dans la conception de ligands biotechnologiques pour ces récepteurs. Les protéines de fusion seront basées sur la GFP, car c'est une molécule facile à détecter tant en microscopie à fluorescence, en immunobuvardage ou en cytométrie de flux. Il s'agit aussi d'une protéine de haut poids moléculaire (27 kDa) qui prouve la faisabilité d'une protéine de fusion ligand de ces récepteurs. Les protéines de fusion comporteront toutes les domaines suivants : domaine GFP, domaine *spacer*, domaine ligand. Le domaine *spacer* permet de créer un espacement entre la protéine fluorescente et le ligand, permettant de réduire au maximum l'encombrement stérique entre la GFP et le récepteur ou entre la GFP et le ligand. Aux cours de cette étude, plusieurs *spacers* seront évalués.

Suite à leur conception, les ligands biotechnologiques seront évalués pour leur capacité à détecter leur récepteur de manière spécifique. Pour les récepteurs qui sont internalisés, ces ligands seront utilisés pour suivre la progression du complexe ligand-récepteur dans le système endosomal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1 Cellules et production des ligands biotechnologiques

Des cellules HEK293a, obtenues de la compagnie Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) ont été utilisées dans toutes les expériences. Ces cellules ont été cultivées dans du *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % de L-glutamine et 1 % de pénicilline-streptomycine.

Ces cellules ont servi d'abord de cellules productrices pour les protéines de fusion basées sur la GFP. Des cellules HEK293a confluentes à 70 % ont été transfectées avec un vecteur codant pour la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP à l'aide du réactif de transfection Exgen (Fermentas, Thermo Scientific, Ottawa, Canada). Ces cellules ont été cultivées pendant 1 mois en présence de généticine (Life Technologies; 500 µg/mL) afin de développer une lignée exprimant le transgène de manière stable. Ces cellules ont par la suite été triées en fonction de leur fluorescence à l'aide d'un appareil de cytométrie en flux (BD SORP LSR II cell analyzer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)). Les milieux conditionnés (MC) des cellules exprimant stablement la protéine de fusion sécrétoire PTH(1-34)-EGFP étaient récoltés après quatre jours de culture et utilisés tels quels pour la stimulation des cellules. Toutefois, pour certaines expériences, le MC a été concentré et dessalé à l'aide de *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units* (Millipore, Billerica, MA; membrane cut-off 10 kDa). À des fins de contrôle, des cellules ont été transfectées de manière transitoire avec le vecteur codant pour la forme sécrétoire de la GFP et cultivées pendant 2 jours avant de récolter le MC.

La majorité des expériences portant sur les récepteurs de la BK ont été basées sur la forme non sécrétée de la GFP. Les protéines de fusion ligands des récepteurs de la BK ont été produites en tant que lysats de cellules HEK293a précédemment transfectées à l'aide d'un réactif de transfection basé sur le polyéthylèneimine (PEI; Morissette et coll., 2008). Après 48 h, les cellules transfectées avec les vecteurs

codant pour les protéines de fusion ont été lavées avec du *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Les cellules, sans surnageant, furent congelées pendant au moins 2 heures à -20°C afin de les lyser. Ensuite, celles-ci furent dégelées et délogées du flacon à l'aide d'un *cell scraper*. La suspension résultante a été centrifugée (15,000g; 10 minutes) et le surnageant (le lysat) fut utilisé comme solution concentrée de protéines de fusion ligand de l'un ou l'autre récepteur de la BK. Comme témoin, des cellules ont été transfectées avec le vecteur codant pour la protéine EGFP-C3 (Clontech, Palo Alto, CA) et celles-ci ont été traitées de la manière décrite précédemment.

1.2 Vecteurs

D'autres cellules HEK293a ont été transfectées transitoirement avec des vecteurs codant pour PTH₁R (don du Dr T.J. Gardella, Massachusetts General Hospital), B₂R humain (Charest-Morin et coll., 2015), myc-B₂R (un récepteur B₂ de lapin exprimant un épitope myc en N-terminal; Bawolak et coll., 2007) et B₁R-FLAG (récepteur B₁ humain fusionné à un tag C-terminal FLAG; Morissette et coll., 2008). Des vecteurs codant pour les protéines ACE-cherryFP et B₂R-cherryFP ont été développés pour ce projet. D'autres cellules ont été transfectées avec *Cherry fluorescent protein* (CherryFP), Rab₅-GTP-locked-CherryFP, Rab₇-CherryFP (dons du Dr M.J. Tremblay, Université Laval, Canada) ou arrestin₁-CherryFP (don du Dr J.-M. Beaulieu, Université Laval, Canada). Finalement, des cellules ont été transfectées avec un plasmide codant pour l'expression de CherryFP sous le contrôle du *cyclic AMP responsive element* (CRE; CRE-CherryFP; Fortin et coll., 2011).

1.2.1 Construction du vecteur PTH(1-34)-EGFP

La forme sécrétée de la GFP (s-EGFP), contenant le *signal peptide* de la préproinsuline, a été précédemment rapportée (Jain et coll., 2011; don du Dr P. Joyce, Université Concordia, Montréal, Canada). La séquence codant pour la PTH(1-34) a été insérée à la suite du *signal peptide* par mutagenèse dirigée par oligonucléotides.

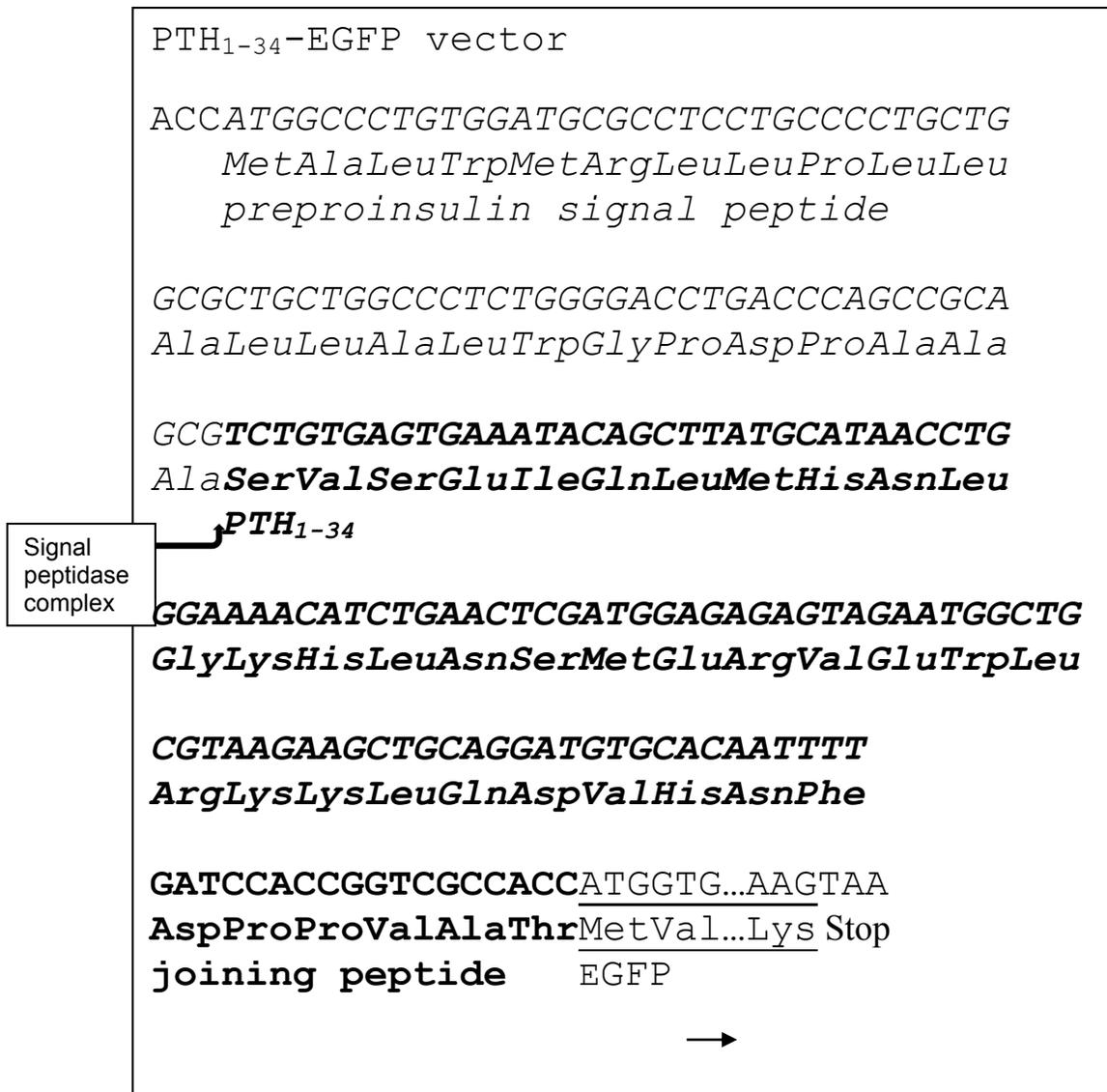


Figure 4. Séquence du vecteur codant pour la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP.

A. PTH₁₋₃₄-EGFP

B. EGFP-MK

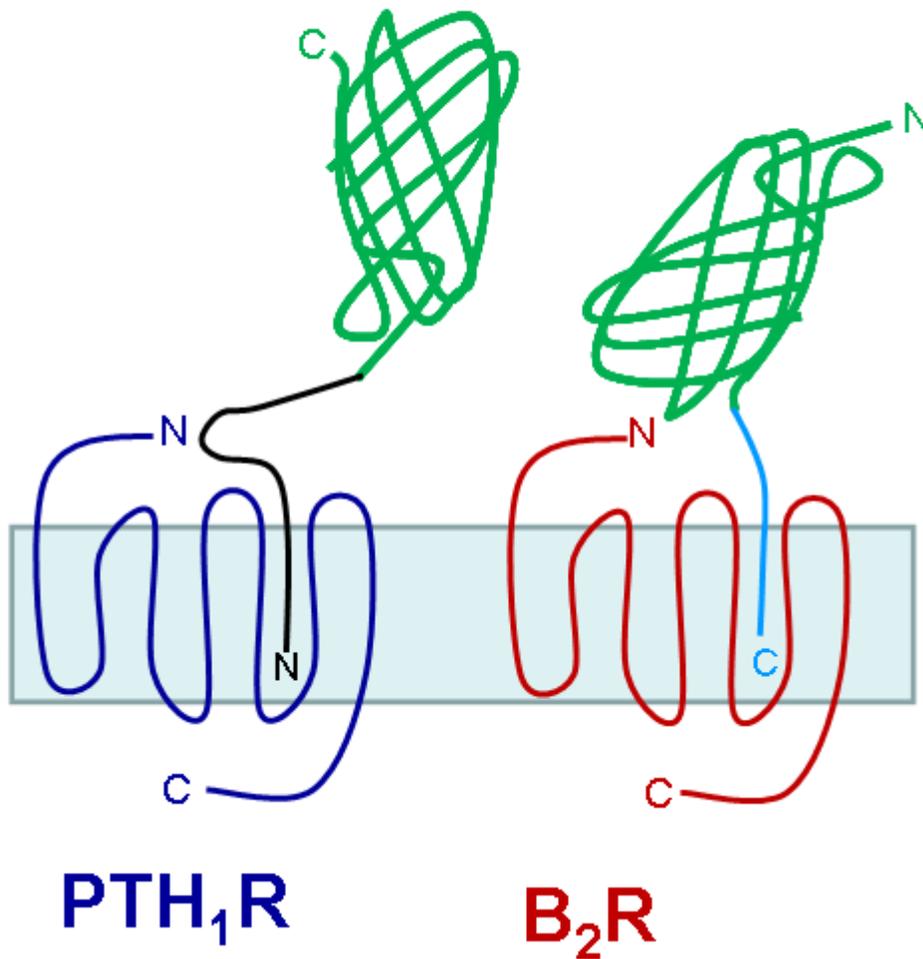


Figure 5. (A) Représentation schématique du récepteur PTH₁R et de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP.

(B) Représentation schématique du récepteur B₂R et de la protéine de fusion EGFP-MK.

La composition du vecteur résultant est détaillée dans la Figure 4 et est représentée schématiquement dans la Figure 5A. La GFP est fusionnée à l'extrémité C-terminal du peptide PTH(1-34), en accord avec le modèle de liaison de cette hormone à son récepteur. La séquence de ce vecteur a été confirmée par séquençage automatisé.

1.2.2 Construction du vecteur EGFP-MK

Deux vecteurs codant pour la protéine de fusion EGFP-MK ont été produits. Le premier a été désigné s-EGFP-MK. Il était composé de la forme sécrétée de la GFP décrite précédemment avec une extension C-terminale composée de la séquence de la maximakinine (MK) (Figure 5B). Les oligonucléotides suivants ont été hybridés afin de générer de l'ADN double brin codant pour la MK : 5'-G TAC AAG GAT TTG CCT AAG ATC AAC CGC AAA GGA CCA CGT CCA CCG GGG TTC TCC CCT TTT CGA TAA C-3' et 5' -TCGAG TTA TCG AAA AGG GGA GAA CCC CGG TGG ACG TGG TCC TTT GCG GTT GAT CTT AGG CAA ATC CTT-3'. L'ADN_{db} a ensuite été inséré dans le produit de digestion BsrGI/XhoI du vecteur s-EGFP à l'aide de la T4 DNA ligase afin de générer le vecteur s-EGFP-MK (Figure 6). Le second vecteur, EGFP-MK, a été produit par la délétion de la séquence d'ADN du *signal peptide* de s-EGFP-MK selon la méthode de Hansson (Hansson et coll., 2008). La délétion s'est faite à l'aide des amorces de PCR suivantes : 5' -CCC AAG CTT CTA GAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA G-3' (sens) and 5' -CTC GCC CTT GCT CAC CAT GGT CTA GAA GCT TGG G -3' (antisens). Le produit de PCR obtenu a ensuite été digéré par DpnI et le vecteur résultant a été transformé dans des bactéries compétentes.

1.2.3 Construction des vecteurs exprimant des protéines de fusion ligands du B₁R

Plusieurs protéines de fusion ont été testées pour ce récepteur et pour chacune d'entre elles, un vecteur fut produit (Figure 7). Toutes les protéines de fusion furent construites sur la même base; c'est-à-dire que chacune comprenait dans l'ordre (de Nt vers Ct) un domaine GFP, un domaine *spacer* (S; S1 à S4) et un domaine peptide (P; P1 et P2).

s-EGFP-MK vector (in pcDNA3)
 Boxed sequence removed in EGFP-MK vector

ACCATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTG
 MetAlaLeuTrpMetArgLeuLeuProLeuLeu
 preproinsulin signal peptide

GCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCA
 AlaLeuLeuAlaLeuTrpGlyProAspProAlaAla

GCG**GATCCACCGGTCGCCACC**ATGGTG ... CTGTAC
 Ala**AspProProValAlaThr**MetVal ... LeuTyr
joining peptide EGFP

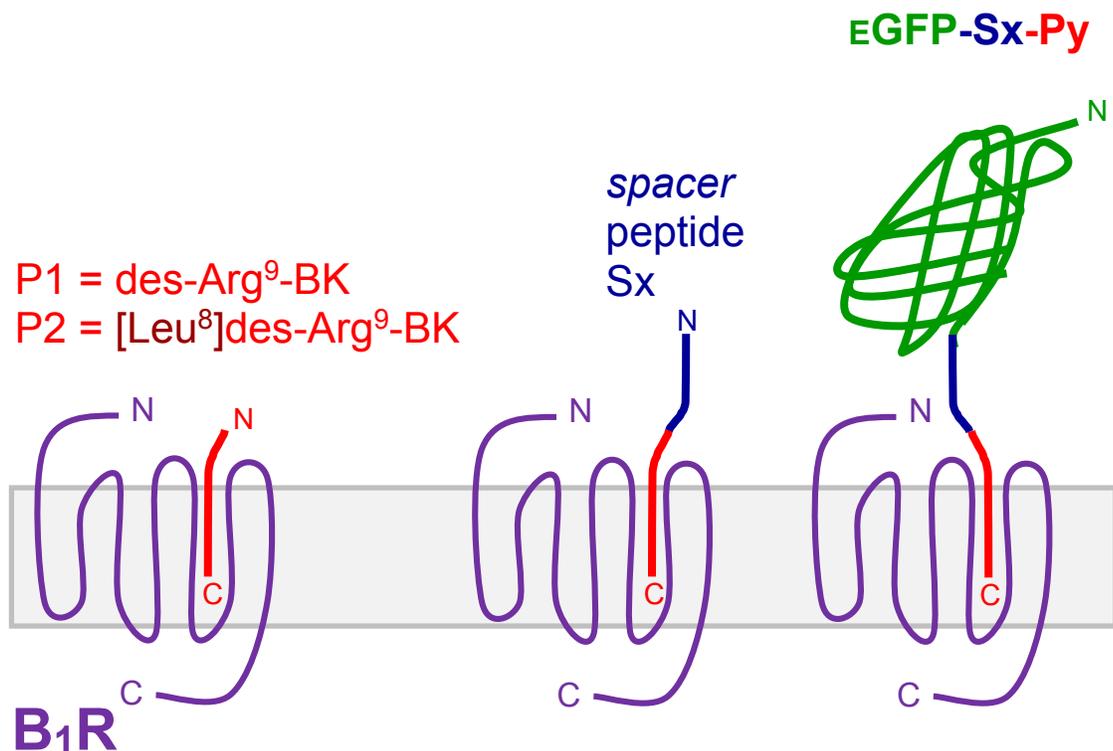
Signal
 peptidase
 complex

AAGGATTTGCCTAAGATCAACCGCAAAGGACCACGT
 Lys**AspLeuProLysIleAsnArgLysGlyProArg**
 maximakinin

CCACCGGGTTCTCCCCTTTTCGATAACTCGAGCATG
ProProGlyPheSerProPheArgStop

Figure 6. Séquence du vecteur codant pour les protéines de fusion s-EGFP-MK et EGFP-MK.

Pour l'identité des *spacers* et des peptides, se référer à la Figure 7. Le vecteur codant pour la protéine de fusion EGFP-S1P1 fut généré par la délétion du codon codant pour l'arginine C-terminale du vecteur EGFP-MK. Cette délétion fut effectuée selon la méthode d'Hansson à l'aide des oligonucléotides suivants : 5'-GGG TTC TCC CCT TTT TAA CTC GAG CAT GCA TCT-3' (sens) et 5'-TG ATG CTC GAG TTA AAA AGG GGA GAA CCC CGG-3' (anti-sens). Le vecteur codant pour la protéine EGFP-S1P2 fut généré par la substitution de la thymine (T) du codon codant pour la phénylalanine C-terminale du vecteur EGFP-S1P1 par une adénosine (A). Les amorces suivantes furent employées : 5'-GT CCA CCG GGG TTC TCC CCT TTA TAA CTC GAG CAT GCA TCT AG-3' (sens) et 5'-CT AGA TGC ATG CTC GAG TTA TAA AGG GGA GAA CCC CGG TGG AC-3' (anti-sens). Ce changement résulte dans l'expression d'une leucine en position C-terminale. Les vecteurs codant pour EGFP-S2P1 et EGFP-S2P2 furent générés par l'insertion des nucléotides AAG en aval de la séquence de la BK comprise dans celle de la MK. Cela résulte dans l'ajout d'un résidu lysine, qui comme discuté plus tôt, est essentiel pour l'affinité des kinines pour le récepteur B₁. Cette insertion s'est faite par la technique de mutagenèse dirigée par oligonucléotides à l'aide des amorces de PCR suivantes : 5'-G ATC AAC CGC AAA GGA CCA AAG CGT CCA CCG GGG TTC TCC-3' (sens) et 5'-GGA GAA CCC CGG TGG ACG CTT TGG TCC TTT GCG GTT GAT C-3' (anti-sens). Les mêmes amorces ont été utilisées pour les deux vecteurs. Le PCR pour EGFP-S2P1 s'est fait à partir du vecteur EGFP-S1P1 et celui pour EGFP-S2P2 à partir du vecteur S1P2. Pour ce qui est des vecteurs codant pour EGFP-S3P1 et EGFP-S3P2, ceux-ci sont basés sur un *spacer* complètement différent, le *spacer* asparagine-glycine plus une lysine C-terminale ((NG)_nK). Il s'agit d'un *spacer* linéaire compatible avec le milieu extracellulaire et qui a été utilisé avec succès dans la génération de protéines de fusion (Fortin et coll., 2009). Les vecteurs EGFP-S3P1 et EGFP-S3P2 comprennent 5 répétitions du *spacer* NG. Pour le vecteur EGFP-S3P1, les oligonucléotides suivants furent hybridés afin d'obtenir de l'ADN_{db} : 5'-G TAC



Nomenclature of fused peptides

S1-P1 = DLPKINRKGPRPPGFSPF (maximakinin-des-Arg)

S2-P1 = DLPKINRKGPKRPPGFSPF

S2-P2 = DLPKINRKGPKRPPGFSPL (antagonist version)

S3-P1 = (NG)₅KRPPGFSPF

S3-P2 = (NG)₅KRPPGFSPL

S4-P1 = (NG)₁₅KRPPGFSPF

Figure 7. Représentation schématique des protéines de fusion évaluées en tant que ligands potentiels du récepteur B₁. Les protéines de fusion sont composées de la GFP lié à un *spacer* (S1 à S4) qui à son tour est lié à un peptide ligand du récepteur B₁ (P1 ou P2).

