



**LIGANDS BIOTECHNOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX
PROTÉINES G : VERS DES APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES OU
THÉRAPEUTIQUES**

Thèse

Xavier Charest-Morin

Doctorat en médecine expérimentale
Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Québec, Canada
© Xavier Charest-Morin, 2018

**LIGANDS BIOTECHNOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX
PROTÉINES G : VERS DES APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES OU
THÉRAPEUTIQUES**

Thèse

Xavier Charest-Morin

Sous la direction de :

François Marceau, directeur de recherche

RÉSUMÉ DU PROJET DE RECHERCHE

Problématiques : 1) Mes travaux de maîtrise ont démontré qu'il était possible de fusionner des hormones peptidiques avec la protéine fluorescente verte (EGFP) pour obtenir des ligands de haute affinité avec un haut poids moléculaire supportant des expériences d'imagerie. Cela a permis de détecter les deux récepteurs de la bradykinine (BK; B₁R et B₂R) ainsi que le récepteur PTH₁ de la parathormone (PTH, PTH₁R), trois récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Malgré la haute affinité de ces sondes, les applications restent limitées à des systèmes surexprimant le récepteur cible recombinant. Cela s'explique par les deux raisons suivantes : a) la faible abondance des récepteurs endogènes et b) le faible rendement de la fluorescence. 2) La génération de ligands de haut poids moléculaire et la démonstration que ceux-ci avaient toujours une activité pharmacologique pourrait permettre de résoudre une problématique majeure reliée à l'administration thérapeutique de BK. Malgré l'accumulation de preuves du rôle protecteur de la BK sur le système vasculaire, les récepteurs de la BK sont des cibles pharmacologiques quasi inexploitées, car les effets délétères causés par les agonistes de la BK, notamment au niveau de l'inflammation et de la génération de douleur, semblent limiter leur développement.

Objectifs : 1) Étudier la pharmacologie de la maximakinine (MK), un analogue de la BK, et le potentiel de ce peptide comme module conférant l'affinité au récepteur B₂ dans la conception de ligands biotechnologiques. 2) Générer des protéines de fusion ligands des deux principales familles de GPCRs (A : B₂R; B : PTH₁R). 3) Utiliser ces protéines de fusion pour permettre la détection de faibles niveaux de récepteurs difficilement détectables par les stratégies conventionnelles. 4) Évaluer l'activité pharmacologique de ces protéines de fusion.

Résultats : Deux des trois protéines de fusion PTH générées (PTH-myc et PTH-HRP) sont capables de détecter de manière spécifique les niveaux endogènes de PTH₁R exprimés par les cellules HOS (ostéosarcome humain) grâce à leur domaine peroxydase intrinsèque ou assemblé. La protéine de fusion PTH-HRP est la plus prometteuse, et peut aussi être utilisée comme ligand non-isotopique dans un essai de compétition de liaison pour identifier de nouveaux ligands du PTH₁R humain. La MK est un agoniste direct du récepteur B₂ de rat, mais n'a qu'une affinité marginale pour le récepteur B₂ humain. L'essai de contractilité de la veine ombilicale humaine a démontré que la MK était une pro-drogue pour le B₂R humain, activée par des peptidases présentes dans ce tissu. La MK ne stimule pas la dégranulation des mastocytes *via* le récepteur MRGPRX2, malgré sa forte charge positive. Chez le rat, la MK est un agoniste persistant, résistant à la dégradation et de haute affinité pour le B₂R. La protéine de fusion fluorescente EGFP-MK est un agoniste spécifique du B₂R de rat, mais pas du B₂R humain. Des études *in vitro* ont démontré qu'elle était aussi un agoniste persistant de haute affinité pour le B₂R de rat. La protéine de fusion avec domaine peroxydase APEX2-(NG)₁₅-MK permet la détection du récepteur B₂ de rat recombinant de manière spécifique et efficace. De plus cette protéine de fusion peut être utilisée comme ligand non-isotopique dans des essais de compétition de liaison pour identifier de nouveaux ligands du B₂R de rat. Il est possible de générer des protéines de fusion contenant la MK agoniste du B₂R de rat de très haut poids moléculaire (>66 kDa), mais ceux-ci peuvent avoir une activité pharmacologique limitée par l'encombrement stérique entre la protéine de fusion et le récepteur.

Conclusions et perspectives : Il est possible de générer des protéines de fusion avec des domaines enzymatiques agonistes des récepteurs B₂ et PTH₁. Cela permet une amplification significative du signal émis par les

protéines de fusion comparativement aux protéines de fusion fluorescentes. La détection des niveaux endogènes de GPCRs par des protéines de fusion pourrait permettre de les utiliser dans des tests diagnostiques. Ces travaux, qui ont démontré qu'il était possible de générer des ligands biotechnologiques de haut poids moléculaire agonistes des principales classes de GPCRs (A et B), pourraient être appliqués aux autres ligands membres de ces familles en accord avec les modèles de liaisons de chaque ligand.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ DU PROJET DE RECHERCHE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
ABRÉVIATIONS	xii
REMERCIEMENTS.....	xiv
INTRODUCTION	1
1. Les récepteurs couplés aux protéines G	1
1.2 Les protéines G.....	2
1.3 Structure des GPCRs	4
1.4 Classes de GPCRs	4
1.4.1 GPCRs de classe A	4
1.4.2 GPCRs de classe B	4
1.4.3 GPCRs de classe C, D, E, F et O	5
1.5 Désensibilisation des GPCRs	5
1.5.1 Désensibilisation homologue.....	5
1.5.2 Désensibilisation hétérologue.....	6
2. Les récepteurs de la bradykinine	7
2.1 Le système kinine-kallikréine.....	7
2.1.1 Les kininogènes	8
2.1.2 Les kallikréines.....	8
2.1.3 Les kinines.....	10
2.1.4 Métabolisme des kinines	10
2.2 Le récepteur B ₁ de la bradykinine	11
2.2.1 Ligands du récepteur B ₁	11
2.2.2 Régulation du B ₁ R.....	12
2.2.3 Signalisation par le récepteur B ₁	13
2.2.4 Localisation du récepteur B ₁	14
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	17
2.4 Le système kinine-kallikréine en pathologie	17
3. Le récepteur de la parathormone 1 (PTH₁R)	19
3.1 La parathormone (PTH)	19
3.1.1 Effets de la parathormone.....	19
3.1.2 Régulation de la sécrétion de la PTH	20
3.2 Le récepteur de la parathormone PTH ₁	21
3.2.1 Les ligands du récepteur PTH ₁	22
3.2.2 Régulation du récepteur PTH ₁	23
3.2.3 Signalisation par le PTH ₁ R.....	24

3.2.4 Localisation du récepteur PTH ₁	24
3.3 Implications de la PTH et du PTH ₁ R en pathologie.....	24
4. La génération de ligands biotechnologiques	25
5. Problématiques et objectifs du projet de recherche	28
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	31
1. Matériel.....	31
1.1 Culture cellulaire	31
1.2 Vecteurs	31
1.2.1 Construction des vecteurs B ₂ R et myc-B ₂ R humains.....	31
1.2.2 Construction des vecteurs B ₂ R et myc-B ₂ R de rat	33
1.2.2 Construction du vecteur EGFP-MK	33
1.2.3 Construction du vecteur APEX2-(NG) ₁₅ -MK.....	34
1.2.4 Construction des vecteurs codants pour les protéines de fusion basées sur la HSA ...	34
1.2.5 Construction des vecteurs codants pour les protéines de fusion agonistes du PTH ₁ R	37
1.3 Agents pharmacologiques.....	38
2. Méthodes	38
2.1 Transfections	38
2.2 Production des protéines de fusion.....	39
2.2.1 Production des protéines de fusion non-sécrétées	39
2.2.2 Production des protéines de fusion sécrétées	42
2.2.3 Validation de l'identité des protéines de fusion par immunobuvardage	43
2.2.4 Dosage des protéines de fusion	44
2.3 Microscopie	44
2.3.1 Microscopie à fluorescence	44
2.3.2 Détection optique des protéines de fusion avec domaine peroxydase liées à leur	
récepteur cible.....	46
2.4 Essais de liaison de la [³ H]BK à son récepteur	46
2.4.1 Essais de saturation.....	47
2.4.2 Essais de compétition	47
2.5 Évaluation de l'activité pharmacologique des protéines de fusion	48
2.5.1 Mobilisation calcique	48
2.5.2 Évaluation de l'accumulation d'AMP cyclique par ELISA	49
2.5.3 Immunobuvardages anti-c-Fos	49
2.6 Cytométrie en flux (FACS)	50
2.7 Quantification de l'activité enzymatique des protéines de fusion avec domaine	
peroxydase liées à leur récepteur cible	50
2.7.1 Détection chimiluminescente	50
2.7.2 Détection colorimétrique	51
2.8 Essais de contractilité de la veine ombilicale humaine	51
2.9 Essais <i>in vivo</i>	52
2.9.1 Mesure des effets hémodynamiques <i>in vivo</i> de divers stimulants.....	53
2.9.2 Mesure par effet Doppler des effets hémodynamiques au niveau des membres	
postérieurs chez le rat anesthésié.....	54
2.10 Étude du métabolisme de la MK par chromatographie liquide couplé à de la	
spectrométrie de masse (LC-MS).....	54
2.11 Analyse statistique.....	55
RÉSULTATS	56

1. Caractérisation des protéines de fusion agonistes du récepteur PTH₁ de la parathormone	56
1.1 Validation de l'expression des différentes protéines de fusion	58
1.2 Caractérisation de l'activité pharmacologique des différentes protéines de fusion PTH	60
1.2.1 Induction de c-Fos par les protéines de fusion PTH.....	60
1.2.2 Stimulation de la production d'AMP _c par PTH-myc et PTH-HRP	62
1.3 Adaptation du ligand PTH-myc pour l'étude de l'internalisation du récepteur PTH ₁ ...	66
1.3.1 Étude de l'internalisation du récepteur PTH ₁	66
1.3.2 Étude de colocalisation de la protéine de fusion avec des marqueurs du système endosomal.....	69
1.4 Détection des populations endogènes de PTH ₁ Rs à l'aide de PTH-myc par immunohistochimie	73
1.5 Détection du PTH ₁ R à l'aide de l'activité enzymatique des protéines de fusion PTH ..	75
1.5.1 Détection du PTH ₁ R à l'aide du domaine enzymatique recruté par PTH-myc	75
1.5.2 Détection du PTH ₁ R à l'aide de la protéine de fusion PTH-APEX2	79
1.5.3 Détection du PTH ₁ R à l'aide de la protéine de fusion PTH-HRP	82
2. Études sur la MK : Caractérisation <i>in vivo</i> et potentiel comme ligand en position C-terminale de protéines de fusion.....	91
2.1 Validation des nouvelles constructions myc-B ₂ R humain et myc-B ₂ R de rat.....	91
2.2 Affinité de la MK pour les récepteurs myc-B ₂ humain ou de rat.....	93
2.3 Activité pharmacologique <i>in vitro</i> de la MK.....	93
2.4 Essai de contractilité de la veine ombilicale humaine isolée appliqué à la MK.....	97
2.5 Identification des peptides générés par l'activation métabolique de MK par LC-MS .	102
2.6 Réponses hémodynamiques <i>in vivo</i> à la MK.....	102
2.7 Caractérisation supplémentaire d'EGFP-MK en tant que modèle pour une protéine de fusion ligand du B ₂ R	108
2.7.1 Évaluation de l'internalisation d'EGFP-MK par les récepteurs hu et rt myc-B ₂ Rs ..	108
2.7.2 Études de la signalisation et de la localisation tardives d'EGFP-MK (30 minutes à 24 heures)	112
2.8 Étude de la protéine de fusion APEX2-(NG) ₁₅ -MK.....	115
2.8.1 Caractérisation de l'activité pharmacologique d'APEX2-(NG) ₁₅ -MK	115
2.8.2 Détection du rt myc-B ₂ R avec APEX2-(NG) ₁₅ -MK	119
2.9 Génération et évaluation de protéines de fusion de haut poids moléculaire basées sur la HSA	124
2.9.1 Relation structure activité des analogues de la BK prolongés en position N-terminale	124
2.9.2 Production, purification et caractérisation pharmacologique des protéines de fusion HSA sécrétées.....	126
2.9.3 Production, purification et caractérisation de la forme cytosolique de HSA-MK.....	127
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	134
1. Protéines de fusion ligand du récepteur PTH₁ de la parathormone.....	134
2. Protéines de fusion ligands du récepteur B₂ de la BK.....	141
BIBLIOGRAPHIE	152
ANNEXE I.....	178

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Affinité des kinines pour le récepteur B ₁ de la BK	13
Tableau 2. Affinité des kinines pour le récepteur B ₂ de la BK	15
Tableau 3. Affinité de différents ligands du récepteur PTH ₁ humain	23
Tableau 4. Vecteurs	32
Tableau 5. Agents pharmacologiques.....	38
Tableau 6. Anticorps utilisés pour les immunobuvardages.....	44
Tableau 7. Paramètres cardiovasculaires de base chez les rats anesthésiés suite au pré-traitement	102

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Récepteurs couplés aux protéines G et protéines G hétérotrimériques	3
Figure 2. Le système kinine-kallikréine	7
Figure 3. Les effets de la parathormone	21
Figure 4. Représentation schématique de la protéine de fusion APEX2-(NG) ₁₅ -MK.....	40
Figure 5. Représentation schématique des protéines de fusion avec un domaine peroxydase (intrinsèque ou assemblé) évaluées pour la détection du récepteur PTH ₁	41
Figure 6. Représentation schématique des protéines de fusion HSA	42
Figure 7. PTH-myc : ligand bi-fonctionnel du récepteur PTH ₁ de la parathormone.....	57
Figure 8. Validation de l'identité des protéines de fusion PTH avec domaine peroxydase	59
Figure 9. Validation de l'effet pharmacologique de PTH-myc <i>via</i> le récepteur PTH ₁ : Induction de c-Fos	61
Figure 10. Validation de l'activité pharmacologique des protéines de fusion PTH avec domaine peroxydase	63
Figure 11. Validation de l'effet pharmacologique de PTH-myc <i>via</i> le récepteur PTH ₁ : Accumulation d'AMP _c	64
Figure 12. Caractérisation supplémentaire de l'activité pharmacologique de PTH-HRP	65
Figure 13. Transport de l'anticorps monoclonal anti-myc conjugué à l'AlexaFluor-488 à l'intérieur de cellules exprimant le récepteur PTH ₁	67
Figure 14. Quantification de l'endocytose du complexe PTH-myc/4A6-AF488 <i>via</i> PTH ₁ R par cytométrie en flux	68
Figure 15. Étude de la colocalisation entre PTH-myc/4A6-AF488 et la β-arrestine ₁ conjuguée à mCherry	70
Figure 16. Étude de la colocalisation entre PTH-myc/4A6-AF488 et le marqueur d'endosomes précoces Rab ₅ conjugué à la protéine fluorescente rouge mCherry 71	
Figure 17. Étude de la colocalisation entre PTH-myc/4A6-AF488 et la le marqueur d'endosomes tardifs Rab ₇ conjugué à la protéine fluorescente rouge mCherry	72
Figure 18. Détection du récepteur PTH ₁ recombinant ou endogène à l'aide du système <i>tyramide signal amplification</i> (TSA).....	74
Figure 19. Marquage des cellules exprimant le PTH ₁ R recombinant ou endogène par le TrueBlue™ suite au traitement avec PTH-myc.....	77
Figure 20. Détection lumineuse du récepteur PTH ₁ à l'aide de PTH-myc <i>via</i> l'assemblage d'un domaine peroxydase (anti-myc + anticorps secondaire couplé à la HRP) à l'extrémité N-terminale du ligand	78
Figure 21. Marquage des cellules exprimant le PTH ₁ R recombinant ou endogène par le TrueBlue™ suite au traitement avec PTH-APEX2	80
Figure 22. Détection lumineuse du récepteur PTH ₁ à l'aide de PTH-APEX2	81

Figure 23. Marquage des cellules exprimant le PTH ₁ R recombinant ou endogène par le TrueBlue™ suite au traitement avec PTH-HRP	84
Figure 24. Validation de l'amplification du signal avec la biotine-phénol	85
Figure 25. Amplification de la sensibilité de détection des récepteurs PTH ₁ par PTH-HRP ..	86
Figure 26. Détection luminescente du récepteur PTH ₁ à l'aide de PTH-HRP	88
Figure 27. Détection colorimétrique (TMB) du récepteur PTH ₁ avec le ligand biotechnologique PTH-HRP (dilué 1:5)	89
Figure 28. Validation des nouveaux vecteurs codant pour les récepteurs B ₂ et myc-B ₂ humain et de rat	92
Figure 29. Profil pharmacologique de divers peptides analogues à la BK prolongés à l'extrémité N-terminale	95
Figure 30. Pharmacologie de la MK chez des cellules HEK 293a : Mobilisation calcique	96
Figure 31. Études de contractilité au niveau de la veine ombilicale humaine isolée appliquées à la BK ainsi qu'à son homologue prolongé en N-terminal, la MK....	99
Figure 32. Détermination par LC-MS des fragments C-terminaux de la MK produits par l'incubation à 37 °C de ce peptide en présence d'un anneau de veine ombilicale humaine pendant 5 ou 15 minutes.	101
Figure 33. Réponses hémodynamiques chez le rat anesthésié suite à l'injection d'un bolus intraveineux de doses croissantes d'agonistes du récepteur B ₂ de la BK.....	103
Figure 34. Réponses hémodynamiques chez le rat anesthésié suite à l'injection d'un bolus intraveineux de doses croissantes d'agonistes du récepteur B ₂	104
Figure 35. Effets simultanés de la BK ou de la MK sur divers paramètres hémodynamiques.	107
Figure 36. Validation de l'identité d'EGFP-MK par immunobuvardage.....	109
Figure 37. Marquage différentiel de cellules HEK 293a exprimant stablement une construction myc-B ₂ R (humain ou rat) par EGFP-MK.....	110
Figure 38. Validation de la spécificité d'EGFP-MK au niveau du rt myc-B ₂ R	111
Figure 39. Colocalisation d'EGFP-MK avec divers marqueurs endosomaux en fonction du temps.....	113
Figure 40. Internalisation et signalisation de EGFP-MK sur cellules HEK 293a exprimant stablement le rt myc-B ₂ R.....	114
Figure 41. Validation de l'identité de APEX2-(NG) ₁₅ -MK par immunobuvardage	116
Figure 42. Mobilisation calcique induite par APEX2-(NG) ₁₅ -MK	177
Figure 43. Immunobuvardage de l'accumulation de c-Fos dépendante de la stimulation du rt myc-B ₂ R par APEX2-(NG) ₁₅ -MK	118
Figure 44. Marquage par le TrueBlue™ suite à la stimulation avec APEX2-(NG) ₁₅ -MK	12
Figure 45. Détection par luminescence de l'activité peroxydase d'APEX2-(NG) ₁₅ -MK liée à son récepteur	122
Figure 46. Détection colorimétrique (TMB) de l'activité peroxydase d'APEX2-(NG) ₁₅ -MK liée à son récepteur	123

Figure 47. Évaluation de l'affinité des nouveaux peptides analogues de la BK prolongés en position N-terminale	125
Figure 48. Immunobuvardage des milieux conditionnés contenant des protéines de fusion HSA sécrétées	128
Figure 49. Purification et concentration des protéines de fusion HSA sécrétées (1 ^{ère} partie)	129
Figure 50. Purification et concentration des protéines de fusion HSA sécrétées (2 ^{ème} partie)	130
Figure 51. Essai de mobilisation calcique avec les protéines de fusion HSA sécrétées.....	131
Figure 52. Production, purification et évaluation de l'activité pharmacologique de la forme cytosolique de myc-HSA-MK	133
Figure 53. Représentation schématique des divers ligands biotechnologiques du récepteur B ₂ de la BK	143

ABRÉVIATIONS

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> ; Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADC	<i>Antibody Drug Conjugate</i> ; conjugué cytoxique d'un anticorps
AM	Acetoxyméthyl
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> ; analyse de variance
AOH	Angioedème héréditaire
ARN _m	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> ; albumine sérique bovine
B ₁ R	Récepteur B ₁ de la bradykinine
B ₂ R	Récepteur B ₂ de la bradykinine
BK	Bradykinine
C1INH	<i>C1 esterase inhibitor</i> ; inhibiteur de l'estrerase C1
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycerol
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i> ; sérum de veau fœtal
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GEF	<i>Guanosine exchange factor</i>
GPCR	<i>G-Protein Coupled Receptor</i> ; Récepteur couplé aux protéines G
GRK	<i>G-Protein Coupled Receptor Kinase</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HEK 293a	<i>Homo Sapiens Embryonic Kidney cells 293a</i>
HMWK	<i>High Molecular Weight Kininogen</i> ; Kinninogène de haut poids moléculaire
HRP	<i>Horseradish Peroxydase</i> ; peroxydase de raifort
HSA	<i>Human Serum Albumin</i> ; Albumine sérique humaine
Hyp	Hydroxyproline
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
Igl	Indanylglycine
IP ₃	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>

KKS	<i>Kinin-Kallikrein System; Système kinine-kallikréine</i>
LMWK	<i>Low Molecular Weight Kininogen; Kinninogène de bas poids moléculaire</i>
LA-PTH	<i>Long-acting PTH; PTH à longue action</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>
Lys-BK	Kallidine
mCherry	<i>Cherry fluorescent protein</i>
MC	Milieu conditionné
MK	Maximakinine
NEP	<i>Neutral endopeptidase; endopeptidase neutre</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NG	Asparagine-Glycine
NO	Oxyde Nitrique
NOs	<i>NO synthase</i>
Oic	<i>Octahydroindole-2-carboxylic acid</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyethylimine
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
Phe	Phénylalanine
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PK	<i>Plasma Kallikrein; Kallikréine plasmatique</i>
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride; fluorure de méthylphénylsulfonyle</i>
PTH	Parathormone
PTH ₁₋₃₄	Tériparatide
PTH _{1R}	Récepteur de la parathormone 1
PTHrP	<i>Parathormone related Peptide</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B</i>
SA	Streptavidine
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
Thi	β -(2-Thienyl)-alanine
Tic	<i>Tetrahydro-isoquinoline-3-carboxylic acid</i>
TIP39	<i>Tuberoinfundibular peptide of 39 residues</i>
TK	<i>Tissue Kallikrein; Kallikréine tissulaire</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbennzidine
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TSA	<i>Tyramide Signal amplification</i>

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaiterais remercier mon directeur de recherche, le Dr François Marceau. Sans son support, son inventivité et sa générosité rien de tout cela n'aurait été possible. Je le remercie plus encore pour toute la confiance qu'il m'a témoignée au cours des 7 dernières années. Grâce à lui, j'ai pu présenter mes travaux dans des congrès à travers le monde. Merci pour toutes les opportunités, je ne l'oublierais jamais.