1.2.5 Construction du vecteur ACE-CherryFP

Tout d'abord, la séquence codante pour l'ACE fut amplifiée par PCR à partir d'un vecteur codant pour cette protéine (don du Dr Corvol, Paris, France) à l'aide des amorces suivantes : 5'-C GTT TAA ACG GGC CCT ATG GGG GCC GCC TCG GGC-3' (sens) et 5'-CT CAC CAT GGA GTG TCT CAG CTC CAC CTC GGA GC-3' (anti-sens). Puis, la séquence codante pour CherryFP fut à son tour amplifiée par PCR à partir d'un vecteur codant pour cette protéine à partir des amorces suivantes : 5'-GA CAC TCC ATG GTG AGC CAA GGG CGA G-3' (sens) et 5'-TTG GTA CCG AGC TCG TTA TCT AGA TCC GGT GGA TCC C-3' (anti-sens). Ce vecteur fut assemblé de la même façon que le vecteur B₂R-CherryFP.

1.3 Agents pharmacologiques

Outre les protéines de fusion, les cellules furent traitées avec les stimulants suivants : PTH(1-34) synthétique (Sigma-Aldrich), forskoline (un activateur direct de l'adénylate cyclase; Calbiochem, La Jolla, CA), bradykinine (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA), anatibant (LF-16-0687; 1-[[2,4-dichloro-3-[(2,4-diméthylquinolin-8-yl)oxy]méthyl]phényl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoiminométhyl)-phényl]carbonylamino]propyl]-2(S)-pyrrolidinedicarboxamide, mesylate salt; don des laboratoires Fournier, Daix, France) et *Compound 11* (2-[(2R)-1-[(3,4-dichlorophényl)sulfonyl]-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-yl]-N-[2-[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phényl]éthyl]acétamide; don du Dr D.J. Pettibone, Merck Research Laboratories, West Point, PA).

Pour les essais de compétitions de liaison du radioligand, les molécules suivantes furent utilisées : [³H]Lys-des-Arg⁹BK (77,0 Ci/mmol; PerkinElmer Biosciences, Boston, MA) et Lys-des-Arg⁹BK (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Aussi, les quatre peptides suivants furent synthétisés sur demande par la compagnie Peptide 2.0 Inc. (Chantilly, VA) : S1P1, S2P1, S3P1 et S3P2.

2. Méthodes

2.1 Immunobuvardage

L'identité des protéines de fusion fut vérifiée par des expériences d'immunobuvardage (10-15 μ L de MC ou 1 μ L de lysat par puits; gels de polyacrylamide-SDS 9 %) conduites comme décrit précédemment (Bawolak et coll., 2007) au moyen de l'anticorps monoclonal anti-GFP JL8 (Clontech).

L'action agoniste de PTH(1-34)-EGFP et de EGFP-MK fut investigué par la quantification de l'expression du facteur de transcription c-Fos. Des cellules HEK293a stimulées par divers traitements furent lysées, et ce lysat utilisé comme matériel pour la détection de c-Fos. L'expression de c-Fos fut détectée à l'aide de l'anticorps anti-c-Fos K-25 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). La β -actine fut aussi détectée dans cette expérience afin de s'assurer que la même quantité de protéine était présente dans chaque puits (Sigma-Aldrich).

2.2 Dosage des protéines de fusion

Toutes les protéines de fusion ont été dosées à l'aide d'un ELISA commercial anti-GFP (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA).

2.3 Microscopie

Pour les expériences de microscopie, des cellules HEK293a ont étéensemencées dans des pétris de 35 mm et transfectées ou non avec le récepteur approprié. Dans la majorité des expériences, les cellules ont été stimulées 30 minutes à 37 °C avec les protéines de fusion. Dans le cas où des antagonistes ont été utilisés, ceux-ci ont été ajoutés 15 minutes avant l'ajout des agonistes. D'autres cellules ont été transfectées avec PTH₁R et CRE-CherryFP. Ces cellules ont été traitées avec divers stimulants, et ce pour une période de 6 h à 37 °C.

Après les stimulations, les cellules furent rincées au PBS puis observées en microscopie avec un microscope Olympus BX51 (Center Valley, PA) couplé à une caméra digitale CoolSnap HQ (Photometrics, Tucson, AZ; filtres pour GFP : excitation 460-500 nm, émission 510-660 nm; pour CherryFP : excitation 525-555 nm, émission 600-660 nm). L'objectif utilisé était le 100x oil UPlanApo (Olympus).

2.4 Cytométrie en flux (FACS)

Des cellules traitées des mêmes façons qu'en microscopie ont été détachées des pétris à l'aide du *Cell Dissociation Buffer* (Life Technologies). Ensuite, elles ont été centrifugées (30 secondes, 15,000 g) puis resuspendues dans du PBS avant d'être analysées en FACS à l'aide du *BD SORP LSR II cell analyzer* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; fluorescence verte ou rouge). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel BD FACS DIVA.

2.5 Détermination de l'affinité des peptides et de EGFP-S4P1 pour B₁R

L'affinité des peptides S1P1, S2P2, S3P1 et S3P2 fut déterminée à l'aide d'un essai de compétition. Une concentration fixe de [³H]Lys-des-Arg⁹BK fut ajoutée à chacun des puits d'une plaque 24 puits contenant des cellules HEK293a exprimant transitoirement le récepteur B₁R-FLAG. Par la suite des concentrations croissantes de chacun des peptides et de la protéine de fusion furent ajoutées à chaque puits. L'essai de compétition s'est déroulé de la manière décrite par Bawolak (Bawolak et coll., 2007). À partir des résultats, exprimés en % de la liaison maximale, il fut possible de tracer des courbes de compétition et à partir de ceux-ci de déterminer l'IC₅₀ de chaque compétiteur. L'IC₅₀ est proportionnelle à l'affinité et nous renseigne sur la capacité de chaque peptides ou protéine de fusion à lier le récepteur B₁.

2.6 Analyse statistique

Les valeurs numériques sont rapportées en tant que moyenne ± l'écart-type. Les groupes de valeurs qui ne suivent pas une distribution normale ont été analysés à

l'aide du test de Kruskal-Wallis suivit d'un test de comparaison multiple (Dunn). Les groupes de valeurs distribués normalement ont été comparés par une ANOVA suivit d'un test de comparaison multiple (Tukey-Kramer ou Dunnett's si les valeurs sont comparées à un groupe contrôle commun). Ces tests ont été effectués à l'aide du programme InStat 3.05 (Graphpad Software, San Diego, CA).

RÉSULTATS

1. Caractérisation de la protéine de fusion agoniste du récepteur PTH₁R

La première protéine de fusion à avoir été générée fut PTH(1-34)-EGFP. Il s'agit d'une protéine de fusion basée sur l'agoniste PTH(1-34) lié directement à l'extrémité N-terminale de la forme sécrétée de la EGFP. Comme mentionné plus tôt, cette protéine fut produite en tant que milieu conditionné de cellules HEK293a exprimant stablement le transgène et mis en culture durant 4 jours. Pour cette protéine de fusion, nous n'avons utilisé aucun *spacer* entre l'agoniste et la GFP.

1.1 Validation de l'expression de la protéine PTH(1-34)-EGFP

Les protéines sécrétées dans le MC des cellules transfectées ont été caractérisées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-GFP (Figure 8). Les cellules HEK293a transfectées de manière transitoire avec un vecteur codant pour la protéine s-EGFP ont sécrétées la protéine attendue. En effet, dans ce puits, on retrouve la présence d'une bande correspondant à la GFP avec un poids moléculaire de 27 kDa. Les cellules exprimant stablement la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP ont quant à elles sécrétées une protéine contenant de la GFP avec un poids moléculaire supérieure à celui de s-EGFP. Cela est cohérent avec la présence d'une extension d'environ 4,1 kDa correspondant à la PTH(1-34). La culture des cellules transfectées en absence de sérum diminue la quantité de protéines de fusion présente dans les MC. Toutes les expériences à venir seront donc basées sur des cellules cultivées en présence de 10 % FBS. Les cellules productrices de PTH(1-34)-EGFP sont caractérisées par une distribution granulaire de la fluorescence, phénomène que l'on remarque aussi chez les cellules productrices de s-EGFP (Figure 8, droite). Le MC des cellules exprimant stablement la protéine de fusion contenait une moyenne de $1,5 \pm 0,3$ nM de protéine basée sur la GFP. Le MC des cellules exprimant transitoirement s-EGFP contenait une moyenne de $1,0 \pm 0,1$ nM de protéine apparentée à la GFP.

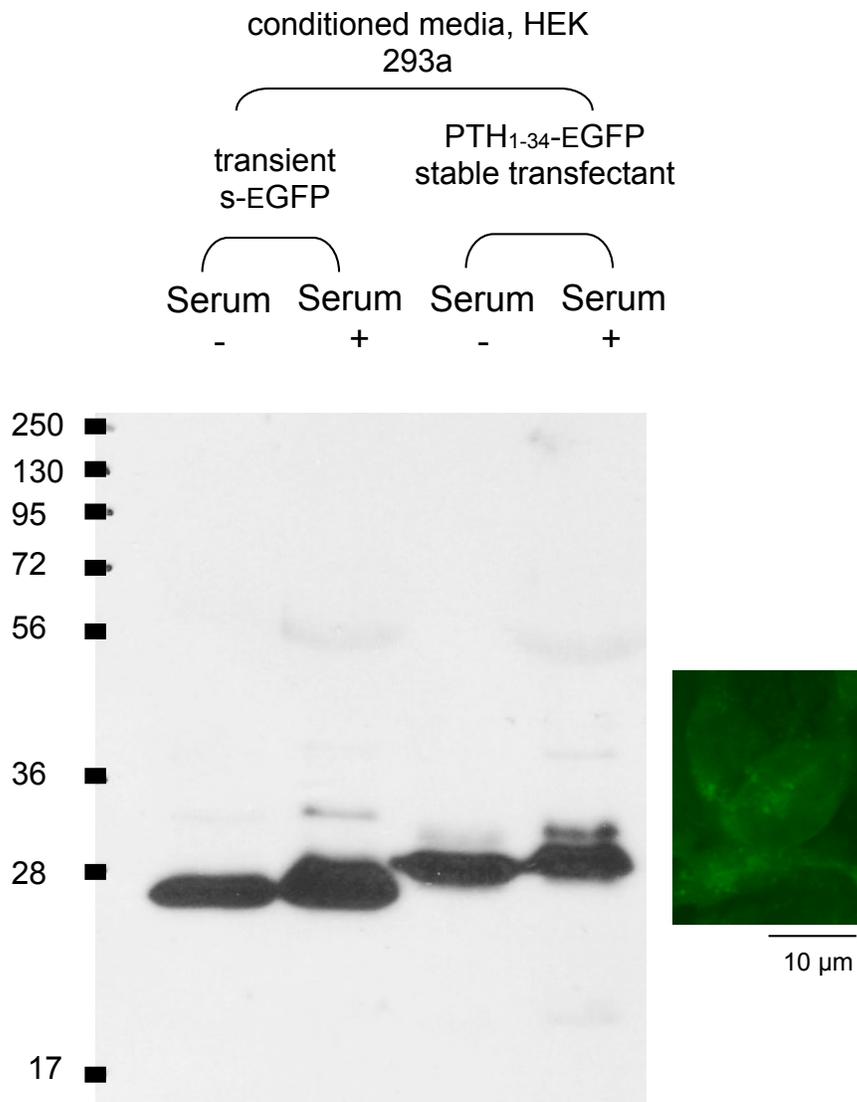


Figure 8. Immunobuvardage des milieux conditionnés (10 µL/puits; migration dans un gel 10%) de cellules HEK293a exprimant soit s-EGFP (transfection transitoire; collecte du MC après 24 h) ou PTH(1-34)-EGFP (transfection stable; collecte après 4 jours de culture). Les milieux conditionnés ont été produits en présence ou en absence de sérum de veau fœtal 10 % comme mentionné. À droite : Champ de microscopie à fluorescence d'une cellule exprimant stablement la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP (400x).

Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'un ELISA pour la GFP et sont représentatifs du dosage de trois MC distincts dans les deux cas. Toujours à l'aide de cet ELISA, il a été déterminé que le MC de cellules non transfectées ne contenait pas de GFP.

1.2 Caractérisation de l'activité agoniste de PTH(1-34)-EGFP

L'étape suivante de la caractérisation de PTH(1-34)-EGFP fut de vérifier si la protéine de fusion conservait les propriétés agonistes du peptide PTH(1-34). L'induction de l'expression du facteur de transcription c-Fos est une réponse cellulaire commune à l'activation de nombreux récepteurs (Syme et coll., 2005). Chez des cellules HEK293a exprimant transitoirement le récepteur PTH₁R, la stimulation avec le peptide synthétique PTH(1-34) (100 nM) induit une forte expression de cette protéine nucléaire (Figure 9). L'induction de c-Fos est détectable après 1 h et après 3 h, mais ne l'est plus après 12 h de stimulation. La diversité observable des poids moléculaires de c-Fos est compatible avec la présence de multiples événements de phosphorylation (Glauser et Schlegel, 2007). Le MC de cellules productrices de PTH(1-34)-EGFP a conservé une fraction de l'activité de l'agoniste synthétique. En effet, la protéine de fusion a aussi atteint son effet maximal après une stimulation de 3 h. Le MC de cellules productrices de s-EGFP n'a pas stimulé l'induction de c-Fos de manière significative. L'activité agoniste de la protéine de fusion a aussi été évaluée à l'aide du gène rapporteur CRE-CherryFP. Dans ce système, lorsqu'il y aura production d'AMP_c, celui-ci liera le *cAMP Response Element* (CRE) et induira l'expression de la protéine CherryFP. Puisqu'il a été rapporté que la PTH stimule la production d'AMP_c (Kousteni et Bilezikian, 2008), ce système est idéal pour valider l'activité agoniste de notre protéine de fusion. PTH(1-34) (100 nM), PTH(1-34)-EGFP et la forskoline ont stimulées l'expression de la protéine fluorescente rouge au dessus du seuil d'autofluorescence de manière significative chez des cellules HEK293a exprimant le récepteur PTH₁R (Figure 10).

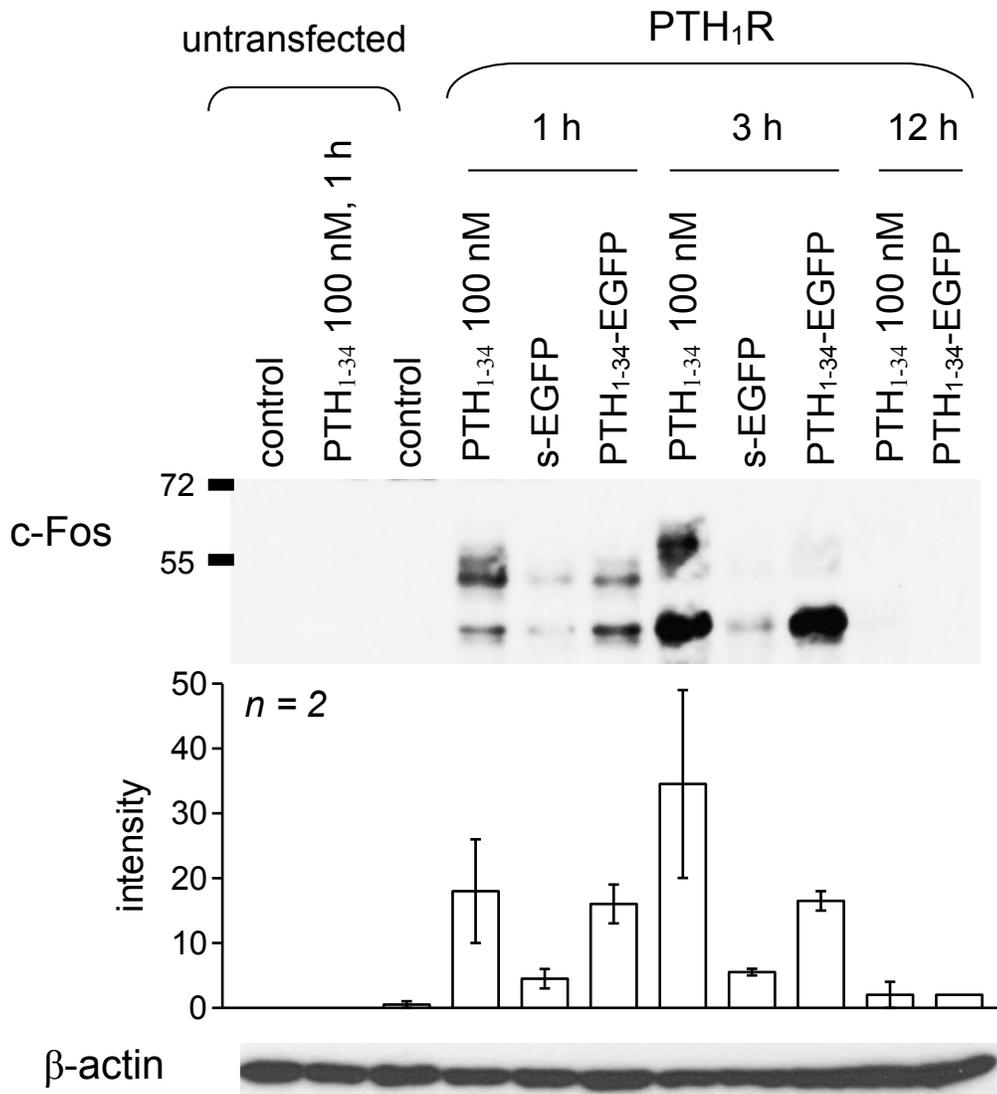


Figure 9. Induction de l'expression du facteur de transcription c-Fos dans des cellules HEK293a exprimant ou non PTH₁R en réponse à des traitements avec les MC (MC PTH(1-34)-EGFP ou MC s-EGFP) ou PTH(1-34) synthétique. Les résultats sont représentatifs de deux expériences. Les histogrammes représentent l'intensité du signal généré par la détection de c-Fos. L'immunobuvardage de la β-actine a permis de vérifier qu'il y avait eu un chargement égal des puits (25 µg/puits).

CRE-Cherry
+ PTH₁R

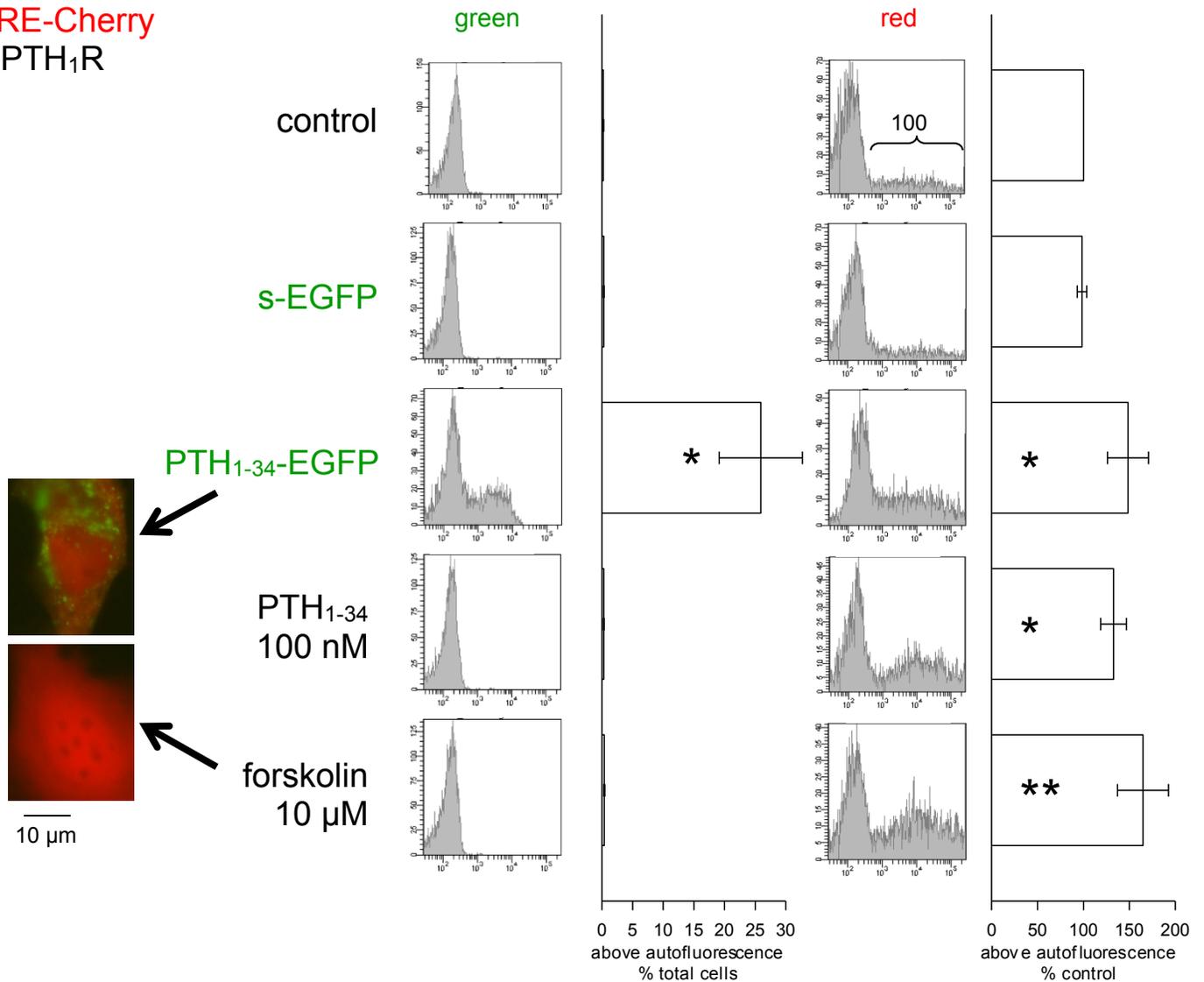


Figure 10. Expression de la protéine CherryFP chez des cellules co-transfectées avec des vecteurs codant pour PTH₁R et CRE-CherryFP (protéine CherryFP sous le contrôle de l'élément de réponse de l'AMP_c). Les cellules ont été stimulées tel qu'indiqué et ce pour une période de 6 heures. Les histogrammes de gauche représentent la proportion de cellules exprimant une fluorescence verte au-dessus du seuil d'autofluorescence. Ceux de droite représentent la proportion de cellules exprimant une fluorescence rouge au-dessus du seuil d'autofluorescence par rapport à la fluorescence du contrôle. Résultats représentatifs de 5-6 expériences et basés sur l'analyse de 10 000 cellules. Le pourcentage de cellules exprimant une fluorescence verte au-dessus du seuil d'autofluorescence était significatif seulement chez les cellules traitées avec la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP (Kruskal-Wallis test $P < 0,01$; test de comparaison multiple de Dunn vs. contrôle : $*P < 0,01$). Pour ce qui est de la fluorescence rouge, le test de Kruskal-Wallis a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P = 0,002$). $*P < 0,05$ and $**P < 0,01$ vs. contrôle (Test de comparaison multiple de Dunn).
À gauche : Champs de microscopie montrant la distribution uniforme de CherryFP dans le cytosol et la distribution granulaire de PTH(1-34)-EGFP.

La forskoline est un activateur direct de l'adénylate cyclase et a été utilisée comme témoin positif. Le MC s-EGFP n'a pas stimulé la production d'AMP_c. Dans cette expérience, la longue période de stimulation a permis d'observer l'accumulation de fluorescence verte dans les cellules traitées avec PTH(1-34)-EGFP. Seules les cellules traitées avec cette protéine de fusion et exprimant le récepteur PTH₁R ont été associées avec la présence d'une fluorescence verte intracellulaire au dessus du seuil d'autofluorescence.

1.3 Internalisation de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP par PTH₁R

La capacité de PTH(1-34)-EGFP à causer l'internalisation du récepteur PTH₁R suite à sa stimulation a été évaluée davantage. Les MC ont été transférés sur des cellules exprimant transitoirement le récepteur PTH₁R et la protéine CherryFP et ce pour une période d'incubation de 30 minutes à 37 °C (Figure 11). Les cellules ont été co-transfectées avec la protéine cytosolique CherryFP afin de faciliter la détection des cellules ayant été efficacement transfectées. Suite à l'incubation de ces cellules avec le MC PTH(1-34)-EGFP, la présence d'une fluorescence verte intense et granulaire a été détectée. La distribution granulaire de la fluorescence est cohérente avec la localisation endosomale du récepteur suite à son internalisation. L'internalisation de la protéine de fusion a été détectée uniquement lorsque les cellules exprimaient le récepteur. Le MC s-EGFP n'a pas marquée les cellules de manière significative tant en présence qu'en absence du récepteur. À l'aide de *Ultra-15 Centrifugal Filter Units*, il a été possible de dessaler et de concentrer 50 fois les milieux conditionnés. Le milieu conditionné concentré (MCC) PTH(1-34)-EGFP a marqué des cellules HEK293a exprimant le PTH₁R d'une manière concentration dépendante (Figure 12). En revanche, le MCC s-EGFP était inefficace pour la détection de cellules exprimant le récepteur PTH₁R. Habituellement, pour déterminer la spécificité d'un ligand pour son récepteur, on compétitionne la liaison de celui-ci avec un excès d'un antagoniste spécifique. Toutefois, la non-disponibilité d'un antagoniste non-peptidique fiable pour le récepteur PTH₁R, nous a forcé à trouver une autre solution.

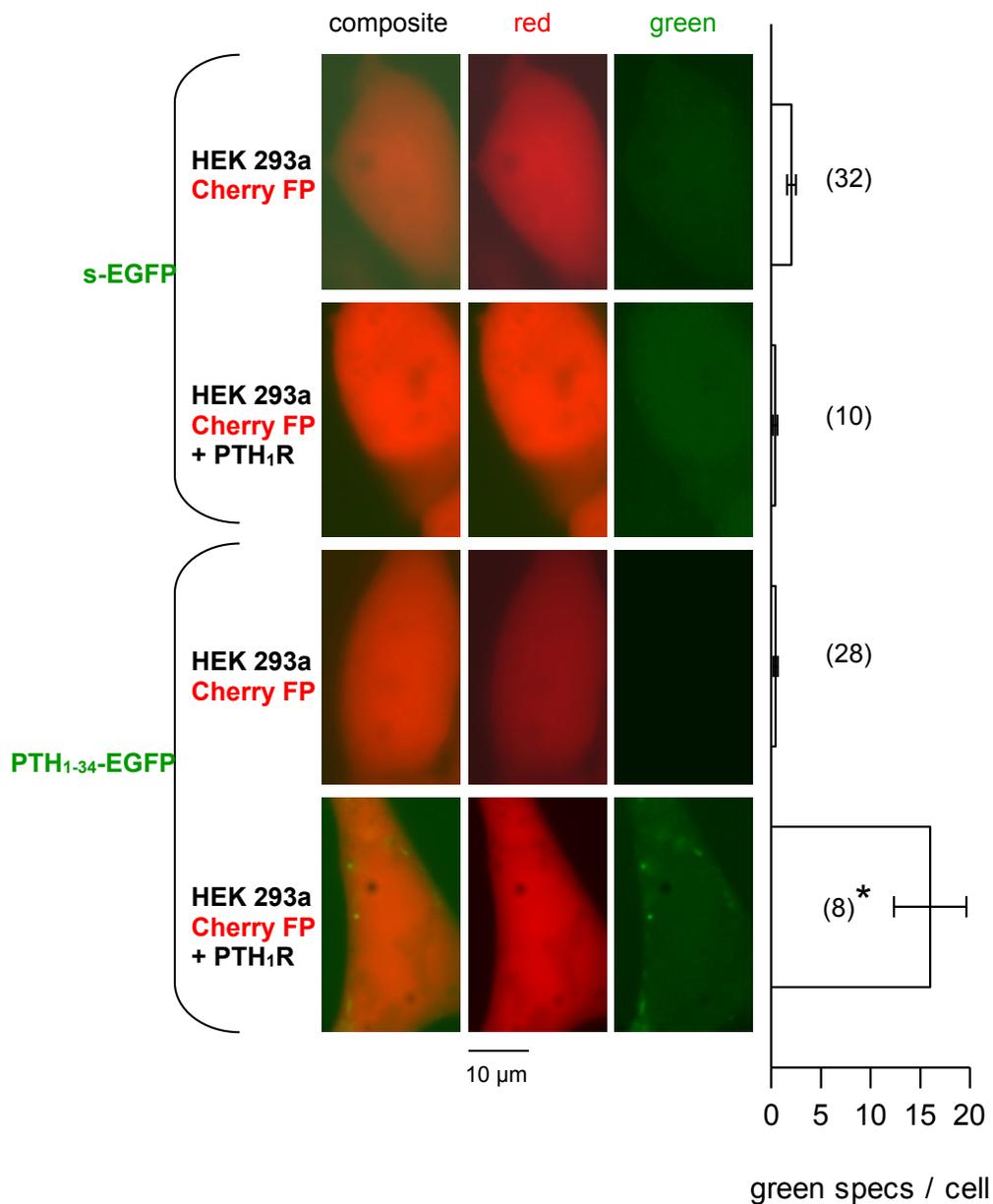


Figure 11. Endocytose de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP par des cellules HEK293a exprimant transitoirement CherryFP et de manière optionnelle, le récepteur PTH₁R. s-EGFP a été utilisée comme contrôle dans cette expérience. Le MC non-dilué a été incubé avec les cellules pour une période de 30 minutes à 37 °C. Après l'incubation les cellules ont été observées à 1000x en fluorescence rouge et verte.

À droite : Le nombre de structure intracellulaire verte «specks» par cellules. Le test de Kruskal-Wallis a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 0,001$). Les effets de la présence du récepteur ont été évalués à l'aide du test de comparaison multiple de Dunn et ce pour chaque MC. * $P < 0.001$.

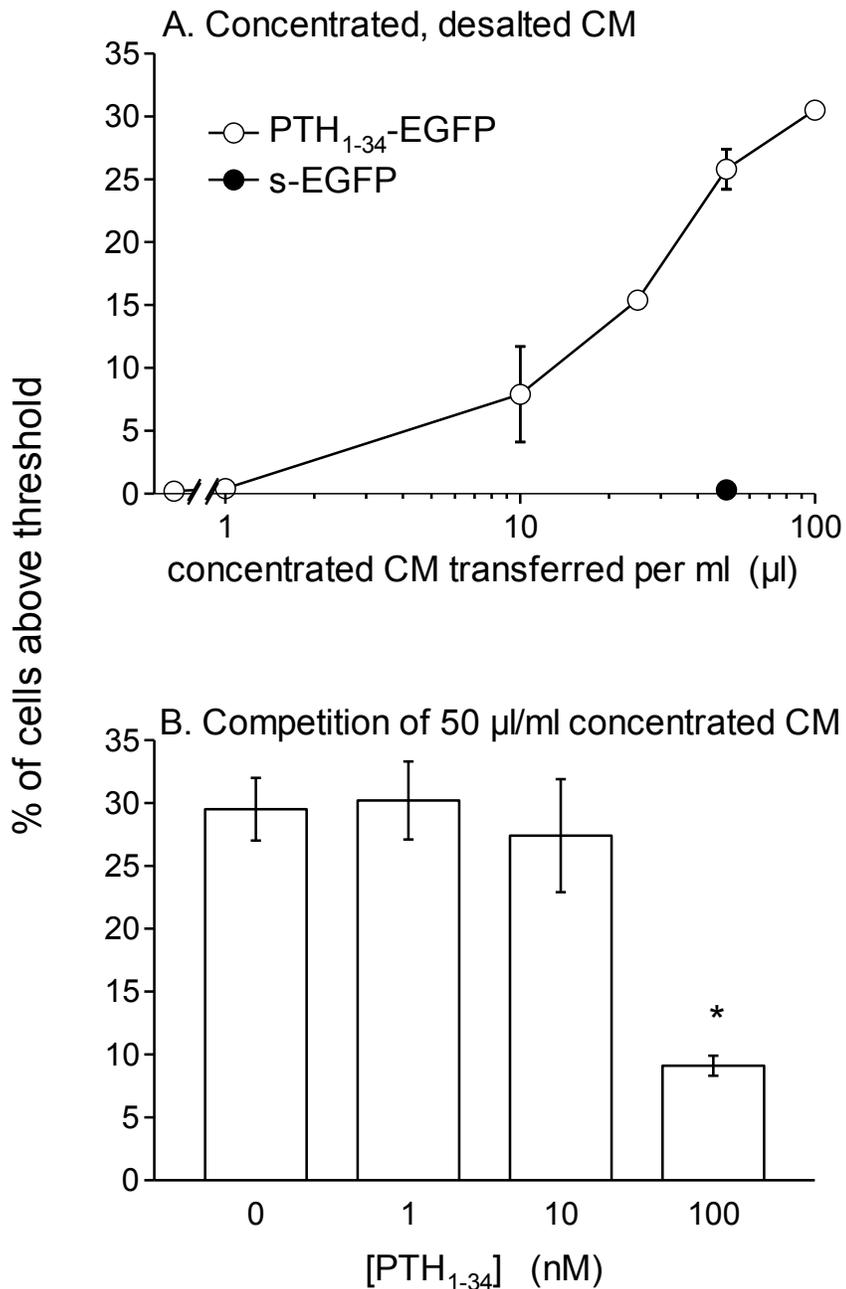


Figure 12. (A) Proportion de cellules HEK293a exprimant le récepteur PTH₁R marquées de manière spécifique par le MC concentré PTH(1-34)-EGFP. Résultats exprimés en % de cellules au-dessus du seuil de fluorescence en fonction de la concentration de la protéine de fusion. Représentatifs de 1-4 expériences.

(B) Compétition de l'endocytose de PTH(1-34)-EGFP par le peptide synthétique PTH(1-34) dans des cellules HEK293a exprimant le récepteur PTH₁R). Un test ANOVA a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 0,001$); * $P < 0,01$ vs. témoin (test de comparaison multiple de Dunnett).

Pour confirmer que le PTH₁R était bel et bien la cible de notre protéine de fusion, nous avons compétitionné son internalisation avec des concentrations croissantes de PTH(1-34) synthétique. La co-incubation (30 minutes, 37 °C) de cellules exprimant transitoirement le PTH₁R avec la PTH(1-34) et la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP (50 µL MCC) a confirmé la spécificité de cette dernière. En effet, la présence de PTH(1-34) synthétique 100 nM a réduit de 90 % la fluorescence associée à l'internalisation de PTH(1-34)-EGFP.

1.4 Étude de colocalisation de la protéine de fusion avec des marqueurs du système endosomal

La construction Rab₅-GTP-Locked-CherryFP est reconnue pour sa capacité à former des endosomes géants dans lesquels les cargos internalisés arrêtent leur progression (Stenmark et coll., 1994). Il s'agit d'une version constitutivement active de la petite protéine G Rab₅, protéine impliquée dans la migration des endosomes précoces. Des cellules co-transfectées avec Rab₅-GTP-Locked-CherryFP et PTH₁R ont été stimulées (30 minutes, 37 °C) avec le MC PTH(1-34)-EGFP (Figure 13A). L'inclusion de la fluorescence verte dans les endosomes à paroi rouge a permis de confirmer que la protéine de fusion suit une voie classique d'endocytose, conforme aux données présentes dans la littérature sur le PTH₁R. La petite protéine G Rab₇ est généralement associée aux endosomes tardifs ou aux lysosomes (Grosshans et coll., 2006). Aucune colocalisation n'a été observée entre Rab₇-CherryFP et PTH(1-34)-EGFP après une incubation de 3 heures (Figure 13B). Toutefois, après 6 heures d'incubation, la colocalisation entre Rab₇-cherryFP et PTH(1-34)-EGFP était significative chez les cellules exprimant transitoirement le récepteur PTH₁R. Ceci suggère que la protéine de fusion agoniste progresse lentement des endosomes précoces vers les endosomes tardifs ou les lysosomes.

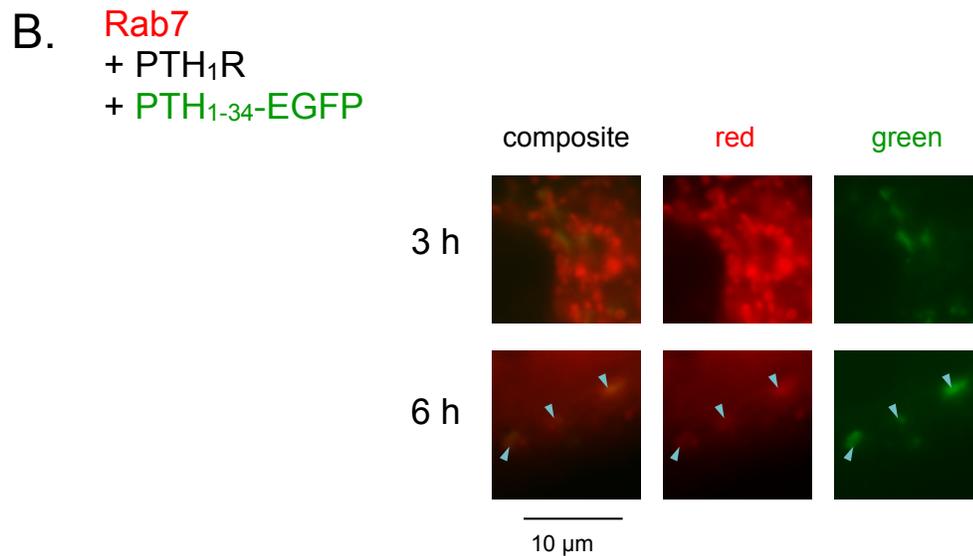
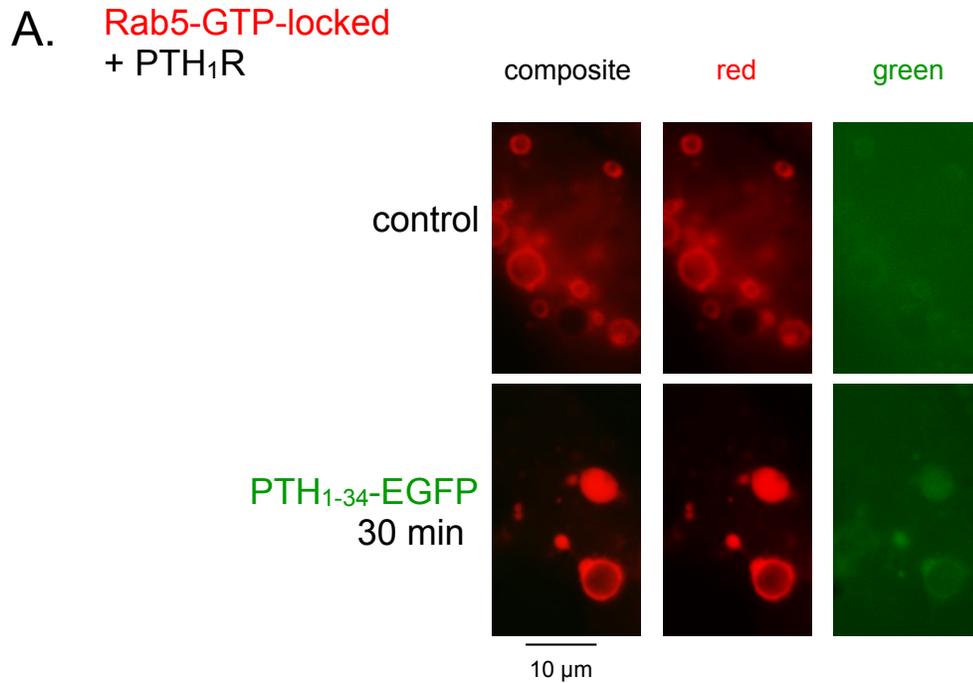


Figure 13. Études de colocalisation sur des cellules HEK293a co-exprimant le récepteur PTH₁R et une construction formée d'une protéine Rab fusionnée à CherryFP.