Je voudrais aussi remercier chaleureusement Madame Johanne Bouthillier qui m'a rendu la tâche tellement plus facile. Son soutien technique, mais surtout son support à travers les difficultés m'aura permis de passer à travers les dernières années.

Un énorme merci à tous les membres passé du laboratoire avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Je souhaite ainsi remercier monsieur Alexandre Parks et madame Mélissa Jean. Dans le même ordre d'idée, je souhaite remercier tous les collaborateurs ainsi que l'ensemble de mes collègues du CRRRI qui ont, chacun à sa manière, participé à la création d'un environnement dans lequel j'ai pu m'épanouir et progresser personnellement et professionnellement.

Je souhaite aussi remercier la Dre Hélène Bachelard pour son rôle crucial dans les expérimentations *in vivo* et pour l'ensemble de ses contributions à mon doctorat.

Finalement, un remerciement spécial à ma conjointe Caroline Gagnon qui aura enduré mes incertitudes et mes doutes, et qui a toujours su quoi dire pour me remettre sur le droit chemin.

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 GPCRs. En plus de cela, 7 autres prix Nobel ont été attribués pour des travaux impliquant ces récepteurs. Les GPCRs 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 perception sensorielle (vision, goût, odorat), la différenciation cellulaire, la sécrétion et la réponse inflammatoire (Hébert et Bouvier, 1998). La diversité des stimuli activant les GPCRs est étonnante. Ceux-ci peuvent être des hormones, des ions, des neurotransmetteurs et même des odeurs, des goûts ou 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 cause 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 GPCRs (Robinson et al., 1967). Ces travaux ont démontré que la lipolyse causée par les catécholamines était due à l'action de l'AMP_c générée par l'adénylate cyclase. Plus tard, il a été 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 al., 1971; Ross et Gillman, 1977). L'hydrolyse de la GTP, par 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 que des hormones, des peptides, des ions ou des lipides (Northup et al., 1980; Codina et al., 1983; Bokoch et al., 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 nos connaissances sur ces protéines au cours des 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 au domaine intracellulaire du récepteur. De plus, au repos, G_{α} est liée 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 (Fig. 1). 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 $G_{\beta\gamma}$. Bien que les effets intracellulaires des GPCRs 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 Kostenis, 2006). En prenant en compte l'épissage alternatif, il existe au moins 20 différentes sous-unités G_{α} , séparées 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.

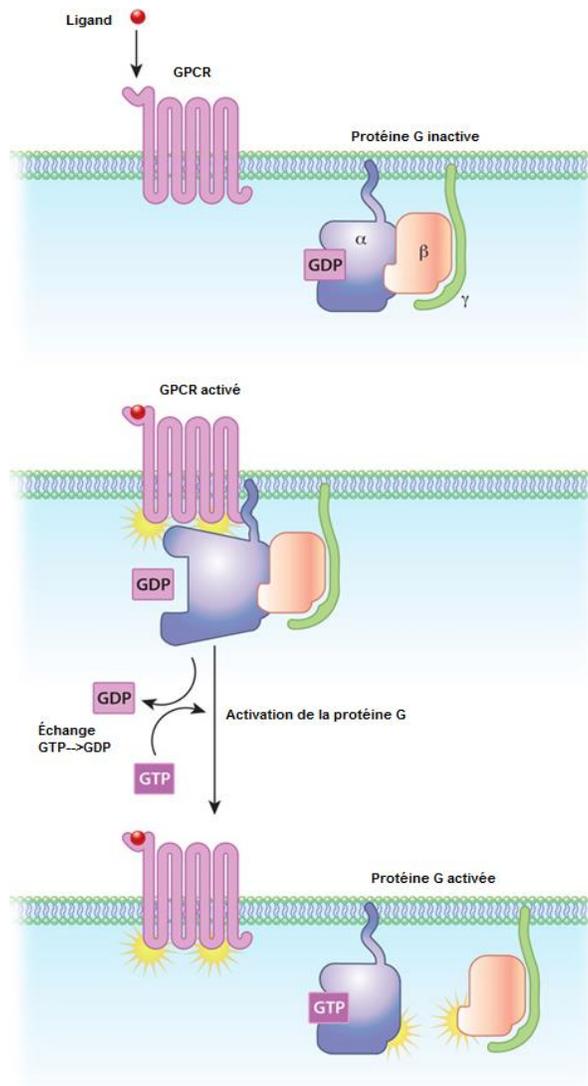


Figure 1. Récepteurs couplés aux protéines G et protéines G hétérotrimériques. Adapté de Nature Education.

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 GTPases 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 GPCRs (Milligan et Kostenis, 2006).

1.3 Structure des GPCRs

Les récepteurs couplés aux protéines G sont aussi connus sous le nom de récepteurs à sept domaines transmembranaires. 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 le domaine intracellulaire est surtout impliqué 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 Classes de GPCRs

Vu le grand nombre de GPCRs, il a été nécessaire de les séparer en classes afin de mieux pouvoir les caractériser. Un système de classification basé sur l'homologie entre les différents GPCRs 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 GPCRs 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 GPCRs connus. Les récepteurs de classe A lient majoritairement des stimuli olfactifs et visuels. Outre ceux-ci, ces récepteurs lient principalement 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 al., 2006).

1.4.2 GPCRs 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 al., 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 al., 2011).

1.4.3 GPCRs 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 al., 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 GPCRs correspond aux récepteurs *Frizzled* et *Smoothened*, deux récepteurs nécessaires à la liaison de *Wnt* en plus de jouer un rôle majeur dans la voie de signalisation *Hedgehog* (Foord et al., 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 al., 2005).

1.5 Désensibilisation des GPCRs

Une propriété importante des GPCRs 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 généralement revêtus de clathrines *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 al., 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 GPCRs emprunte la voie des arrestines, mais il existe d'autres possibilités. Une voie alternative de l'endocytose des GPCRs 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 al., 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 al., 1990; Zhang et al., 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 causent l'hydrolyse enzymatique des kininogènes et l'activation de la voie intrinsèque de coagulation (Fig. 2; Kashuba et al., 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 al., 2011; Colman, 2006; Colman et Schmaier, 1997; Marcondes et Antunes, 2005).

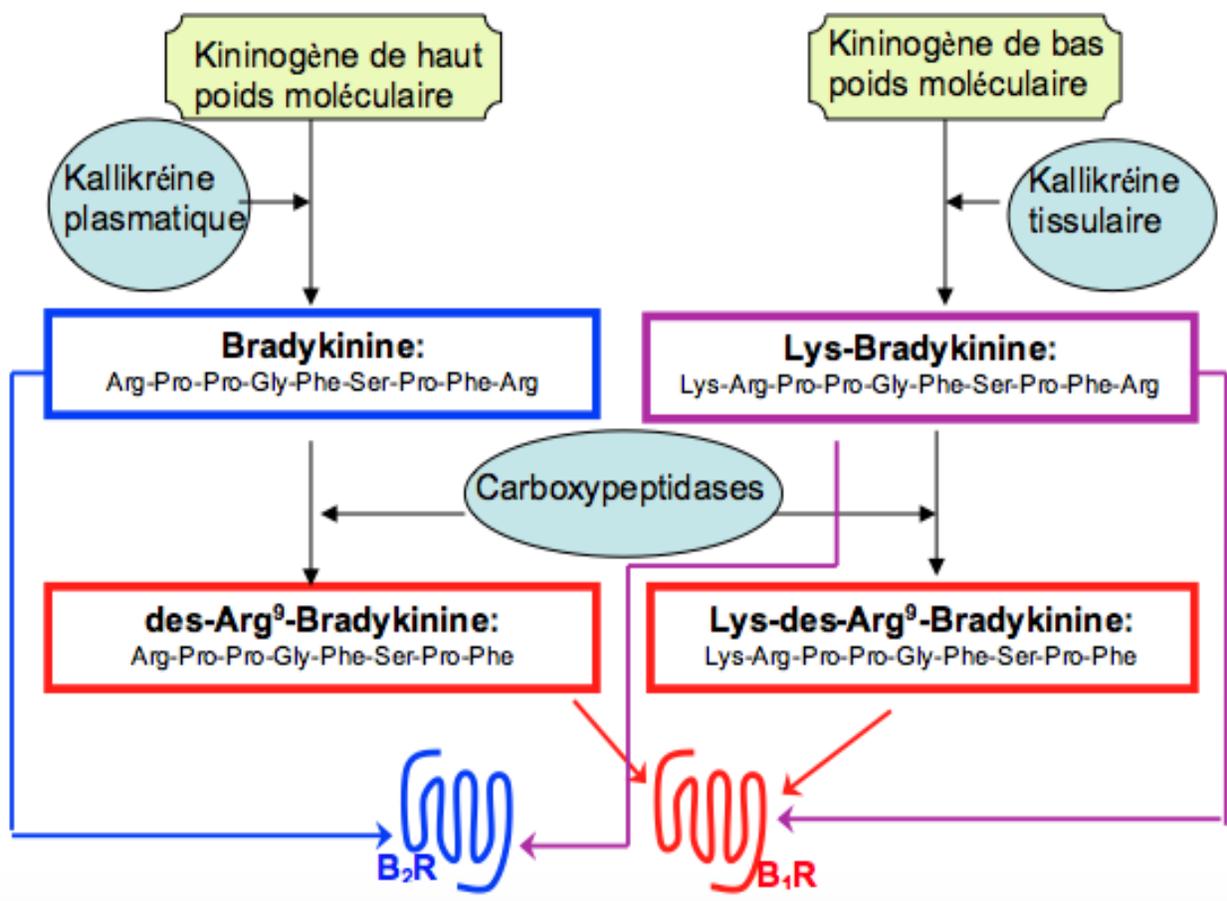


Figure 2. Le système kinine-kallikréine.

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 -globulines exprimé à une concentration plasmatique moyenne de 80 mg/ml (Sainz et al., 2007). Il est composé de 626 acides aminés et est divisé 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 (forme inactive de la kallikréine plasmatique; Colman, 2006; Moreau et al., 2005b). En effet au niveau plasmatique, la pré-kallikréine est majoritairement complexée avec le HMWK (Reddigari et Kaplan, 1989). Afin de libérer la BK à partir du HMWK, celui-ci doit être clivé à deux endroits. D'abord le HMWK est clivé entre les résidus Arg³⁸⁹ et Ser³⁹⁰ puis entre les résidus Lys³⁸⁰ et Arg³⁸¹ (Mori et al., 1981). La protéase PR3, relâchée par les neutrophiles activés, peut cliver le HMWK à des sites différents, et ainsi relâcher la kinine Met-Lys-BK-Ser-Ser (Kahn et al., 2009; Gera et al., 2011).