(A) Colocalisation basée sur Rab₅-GTP^{locked}-CherryFP. Les cellules ont été stimulées 30 minutes avec la PTH(1-34)-EGFP.

(B) Colocalisation basée sur Rab₇-CherryFP. La colocalisation est rare après 3 heures d'incubation mais est nettement plus présente après 6 heures (flèches).

Observation à 1000x

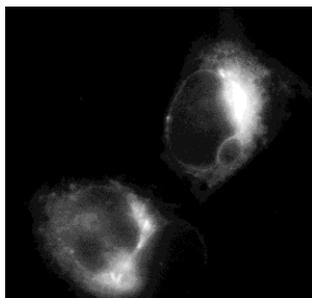
2. Caractérisation de la protéine de fusion agoniste du récepteur B₂R

Deux protéines de fusions différentes ont été générées comme ligands potentiels du récepteur B₂R. Toutes deux sont basées sur la maximakinine (MK), un peptide retrouvé dans la peau du crapaud chinois *Bombina maxima*. Ce peptide est composé de la séquence complète de la bradykinine avec une extension hydrophile C-terminale de 10 acides aminés (DLPKINRKGPRPPGFSPFR). Ce peptide possède une affinité entre 8 et 12 fois inférieure à celle de la BK pour le récepteur B₂R (Bawolak et coll., 2012) mais porte l'espoir d'un *spacer* naturellement sélectionné. La première protéine de fusion générée fut s-EGFP-MK, basée sur la forme sécrétée de la GFP. La seconde, nommée EGFP-MK, est la forme non sécrétée, donc cytosolique, de la première.

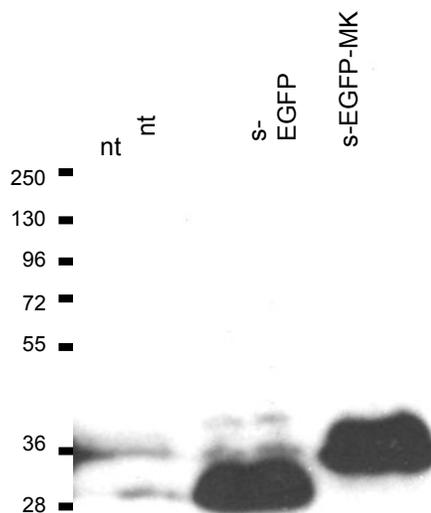
2.1 Validation de l'expression des protéines de fusion s-EGFP-MK et EGFP-MK

La protéine de fusion s-EGFP-MK a été détectée dans le MC de cellules productrices à l'aide d'un immunobuvardage basé sur un anticorps monoclonal anti-GFP. La protéine de fusion possède un poids supérieur à la forme sécrétée de la GFP, s-EGFP (Figure 14B). Cela est cohérent avec la présence de la MK, une extension correspondant à un poids moléculaires de 2,2 kDa. Les cellules productrices de s-EGFP-MK sont caractérisées par une distribution granulaire de la fluorescence, phénomène comparable à ce qui a été observé pour PTH(1-34)-EGFP (Figure 14A). Toutefois, une évaluation pharmacologique du milieu conditionnée de HEK293a exprimant stablement la protéine de fusion (96 heures de culture avant la récolte) n'a pas permis de détecter un effet agoniste au niveau du récepteur B₂ (non montré). Donc, la forme non sécrétée de s-EGFP-MK, EGFP-MK, a été utilisée pour le reste des expériences. Les cellules transfectées transitoirement avec ce vecteur étaient caractérisées par une fluorescence verte cytosolique diffuse (Figure 14C). Ces cellules, une fois rincée au PBS, gelées pendant deux heures puis dégelées, étaient la source d'un lysat cellulaire contenant la protéine de fusion.

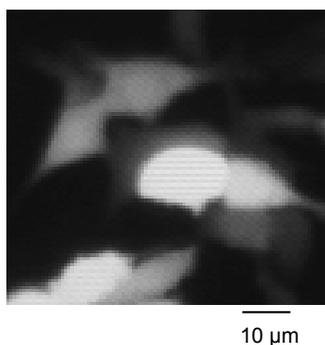
A. Producer HEK 293a cells s-EGFP-MK



B. Anti-GFP immunoblots in conditioned medium



C. Producer HEK 293a cells EGFP-MK



D. Anti-GFP immunoblots in cell lysates

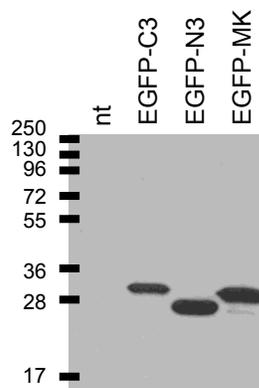


Figure 14. Production des protéines codées par les vecteurs sEGFP-MK et EGFP-MK. Les cellules HEK293a transfectées avec le premier vecteur sont caractérisées par une distribution granulaire de la fluorescence alors que la transfection avec le second vecteur produit une distribution uniforme de la fluorescence au niveau cytosolique. Immunobuvardage de la protéine de fusion s-EGFP-MK (B) ou de la protéine de fusion EGFP-MK (D) à l'aide d'un anticorps anti-GFP. À titre comparatif, les formes sécrétées ou cytosoliques de la GFP ont aussi été détectées par immunobuvardage. L'extension MK génère une augmentation du poids moléculaire vs. les protéines GFP natives.

Un immunobuvardage d'une telle préparation révèle la présence d'une protéine reliée à la GFP avec un poids moléculaire ≈ 30 kDa (Figure 14D). Cela est cohérent avec la présence de l'extension MK. En effet, la protéine de fusion était à mi-chemin entre la protéine EGFP-C3 (34 kDa; extension C-terminale prévue pour le clonage) et EGFP-N3 (27 kDa; extension N-terminale n'affectant pas la protéine finale). Le fait que tant EGFP-MK que EGFP-C3 soient détectés avec le bon poids moléculaire est cohérent avec la très grande stabilité de la GFP dans les cellules de mammifères (Corish et Tyler-Smith; 1999). Après une standardisation des lysats, la concentration en GFP fut déterminée à l'aide d'un ELISA anti-GFP. En moyenne, la concentration du lysat EGFP-MK contenait $1,67 \mu\text{M}$ de GFP et celui de EGFP-C3 en contenait 30 nM . Bien que les concentrations en GFP varient grandement entre les deux lysats, le lysat de cellules transfectées avec EGFP-C3 a été utilisé comme témoin dans la majorité des expériences. Il est représentatif du lysat de cellules HEK293a afin d'exclure toute activité pharmacologique provenant du cytosol.

2.2 Caractérisation des propriétés agonistes de EGFP-MK

Ensuite, les propriétés agonistes de la construction EGFP-MK ont été étudiées au moyen d'un immunobuvardage anti-c-Fos. L'induction de l'expression de c-Fos est aussi un évènement distal de signalisation résultant de la stimulation du récepteur B_2 par un agoniste (Bawolak et coll., 2011). Le traitement de cellules HEK293a exprimant transitoirement le récepteur myc- B_2R avec de la BK induit l'expression du facteur de transcription avec une réponse maximale après 1 heure (Figure 15). L'induction de c-Fos demeure toutefois détectable après 3 heures. EGFP-MK (concentration finale de $12,6 \text{ nM}$) induit l'expression de c-Fos après 1 ou 3 heures de stimulation. L'antagoniste non-peptidique anatibant a inhibé les effets agonistes de EGFP-MK. Le lysat de cellules HEK293a ont été inefficace dans l'induction de l'expression de c-Fos.

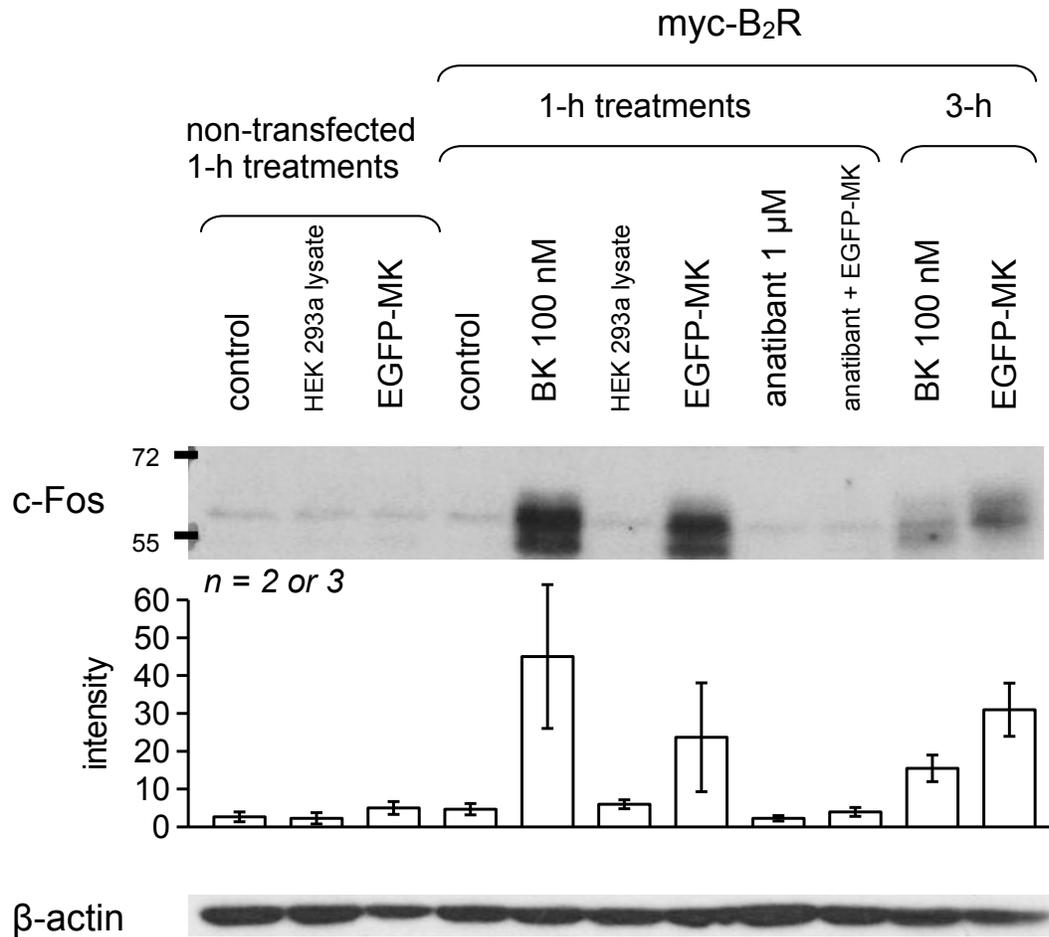


Figure 15. Induction de c-Fos dans des cellules HEK293a non transfectées ou exprimant le récepteur myc-B₂R en réponse au traitement avec EGFP-MK (concentration finale 12,6 nM) ou avec le lysat de cellules HEK293a. Les résultats sont représentatifs de 2-3 expériences. Présentation similaire à la Figure 9.

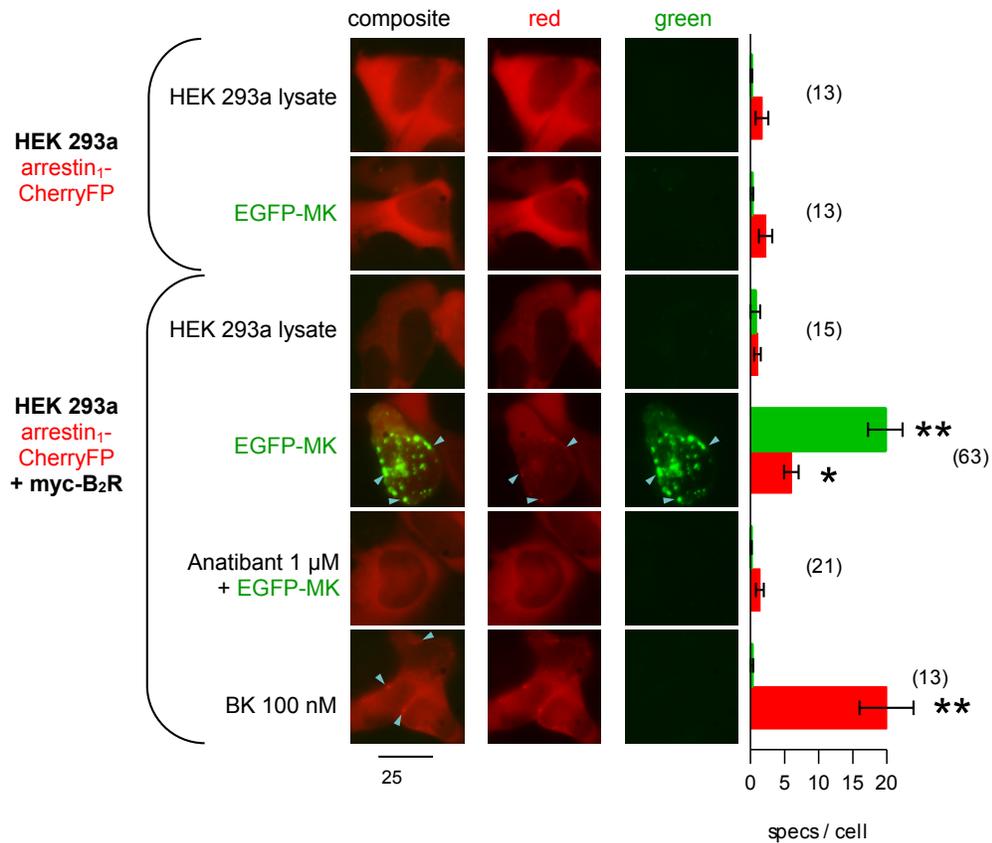


Figure 16. Études de microscopie dans des cellules exprimant arrestine₁-CherryFP et, de manière optionnelle, le récepteur myc-B₂R. Ces cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec l'agent indiqué. La protéine de fusion EGFP-MK a été utilisée à une concentration de 4,2 nM. Seules les cellules exprimant le récepteur myc-B₂R et stimulées avec EGFP-MK se caractérisent par la présence de fluorescence verte intracellulaire au niveau des endosomes. Certains de ces endosomes colocalisent avec la construction arrestine₁-CherryFP. La stimulation par la BK a aussi généré une condensation endosomale de l'arrestine, mais sans signal vert.

À droite : Nombre de structure intracellulaire «specs» par cellules pour le signal vert ou rouge. Le nombre entre parenthèse représente le nombre de cellules analysées. Le test de Kruskal-Wallis a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes tant pour le signal vert que pour le signal rouge ($P < 0,001$). Les effets des différents traitements vs. les cellules témoins ont été évalués à l'aide du test de comparaison multiple de Dunn. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

2.3 Études sur l'internalisation de EGFP-MK via le récepteur B₂R

Des cellules exprimant la construction arrestine₁-CherryFP et, de manière optionnelle, le récepteur myc-B₂R, ont été stimulées (30 minutes, 37°C) avec les lysats (collectés 48 heures post-transfection; dilution 1 :100) (Figure 16). Chez les cellules traitées avec EGFP-MK, une intense fluorescence verte distribuée dans des endosomes était observable. De plus, la stimulation de ces cellules par la protéine de fusion a causé une condensation de l'arrestine₁ au niveau des endosomes. L'arrestine est une protéine cytosolique qui se redistribue au niveau des endosomes lorsque certains GPCRs, dont le B₂R, sont stimulés. En effet, la stimulation avec de la BK a causé une condensation de l'arrestine sans toutefois qu'il y ait de fluorescence verte détectable comme c'est le cas avec EGFP-MK. La protéine de fusion a colocalisé avec l'arrestine, prouvant que EGFP-MK est internalisée par une voie classique propre au récepteur B₂R. Le lysat témoin n'a eu aucun effet. Le pré-traitement des cellules avec un antagoniste, l'antagoniste, a inhibé tant l'internalisation de EGFP-MK que la condensation de l'arrestine. Des cellules HEK293a non transfectées ou exprimant transitoirement le récepteur myc-B₂R ont été stimulées avec le lysat EGFP-MK (30 minutes, 37 °C) puis analysées en cytométrie de flux (Figure 17A). Cette approche quantitative a permis de confirmer que seules les cellules exprimant le récepteur myc-B₂R et étant stimulées par EGFP-MK étaient caractérisées par une fluorescence verte au dessus du seuil d'autofluorescence. La protéine de fusion a démontré une puissance d'ordre nanomolaire du même ordre de grandeur que celle du peptide MK (Bawolak et coll., 2012). Cette conclusion est basée sur les concentrations de EGFP-MK calculées à l'aide de l'ELISA anti-GFP. La spécificité de EGFP-MK pour le récepteur B₂ a été testée en vérifiant si la protéine de fusion était capable de lier d'autres cibles du système kinines-kallikérine (Figure 17B). Des cellules HEK293a exprimant le récepteur B₁ recombinant (vecteur hB₁R-FLAG; Morissette et coll., 2008) ou la forme recombinante de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (vecteur peACE; Wei et coll., 1991) ont été incapable de lier EGFP-MK.

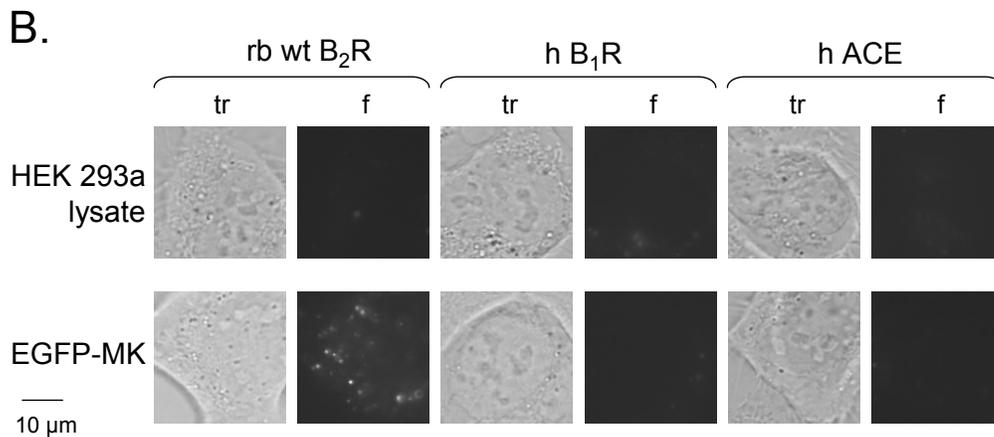
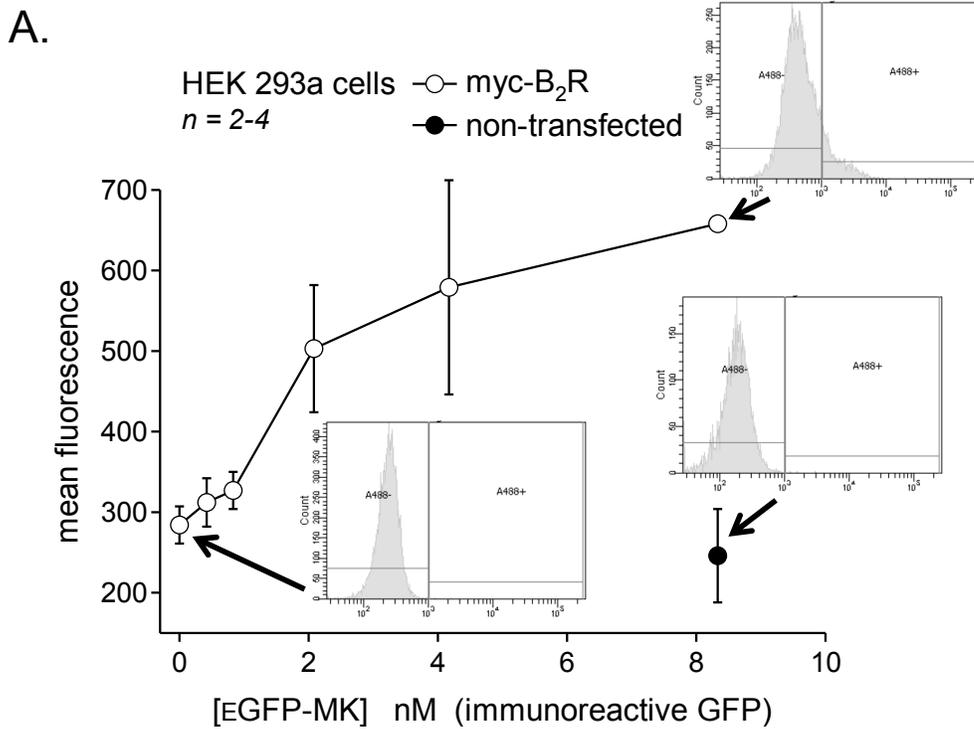


Figure 17. (A) Analyse en cytométrie en flux de cellules HEK293a exprimant optionnellement le récepteur myc-B₂R. Ces cellules ont été mises en suspension puis traitées pendant 30 minutes à 37 °C avec EGFP-MK.

(B) Vérification de la sélectivité du marquage par EGFP-MK (4,2 nM, 30 minutes, 37°C). La protéine de fusion a marqué de manière spécifique les cellules exprimant le récepteur B₂R de lapin sans toutefois marquer celles exprimant soit le récepteur B₁ ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Observation effectuée à 1000x.

L'ACE n'est pas un GPCR mais représente tout de même un site de liaison spécifique pour la BK à la surface des cellules (Gera et coll., 2011). La liaison de la protéine de fusion à wt rbB₂R a servi de témoin positif dans cette expérience.

2.4 Étude de colocalisation de la protéine de fusion avec des marqueurs du système endosomal

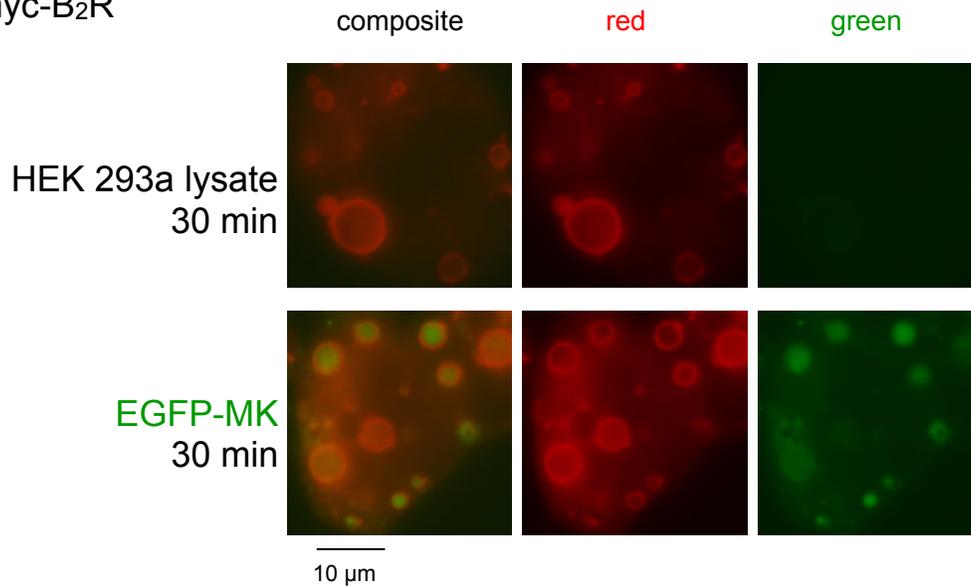
Des cellules HEK293a exprimant le récepteur myc-B₂R et la construction Rab₅^{GTP_{Locked}}-CherryFP ont été traitées (30 minutes, 37 °C) avec le lysat de cellules productrices de EGFP-MK (Figure 18A). La protéine de fusion s'est retrouvée séquestrée dans des endosomes géants caractéristiques de la construction Rab₅ constitutivement active. La protéine de haut poids moléculaire est donc internalisée par un mécanisme récepteur dépendant impliquant la protéine Rab₅ conformément à ce qui est rapporté dans la littérature au sujet de ce récepteur (Charest-Morin et coll., 2013). D'autres cellules, exprimant toujours le myc-B₂R ainsi que la construction Rab₇-CherryFP, ont à leur tour été stimulées par EGFP-MK (3-6 heures, 37 °C) (Figure 18B). La colocalisation de la protéine de fusion avec la construction Rabb₇-CherryFP après 6 h de stimulation suggère une progression de l'agoniste fluorescent vers les endosomes tardifs et les lysosomes.

2.5 Vérification de la spécificité des protéines de fusion EGFP-MK et PTH(1-34)-EGFP

Des expériences supplémentaires, rapportées dans la Figure 19, ont démontré l'absence d'internalisation non spécifique de l'une ou l'autre protéine de fusion (PTH(1-34)-EGFP ou EGFP-MK). Cela a été prouvé en stimulant des cellules exprimant le récepteur non correspondant avec la protéine de fusion en plus de les co-stimuler avec l'agoniste de ce récepteur. C'est-à-dire que EGFP-MK n'est pas internalisée lorsque le récepteur PTH₁R est stimulé par la PTH(1-34) synthétique. Cela veut aussi dire que PTH(1-34)-EGFP n'est pas internalisée lorsque myc-B₂R est stimulé par la BK.

A

Rab5-GTP-locked
+ myc-B₂R



B

Rab7
+ myc-B₂R
+ EGFP-MK

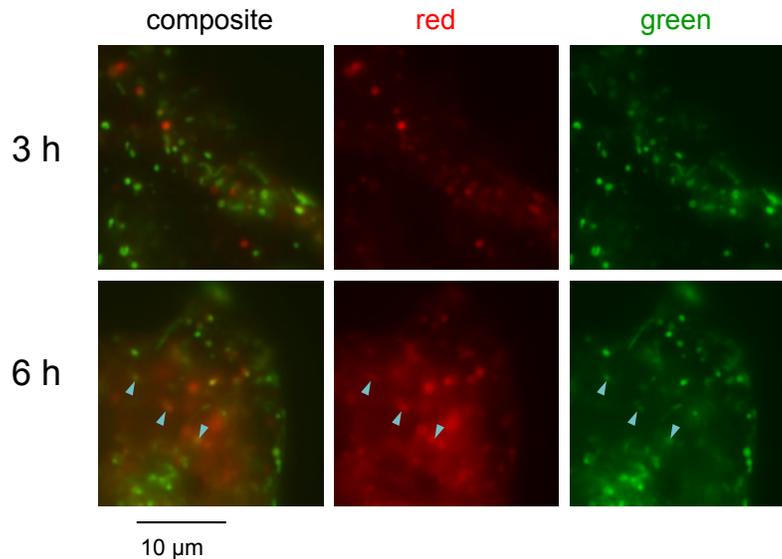


Figure 18. Études de colocalisation sur des cellules HEK293a co-exprimant le récepteur myc-B₂R et une construction formée d'une protéine Rab fusionnée à CherryFP.

(A) Colocalisation basée sur Rab5-GTP_{locked}-CherryFP. Les cellules ont été stimulées pendant 30 min avec le lysat de cellules exprimant EGFP-MK ou EGFP-C3.

(B) Colocalisation basée sur Rab7-CherryFP. La colocalisation est rare après 3 heures d'incubation mais est nettement plus présente après 6 heures (flèches).

Observation à 1000x.

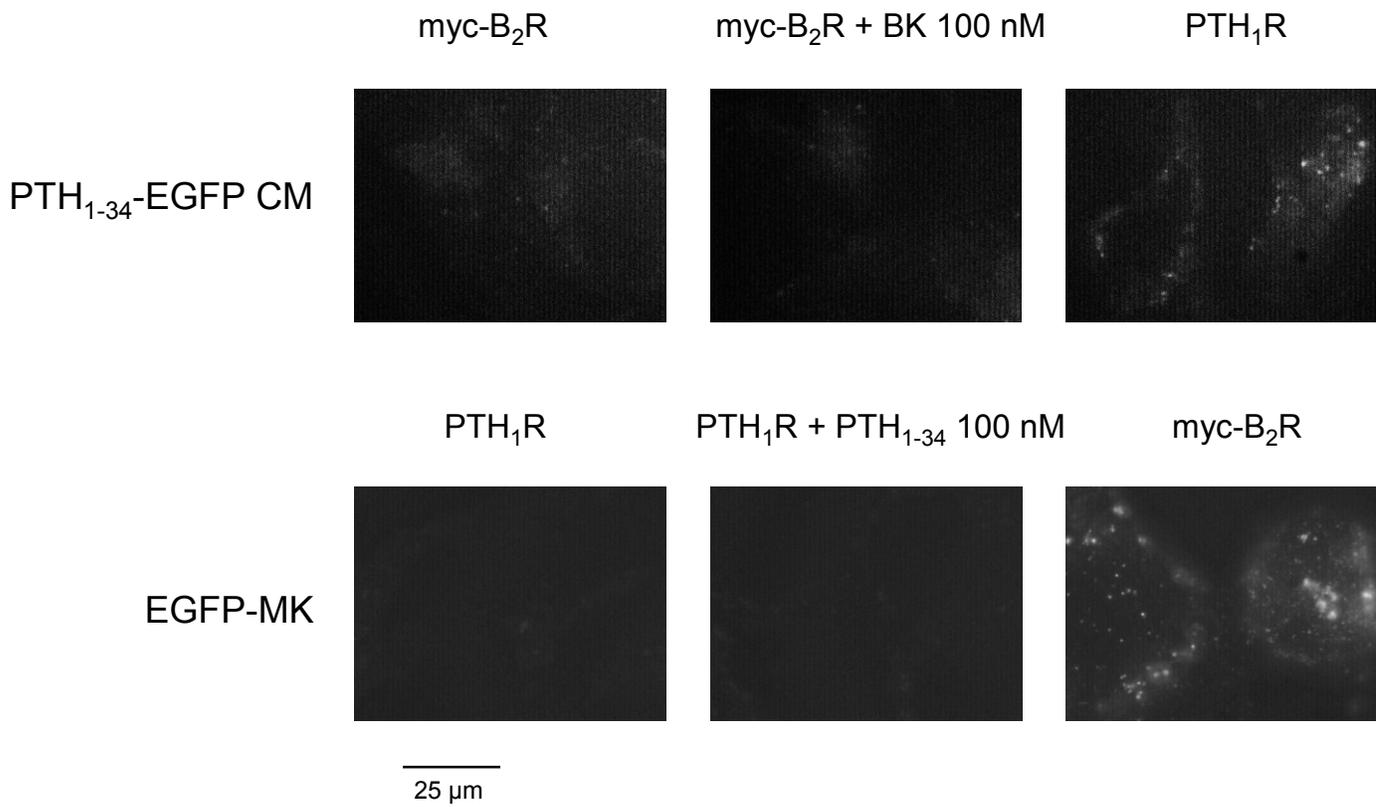


Figure 19. Absence d'internalisation des protéines de fusion fluorescentes par des cellules exprimant le récepteur non correspondant. Des cellules HEK293a exprimant le récepteur indiqué ont été stimulées pendant 30 minutes avec PTH(1-34)-EGFP, EGFP-MK ou le peptide correspondant non fluorescent (PTH(1-34) ou BK).

Cela confirme la spécificité des deux protéines de fusion et exclut la possibilité que l'internalisation soit non spécifique. L'internalisation non-spécifique fait référence à la pinocytose, à l'endocytose résultante de la présence résiduelle de réactif de transfection ou à l'internalisation de peptides «cell-penetrating».

3. Conception et caractérisation des protéines de fusions ligand du récepteur B₁ de la BK

Pour la conception d'un ligand pour le récepteur B₁ de la BK, une approche plus méthodique a été utilisée. Six protéines de fusion potentiellement ligand du B₁R ont été générées et évaluées pharmacologiquement (Figure 7). Ces protéines de fusions sont constituées de trois domaines. Le domaine GFP N-terminal, un *spacer* et un peptide ligand du B₁R. Deux peptides et quatre *spacers* ont été évalués. Les deux peptides sont soit la des-Arg⁹BK (P1) ou la [Leu⁸]des-Arg⁹BK (P2). Le premier *spacer* (S1) est composé de l'extension hydrophile de la maximakine (DLPKINRKGK). Le *spacer* S2 est lui aussi basé sur l'extension de la MK mais avec l'insertion un résidu lysine en C-terminal (DLPKINRKGPK). Les *spacers* S3 et S4 sont d'une toute autre nature. Il s'agit de plusieurs répétitions d'un dimère formé des résidus asparagine et glycine (NG_n) avec un résidu lysine en C-terminal. Le *spacer* S3 en compte 5 ((NG)₅K) alors que le S4 en compte 15 ((NG)₁₅K).

3.1 Affinité pour le B₁R des peptides candidats pour la génération de la protéine de fusion ligand du B₁R

La première étape, fut de déterminer qu'elle était la meilleure combinaison *spacer-peptide* (SxPy); c'est-à-dire quelle combinaison avait la meilleure affinité pour le récepteur B₁R (Figure 19). Pour ce faire, un essai de compétition de liaison basé sur le récepteur recombinant B₁R-FLAG et son ligand radioactif [³H]Lys-des-Arg⁹BK a été utilisé. La forme non-radioactive de la Lys-des-Arg⁹BK a efficacement compétitionné sa forme tritiée (IC₅₀ = 0,99 nM).

binding of 1 nM [³H]Lys-des-Arg⁹BK to B₁R-FLAG

n = 3

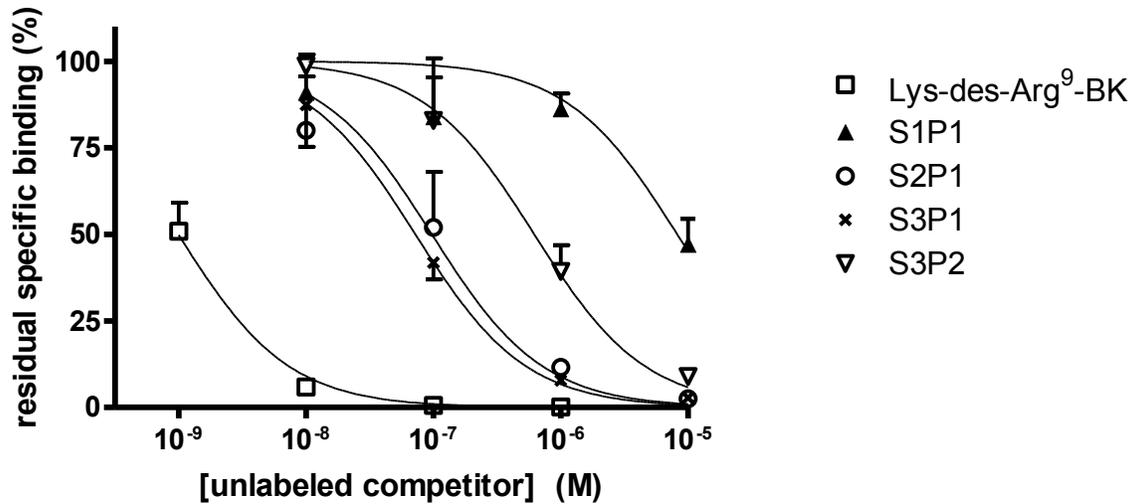


Figure 20. Compétition de la liaison de [³H] Lys-des-Arg⁹BK (1 nM) au récepteur B₁R-FLAG par différents peptides synthétiques (vérification de l'affinité de ces peptides afin de déterminer la meilleure combinaison pour la conception d'une protéine de fusion ligand du B₁R). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison maximale. L'affinité des différents peptides est rapportée dans la section résultats. Résultats représentatifs de 3 expériences.

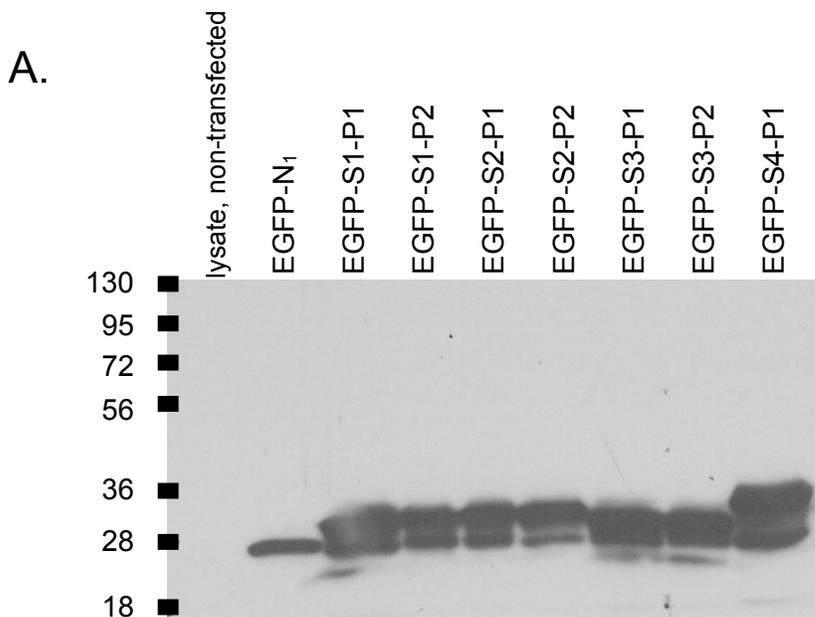
Les 4 peptides synthétiques prolongés en N-terminale sont caractérisés par des affinités variables. Le peptide S1P1 possédait une très faible affinité pour le récepteur (IC_{50} 8,24 μ M). L'ajout d'un résidu lysine en C-terminal de S1 (S2) a significativement augmenté l'affinité du peptide (S2P1 IC_{50} 97 nM). Toutefois, le meilleur compétiteur a été le peptide S3P1, avec un IC_{50} de 72 nM. La version antagoniste de ce peptide a cependant une affinité 8,6 fois plus faible pour le récepteur B_1 (S3P2 : IC_{50} 622 nM). Cette perte d'affinité est cohérente avec l'affinité pour le B_1R 4,8 fois inférieure de Lys[Leu⁸]des-Arg⁹BK par rapport à Lys-des-Arg⁹BK (Bastian et coll., 1997). La combinaison du *spacer* NG et du peptide agoniste semble être la plus prometteuse.

3.2 Validation de l'expression des différentes protéines de fusion ligand du récepteur B_1R

Suite à leur production, par la transfection transitoire de cellules HEK293a avec les vecteurs appropriés, les protéines de fusion présentes dans les différents lysats ont été identifiées par immunobuvardage grâce à un anticorps anti-GFP (1 μ L de lysat par puits; migration dans gel 9 %) (Figure 20). La bande supérieure représente la protéine de fusion. Le poids moléculaire de chaque construction a pu être évalué grâce à cette technique et cela a permis de confirmer l'identité de chacune. En effet, le poids moléculaire des protéines de fusion a varié de manière cohérente avec la combinaison *spacer*-peptide de chacune. Les lysats de ces cellules ont tous été dosés à l'aide d'un ELISA anti-GFP et les concentrations sont relativement constante (7,4-16 μ M).

3.3 Évaluation en microscopie des différentes protéines de fusion ligand du récepteur B_1R

Le lysat de cellules transfectées avec l'un ou l'autre des six vecteurs codant pour l'une des protéines identifiées dans la Figure 7 a été introduit dans le milieu de cellules HEK293a exprimant transitoirement le récepteur B_1R -FLAG (Figure 20). La forme des-Arg de la MK a échoué dans le marquage des cellules.