Le kininogène de bas poids moléculaire (LMWK) ressemble à peu de chose près au HMWK. En fait, il contient les 4 premiers domaines du HMWK. Toutefois, il exprime une chaîne légère tronquée et n'exprime pas le domaine D6 (Colman, 1996). Cette absence du domaine D6 empêche le LMWK de lier la pré-kallikréine. 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 al., 1996; Colman et al., 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 et le HMWK font tous deux parti du système de contact, aussi appelé voie intrinsèque de coagulation. Le système de contact est activé suite à la liaison du facteur XII à une surface activatrice. Ces surfaces peuvent être des constituants de la membrane basale suite à une lésion endothéliale, des agents pathogènes comme le LPS ou des protéines sécrétées par des cellules du système immunitaire (Brunnee et al., 1997; Kaplan et Silverberg, 1987). Suite à la liaison du facteur XII, celui-ci va s'autoactiver ce qui va lui permettre d'activer la pré-kallikréine *via* son action protéolytique. La kallikréine plasmatique libérée, va ensuite cliver le HMWK pour générer la BK. La kallikréine plasmatique peut aussi activer le facteur XII, qui à son tour va générer plus de kallikréine active et ainsi de suite. Le HMWK clivé aurait des fonctions pro-inflammatoires causées par la liaison de cette molécule à des récepteurs exprimés par des cellules immunitaires ou endothéliales (Sainz et al., 2007). L'activation du système de contact est impliquée dans la coagulation et dans l'activation de la cascade du complément (Merlini et al., 2004). Toutefois la contribution du système de contact à la coagulation est minime, puisqu'une déficience en facteur XII ne résulte pas en des changements majeurs sur la capacité hémostatique des patients (Muller et Renne, 2008). L'inhibiteur de l'estérase C1 (C1INH), est le principal régulateur négatif de l'activité du système de contact, puisque cette serpine est capable d'inhiber de manière irréversible tant le facteur XII que la kallikréine plasmatique (Longhurst et Cicardi, 2012). D'autres protéines comme l' α 2-macroglobuline, l'antithrombine III, et l' α 2-antiplasmine sont capables d'inhiber le système de contact (Kaplan et al., 1997).

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 al., 1988; Marcondes et Antunes, 2005). Son rôle physiologique principal est la génération de Lys-BK, aussi appelée kallidine, en hydrolysant le LMWK. Le clivage du LMWK par la kallikréine tissulaire se fait entre les résidus Met³⁷⁹ et Lys³⁸⁰ et entre les résidus Arg³⁸⁹ et Ser³⁹⁰ (Fogaca et al., 2004).

2.1.3 Les kinines

Chez l'homme on retrouve 4 peptides apparentés à la BK : la BK, la Lys-BK, la des-Arg⁹-BK et la Lys-des-Arg⁹-BK. Les deux premiers peptides correspondent aux produits de l'hydrolyse des kininogènes par l'une ou l'autre des kallikréines, alors que la des-Arg⁹-BK et la Lys-des-Arg⁹-BK 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 al., 1996). Toutefois, il s'agit de peptides très efficaces, car des concentrations nanomolaires suffisent pour produire un effet biologique (Moreau et al., 2005a). 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 la 3^{ème} boucle extracellulaire (Leeb-Lundberg et al., 2005).

Il existe un nombre important d'analogues des kinines chez diverses espèces animales, comme chez les oiseaux (Shroeder et al., 1997), les amphibiens (Colon et Aronsson, 1997; Yasuhara et al., 1979) ou chez les reptiles (Kwok et al., 2008). Le venin présent dans la peau de l'espèce *Bombina maxima*, un crapaud asiatique, contient un peptide de dix-neuf acides aminés, dont les neuf derniers reproduisent la séquence de la BK (Chen et al., 2003; O'Rourke et al., 2004; Chen et al., 2005). Ce peptide, dénommé maximakinine (MK; DLPKINRKGP-BK), possède une activité vasorelaxante dans des essais exploitant le muscle lisse de rat (O'Rourke et al., 2004). Chez le rat, on retrouve une forme alternative du kininogène; le T-kininogène. Celui-ci, lorsqu'activé, libère la T-kinine (Ile-Ser-BK), un peptide de haute affinité pour le récepteur B₂ de rat (Greenbaum et al., 1992). On retrouve de très nombreux peptides apparentés à la BK chez les guêpes (Konno et al., 2016), notamment la *Polistes* kinine (Pyr-Thr-Asn-Lys-Lys-Lys-Leu-BK; Pisano, 1968).

2.1.4 Métabolisme des kinines

Les principales enzymes responsables de la dégradation des kinines sont l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), les carboxypeptidases M et N, les aminopeptidases N

et P et l'endopeptidase neutre (NEP). L'ACE est une enzyme impliquée dans l'activation de l'angiotensine I en angiotensine II, mais elle est la principale enzyme de dégradation de la BK. En effet, la BK a plus d'affinité pour l'ACE que l'angiotensine I. Dans un premier temps, la BK va être convertie en BK₁₋₇ par l'ACE qui pourra aussi cliver ce peptide une seconde fois pour générer la BK₁₋₅. La BK₁₋₇ et la BK₁₋₅ sont deux fragments inactifs (Marceau et al., 1998). L'ACE est inhibée par de nombreuses drogues connues sous le nom d'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ces drogues, comme le captopril et l'énalaprilat, sont utilisées dans le traitement de l'hypertension et l'insuffisance cardiaque. Bien que ces drogues aient été conçues afin d'inhiber la production d'angiotensine II, il a été rapporté que la majorité des effets cardioprotecteurs de ces drogues seraient dus à l'accumulation de BK plus qu'à la diminution d'angiotensine II (Taddei et Bortolotto, 2016). Les carboxypeptidases N et M sont deux enzymes capables de retirer l'arginine C-terminale de la BK et de la Lys-BK (Campbell DJ, 1995). Leur rôle dans le métabolisme est toutefois minime, mais leur participation à la génération d'agoniste du B₁R est cruciale. Les aminopeptidases N et P retirent les acides aminés en position N-terminale des kinines. Ces enzymes jouent un rôle important dans l'inactivation des kinines.

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 al., 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 al., 2005).

2.2.1 Ligands du récepteur B₁

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-Arg⁹-BK 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 centaines 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-Arg⁹-BK 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, alors qu'elle est supérieure à 30 000 nM pour le récepteur B₂ (Bastian et al., 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 al., 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-kappa B* (NF-κB) et est influencée par diverses cytokines telles que l'interleukine 1β (IL-1β), l'interféron γ ou le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF-α) (Schanstra et al., 1998; Medeiros et al., 2004; Leeb-Lundberg et al., 2005; Bawolak et al., 2007; Koumbadinga et al., 2010). Son induction compense pour la désensibilisation rapide du récepteur B₂ de la bradykinine (Bhoola et al., 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 al., 2002), suivant en cela la distribution de $G_{\alpha q}$.

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-Arg⁹-BK	1930	0,7	32
Lys-des-Arg⁹-BK	0,12	1,7	0,23

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 al., 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 HEK 293a est plus forte que l'activité du B₂R induite par une stimulation agoniste (Leeb-Lundberg, et al., 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 al., 2001).

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 $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha i}$ (Austin et al., 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

¹ Leeb-Lundberg et al., 2005

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 prostacycline (PGI₂; vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire) *via* l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Higashida et al., 1986; Burch et Axelrod, 1987; Palmer et al., 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 al., 2007).

2.3 Le récepteur B₂ de la bradykinine

L'existence du récepteur B₂ de la bradykinine (B₂R) fut postulée, 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 al., 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-Arg⁹-BK=Lys-des-Arg⁹-BK. 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. 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.

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-Arg⁹-BK	8100	6400	>1000
Lys-des-Arg⁹-BK	>30000	25000	>1000

L'icatibant est un antagoniste spécifique du récepteur B₂ avec une affinité 1000 fois supérieure pour celui-ci que pour le B₁R (Hess et al., 1994). La forme des-Arg de l'icatibant (des-Arg⁹-HOE 140) est un antagoniste mixte des récepteurs B₁ et B₂ (Bastian et al., 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(aminoiminométhyl)phényl]carbonylamino]-propyl]-2(S)-pyrrolidine-carboxamide, mesylate salt), un antagoniste spécifique du récepteur B₂ (Pruneau et al., 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 al., 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 al., 2001). Les sites de phosphorylation proposés sont les sérines 339, 346 et 348 et les tyrosines 342 et 345. La

² Leeb-Lundberg et al., 2005

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 al., 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 al., 2007), bien que l'on retrouve certaines données suggérant que ce ne soit pas le cas (de Weerd et Leeb-Lundberg, 1997; Haasemann et al., 1998). La désensibilisation du B₂R passe par un cycle d'endocytose et de recyclage bien documenté (Marceau et al., 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 al., 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 al., 1994). Il a été proposé que le récepteur B₂ puisse être activé directement par la kallikréine plasmatique (Hecquet et al., 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 al., 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 al., 1991; Ewald et al., 1989; Liebmann et al., 1996; Gohla et al., 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 al., 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 al., 1996; Faussner et al., 1998). Toutefois, étant donné le caractère inductible du B₁R et l'expression constitutive du B₂R, la majorité des effets des kinines en situation physiologique dépendent 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 al., 2000; Bhoola et al., 1997; Wu et al., 2002). En effet, l'ARN_m du B₂R a été détecté dans 36 des 39 tissus testés par Ma (Ma et al., 1994). La rate, les glandes salivaires et la veine mésentérique sont les seuls tissus qui n'exprimaient pas l'ARN_m du B₂R.

2.4 Le système kinine-kallikréine en pathologie

La manifestation clinique où le rôle du système kinine-kallikréine est le plus reconnu, est l'angioedème héréditaire (AOH). Il s'agit d'une maladie rare autosomale dominante caractérisée par des épisodes d'œdème localisés (Cicardi et Agostoni, 1996). En effet, cette maladie se caractérise par des crises aléatoires, douloureuses et souvent imprévisibles d'œdèmes se produisant généralement au niveau des extrémités, de la muqueuse intestinale, des organes génitaux, du visage et des voies respiratoires supérieures (Zuraw BL, 2008; Bork et al., 2012). Ces crises résultent d'un dérèglement dans la synthèse de bradykinine causé par une faible expression du C1-INH (AOH type I) ou par des mutations inactivantes dans le gène du C1-INH (AOH type II). L'AOH de type I se caractérise par une faible expression du C1-INH alors que dans l'AOH de type II le C1-INH est exprimé de manière normale, mais il n'est pas fonctionnel (Gompels et al., 2002; Tarzi et al., 2007). Comme mentionné plus haut, le C1-INH est responsable de l'inhibition du facteur XII et de la kallikréine plasmatique. Donc, lorsqu'une crise est déclenchée, il y a sur-activation du facteur XII et de la kallikréine qui mène à une génération incontrôlée de BK, d'où la formation de douloureux œdèmes (Kaplan et al., 2002). Il existe aussi un AOH de type III (aussi appelé AOH à C1-INH normal) caractérisé par un niveau normal et une activité normale du C1-INH (Bork K, 2013). L'AOH de type III n'est pas aussi bien documenté que les deux autres types, et des mutations dans le facteur XII ou dans des enzymes responsables du catabolisme de la BK pourraient être en cause (Cicardi M, 2014). Les manifestations cliniques des différents types d'AOH sont similaires (Bork K, 2010). Il

existe plusieurs traitements afin de prévenir les crises d'AOH ou d'accélérer la rémission suite à l'une de ces crises, en commençant par l'administration de C1-INH exogène concentré. L'icatibant, un antagoniste du B₂R, s'est révélé efficace dans le traitement des crises d'AOH et a été homologué par Santé Canada en 2014 pour le traitement de l'AOH (Lumry et al., 2015; Cole et Lundquist, 2013; Malbràn et al., 2014). Un inhibiteur de la kallikréine plasmatique, l'ecallantide, est aussi reconnu pour sa capacité à traiter les crises d'AOH (Schneider et al., 2007; Cicardi et al., 2010; Levy et al., 2010). Toutefois, celui-ci n'est pas disponible au Canada. D'autres traitements basés sur des anti-fibrinolytiques ou des androgènes atténués sont aussi disponibles, mais leur efficacité ne fait pas l'unanimité (Sheffer et al., 1972; Farkas et al., 2010).