B. binding of 1 nM [³H]Lys-des-Arg⁹BK to hu B₁R-FLAG

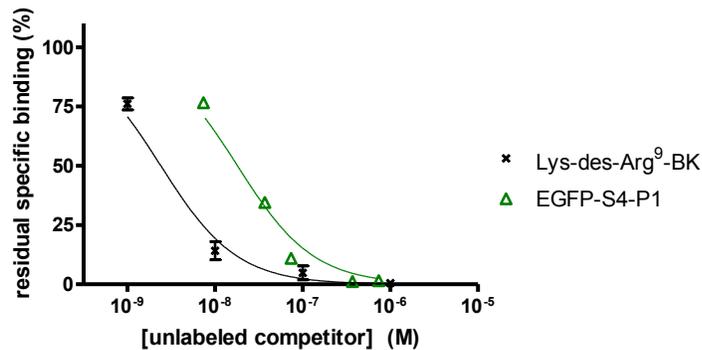


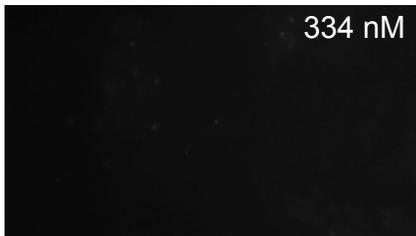
Figure 21. Propriétés des protéines de fusion ligand du récepteur B₁R.

(A) Immunobuvardage des lysats de cellules HEK293a exprimant transitoirement les protéines de fusion (1 μ L lysat/puits; migration dans un gel 9%) ou EGFP-N1 (GFP authentique, 27 kDa, 10 μ L lysat). Pour chaque piste, la bande supérieure principale est la bande correspondant au ligand GFP. Le poids observé des différentes protéines de fusion est cohérent avec la taille de l'insert (S1P1 : 2,02 kDa; S1P2 : 1,99 kDa; S2-P1: 2.15 kDa; S2-P2: 2.12 kDa; S3-P1: 1.89 kDa; S3-P2: 1.85 kDa; S4-P1: 3.79 kDa)

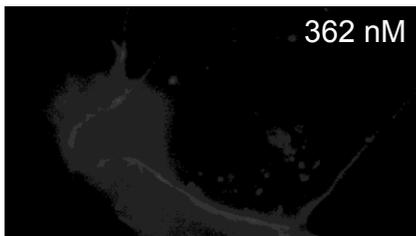
(B) Compétition de la liaison de [³H] Lys-des-Arg⁹BK (1 nM) au récepteur B₁R-FLAG par des concentrations croissantes de EGFP-S4P1. EGFP-S4P1 est la construction la plus puissante avec une affinité seulement 7,5 fois inférieure à Lys-des-Arg⁹-BK, le meilleur ligand du récepteur B₁. Présentation des résultats similaire à la Figure 19.

HEK 293a expressing hB₁R-FLAG
treated 30 min with lysate (1:40 or *1:100)

EGFP-S1-P1
(EGFP-maximakinin-des-Arg)



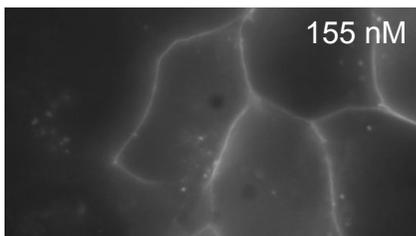
EGFP-S2-P1



EGFP-S2-P2



EGFP-S3-P1*



EGFP-S3-P2*



EGFP-S4-P1*

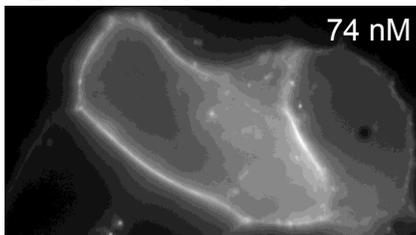


Figure 22. Test pour le marquage des membranes de cellules HEK293a exprimant transitoirement le récepteur B₁R-FLAG par les protéines de fusion ligand du récepteur B₁. Les cellules ont été stimulées avec les protéines de fusion pour 30 minutes à 37 °C. La concentration finale est indiquée dans le coin supérieur droit de chaque champ (concentration calculée à partir d'un ELISA GFP). Observation à 1000x.

Toutefois, l'insertion d'un résidu lysine entre le *spacer* et le peptide résulte dans la génération d'une protéine de fusion de très faible affinité pour le récepteur B₁R. En effet, un marquage très faible, mais visible, des cellules exprimant ce récepteur a été détecté lorsque celles-ci ont été stimulées par EGFP-S2P1. Le remplacement du *spacer* d'origine amphibienne par celui basé sur le dimère asparagine-glycine (EGFP-S3P1) cause un marquage intense des membranes plasmiques des cellules exprimant le B₁R. En effet, dans le cas d'un agoniste du B₁R, la fluorescence est membranaire alors qu'un agoniste B₂R comme EGFP-MK se redistribue au niveau endosomal. Le traitement des cellules avec l'une ou l'autre des constructions antagonistes (EGFP-S2P2 et EGFP-S3P2) n'a pas marqué les cellules. Cela est cohérent avec la perte d'affinité importante des peptides basés sur la version antagoniste constatée par les essais de compétition. La protéine de fusion basée sur un très long *spacer* (EGFP-S4P1; 15 répétitions du NG *spacer*) a généré le plus fort marquage des cellules et ce à la plus faible concentration.

3.4 Évaluation de la spécificité de la protéine de fusion EGFP-S4P1 pour le récepteur B₁R

Le profil pharmacologique de la protéine de fusion EGFP-S4P1 a été étudiée davantage. Des cellules HEK293a exprimant le récepteur B₁R-FLAG ont subies un prétraitement avec un antagoniste non peptidique spécifique au B₁R, le *compound 11* (Morissette et coll., 2004). Cet antagoniste, utilisé à une concentration de 100 nM, a complètement inhibé le marquage membranaire causé par EGFP-S4P1. De plus, la protéine de fusion ne se lie pas aux cellules n'exprimant pas le B₁R. La spécificité de EGFP-S4P1 pour le B₁R a été évaluée en vérifiant si cette protéine de fusion avait la capacité de se lier à d'autres cibles du système kinine-kallikréine. Des cellules transfectées soit avec la construction B₂R-CherryFP ou la construction ACE-CherryFP, n'ont pas été marquées par EGFP-S4P1. La présence du récepteur et de l'enzyme a été vérifiée par la présence d'une intense fluorescence rouge membranaire.

HEK 293a

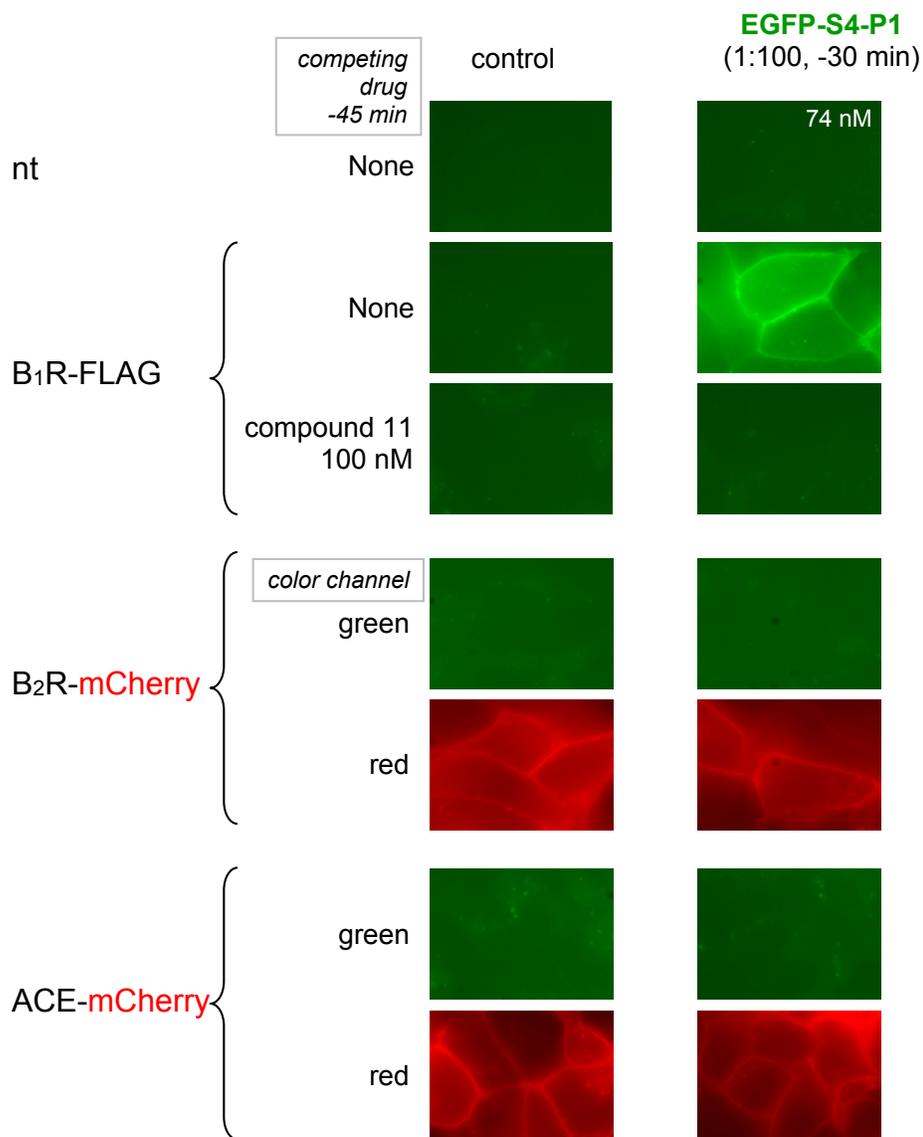


Figure 23. Caractérisation de la liaison de EGFP-S4P1 à différentes cibles moléculaires reliées au système kinine-kallikréine.

Haut : Compétition de la liaison de EGFP-S4P1 par le *compound 11*, un antagoniste non-peptidique du récepteur B₁.

Milieu : Absence de liaison de la protéine de fusion à des cellules exprimant transitoirement le récepteur B₂R-CherryFP.

Bas : Absence de la liaison de EGFP-S4P1 à des cellules exprimant transitoirement la forme membranaire de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE-CherryFP). La fusion de la protéine CherryFP à l'ACE ou au récepteur B₂ permet la confirmation visuelle de l'expression de ces deux protéines au niveau membranaire.

Étant donné le caractère prometteur de EGFP-S4P1, cette construction a été étudiée davantage. En effet, l'affinité de la protéine de fusion a été évaluée à l'aide d'un essai de compétition de liaison (Figure 20B). Cela a permis de déterminer que la protéine de fusion EGFP-S4P1 est seulement 7,5 fois moins puissante que la Lys-des-Arg⁹BK pour déplacer la forme tritiée de l'agoniste optimal du B₁R (Lys-des-Arg⁹BK). Cela indique que EGFP-S4P1 possède une affinité nanomolaire pour le récepteur B₁R.

DISCUSSION

Il a été démontré que les peptides ligands des récepteurs couplés aux protéines G de classe II peuvent être prolongés au niveau de leur extrémité C-terminale sans que cela ne les empêche d'activer leur cible (Fortin et coll., 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une protéine de fusion basée sur la GFP et comprenant la séquence de la PTH(1-34) à son extrémité N-terminale serait un agoniste du récepteur PTH₁R. En effet, selon notre hypothèse, cette protéine de fusion activerait le récepteur et serait internalisée par un mécanisme dépendant de l'endocytose de PTH₁R. Ces prévisions ont été largement confirmées à l'aide de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP. La protéine de 31 kDa est capable de stimuler le récepteur PTH₁R, phénomène vérifié par l'induction de c-Fos et par la production d'AMP_c, en plus d'être internalisée dans des structures endosomales uniquement chez les cellules exprimant le récepteur approprié. Les effets de PTH(1-34)-EGFP sont spécifiques et dépendent de la présence du récepteur PTH₁R. La protéine s-EGFP était inefficace pour la stimulation du récepteur tant pour l'induction de c-Fos que pour la production d'AMP_c et celle-ci n'était pas internalisée par le récepteur PTH₁R ni par aucun autre mécanisme. Ces résultats ont été obtenus malgré de nombreuses contraintes techniques. Ces contraintes étaient dues au système d'expression de la protéine de fusion. En effet, les milieux conditionnés issus des cellules productrices utilisées pour les expériences ne contenaient la protéine de fusion qu'en concentration nanomolaire. Même en utilisant les milieux conditionnés concentrés et dessalés, il était impossible de saturer la capture de la protéine de fusion. Le peptide PTH(1-34) est rapidement dégradé en présence de sérum (Seibel et coll., 1996), mais cela ne semble pas être le cas de la protéine de fusion PTH(1-34)-EGFP. En effet, la protéine de fusion retrouvée dans le milieu conditionné génère une bande uniforme dans une expérience d'immunobuvardage basée sur un anticorps anti-GFP. L'affinité de PTH(1-34)-EGFP pour le PTH₁R peut être estimée à l'aide de l'expérience basée sur la compétition de son internalisation par des doses croissantes de PTH(1-34) synthétique. L'affinité de la protéine de fusion pour son récepteur semble être du

même ordre que le peptide PTH(1-34), un peptide avec un EC_{50} se situant entre 10 et 100 nM (Nickols, 1985). PTH(1-34)-EGFP est un agoniste fluorescent du PTH₁R et peut être utilisé dans des expériences d'imagerie cellulaire. La protéine de fusion est internalisée dans des endosomes précoces Rab₅ positifs en accord avec la littérature sur ce sujet (Cupp et coll., 2013). Toutefois, il a été impossible d'étudier la colocalisation entre PTH(1-34)-EGFP et les arrestines. Cela est dû au fait que la protéine de fusion était en concentration trop faible et que la fluorescence émise n'était pas assez forte pour être détectée. Par la suite, il a été possible de détecter la colocalisation de la protéine de fusion avec des endosomes tardifs Rab₇ positifs. Il semblerait donc que PTH(1-34)-EGFP ait un destin différent de son récepteur. Le récepteur PTH₁R est rapidement recyclé à la membrane plasmique (Zelman-Femiak et coll., 2010) alors que la colocalisation avec Rab₇ suggère que la protéine de fusion sera dégradée au niveau des endosomes. Même 6 heures après le traitement des cellules avec le milieu conditionné, la fluorescence reste endosomale et n'est pas relâchée dans le cytosol. Des ligands de haut poids moléculaire de quelques GPCR de classe B ont été caractérisés par d'autres équipes. Par exemple, des protéines de fusion basées sur la séquence des immunoglobulines ainsi que sur celle de la substance P ou de la chimiokine CCL19 ont été rapportées dans la littérature (Otero et coll., 2006; Rizk et coll., 2009). Le récepteur PTH₁R est capable d'internaliser des cargos de très haut poids moléculaire, bien plus gros que la GFP (27 kDa). En effet, la PTH(1-84) prolongée en C-terminal par l'épitope myc (EQKLISEEDL) est capable de lier un anticorps anti-myc fluorescent (4A6-AF488) et de le transporter à l'intérieur d'une cellule exprimant PTH₁R (Charest-Morin et coll., 2014). L'internalisation du complexe ligand-anticorps (≈ 150 kDa) se fait par un mécanisme dépendant de l'activation du récepteur par la parathormone. Le récepteur PTH₁R peut transporter des cargos d'encore plus grandes tailles tels les Q-Dots. Les Q-Dots sont des nanomatériaux semi-conducteurs. Donc, des Q-Dots directement liés au PTH₁R ont été internalisés par un mécanisme récepteur-dépendant suite à la stimulation de celui-ci par un agoniste approprié (Zelman-Femiak et coll., 2010).

À l'aide du modèle de liaison actuel de la BK à son récepteur, il a été possible de générer un agoniste de haut poids moléculaire pour ce récepteur. Le modèle prédit que l'extrémité C-terminale de la BK interagit avec le récepteur laissant ainsi le domaine N-terminal libre dans le milieu extracellulaire. Cela est cohérent avec le fait que la MK possède une extension N-terminale qui lie et stimule le B₂R avec une affinité légèrement plus faible que celle de la BK (≈10 fois moins d'affinité; Bawolak et coll., 2012). Cela est beaucoup moins drastique que dans le cas des analogues de la bradykinine couplés à des fluorophores. Ceux-ci avaient perdu en moyenne près de 1000 fois d'affinité pour le B₂R comparativement à la BK (Gera et coll., 2012). Les résultats actuels suggèrent que l'extension hydrophile de la MK représente un *spacer* approprié entre la BK et un cargo de haut poids moléculaire tel la GFP pour la conception de ligands biotechnologique agoniste du récepteur B₂ de la BK. À l'aide de l'expérience de cytofluorométrie basée sur EGFP-MK, il a été possible d'estimer que l'affinité de la protéine de fusion est au moins aussi bonne, sinon meilleure, que celle de la MK. Toutefois, le dosage de la protéine de fusion s'est fait à l'aide d'un ELISA anti-GFP et peut-être que celui-ci sous-estime la concentration de EGFP-MK à cause de son extension N-terminale. La GFP est une protéine extrêmement stable dans les cellules de mammifères (Corish et Tyler-Smith, 1999) et il semblerait que la protéine de fusion EGFP-MK soit elle aussi protégée de la dégradation intracellulaire. Le lysat des cellules transfectées avec EGFP-MK contient une protéine de fusion pharmacologiquement active. De plus, celle-ci a une masse molaire cohérente avec celle calculée. EGFP-MK n'a aucun effet sur les cellules n'exprimant pas le récepteur B₂R et les effets de la protéine de fusion sont tous inhibés par le prétraitement avec l'antagoniste anatibant. Aussi, le fait que la protéine de fusion EGFP-S1P1, basée sur la des-Arg-MK, ne lit pas le récepteur B1 valorise la construction EGFP-MK, car la perte du résidu arginine C-terminal n'engendrerait pas un ligand spécifique à un autre récepteur. Tout cela confirme la spécificité de EGFP-MK pour le B₂R. La protéine de fusion est sélective pour ce récepteur car elle n'a pas interagi avec le récepteur B₁R ni avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine. EGFP-MK est donc une

sonde pour les récepteurs B₂ supérieure au peptide carboxyfluorescéine- ϵ -aminocaproyl-BK. Ce peptide liait tant le récepteur B₂R que l'ACE et ce à des concentrations similaires (Gera et coll., 2011). EGFP-MK ne lie pas l'ACE car la GFP est une protéine de haut poids moléculaire ce qui cause l'exclusion du site catalytique de la peptidase pour la protéine de fusion. Il semble surprenant que 12,6 nM de EGFP-génère une stimulation équivalente à celle de 100 nM de bradykinine dans l'expérience de l'induction de c-Fos. Toutefois, cela peut s'expliquer assez logiquement. En effet, la résistance à la dégradation de EGFP-MK par l'ACE et la dégradation extrêmement rapide de la BK dans le milieu de culture complet explique ce phénomène. Aussi, la protéine de fusion a un effet beaucoup plus durable sur l'induction de c-Fos que la BK comme on peut le voir après 3 heures. Cela s'explique par le fait que la MK cause une signalisation prolongée comparativement à la BK, car la MK serait résistante à la dégradation endosomale (Bawolak et coll., 2012). Tout comme PTH(1-34)-EGFP, EGFP-MK est internalisé dans des endosomes Rab₅ positifs et migrent vers des endosomes Rab₇ positifs. La protéine de fusion y sera probablement dégradée lorsque ceux-ci fusionneront avec des lysosomes. D'autres ligands du récepteur B₂ ont été rapportés capables de transporter des cargos de haut poids moléculaire. C'est le cas du peptide myc-KGP-B9972, formé de l'agoniste du récepteur B₂R résistant à la dégradation B9972 et de l'épitope myc (Gera et coll., 2013). Ce peptide est capable d'internaliser un anticorps anti-myc couplé à un fluorophore (4A6-Alexa-Fluor 488). Le récepteur B₂R, tout comme le récepteur PTH₁R, est capable d'internaliser des molécules de très hauts poids moléculaires. Une construction myc-B₂R a été capable d'internaliser des Q-dots liés à un anticorps anti-myc (Bawolak et coll., 2012).

Au cours de nos études sur les protéines de fusion ligand du récepteur B₁, nous avons conçu et caractérisé 6 protéines de fusions différentes. Nous avons commencé par évaluer l'affinité de la combinaison de certains *spacers* (S; S1-S4) et peptides (P; P1 ou P2) pour le récepteur B₁R. Cette étude nous a permis de confirmer que la lysine en N-terminale de la Lys-BK est essentielle pour que le

peptide ait une haute affinité pour son récepteur. De plus l'utilisation de la forme antagoniste du peptide (P2) entraîne une perte d'affinité de 10 fois, et il est préférable de travailler avec la forme agoniste (P1) qui a une meilleure affinité. La protéine de fusion du récepteur B₂ EGFP-MK, est basée sur le *spacer* de la maximakinine (S1) mais ce *spacer* ne semble pas convenir pour la génération d'un ligand pour le récepteur B₁. En effet, même lorsqu'on rajoute la lysine en N-terminal de la séquence de la Lys-BK, la protéine de fusion demeure un agoniste de faible affinité ne marquant les membranes cellulaires que de manière très faible. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers un autre *spacer* soit le *spacer* basé sur le dimère asparagine-glycine (NG). Nous avons conservé la lysine N-terminale de la Lys-BK car, comme démontré plus tôt, celle-ci est essentielle pour la haute affinité du ligand. Le *spacer* S3 est constitué de cinq répétitions du dimère NG et a permis de marquer les membranes de cellules exprimant le récepteur B₁R de manière significative avec des concentrations raisonnables. Cependant, nous croyions que l'encombrement stérique entre la GFP et le récepteur était un obstacle majeur dans l'obtention d'un ligand de haute affinité et c'est pourquoi nous avons généré une protéine de fusion avec un *spacer* 3 fois plus long (n=15). La protéine EGFP-S4P1 s'est révélée être un agoniste de haut poids moléculaire avec une affinité nanomolaire pour le récepteur B₁ de la bradykinine. En effet, l'essai de compétition de liaison a permis d'évaluer l'affinité de la construction. L'IC₅₀ de la protéine de fusion est seulement 7,5 fois inférieur à celui de la Lys-des-Arg⁹BK dans cet essai. Puisque les IC₅₀ sont proportionnels à l'affinité, il est possible d'estimer l'affinité de EGFP-S4P1. Si la Lys-des-Arg⁹BK a une affinité d'environ 0,2 nM, celle de EGFP-S4P1 se situe autour de 1,5 nM. C'est une affinité exceptionnelle considérant l'ampleur des modifications que le ligand endogène a subies. Cette prometteuse protéine de fusion a été ensuite identifiée dans le lysat de cellules productrices par immunobuvardage. Dans la même expérience, toutes les protéines de fusion générées ont aussi été identifiées. Chacune d'entre elles a été détectée à la hauteur correspondant au poids moléculaire approprié, confirmant une fois de plus la stabilité de la protéine GFP dans les cellules de mammifères. De plus, les résultats actuels suggèrent que la protéine de fusion EGFP-S4P1 est fortement

sélective pour le récepteur B₁ de la bradykinine. En effet, celle-ci n'a pas marqué les membranes de cellules exprimant soit le récepteur B₂R ou bien la peptidase ACE. Tout comme EGFP-MK, EGFP-S4P1 est probablement exclu du site catalytique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine en raison de la grande taille de la protéine de fusion. Il est aussi important de mentionner que EGFP-S4P1 offre une meilleure stabilité du fluorophore et une meilleure spécificité vis-à-vis sa cible que les petits peptides conjugués à un fluorophore précédemment rapporté (Bawolak et coll. 2009). Conformément aux connaissances actuelles, la protéine de fusion agoniste du récepteur B₁ n'est pas internalisée après avoir stimulé le récepteur. Ceci est dû à l'absence du domaine de phosphorylation, présent chez le récepteur B₂R, responsable du phénomène d'endocytose via les arrestines (Marceau et coll., 2013).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mes travaux de maîtrise ont permis de prouver que les récepteurs B₂R, B₁R et PTH₁R pouvaient lier et, dans certains cas, internaliser des ligands biotechnologiques de hauts poids moléculaire. Ces ligands ont été produits en fusionnant la GFP avec un ligand naturel de chacun de ces récepteurs. Pour ce faire, nous avons tenu compte des modèles de liaison de ces ligands à leur récepteur. En effet, il était crucial que la GFP soit positionnée en N-terminal pour le B₁R et le B₂R alors que la protéine fluorescente devait être en C-terminal pour le récepteur PTH₁R. De plus, dans certains cas, nous avons utilisé un *spacer* entre le ligand et la GFP afin de limiter l'encombrement stérique entre celle-ci et le récepteur. Dans ces expériences, la GFP a été utilisée car il s'agit d'une protéine extrêmement stable et qui est très facile à détecter grâce à sa fluorescence intrinsèque. Toutefois, mes travaux suggèrent que la GFP pourrait être remplacée par n'importe quelle autre protéine. De plus, les travaux réalisés sur les récepteurs B₂R et PTH₁R avec les agonistes fusionnés à l'épitope myc (Gera et coll., 2013; Charest-Morin et coll., 2014) ont démontrés que ces récepteurs pouvait internaliser des cargos de plus de 150 kDa. Donc, les ligands de ces récepteurs pourraient être fusionnés à pratiquement n'importe quelle protéine peu importe sa taille.

Par exemple, la séquence de la MK pourrait être fusionnée à l'albumine sérique humaine (HSA). Cela générerait un agoniste de haut poids moléculaire, qui lorsqu'administré de manière intraveineuse, ne pourrait sortir de la circulation du fait de son haut poids moléculaire. Cela pourrait avoir de nombreux effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire car en plus des propriétés hypotensives de la BK, cette hormone aurait aussi des propriétés anti-hypertrophiques, anti-agrégation et anti-athérosclérotiques (Heitsch, 2000). Les problèmes associés à l'administration de la bradykinine proviennent généralement de la stimulation de cibles extra-vasculaire comme les neurones sensoriels ou les cellules intestinales. Avec un agoniste comme HSA-MK, ces effets ne pourraient se produire car la protéine de fusion ne pourrait quitter le système vasculaire.

Cependant, de la par la nature des effets de la bradykinine (augmentation de la perméabilité vasculaire), il est possible que la protéine de fusion HSA-MK cause sa propre extravasation.

Un agoniste de haut poids moléculaire du récepteur PTH₁R pourrait lui aussi avoir des applications cliniques intéressantes. Par exemple, une protéine de fusion composée de la HSA ou de la chaîne lourde des immunoglobulines et du teriparatide pourrait être administrée localement au niveau des articulations. En effet, il a été démontré que la PTH(1-34) possède des propriétés chondro-régénératives (Sampson et coll., 2011). La régénération du cartilage est une stratégie intéressante pour le traitement de l'ostéoarthrose. L'avantage de cette stratégie, est que la protéine de fusion basée sur PTH(1-34) ne pourrait diffuser en dehors des articulations du fait de son très haut poids moléculaire.

La protéine de fusion EGFP-S4P1 possède de possibles applications directes. En effet, EGFP-S4P1 pourrait être utilisé afin de caractériser le rôle du récepteur B₁R dans le développement des crises d'angioedème héréditaire. Vu l'importance de la BK dans cette pathologie, une meilleure connaissance sur la contribution de ce récepteur permettrait une meilleure compréhension de cette maladie. Plusieurs groupes de recherches, dont celui du Dr Drouet de Grenoble et celui du Dr Zuraw de San Diego, nous ont approchés afin d'établir une collaboration pour ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, E., Glauser, M.P., Butler, T. (1997). *p55 Tumor Necrosis Factor Receptor Fusion Protein in the Treatment of Patients With Severe Sepsis and Septic Shock: A Randomized Controlled Multicenter Trial*. JAMA. 277(19): 1531-1538.

Anderson, J.G. (1998). *The caveolae membrane system*. Annu. Rev. Biochem. 67: 199-225.

Austin, C.E., Faussner, A., Robinson, H.E., Chakravarty, S., Kyle, D.J., Bathon, J.M., Proud, D. (1997). *Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells: characterization of ligand binding and effector pathways*. J. Biol. Chem. 272: 11420–11425.

Bachvarov, D.R., Houle, S., Bachvarova, M., Bouthillier, J., Adam, A., Marceau, F. (2001). *Bradykinin B2 receptor endocytosis, recycling and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297: 19–26.

Bastian, S., Loillier, B., Paquet, J.L., Pruneau, D. (1997) *Stable expression of human kinin B1 receptor in 293 cells: pharmacological and functional characterization*. Br. J. Pharmacol. 122: 393–399.

Bawolak, M.T., Gera, L., Morissette, G., Bouthillier, J., Stewart, J.M., Gobeil, L.A., Lodge, R., Adam, A., Marceau, F. (2009) *Fluorescent ligands of the bradykinin B₁ receptors: pharmacologic characterization and application to the study of agonist-induced receptor translocation and cell surface receptor expression*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 329: 159-68.

Bawolak, M.T., Gera, L., Morissette, G., Stewart, J.M., Marceau, F. (2007). *B-9972 (D-Arg-[Hyp3, Igl5, Oic7, Igl8]-bradykinin) is an inactivation-resistant agonist of the bradykinin B2 receptor derived from the peptide antagonist B-9430 (D-Arg-[Hyp3,Igl5, D-Igl7, Oic8]-bradykinin): pharmacologic profile and effective induction of receptor degradation*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 323: 534–546.

Bawolak, M.T., Lodge, R., Morissette, G., Marceau, F. (2011). *Bradykinin B receptor-mediated transport into intact cells: anti-receptor antibody-based cargoes*. Eur. J. Pharmacol. 668: 107–114.

Bawolak, M.T., Roy, C., Gera, L., Marceau, F. (2012). *Prolonged signalling and trafficking of the bradykinin B 2 receptor stimulated with the amphibian peptide maximakinin: insight into the endosomal inactivation of kinins*. Pharmacol. Res. 65: 247–253.

Birnbaumer, L., Rodbell, M. (1969). *Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors*. J. Biol. Chem. 244: 3477-3482.

Bhoola, R., Ramsaroop, R., Naidoo, S., Muller-Esterl, W., Bhoola, K.D. (1997). *Kinin receptor status in normal and inflamed gastric mucosa*. Immunopharmacology. 36: 161–165.

Bhoola, K., Ramsaroop, R., Plendl, J., Cassim, B., Dlamini, Z., Naicker, S. (2001). *Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer*. Biol. Chem. 382(1):77-89.#

Blind, E., Bambino, T., Nissenson, R. A. (1995). *Agonist-stimulated phosphorylation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein*. Endocrinology 136: 4271–4277.

Bockaert, J. (2012). *G-protein receptors: general features and activation mechanisms*. Bull. Acad. Natl. Med. 196(9): 1765-75.

Bokoch, G.M., Katada. T., Northup. J.K., Ui M., Gilman, A.G. (1984). *Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adénylate cyclase*. J. Biol. Chem. 259: 3560-3567.

Bossi, F., Peerschke, E.I., Ghebrehiwet, B., Tedesco, F. (2011). *Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability*. Immunol. Lett. 140: 7–13.

Blaukat, A., Pizard, A., Breit, A., Wernstedt, C., Alhenc-Gelas, F., Muller-Esterl, W., Dikic, I. (2001). *Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function*. J. Biol. Chem. 276: 40431–40440.

Bringhurst, F. R. (1989) *Calcium and phosphate distribution, turnover, and metabolic actions*. In: Endocrinology, edited by L. J. DeGroot. Philadelphia, PA: Saunders, 1989, p. 805–843.

Bringhurst, F., Stern, A. M., Yotts, M., Mizrahi, N., Segre, G., Potts, Jr., J. T. (1988). *Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo*. Am. J. Physiol. 255: E886–E893.

Burch, R.M., Axelrod, J. (1987). *Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 6374–6378.

Campbell, D.J. (2003). *The renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 35(6): 784-91.

Cardoso, J.C., Pinto, V.C., Vieira, F.A., Clark, M.S., Power, D.M. (2006). *Evolution of secretin family GPCR members in the metazoa*. BMC Evol. Biol. 6: 108.

Cassel, D., Sellinger, Z. (1976). *Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes*. Biochim. Biophys. Acta, 452: 538–551.

Charest-Morin, X., Fortin, J.P., Lodge, R., Allaey, I., Poubelle, P.E., Marceau, F. (2014). *A tagged parathyroid hormone derivative as a carrier of antibody cargoes transported by the G protein coupled PTH1 receptor*. Peptides. 60: 71-9.

Charest-Morin, X., Fortin, S., Lodge, R., Roy, C., Gera, L., C.-Gaudreault, R., Marceau, F. (2013). *Inhibitory effects of cytoskeleton disrupting drugs and GDP-locked Rab mutants on bradykinin B₂ receptor cycling*. Pharmacol. Res. 71: 44-52.

Charest-Morin, X., Raghavan, A., Charles, M.L., Kolodka, T., Bouthillier, J., Jean, M., Robbins, M.S., Marceau, F. (2015) *Pharmacological effects of recombinant human tissue kallikrein on bradykinin B₂ receptors*. Pharmacol. Res. Persp. Accepted.

Cheng, L., et B. Sacktor. (1981). *Sodium gradient-dependent phosphate transport in renal brush border vesicles*. J. Biol. Chem. 256: 1556–1564.

Chen, S.C., Tsai, M.H., Wang, H.J., Yu, H.S., Chang, L.W. (2007). *Involvement of substance P and neurogenic inflammation in arsenic-induced early vascular dysfunction*. Toxicol. Sci. 95(1): 82-8.

Chorev, M. (2002) *Parathyroid hormone 1 receptor: insights into structure and function*. Receptors Channels. 8: 219–42.

Codina, J., Hildebrandt, J.D., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R.D., Manclark, C.R. (1983). *Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an alpha beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4276-4280.

Collip, J.B. 1925, *The internal secretion of the parathyroid glands*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 11: 484–485.

Colman, R.W. (1996). *Inhibitory and antiadhesive properties of human kininogens*. Immunopharmacology. 32 :9–18.

Colman, R.W. (2006). *Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system*. Curr. Pharmaceutical Des. 12: 2599–607

Colman, R.W., Schmaier, A.H. (1997). *Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes*. Blood 90: 3819–43.

- Colman, R.W., Wu, Y., Liu, Y. (2010). *Mechanisms by which cleaved kininogen inhibits endothelial cell differentiation and signalling*. *Thrombosis Haemostasis*. 104: 875–885.
- Corish, P., Tyler-Smith, C. (1999). *Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells*. *Protein. Eng.* 12: 1035 – 1040.
- Cupp, M.E., Nayak, S.K., Adem, A.S., Thomsen, W.J. (2013). *Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide domains contributing to activation of different PTH receptor-mediated signaling pathways*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 345: 404 – 418.
- Das, S.S., Banker, G.A. (2006). *The role of protein interaction motifs in regulating the polarity and clustering of the metabotropic glutamate receptor mGluR1a*. *J. Neurosci.* 26: 8115–8125.
- Décarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., Adam, A. (1996) *Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat*. *Am. J. Physiol.* 273(1): C7-20
- de Weerd, W.F., Leeb-Lundberg, L.M. (1997). *Bradykinin sequesters B₂ bradykinin receptors and the receptor-coupled G α subunits G α_q and G α_i in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells*. *J. Biol. Chem.* 272: 17858–17866.
- Dobolyi, A., Palkovits, M., Usdin, T.B. (2010). *The TIP39-PTH2 receptor system: unique peptidergic cell groups in the brainstem and their interactions with central regulatory mechanisms*. *Prog. Neurobiol.* 90: 29–59.
- Enquist, J., Skroder, R.A., Whistler, J.L., Leeb-Lundberg, L.M. (2007). *Kinins promote B₂ receptor endocytosis and delay constitutive B₁ receptor endocytosis*. *Mol. Pharmacol.* 71(2): 494-507.
- Ewald, D.A., Pang, I.H., Sternweis, P.C., Miller, R.J. (1989). *Differential G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro*. *Neuron.* 2: 1185–1193.
- Faussner, A., Proud, D., Towns, M., Bathon, J.M. (1998). *Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B₁ and B₂ kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization and signal transduction*. *J. Biol. Chem.* 273: 2617–2623.
- Foord, S.M., Jupe, S., Holbrook, J. (2002). *Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors*. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 473–479.
- Fortin, J.-P., Bouthillier, J., Marceau, F. (2003). *High agonist-independent clearance of rabbit B₁ receptors on cultured cells*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H1647–H1654.

- Fortin, J.P., Chinnapen, D., Beinborn, M., Lencer, W.M., Kopin, A.S. (2011). *Discovery of dual-action membrane-anchored modulators of incretin receptors*. PLoS ONE 6: e24693.
- Fortin, J.P., Zhu, Y., Choi, C., Beinborn, M., Nitabach, M.N., Kopin, A.S. (2009). *Membrane-tethered ligands are effective probes for exploring class B1 G protein-coupled receptor function*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 8049–8054.
- Fridmanis, D., Fredriksson, R., Kapa, I., Schiöth, H.B., Klovins, J. (2006). *Formation of new genes explains lower intron density in mammalian Rhodopsin G protein-coupled receptors*. Mol. Phylogenet. Evol. 43: 864–880.
- Gera, L., Bawolak, M.T., Roy, C., Lodge, R., Marceau, F. (2011). *Design of fluorescent bradykinin analogs: application to imaging of B2 receptor-mediated agonist endocytosis and trafficking and of angiotensin converting enzyme*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 337: 33 – 41.
- Gera, L., Roy, C., Bawolak, M.T., Charest-Morin, X., Marceau, F. (2012). *N-terminal extended conjugates of the agonists and antagonists of both bradykinin receptor subtypes: structure-activity relationship, cell imaging using ligands conjugated with fluorophores and prospect for functionally active cargoes*. Peptides. 34: 433 – 446.
- Gera, L., Roy, C., Marceau, F. (2013). *Bifunctional epitope-agonist ligands of the bradykinin B2 receptor*. Biol. Chem. 394: 379 – 383.
- Gohla, A.S., Offermanns, S., Wilkie, T.M., Schultz, G. (1999). *Differential involvement of G α 12 and G α 13 in receptor-mediated stress fiber formation*. J. Biol. Chem. 274: 17901–17907.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O. (2009). *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nat. Met. 6: 343 – 345.
- Goddard, A.D., Watts, A. (2012). *Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol*. BMC Biol. 10: 27.
- Goeddel, D.V. (1979). *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 106–110.
- Glauser, D.A., Schlegel, W. (2007). *Sequential actions of ERK1/2 on the AP-1 transcription factor allow temporal integration of metabolic signals in pancreatic b cells*. FASEB. 21: 3240 – 3249.
- Gloriam, D.E., Schiöth, H.B., Fredriksson, R. (2005). *Nine new human Rhodopsin family G-protein coupled receptors: identification, sequence characterisation and evolutionary relation-ship*. Biochim. Biophys. Acta. 1722: 235–246.

Grosshans, B.L., Ortiz, D., Novick, P. (2006). *Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 11821 – 11827.

Gutowski, S., Smrcka, A., Nowak, L., Wu, D.G., Simon, M., Sternweis, P.C. (1991). *Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones*. J. Biol. Chem. 266: 20519–20524.

Haasemann, M., Cartaud, J., Müller-Esterl, W., Dunia, I. (1998). *Agonist-induced redistribution of bradykinin B₂ receptor in caveolae*. J. Cell. Sci. 111: 917–928.

Hansson, M.D., Rzeznicka, K., Rosenback, M., Hansson, M., Sirijovs.ki, N. (2008). *PCR-mediated deletion of plasmid DNA*. Anal. Biochem. 375: 373 – 375.

Hasan, A.A., Amenta, S., Schmaier, A.H. (1996). *Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of α -thrombin-induced platelet activation*. Circulation. 94(3): 517–528.

Hebert, T.E., Bouvier, M. (1998). *Structural and functional aspects of G-protein-coupled receptor oligomerization*. Biochem. Cell. Biol. 76: 1–11.

Hecquet, C., Tan, F., Marcic, B.M., Erdös, E.G. (2000). *Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases*. Mol. Pharmacol. 58: 828–836.

Heitsch, H. *Bradykinin B₂ receptor as a potential therapeutic target*. Drug. News. Perspect. 13: 213–225.