L'angioedème associé aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine est un effet secondaire fréquent de ces drogues pouvant toucher jusqu'à 20% des patients (Dicpinigaitis PV, 2006). Il a été proposé que cette forme d'angioedème soit dépendante de l'accumulation de BK suite à l'inhibition d'une de ses principales voies de dégradation (Baram et al., 2013). Une première étude clinique publiée en 2015 a démontré que l'icatibant pouvait réduire la durée de ces épisodes d'angioedème, mais depuis d'autres études sont venues contredire ces affirmations (Bas et al., 2015; Straka et al., 2017). L'absence d'effet d'un antagoniste B₂ chez ces patients pourrait suggérer l'implication du récepteur B₁ de la bradykinine.

Différentes études précliniques suggèrent des rôles délétères ou protecteurs pour les récepteurs de la BK dans différentes pathologies. Ces récepteurs semblent jouer un rôle important lors de la reperfusion au niveau cardiaque. Dans un modèle d'ischémie chez la souris, une administration continue d'un agoniste spécifique du B₂R a permis de diminuer le remodelage cardiaque, ainsi qu'une réduction significative dans l'expression de médiateurs inflammatoires (Marketou et al., 2010; Manolis et al., 2010). Il a aussi été démontré que l'activation du système kinine-kallikréine permettait de stimuler le recrutement de cellules progénitrices cardiaques au site de l'infarctus tout en stimulant une néovascularisation plus efficace (Spillman et al., 2006). La BK et ses récepteurs ont été rapportés comme des agents importants dans la formation et la propagation de nombreux cancers (da Costa et al., 2014). En effet, de nombreux cancers surexpriment les deux types de récepteurs ou utilisent

la BK comme facteur autocrine afin de stimuler leur croissance (Barki-Harrington et al., 2003; Chee et al., 2007; Beck et al., 2007). De plus, divers antagonistes sélectifs pour les récepteurs B₁ ou B₂ ont démontrés des propriétés antiprolifératives, anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et anti-migratoires (Sevcik et al., 2005; Whalley et al., 2012; Neo et al., 2007; Chan et al., 2002; Drube et Liebmann., 2000). Puisque que l'ensemble des données provient d'études sur des cellules en cultures et sur des animaux, des études cliniques fiables seront nécessaires afin de permettre le transfert de ces connaissances à l'humain (da Costa et al., 2014). Néanmoins, le ciblage du récepteur B₁ surexprimé par les cellules cancéreuses est une stratégie attirante en oncologie, puisque celui-ci n'est pas exprimé par les adultes en santé, ce qui diminuerait les effets secondaires indésirables sur les cellules saines. Récemment, la synthèse d'antagonistes non-peptidiques du récepteur B₁ marqué avec le gallium-68 (⁶⁸Ga) a été rapportée. Ces peptides ont permis la détection de tumeurs solides, formées par l'injection de cellules HEK 293T exprimant stablement le B₁R, chez le rat (Zhang et al., 2016).

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 (Fig. 3). 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 al., 1998; Yasuda et al., 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. 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 protéines 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 al., 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 vont 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, L.E. 1989).

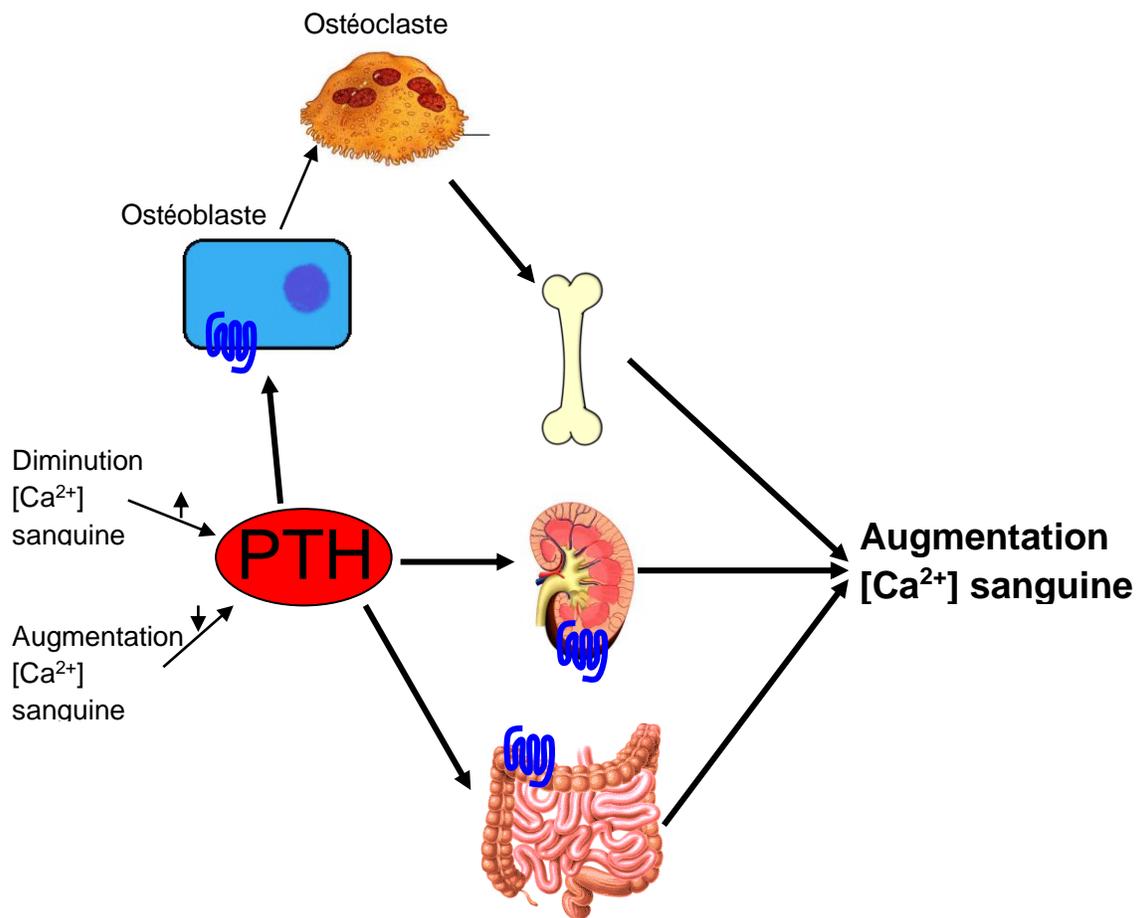


Figure 3. Les principaux sites d'action de la PTH pour le maintien de l'homéostasie calcique.

3.2 Le récepteur de la parathormone PTH_1

Le PTH₁R 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 al., 1994). Comme tous les récepteurs de cette classe, le PTH₁R 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 PTH₂. Celui-ci possède une distribution et des ligands différents de ceux du PTH₁R. Il est particulièrement abondant dans le cerveau et n'est pas impliqué dans l'homéostasie calcique. En effet, les ligands du PTH₂R, dont le *Tuberoinfundibular peptide of 39 residues* (TIP39), agissent comme des neurotransmetteurs (Dobolyi et al., 2010).

3.2.1 Les ligands du récepteur PTH₁

Le récepteur PTH₁ possède deux ligands agonistes endogènes soit la parathormone et le *parathormone related peptide* (PTHrP). PTHrP est surtout impliqué dans le développement embryonnaire des os et du cartilage (Strewler, 2000; Kronenber et Chung, 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 al., 1995). L'activité pharmacologique de ces deux peptides est conservée lorsque l'on stimule le PTH₁R avec les 34 premiers résidus de chacun (PTH₁₋₃₄ ou PTHrP₁₋₃₄). 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 PTH₁. La délétion des résidus 31 à 34 de la PTH₁₋₃₄ cause une perte d'affinité de 100 fois et la délétion des résidus 28 à 34 de la PTH₁₋₃₄ 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 GPCRs 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-translotionnelles ou des clivages par des endopeptidases

gènèrent des fragments N-terminaux de la PTH possédant des activités biologiques diverses (Segre et al., 1981; Bringham et al., 1988; Wu et al., 1996). Ces fragments, tels que PTH₇₋₈₄, PTH₃₅₋₈₄ et PTH₆₉₋₈₄, stimuleraient le récepteur PTH₁ 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 un radioligand (Nguyen-Yamamoto et al., 2001). Finalement, le peptide TIP39 est un antagoniste endogène du récepteur PTH₁. C'est aussi un agoniste de haute affinité du récepteur PTH₂R (voir Tableau 3).

Tableau 3 : Affinité des différents ligands du récepteur PTH₁ 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

3.2.2 Régulation du récepteur PTH₁

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 PTH₁ 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 al., 1995; Qian et al., 1998). Selon certains groupes, l'internalisation du récepteur suite à sa stimulation serait indépendante de la phosphorylation (Malecz et al., 1998) alors que pour d'autres, il s'agit d'une étape cruciale pour l'endocytose (Tawfeek et al., 2002). Une fois internalisé par un mécanisme clathrine dépendant, le récepteur va progresser dans

³ Hoare et Usdin, 2001

le système endosomal pour être soit recyclé à la surface ou dégradé dans les lysosomes (McDonald et al., 2001).

3.2.3 Signalisation par le PTH₁R

Lorsque stimulé par la PTH ou la PTH₁₋₃₄, le PTH₁R interagit principalement avec la protéine G_{as}. La protéine G_{as} va stimuler la production d'AMP_c *via* l'activation de l'adénylate cyclase (Schwindinger et al., 1998). Fait intéressant, différents agonistes recrutent différentes protéines G ou dans certains cas favorisent une signalisation principalement arrestine-dépendante. Par exemple, PTH₇₋₃₄ génère une réponse arrestine-dépendante qui inhibe la production d'AMP_c, réponse cellulaire contraire à celle engendrée par PTH₁₋₃₄ (van der Lee et al., 2013).

3.2.4 Localisation du récepteur PTH₁

Le récepteur PTH₁ est distribué dans presque tous les tissus mais principalement au niveau des os (ostéoblastes), des reins et du foie (Urena et al., 1993; Tian et al., 1993). La vaste distribution de ce récepteur expliquerait les effets non classiques qui lui sont associé *via* l'action de PTHrP.

3.3 Implications de la PTH et du PTH₁R en pathologie

Les principales pathologies associées à l'hormone parathyroïdienne sont l'hyperparathyroïdie et l'hypoparathyroïdie. L'hyperparathyroïdie primaire est un trouble endocrinien causé par la suractivation de la glande parathyroïde résultant dans une relâche excessive de PTH (Madkhali et al., 2016). C'est le troisième trouble endocrinien le plus commun après le diabète et les troubles de la thyroïde avec une prévalence entre 0,1 et 1 % dans la population (Cordellat IM, 2012). Dans 80-85 % des cas, cette maladie est causée par la présence d'un adénome sur la glande parathyroïdienne (Carneiro-Pla et al., 2007). Les manifestations cliniques de cette maladie sont généralement une hypercalcémie associée à des niveaux anormalement élevés de PTH dans le sang. La chirurgie est généralement le traitement privilégié, mais dans certains cas des drogues calcimimétiques sont utilisées pour rétablir l'homéostasie calcique (Bilezikian et al., 2009; Gopinath et al.,

2010). L'hypoparathyroïdie est une maladie endocrine rare dans laquelle la sécrétion de PTH est anormalement basse ou absente, ce qui cause de l'hypocalcémie et de l'hyperphosphatémie (Abate et Clarke, 2016). Les causes principales sont des lésions à la glande parathyroïde ou une excision involontaire de cette glande lors d'une chirurgie de la glande thyroïde (Shoback et al., 2016). Cette pathologie est traitée avec le *teriparatide* (PTH₁₋₃₄) ou le *natpara* (PTH₁₋₈₄), mais les effets à long-terme chez l'homme de tels traitements, notamment sur l'apparition d'ostéosarcomes, sont inconnus (Watanabe et al., 2012).

La principale utilisation de la PTH en clinique est dans le traitement de l'ostéoporose. En effet l'administration intermittente de PTH (< 2 heures/jour) résulte dans une augmentation de la masse osseuse, alors qu'une administration continue (> 2 heures/jour) de cette hormone résulte dans une diminution de la masse osseuse, comme ce que l'on peut observer dans les cas d'hyperparathyroïdie (Cosman F, 2008). L'avantage d'une telle thérapie vs. les inhibiteurs de la résorption osseuse comme les biphosphonates, est que la PTH stimule la formation osseuse au lieu de simplement bloquer sa dégradation (Potts J.T., 2005; Osagie-Clouard et al., 2017)

Diverses mutations associées au récepteur PTH₁ causent des maladies osseuses rares. Par exemple, la dysplasie de Blomstrand est une maladie néonatale létale caractérisée par une mutation perte de fonction bi-allélique résultant dans un PTH₁R inactif (Hoogendam et al., 2007). Les patients atteints du syndrome de Eiken expriment un PTH₁R avec une queue C-terminale tronquée et souffre d'un important retard dans la formation des os (Duchatelet et al., 2005). La chondrodysplasie métaphysaire de Jansen est caractérisé par un récepteur PTH₁ constitutivement actif, causé par une mutation dans l'un de ses domaines transmembranaires (His²²³, Thr⁴¹⁰ ou Arg⁴⁵⁸., Calvi et Schipani, 2000). Ces patients sont sujets à une forme particulière de nanisme.

4. La génération de ligands biotechnologiques

La description en 1970 de la première enzyme de restriction de type II (Smith et Wilcox, 1970), a permis 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 50 dernières années. L'un des premiers succès du génie génétique fut la production d'insuline humaine non antigénique par la bactérie *E. coli* en 1979 (Goeddel et al., 1979). L'insuline d'origine bactérienne est utilisée chez les 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 permis l'éclosion d'un autre domaine, la biologie moléculaire. Les techniques de clonage, basées 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 autres, permis 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 un 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 al., 2000), nucléaires (Shiga et al., 2003), membranaires (Abraham et al., 1997) que plasmiques (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 al., 1962) a permis la production de protéines de fusion fluorescente, donc facile à détecter optiquement. Depuis, des protéines fluorescentes couvrant l'ensemble du spectre visible et même au-delà ont été générées (Day et Davidson, 2009; Shcherbakova et Verkhusha, 2013).

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. De telles protéines de fusion pourraient avoir un potentiel diagnostique, dans le cas où elles permettent de détecter un récepteur qui est indicatif d'une pathologie ou d'un état. En effet, plusieurs GPCRs sont des biomarqueurs de certaines maladies, mais la difficulté de détecter ces molécules sur des cellules intactes limite leur utilisation. De plus, une étude publiée en 2009 a révélé que les anticorps anti-GPCRs étaient plus souvent qu'autrement non-spécifiques (Michel et al., 2009). Peut-être que les protéines de fusion pourraient offrir une alternative plus spécifique pour la détection des GPCRs sur les cellules intactes.

Il est aussi possible de générer des protéines des protéines de fusion avec un potentiel thérapeutique. En effet, de nombreuses protéines de fusion de ce type sont actuellement disponibles sur le marché : Enbrel® (récepteur au TNF- α fusionné avec le domaine Fc des IgG1), Ontak® (IL-2 humaine fusionnée aux domaines catalytiques et transmembranaires de la toxine de la diphtérie) ou Amevive® (la molécule d'adhésion humaine LFA-3 fusionnée au domaine Fc des IgG1) (Yu et al, 2015). Dans la conception des protéines de fusion thérapeutiques, l'un des domaines joue un rôle fonctionnel (exemple : lier le récepteur), alors que l'autre vient conférer de nouvelles propriétés au premier domaine. Parmi ces propriétés, on retrouve une amélioration de la stabilité, des effets cytotoxiques, une meilleure pharmacocinétique ou une meilleure pharmacodynamique (Yu et al., 2015). Les protéines de fusion Fc sont particulièrement attractives, car la fusion avec ce domaine permet entre autres de solubiliser les protéines/peptides hydrophobiques et de prolonger la demi-vie de la protéine de fusion tout en profitant de la purification abordable et efficace basée sur les protéines A/G (Mekhaïel et al., 2011). Les protéines de fusion basées sur l'albumine sérique humaine (HSA) peuvent conférer de nombreuses propriétés utiles à des protéines de fusion thérapeutiques. En premier lieu, la HSA est une protéine sérique de 66,5 kDa avec une demi-vie d'environ 19 jours dans le plasma (Strohl W.R., 2015). En effet, le fait que cette protéine soit à la limite supérieure de taille pour la filtration glomérulaire, en plus d'être fortement anionique, résulte en une très lente filtration par les reins d'où la longue demi-vie (Caliceti et Veronese, 2003). Il s'agit aussi de la protéine la plus abondante dans le sang, avec une concentration sérique de 50 mg/ml. La HSA exerce de nombreuses

fonctions, dont le contrôle du pH du plasma, le transport des acides gras, ainsi qu'un rôle dans le maintien de la pression sanguine. De plus, la HSA a tendance à s'accumuler dans les tumeurs et les tissus inflammés, ce qui laisse croire qu'une protéine de fusion HSA pourrait aider à cibler ces sites (Kratz F, 2008). De plus, une telle protéine de fusion pourrait permettre à un peptide ou à une autre protéine de plus petite taille, d'échapper au processus de filtration glomérulaire. Toutefois, les protéines de fusion thérapeutiques comportent certains risques, notamment des réactions d'hypersensibilités de type I et IV. De plus, étant donné que la protéine de fusion utilisée n'est pas naturelle, il y a d'importants risques d'immunogénicité (Baldo BA, 2015).

5. Problématiques et objectifs du projet de recherche

Lors de ma maîtrise, j'ai démontré qu'il était possible de générer des protéines de fusion ligands des deux principales classes de GPCRs (Charest-Morin et al., 2013; Charest-Morin et Marceau, 2016). J'ai créé des protéines de fusion ligands des récepteurs PTH₁ et B₂. En effet j'ai généré une protéine de fusion fluorescente agoniste du B₂R. Celle-ci est composée de la GFP fusionnée à l'extrémité N-terminale de la maximakinine (MK; EGFP-MK). Par la stimulation de cellules exprimant transitoirement le B₂R de lapin avec EGFP-MK, j'ai démontré que cette protéine de fusion est internalisée par un mécanisme β -arrestine dépendant. Une protéine de fusion pour le PTH₁R a aussi été conçue. Puisque dans le cas du PTH₁R, c'est l'extrémité N-terminale qui interagit avec le récepteur (Pal et al., 2012), la GFP a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de la PTH₁₋₃₄ (PTH₁₋₃₄-EGFP; Charest-Morin et al., 2013). Cette construction a permis de visualiser l'endocytose du PTH₁R ainsi que sa colocalisation avec les β -arrestines ainsi qu'avec plusieurs marqueurs des endosomes précoces et tardifs. C'est sur ces travaux antérieurs que se basent mes travaux de doctorats.

Pour mon doctorat, j'ai décidé de poursuivre mes travaux sur les protéines de fusion ligands des GPCRs. Toutefois, j'ai développé ces protéines de fusion afin de leur conférer des propriétés non seulement d'imagerie mais aussi des propriétés diagnostiques et thérapeutiques. Dans mes travaux de doctorat, j'ai utilisé mes connaissances sur les

protéines de fusion pour répondre à deux problématiques, la première avec des applications diagnostiques alors que la seconde a des applications thérapeutiques.

La première problématique que j'ai étudiée est la difficulté de détecter les niveaux endogènes de GPCRs. En effet, ce sont des protéines très difficiles à détecter avec les stratégies actuelles, notamment les anticorps. Il y a plusieurs situations où il est impossible de générer des anticorps contre certains antigènes. Par exemple, lorsque l'antigène possède une forte homologie avec une protéine de l'animal immunisé, il sera très difficile de générer un bon anticorps (Chames et al., 2013). C'est un problème pertinent dans le cas des GPCRs, car ces récepteurs sont souvent bien conservés d'une espèce à l'autre. Aussi si l'épitope à reconnaître est conformationnel ou post-traductionnel, l'anticorps résultant risque d'être éliminé lors de l'apprêtement des antigènes (Keefe et al., 2013). Pour détecter des GPCRs sur de cellules intactes, il faut absolument que l'anticorps soit capable de reconnaître la conformation intacte et tridimensionnelle du récepteur alors que la plupart des anticorps sur le marché reconnaissent les structures dénaturées des protéines. Aussi il est très difficile pour des molécules de très grandes tailles comme les anticorps (>150 kDa) de détecter les GPCRs intacts, car ceux-ci sont enfouis dans la membrane plasmique. De plus, comme mentionné plus haut, les anticorps anti-GPCRs commerciaux ne sont pas validés et sont plus souvent qu'autrement non-spécifiques (Michel et al., 2009). Une autre étude portant sur plus de 20 000 anticorps commerciaux a rapporté que seulement la moitié d'entre eux pouvait détecter leur cible dans l'application recommandée par le fabricant (Berglund et al., 2008). Une approche basée sur les protéines de fusion permettrait la détection spécifique des GPCRs. En effet, cette approche est basée sur le peptide ligand du récepteur qui bénéficie de plusieurs millions d'années de coévolution avec sa cible, résultant en une affinité très élevée. Toutefois, l'approche basée sur les protéines de fusion fluorescentes que j'ai explorée durant ma maîtrise n'est pas compatible avec la détection des populations endogènes de récepteur. En effet, ceux-ci sont trop peu abondants, seulement quelques femtomoles de récepteurs par cm^2 de cellules en culture. Aussi, la fluorescence n'est pas un outil assez sensible pour permettre la détection de ces récepteurs. Je m'étais donc fixé comme objectif de développer des protéines de fusion ligands des deux principales classes de GPCRs (A et B) permettant la détection des niveaux endogènes de ces récepteurs. Pour y arriver, j'ai proposé de remplacer le domaine fluorescent de mes

précédentes constructions par des domaines fonctionnels (enzymes ou domaine antigénique). Cela devrait permettre une amplification du signal émis par la protéine de fusion ce qui supportera la détection de faible quantité de GPCRs.

La seconde problématique de recherche couverte par mon projet de doctorat concerne la stimulation du B₂R. Des données précliniques suggèrent que la stimulation du B₂R par son agoniste, la BK, cause de nombreux effets cardiovasculaires bénéfiques. En effet, l'administration de la BK entraîne des effets anti-hypertensifs et des effets cardioprotecteurs (anti-hypertrophie, prévention des infarctus et prévention des arythmies; Blaes et Girolami, 2013). De plus, les effets thérapeutiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine proviennent en partie de la stimulation du B₂R par la BK (Linz et al., 1995). Malgré l'ensemble de ces effets bénéfiques, ni la BK ni aucun agoniste du B₂R n'est utilisé en clinique. La raison est simple; la BK cause de nombreux effets extravasculaires indésirables. La BK peut stimuler directement les afférences sensorielles nerveuses menant ainsi à la perception de douleur (Golias et al., 2007). Toujours dans le système nerveux, la BK peut aussi stimuler la partie afférente du système nerveux autonome et causer ainsi de la tachycardie (Cloutier et al., 2002). Puisqu'il semblerait que la majorité des effets bénéfiques de la BK soient générés par une stimulation endothéliale et que les effets néfastes par une stimulation extravasculaire, j'avais comme objectif d'essayer trouver une solution pour dissocier les effets bénéfiques des effets néfastes. J'ai donc proposé qu'un ligand de haut poids moléculaire puisse permettre la stimulation vasculaire des récepteurs B₂ de la BK sans stimuler les récepteurs extravasculaires. En effet, un ligand de haut poids moléculaire du B₂R serait restreint au niveau vasculaire, car son haut poids moléculaire l'empêcherait de sortir de la circulation. Pour ce faire, j'ai fusionné une protéine de haut poids moléculaire à l'extrémité N-terminale de la BK et j'ai évalué l'activité pharmacologique d'une telle construction.