Hess, J.F., Borkowski, J.A., Macneil, T., Stonesifer, G.Y., Fraher, J., Strader, C.D., Ransom, R.W. (1994). *Differential pharmacology of cloned human and mouse B₂bradykinin receptors*. Mol. Pharmacol. 45: 1–8.

Higashida, H., Streaty, R.A., Klee, W., Nirenberg, M. (1986). *Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second messenger in NG108–15 neuroblastoma-glioma hybrid cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 942–946.

Hoare, S. R., Usdin, T. B. (2001). *Molecular mechanisms of ligand recognition by parathyroid hormone 1 (PTH1) and PTH2 receptors*. Curr. Pharm. Des. 7: 689–713.

Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R. (1988). *Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelat adsorbent*. Nat. Biotech. 6(11): 1321-1325.

- Hodgson, L., Qiu, W., Dong, C., Henderson, A.J. (2000) *Use of green fluorescent protein-conjugated beta-actin as a novel molecular marker for in vitro tumor cell chemotaxis assay*. *Biotechnol. Prog.* 16: 1106–14.
- Hopkins, A.L., Groom, C.R., (2002). *The druggable genome*. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1(9): 727-30.
- Jain, R.K., Joyce, P.B.M., Molinete, M., Halban, P.A., Gorr, S.U. (2001). *Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of the endocrine cells*. *Biochem. J.* 360: 645 – 649.
- Kashuba, E., Bailey, J., Allsup, D., Cawkwell, L. (2013). *The kinin–kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers*. *Biomarkers.* 18(4): 279-296.
- Kelly, E., Bailey, C.P., Henderson, G. (2008). *Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization*. *Br. J. Pharmacol.* 153(Suppl. 1): S379-S338.
- Kolakowski, L.F. (1994) *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. *Recept. Channels,* 2: 1–7.
- Koumbadinga, G. A., Désormeaux, A., Adam, A., Marceau, F. (2010). *Effect of interferon-g on inflammatory cytokine-induced bradykinin B1 receptor expression in human vascular cells*. *Eur. J. Pharmacol.* 647: 117–125.
- Kousteni, S., Bilezikian, J.P. (2008). *The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts*. *Curr. Osteoporos. Rep.* 6: 72 – 76.
- Kronenberg, H. M., Chung, U. I. (2001). *The parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog feedback loop in the growth plate*. *Novartis Found Symp.* 232: 144–152.
- Krupnic, J.G., Benovic, J.L., (1998). *The role of receptor kinase and arrestines in G protein-coupled receptor regulation*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 289-319.
- Lederberg, J. (1952). *Cell genetics and hereditary symbiosis*. *Physiol. Rev.* 32: 403–430.
- Leeb-Lundberg, L.M., Kang, D.S., Lamb, M.E., Mathis, S., Fathy, D.B. (2001). *The human B1 bradykinin receptor exhibits high ligand-independent, constitutive activity: roles of the third transmembrane and C-terminal domains*. *J. Biol. Chem.* 276: 8785–8792.
- Leeb-Lundberg, L.M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D.J., Zuraw, B.L. (2005). *International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences*. *Pharmacol. Rev.* 57: 27 – 77.

Leeb-Lundberg, L.M., Song, X.H., Mathis, S.A. (1994). *Focal adhesion-associated proteins p125 FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells*. J. Biol. Chem. 269: 24328–24334.

Liebmann, C., Graness, A., Ludwig, B., Adomeit, A., Boehmer, A., Boehmer, F.D., Nurnberg, B., Wetzker, R. (1996). *Dual bradykinin B2 receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a GS-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway*. Biochem. J. 313: 109–118.

Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990) *β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function*. Science. 248(4962): 1547-50.

MacDonald, R.J., Margolius, H.S., Erdos, E.G. (1988). *Molecular biology of tissue kallikrein*. Biochem. J. 253: 313–21.

MacNeil, T., Feighner, S., Hreniuk, D.L., Hess, J.F., Van der Ploeg, L.H. (1997). *Partial agonists and full antagonists at the human and murine bradykinin B1 receptors*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 75: 735–740.

Ma, J.-X., Wang, D.-Z., Ward, D.C., Chen, L., Trushna, D., Chao, J., Chao, L. (1994). *Structure and Chromosomal Localization of the Gene (BDKRB2) Encoding Bradykinin B₂ Receptor*. Genomics. 23(2): 362-369.

Malbrán, A., Riedl, M., Ritchie, B., Smith, W.B., Yang, W., Banerji, A., Hébert, J., Gleich, G.J., Hurewitz, D., Jacobson, K.W., Bernstein, J.A., Khan, D.A., Kirkpatrick, C.H., Resnick, D., Li, H., Fernández-Romero, D.S., Lumry, W. (2014). *Repeat treatment of acute hereditary angioedema attacks with open-label icatibant in the FAST-1 trial*. Clin. Exp. Immunol. 177(2): 544-53

Malecz, N., Bambino, T., Bencsik, M., Nissenson, R. A. (1998). *Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization*. Mol. Endocrinol. 12: 1846–1856.

Mallette LE. *Regulation of blood calcium in humans*. Endocrinol Metab Clin N Am. 1989;18:601-610.

Marceau, F., Bouthillier, J., Houle, S., Sabourin, T., Fortin, J.P., Morissette, G., Lodge, R., Fortin, S., C.-Gaudreault, R., Bawolak, M.T., Koumbadinga, G.A., Roy, C., Charest-Morin, X., Gera, L. (2013). *Bradykinin receptors: agonists, antagonists,*

expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. J. Angioedema 1(2): 9-17.

Marceau, F., Sabourin, T., Houle, S., Fortin, J.P., Petitclerc, E., Molinaro, G., Adam, A. (2002). *Kinin receptors : Functional aspects*. Int. Immunopharmacol. 2: 1729-39.

Marcondes, S., Antunes, E. (2005). *The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system*. Current Med. Chem. Cardiovas. Hematol. Agents. 3: 33-44.

Mathis, S.A., Criscimagna, N.L., Leeb-Lundberg, L.M.F. (1996). *B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca² signaling in single cultured vascular smooth muscle cells*. Mol. Pharmacol. 50: 128-139.

McDonald, P. H., Lefkowitz, R. J. (2001). *Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions*. Cellular Signalling 13: 683-689.

Medeiros, R., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Fernandes, E.S., Mori, M.A., Pesquero, J.B., Bader, M., Avellar, M.C., Campos, M.M., Calixto, J.B. (2004). *Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways*. Circ. Res. 94: 1375-1382.

Menke, J.G., Borkowski, J.A., Bierilo, K.K., MacNeil, T., Derrick, A.W., Schneck, K.A., Ransom, R.W., Strader, C.D., Linemeyer, D.L., Hess, J.F. (1994). *Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor*. J. Biol. Chem. 269: 21583-21586.

Mignery, G. A., Sudhof, T. C. (1990). *The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor*. EMBO. J. 9: 3893-3898.

Milligan, G., Kostenis, E., (2006) *Heterotrimeric G-protein: a short history*. Br. J. Pharmacol. 147: S46-S55.

Moreau, M.E., Dubreuil, P., Molinaro, G., Chagnon, M., Müller-Esterl, W., Lepage, Y., Marceau, F., Adam, A. (2005b). *Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effect of ACE inhibition and inflammation*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 315: 1065-74.

Moreau, M.E., Garbacki, N., Molinaro, G. (2005a). *The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets*. J. Pharmacol. Sci. 99: 6-38.

Morissette, G., Couture, J.P., Desormeaux, A., Adam, A., Marceau, F. (2008). *Lack of direct interaction between enalaprilat and the kinin B 1 receptors*. Peptides. 29: 606 - 612.

Morissette, G., Fortin, J.P., Otis, S., Bouthillier, J., Marceau, F. (2004) *A novel nonpeptide antagonist of the kinin B₁ receptor: effects at the rabbit receptor*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 311: 1121-1130.

Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T., Touhara, K. (2005). *Insect sex pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors*. Science 307: 1638 –1642.

Nemeth, E.F., Scarpa, A. (1987). *Rapid mobilization of cellular Ca²⁺ in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor*. J. Biol. Chem. 262: 5188–5196.

Nickols, G.A. (1985). *Increased cyclic AMP in cultured vascular smooth muscle cells and relaxation of aortic strips by parathyroid hormone*. Eur. J. Pharmacol. 116: 137 – 144.

Nguyen-Yamamoto, L., Rousseau, L., Brossard, J. H., Lepage, R., D'Amour, P. (2001). *Synthetic carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTH-related peptide receptor*. Endocrinology 142: 1386–1392.

Northup, J.K., Sternweis, P.C., Smigel, M.D., Schleifer, L.S., Ross, E.M., Gilman, A.G. (1980). *Purification of the regulatory component of adenylylate cyclase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 6516-6520.

Otero, C., Groettrup, M., Legler, D.F. (2006). *Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation*. J. Immunol. 177: 2314 – 2323.

Pal, K., Melcher, K., Xu, H.E. (2012). *Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by Class B G-protein-coupled receptors*. Acta. Pharmacol. Sin. 33: 300–311.

Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987). *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature (Lond). 327: 524–526.

Prabhu, Y., Eichinger, L. (2006). *The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors*. Eur. J. Cell Biol. 85: 937–946.

Prat, A., Biernacki, K., Saroli, T., Orav, J.E., Guttmann, C.R., Weiner, H.L., Khoury, S.J., Antel, J.P. (2005). *Kinin B₁ receptor expression on multiple sclerosis mononuclear cells: correlation with magnetic resonance imaging T₂-weighted lesion volume and clinical disability*. Arch. Neurol. 62(5): 795-800.

Pesquero, J.B., Lindsey, C.J., Zeh, K., Paiva, A.C., Ganten, D., Bader, M. (1994). *Molecular structure and expression of rat bradykinin B₂ receptor gene. Evidence for alternative splicing*. J. Biol. Chem. 269: 26920–26925.

Pruneau, D., Paquet, J.L., Luccarini, J.M., Defrêne, E., Fouchet, C., Franck, R.-M., Loillier, B., Robert, C., Bélichard, P., Duclos, H. (1999) *Pharmacological profile of LF16-0687, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist*. Immunopharmacology. 43: 187–194.

Qian, F., Leung, A., Abou-Samra, A. (1998). *Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor*. Biochemistry 37: 6240–6246.

Quinn, J. M., J. Elliott, M. T. Gillespie, T. J. Martin. (1998) *A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro*. Endocrinology. 139: 4424–4427.

Rasmussen, H., Craig, L.C. (1959) Purification of parathormone by use of countercurrent distribution. J. Am. Chem. Soc.81: 5003.

Regoli, D. et Barabé, J. (1980). *Pharmacology of bradykinin and related kinins*. Pharmacol. Rev. 32: 1–46.

Ricupero, D.A., Romero, J.R., Rishikof, D.C., Goldstein, R.H. (2000). *Des-Arg10-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA*. J. Biol. Chem. 275: 12475–12480.

Rizk, S.S., Luchniak, A., Uysal, S., Brawley, C.M., Rock, R.S., Kossiakoff, A.A. (2009). *An engineered substance P variant for receptor-mediated delivery of synthetic antibodies into tumor cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 11011 – 11015.

Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, H.M.J. (1971) *The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membrane of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action*. J. Biol Chem. 246: 1877-1882.

Robinson, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W. (1967). *Adenylyl cyclase as an adrenergic receptor*. Ann. NY Acad. Sci. 139: 703.

Ross, E.M, Gilman, A.G. (1977). *Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity*. J. Biol. Chem. 253: 6966-6969.

Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D.R., Marceau, F. (2002). *Agonist-induced translocation of the kinin B1 receptor to caveolae-related rafts*. Mol. Pharmacol. 61: 546–553.

Sainz, I.M., Pixley, R.A., Colman, R.W. (2007). *Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology*. *Thrombosis Haemostasis*. 98: 77–83.

Sampson, E.R., Hilton, M.J., Tian, Y., Chen, D., Schwarz, E.M., Mooney, R.A., Bukata, S.V., O'Keefe, R.J., Awad, H., Puzas, J.E., Rosier, R.N., Zuscik, M.J. (2011). *Teriparatide as a chondroregenerative therapy for injury-induced osteoarthritis*. *Sci. Transl. Med.* 3:101ra193.

Schanstra, J.P., Bataille, E., Marin Castano, M.E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J.B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J.P., Bascands, J.L. (1998). *The B1-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts*. *J. Clin. Invest.* 101: 2080–2091.

Schneider, H., Feyen, J. H. M., Seuwenm, K. (1994). *A C-terminally truncated human parathyroid hormone receptor is functional and activates multiple G proteins*. *FEBS Letters* 351: 281–285.

Schulte, S. (2008). *Use of albumin fusion technology to prolong the half-life of recombinant factor VIIa*. *Thromb. Res.* 122: S14-S19.

Schwindinger, W. F., Fredericks, J., Watkins, L., Robinson, H., Bathon, J. M., Pines, M., Suva, L. J., Levine, M. A. (1998). *Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of Gs, Gq/11, and Gi(1) by [alpha-32P]GTP-gamma-azidoanilide photoaffinity labeling*. *Endocrine* 2: 201–209.

Seibel, M.W., Lade, D.A., Hartke, J.R., Wehmeyer, K.R. (1996). *Validation and application of an immunoradiometric assay for the determination of human parathyroid hormone fragment 1-34 in dog plasma following subcutaneous and intravenous injection*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 1699 – 1707.

Segre, G., D'Amour, P., Hultman, A., Potts, Jr., J. T. (1981). *Effects of hepatectomy, nephrectomy, and nephrectomy/uremia on the metabolism of parathyroid hormone in the rat*. *J. Clin. Invest.* 67(2): 439–448.

Shiga, Y., Tanaka-Matakatsu, M., Hayashi, S. (1996). *A nuclear GFP-galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living Drosophila*. *Dev. Growth Differ.* 38: 99–106.

Shimomura O., Johnson F.H., Saiga, Y. (1962). *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223–239.

Smith, H.O., Wilcox, K.W. (1970). *A restriction enzyme from Hemophilus influenzae: I. Purification and general properties*. *J. Mol. Biol.* 51: 379–391.

Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Butcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M. (1994). *Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis*. EMBO. J. 13: 1287 – 1296.

Strewler, G. J. (2000). *The parathyroid hormone-related protein*. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 29: 629–645.

Syme, C. A., Friedman, P. A., Bisello, A. (2005). *Parathyroid Hormone Receptor Trafficking Contributes to the Activation of Extracellular Signal-regulated Kinases but Is Not Required for Regulation of cAMP Signaling*. J. Biol. Chem. 280: 11281–11288

Tawfeek, H. A. W., Qian, F., Abou-Samra, A. B. (2002). *Phosphorylation of the receptor for PTH and PTHrP is required for internalization and regulates receptor signaling*. Mol. Endocrinol. 16: 1–13.

Tian, J., Smogorzewski, M., Kedes, L., Massry, S. (1993). *Parathyroid hormone-parathyroid hormone related protein receptor messenger RNA is present in many tissues besides the kidney*. American Journal of Nephrology 13: 210–213.

Urena, P., Kong, X. F., Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Kronenberg, H. M., Pott, J. T., Segre, G. V. (1993). *Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues*. Endocrinology 133: 617–623.

Usdin, T.B., Gruber, C., Bonner, T.I. (1995) *Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor*. J. Biol. Chem. 270: 15455–15458.

van der Lee, M.M., Verkaar, F., Wat, J.W., van Offenbeek, J., Timmerman, M., Voorneveld, L., van Lith, L.H., Zaman, G.J. (2013). *β -Arrestin-biased signaling of PTH analogs of the type 1 parathyroid hormone receptor*. Cell. Signal. 25: 527–538.

Vavrek, R.J., Stewart, J.M. (1985). *Competitive antagonists of bradykinin*. Peptides. 6: 161–164.

Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., Michaud, A., Corvol, P., Clauser, E. (1991). *Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes*. J. Biol. Chem. 266: 5540 – 5546.

Weiss, B., Richardson, C.C. (1967). *Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme*

system from Escherichia coli infected with T4 bacteriophage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57: 1021–1028.

Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Miyamoto, Y., Nakagawa, T., Miyakawa, K., Muller-Esterl, W., Maeda, H. (2002). *Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues*. Int. J. Cancer. 98 :29–35.

Wu, T. L., Vasavada, R. C., Yang, K., Massfelder, T., Ganz, M., Abbas, S. K., Care, A. D., Stewart, A. F. (1996). *Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein*. The Journal of Biological Chemistry 271: 24371–24381.

Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. I. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, T. Suda. (1998). *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 3597–3602.

Zelman-Femiak, M., Wang, K., Gromova, K.V., Knaus, P., Harms, G. (2010). *Covalent quantum dot receptor linkage via the acyl carrier protein for single-molecule tracking, internalization, and trafficking studies*. Biotechniques 49: 574 – 579.

Zhang, M., Turnbaugh, D., Cofie, D., Dogan, S., Koshida, H., Fugate, R., Kem, D.C., (1996). *Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization*. Hypertension. 27(2): 269-75.

ANNEXE I

Articles originaux revus par les pairs

Charest-Morin, X., Raghavan, A., Charles, M.L., Kolodka, T., Bouthillier, J., Jean, M., Robbins, M.S., Marceau, F. (2015) *Pharmacological effects of recombinant human tissue kallikrein on bradykinin B₂ receptors*. Pharmacol. Res. Persp. Accepted

Charest-Morin, X., Fortin, S., Lodge, R., Roy, C., Gera, L., C-Gaudreault, R., Marceau, F. (2013). *Inhibitory effects of cytoskeleton disrupting drugs and GDPlocked Rab mutants on bradykinin B₂ receptor cycling*. Pharmacol. Res, 71: 44-52. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.02.007

Charest-Morin, X., Fortin, JP., Bawolak, MT., Lodge, R., Marceau, F. (2013). *Green fluorescent protein fused to peptide agonists of two dissimilar G protein-coupled receptors: novel ligands of the bradykinin B₂ (rhodopsin family) receptor and parathyroid hormone PTH1 (secretin family) receptor*. Pharmacol. Res. Perspect. 1:e00004. DOI: 10.1002/prp2.4

Gera, L., Roy, C., Charest-Morin, X., Marceau, F. (2013). *Vasopeptidase-activated latent ligands of the histamine receptor-1*. Int. Immunopharmacol. 17:667-683. DOI:10.1016/j.intimp.2013.08.014

Charest-Morin, X., Pépin, R., Gagné-Henley, A., Morissette, G., Lodge, R., Marceau, F. (2013). *C-C chemokine receptor-7 mediated endocytosis of antibody cargoes into intact cells*. Front. Pharmacol. 4:122. DOI:10.3389/fphar.2013.00122

Charest-Morin, X., Roy, C., Fortin, EJ., Bouthillier, J., Marceau, F. (2014). *Pharmacological evidence of bradykinin regeneration from extended sequences that behave as peptidase-activated B₂ receptor agonists*. Front. Pharmacol. 5: 32. DOI:10.32389/fphar.2014.00032

Charest-Morin, X., Fortin, JP., Lodge, R., Allaey, I., Poubelle, PE., Marceau, F. (2014). *A tagged parathyroid hormone derivative as a carrier of antibody cargoes transported by the G protein coupled PTH1 receptor*. Peptides. 60: 71-79. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.09.001

Articles de revue, revus par les pairs

Gera, L., Roy, C., Bawolak, MT., Charest-Morin, X., Marceau, F. (2012) *N-terminal extended conjugates of the agonists and antagonists of both bradykinin receptor subtypes: structure-activity relationship, cell imaging using ligands conjugated with fluorophores and prospect for functionally active cargoes*. Peptides, 34: 433-446 [refereed review article containing a large proportion of original data]. DOI:10.1016/j.peptides.2012.02.007

Marceau, F., Bouthillier, J., Houle, S., Sabourin, T., Fortin, JP., Morissette, G., Lodge, R., Fortin, S., C.-Gaudreault, R., Bawolak, MT., Koumbadinga, G.A., Roy, C., Charest-Morin, X., Gera, L. (2013). *Bradykinin receptors: agonists, antagonists, expression, signaling and adaptation to sustained stimulation*. J. Angioedema 1: 9-17. www.journalofangioedema.com/Issues/December/2013.htm