En combinant les connaissances sur les protéines de fusion ainsi que sur les GPCRs, il sera possible d'étudier de manière plus approfondie ces récepteurs et d'ainsi générer des protéines de fusion conférant des nouvelles propriétés thérapeutiques ou diagnostiques aux ligands de ces récepteurs

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1 Culture cellulaire

Des cellules HEK 293a, obtenues de la compagnie Sigma-Aldrich ont été utilisées dans la grande majorité des 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 été utilisées comme cellules productrices pour la génération de l'entièreté des protéines de fusions évaluées dans cette thèse (voir section Production des protéines de fusion).

Ces cellules ont aussi été utilisées pour générer des transfectants stables. Brièvement, ces cellules ont été transfectées puis maintenues en culture avec l'agent de sélection généticienne (50 µg/ml, 3 semaines) avant d'être triées en fonction du transgène exprimé *via* cytométrie en flux. Les transfectants stables suivants ont été générés et utilisés : le récepteur myc-B₂ de rat et le récepteur myc-B₂ humain, toutes deux des constructions originales.

D'autres lignées cellulaires ont aussi été utilisées dans certaines expériences. Les lignées MG-63 (ostéosarcome humain; ATCC # CRL-1427) et HOS (ostéosarcome humain; ATCC # CRL-1543) sont toutes deux des dons du Dr Patrice Poubelle, et ont été utilisées dans les expériences portant sur les ligands biotechnologiques du récepteur PTH₁.

1.2 Vecteurs

De nombreux vecteurs ont été utilisés pour transfecter les cellules HEK 293a. La liste complète est présentée dans le Tableau 4. De nombreux vecteurs ont été générés spécialement pour ce projet. Les constructions originales réalisées dans le cadre de ce projet seront détaillées plus bas.

1.2.1 Construction des vecteurs B₂R et myc-B₂R humains

Le vecteur codant pour le récepteur B₂ humain a été généré suite à l'amplification de la région codante de l'exon 3 du gène de ce récepteur (BDKRB2; Leeb-Lundberg et al., 2005)

à l'aide des oligonucléotides suivants à partir de l'ADN génomique de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) : 5'- C GTT TAA ACG GGC CCT ATG CTC AAT GTC ACC TTG C -3' et 5'- TTG GTA CCG AGC TCG TCA CTG TCT GCT CCC TGC -3'. Le produit de PCR a été cloné à l'intérieur du vecteur pcDNA3.1 digéré avec les enzymes de restrictions XbaI et BamHI (digestion 2 heures à 37 °C) grâce à la technique de clonage *Gibson Assembly*. La séquence codant pour le récepteur B₂ humain a été validée par séquençage.

Tableau 4 : Vecteurs

Vecteur	Origine	Référence
Ligands biotechnologiques		
APEX2-(NG) ₁₅ -MK	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
cyto myc-HSA-MK	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
EGFP-MK	Construction originale	Charest-Morin et al., 2013
HSA	Origene Technologies # cat. RC319937	Charest-Morin et al., en révision
HSA-(NG) ₅ -BK	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
HSA-(NG) ₃₀ -MK	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
HSA-(NG) ₄₅ -MK	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
HSA-(NG) ₆₀ -MK	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
HSA-MISI	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
HSA-MK	Construction originale	Charest-Morin et al., en révision
PTH-APEX2	Construction originale	Charest-Morin et al., Accepté
PTH-HRP	Construction originale	Charest-Morin et al., Accepté
PTH-myc	Origene Technologies # cat. RC219848	Charest-Morin et al., Accepté
Récepteurs		
human myc-B ₂ R	Construction originale	Charest-Morinet al., 2015
MRGPRX2-Tango	Addgene # cat. 66440	Kroeze et al., 2015
PTH ₁ R	Don Dr T.J. Gardella	
rat myc-B ₂ R	Construction originale	Charest-Morinet al., 2015
Protéines cytosoliques		
Lamp ₁ -mCherry	Construction originale	Parks et al., 2015
Rab5-GTP Locked-mCherry	Don Dr M.J. Tremblay	
Rab5-mCherry	Don Dr M.J. Tremblay	
Rab7-mCherry	Don Dr M.J. Tremblay	
β-arrestine ₁ -mCherry	Don Dr J.M. Beaulieu	
Autres		
mCherry	Takara Bio USA Inc. # cat. 632523	
pcDNA3.1(-)	Invitrogen # cat. V79520	
pcDNA3.1-APEX2-NES	Addgene # cat. 49386	Lam et al., 2015
pCMV-erHRP, N175S mutant	Addgene # cat. 79909	Joesch et al., 2016

Le vecteur codant pour le récepteur myc-B₂ humain (hu myc-B₂R) a été généré en extrayant la séquence codant pour le récepteur B₂ du vecteur précédemment décrit à l'aide des amorces de PCR suivantes : 5'- C GTT TAA ACG GGC CCT ATG GAG CAG AAA CTC

ATC TCA GAA GAG GAT CTC AAT GTC ACC TTG CAA GG -3' et 5'-TTG GTA CCG AGC TCG TCA CTG TCT GCT CCC TGC -3'. Ce produit de PCR a été cloné dans le vecteur pcDNA3.1 digéré avec XbaI et BamHI grâce à la technique *Gibson Assembly* (Gibson et al., 2009). L'ajout d'un *spacer* (souligné) entre la séquence chevauchant le vecteur et celle chevauchant l'insert a permis l'insertion de la séquence de nucléotide codant pour l'épitope myc (EQKLISEEDL). La séquence codant pour le récepteur myc-B₂ humain a été validée par séquençage.

1.2.2 Construction des vecteurs B₂R et myc-B₂R de rat

L'ADN génomique de rat a été isolé à partir d'une culture primaire de cellules de Leydig (don du Dr J. Tremblay). Le vecteur codant pour le récepteur B₂ de rat a été généré en amplifiant par PCR la région codante de l'exon 3 du gène de ce récepteur avec les amorces de PCR suivantes : 5'- C GTT TAA ACG GGC CCT ATG TTC AAC ATC ACC ACG CAA G -3' et 5'- TTG GTA CCG AGC TCG TCA CTG CTT GTT CCC CGC -3'. Le produit de PCR a été cloné à l'intérieur du vecteur pcDNA3.1 digéré avec les enzymes de restrictions XbaI et BamHI grâce à la technique de clonage *Gibson Assembly*. La séquence codant pour le récepteur B₂ de rat a été validée par séquençage. Afin de générer le vecteur codant pour le récepteur myc-B₂ de rat (rt myc-B₂R), les amorces de PCR suivantes ont été utilisées afin d'amplifier l'insert du vecteur décrit plus haut : 5'- C GTT TAA ACG GGC CCT ATG GAG CAG AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG ATG TTC AAC ATC ACC ACG CAA G -3' et 5' – TTG GTA CCG AGC TCG TCA CTG CTT GTT CCC CGC - 3'. Ce produit de PCR a été cloné dans le vecteur pcDNA3.1 digéré avec XbaI et BamHI grâce à la technique *Gibson Assembly*. L'ajout d'un *spacer* (souligné) entre la séquence chevauchant le vecteur et celle chevauchant la séquence du récepteur B₂ de rat a permis l'insertion de la séquence de nucléotides codant pour l'épitope myc (EQKLISEEDL). La séquence codant pour le récepteur myc-B₂ de rat a été validée par séquençage.

1.2.2 Construction du vecteur EGFP-MK

Le vecteur EGFP-MK, a été produit par la délétion de la séquence d'ADN du *signal peptide* de s-EGFP-MK (forme sécrétée de cette protéine de fusion rapportée dans Charest-Morin et al., 2013) selon la méthode de Hansson (Hansson et al., 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' et 5'-CTC GCC CTT GCT CAC CAT GGT CTA GAA GCT TGG G -3'. 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 du vecteur APEX2-(NG)₁₅-MK

L'agoniste du récepteur B₂, APEX2-(NG)₁₅-MK, a été généré en fusionnant la peroxydase APEX2 à l'extrémité N-terminale de l'analogue de la bradykinine MK. APEX2 est une peroxydase génétiquement modifiée créée à partir de la peroxydase de soya APX (K14D, W41F, E112K, A134P; Lam et al., 2015). Afin de minimiser le possible encombrement stérique entre la peroxydase et le récepteur cible de cette protéine de fusion, un *spacer* fait de 15 répétitions du dimère Asn-Gly (NG)₁₅ a été inséré entre la MK et APEX2. Le *spacer* formé de répétitions du dimère Asn-Gly a été précédemment rapporté comme efficace dans la génération de protéines de fusion et compatible avec le milieu extracellulaire. (Fortin et al., 2009; Charest-Morin et Marceau, 2016). Afin de générer ce vecteur, les amorces de PCR suivantes ont été utilisées afin d'amplifier la séquence codante pour la peroxydase à partir du vecteur pcDNA3.1-APEX2-NES (Addgene): 5'-C GTT TAA ACG GGC CCT ATG GAC TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GG-3' et 5'- GTT GAT CTT AGG CAA ATC GCC GTT GCC GTT GCC GTT G-3'. À l'aide de technique *Gibson Assembly*, le produit de ce PCR a été cloné à l'intérieur du vecteur HSA-(NG)₁₅-MK (voir plus bas) préalablement linéarisé par PCR avec les amorces suivantes : 5'- GAT TTG CCT AAG ATC AAC CGC AAA G-3' et 5'- AGG GCC CGT TTA AAC GCT AG- 3'. La séquence codant pour cette protéine de fusion a été confirmée par séquençage.

1.2.4 Construction des vecteurs codants pour les protéines de fusion basées sur la HSA

De nombreux vecteurs ont été générés avec l'objectif de créer un ligand de haut poids moléculaire agoniste du récepteur B₂ de la BK. Pour ce faire, diverses combinaisons de *spacers* et d'agonistes ont été fusionnées à l'extrémité C-terminale de l'albumine sérique humaine (HSA). Un vecteur codant pour la HSA a été acheté à la compagnie Origene Technologies. Ce vecteur contient la séquence complète de la HSA ainsi que son peptide

signal ce qui permet aux cellules productrices transfectées avec ce vecteur de sécréter la protéine codée par le vecteur.

La première construction basée sur la HSA qui fut générée est la HSA-MK. Il s'agit d'une protéine de fusion basée sur le ligand fluorescent agoniste du récepteur B₂ précédemment rapporté, EGFP-MK. En effet, la séquence codant pour le peptide amphibien MK a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de la HSA. Pour ce faire, la séquence codant pour la HSA a été amplifiée par PCR à partir du vecteur commercial à l'aide des amorces suivantes : 5'- GTT TAA ACG GGC CCT ATG AAG TGG GTA ACC TT-3' et 5'- TT AGG CAA ATC TAA GCC TAA GGC AGC TTG ACT TGC-3' alors que la séquence de la MK était amplifiée avec les amorces suivantes à partir du vecteur EGFP-MK : 5'-C TTA GGC TTA GAT TTG CCT AAG ATC AAC CGC AAA GG-3' et 5'- TTG GTA CCG AGC TCG TTA TCG AAA AGG GGA GAA CCC CG-3'. Les deux PCRs ont par la suite été clonés dans le vecteur pcDNA3.1 préalablement digéré avec XbaI et BamHI.

D'autres protéines de fusion basées sur la HSA ont été générées avec différentes combinaisons de *spacers* et d'agonistes. HSA-(NG)₅-BK est inspirée de la construction EGFP-S4P1, une protéine de fusion fluorescente agoniste du récepteur B₁ de la bradykinine (Charest-Morin et Marceau, 2016). Afin de générer cette protéine de fusion, la séquence de la HSA a été amplifiée par PCR à partir du vecteur codant pour la HSA à l'aide des amorces suivantes : 5'-C GTT TAA ACG GGC CCT ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TC-3' et 5'-TTG GTA CCG AGC TCG TTA TCG AAA AGG GGA GAA CCC CGG TGG ACG GCC GTT GCC GTT GCC GTT GCC GTT GCC GTT TAA GCC TAA GGC AGC TTG-3'. La présence d'un *spacer* de nucléotides (souligné) entre la séquence chevauchant celle de la HSA et celle du vecteur pcDNA3.1 a permis d'introduire (NG)₅-BK en position C-terminale de la HSA. Le produit de ce PCR a été cloné dans le vecteur pcDNA3.1 préalablement digéré avec XbaI et BamHI à l'aide de la technique *Gibson Assembly*. La protéine de fusion HSA-MISI (MISI : *maximakinin with Ile-Ser insert*) a été générée par mutagenèse dirigée par oligonucléotides à l'aide des amorces de PCR suivantes : 5'-CGC AAA GGA CCA ATC AGC CGT CCA CCG GGG-3' et 5'-CCC CGG TGG ACG GCT GAT TGG TCC TTT GCG-3'. Ces amorces ont permis d'amplifier la séquence de HSA-MK tout en insérant les résidus Ile et Ser (soulignés dans amorces) entre la séquence codant pour la BK dans la MK et l'extension hydrophile de cette dernière.

Par la suite, une autre série de protéines de fusion basée sur la HSA furent générées, mais cette fois-ci l'objectif était d'introduire un grand nombre (>30) de répétitions du dimère Asn-Gly entre la HSA et la MK. Afin d'y arriver, la séquence de la HSA a été amplifiée par PCR à l'aide des oligonucléotides suivants : 5'- C GTT TAA ACG GGC CCT ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TC-3' et 5'- CTT GTA GTC TAA GCC TAA GGC AGC TTG-3'. La séquence de nucléotides codant pour (NG)_x-MK a été produite en deux étapes. Premièrement, un PCR a permis d'extraire la séquence (NG)₁₅-Lys-des-Arg⁹-BK du vecteur EGFP-S4P1 avec les amorces suivantes : 5'-GAC GAG CTG TAC AAG GAC TAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG AAC GGC AAC GGC AAC GGC-3' et 5'- TG GTA CCG AGC TCG TTA AAA AGG GGA GAA CCC-3'. La présence d'un *spacer* de nucléotides (souligné) entre la séquence chevauchant celle de la EGFP et celle du *spacer* Asn-Gly a permis d'introduire la séquence codant pour l'épitope FLAG (DYKDDDDK) en position N-terminale de (NG)₁₅-Lys-desArg⁹-BK facilitant ainsi la manipulation à venir du *spacer* Asn-Gly. Par la suite, un second PCR a permis d'amplifier la séquence FLAG-(NG)₁₅ tout en insérant la séquence de la MK (soulignée) en position C-terminale *via* les amorces suivantes : TTA GGC TTA GAC TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG AAT GG-3' et 5'- TTG GTA CCG AGC TCG TTA TCG AAA AGG GGA GAA CCC CGG TGG ACG TGG TCC TTT GCG GTT GAT CTT AGG CAA ATC ACG CTT GCC GTT GCC GTT-3'. Le second PCR ainsi que celui fait sur la séquence de la HSA ont tous deux été clonés dans le vecteur pcDNA3.1 préalablement digéré avec XbaI et BamHI *via* la technique *Gibson Assembly*. Toutefois, étant donné la nature répétitive du *spacer* Asn-Gly, des protéines de fusion HSA avec différents nombres de répétition du *spacer* ont été obtenues. En effet, les protéines de fusion HSA-(NG)₁₅-MK, HSA-(NG)₃₀-MK, HSA-(NG)₄₅-MK et HSA-(NG)₆₀-MK ont été obtenues et validées par séquençage.

La dernière protéine de fusion HSA à avoir été produite est la forme cytosolique de HSA-MK avec un épitope myc en position N-terminale (cyto myc-HSA-MK). Cette protéine de fusion a été produite en remplaçant les 18 premiers acides aminés de la séquence de la HSA qui sont nécessaires pour la sécrétion (MKWVTFISLLFLFSSAYS) par ceux codant pour l'épitope myc (MEQKLISEEDL). Pour ce faire, la séquence de HSA-MK précédemment mentionnée a été amplifiée (sans le signal de sécrétion) à l'aide des amorces de PCR suivantes : 5'- C GTT TAA ACG GGC CCT ATG GAG CAG AAA CTC ATC TCA GAA

GAG GAT CTC AGG GGT GTG TTT CGT CGA-3' et 5'- TTG GTA CCG AGC TCG TTA TCG AAA AGG GGA GAA CC-3'. La présence d'un *spacer* de nucléotides (souligné) entre la séquence chevauchant celle du vecteur pcDNA3.1 et celle de la HSA a permis d'introduire l'épitope myc en position N-terminale de la nouvelle protéine de fusion. Ce produit de PCR a par la suite été cloné dans le vecteur pcDNA3.1 préalablement digéré avec XbaI et BamHI par la technique *Gibson Assembly*. Les séquences de l'ensemble des protéines de fusion mentionnées plus haut ont été validées par séquençage automatisé.

1.2.5 Construction des vecteurs codants pour les protéines de fusion agonistes du PTH_{1R}

Le vecteur codant pour PTH-myc a été obtenu de la compagnie OriGene et a été utilisé tel quel. La protéine de fusion PTH-APEX2 a été générée en fusionnant la séquence codant pour la prepro-PTH₁₋₈₄ à l'extrémité N-terminale de la peroxydase APEX2. Puisqu'elle contient le peptide signal et la pro-séquence de la PTH, cette protéine de fusion sera sécrétée par les cellules productrices. Pour générer PTH-APEX2, la séquence codant pour la preproPTH₁₋₈₄ a été amplifiée par PCR à partir du vecteur codant pour PTH-myc à l'aide des amorces suivantes : 5'- C GTT TAA ACG GGC CCT ATG ATA CCT GCA AAA GAC ATG-3' et 5'-CTT GTA GTC CTG GGA TTT AGC TTT AGT TAA TAC-3'. La séquence codant pour APEX2 a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces suivantes : 5'- AA TCC CAG GAC TAC AAG GAT GAC GAC G-3' et 5'-TTG GTA CCG AGC TCG TTA GTC CAG GGT CAG GCG-3'. Les deux produits de PCR ont par la suite été clonés à l'intérieur du vecteur pcDNA3.1 préalablement digéré avec XbaI et BamHI par la technique *Gibson Assembly*. La séquence codant pour PTH-APEX2 a été confirmée par séquençage.

La protéine de fusion PTH-HRP a été générée selon une stratégie similaire. En effet, la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*, HRP) a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de la preproPTH₁₋₈₄. Pour ce faire, la séquence de la PTH a été amplifiée à partir du vecteur PTH-myc avec les amorces de PCR suivantes : 5'-C GTT TAA ACG GGC CCT ATG ATA CCT GCA AAA GAC-3' et 5'-C ATA TGG ATA CTG GGA TTT AGC TTT AGT TAA TAC-3'. Dans le même ordre d'idée, la séquence codant pour la peroxydase HRP a été amplifiée à partir d'un vecteur codant pour la HRP (pCMV-erHRP, N175S

mutant; Addgene) : 5'-AA TCC CAG TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT G-3' et 5'-TTG GTA CCG AGC TCG TTA CAA GTC AGA-5'. La séquence codant pour PTH-HRP a été validée par séquençage.

1.3 Agents pharmacologiques

Outre les protéines de fusion mentionnées plus haut, les cellules et tissus ont été stimulées avec de nombreux agents pharmacologiques. Ceux-ci sont répertoriés dans le Tableau 5 avec leur origine et leur utilisation.

Tableau 5 : Agents pharmacologiques

Agent pharmacologique	Utilisation	Fournisseur
Bestatine	Inhibiteurs de peptidases/protéases	Sigma-Aldrich
Bradykinine	Agoniste B ₂ R	Bachem
Composé 48/80	Agoniste récepteur MRGPRX2	Sigma-Aldrich
des-Arg-Maximakinin	Ligand putatif du B ₁ R	Peptide 2.0
E-64	Inhibiteurs de peptidases/protéases	Sigma-Aldrich
EDTA	Inhibiteurs de peptidases/protéases	Sigma-Aldrich
Enalaprilat	Inhibiteur ACE	Kemprotec
Icatibant	Antagoniste B ₂ R	Shire
Leupeptine	Inhibiteurs de peptidases/protéases	Sigma-Aldrich
Maximakinine	Agoniste B ₂ R	Tocris
MISI	Ligand putatif du B ₂ R	CanPeptides
(NG) ₅ -BK	Ligand putatif du B ₂ R	CanPeptides
Pefabloc SC	Inhibiteurs de peptidases/protéases	Sigma-Aldrich
PTH ₁₋₃₄	Agoniste PTH ₁ R	R&D Systems
PTH ₁₋₈₄	Agoniste PTH ₁ R	R&D Systems
Puromycine	Inhibiteurs de peptidases/protéases	Sigma-Aldrich
Pyrilamine	Agoniste récepteur H ₁	Sigma-Aldrich

2. Méthodes

2.1 Transfections

Plusieurs expériences, notamment la production des protéines de fusion, sont basées sur la transfection de cellules HEK 293a avec le polyéthylèneimine (PEI). Brièvement, les

cellules ont étéensemencées de manière à atteindre une confluence de 60-80% le lendemain. Elles ont ensuite été transfectées en utilisant la quantité appropriée d'ADN selon la surface de culture (flacon 75 cm² : 15 µg; flacon 25 cm² : 5 µg; pétri 8 cm² : 2 µg; plaque 24 puits : 0,75 µg/puits). L'ADN a été dissout dans une solution de NaCl 150 mM et le PEI (1 µg/µl) a été ajouté dans un ratio de 4 :1 avec l'ADN. Cette solution a été incubée à température pièce pendant 30 minutes avant d'être ajoutées aux cellules fraîchement changées de milieu. Généralement, les cellules étaient incubées 48 heures avec un changement de milieu après 24 heures avant d'être utilisées.

2.2 Production des protéines de fusion

L'ensemble des protéines de fusion ont été produites dans des cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec le vecteur codant pour la protéine de fusion que l'on désirait produire. Certaines protéines de fusion ont été produites en tant que lysat cellulaire; c'est à dire qu'elles s'accumulaient dans le cytosol des cellules productrices alors que d'autres contenaient une séquence leur permettant d'être sécrétées dans le milieu de culture.

2.2.1 Production des protéines de fusion non-sécrétées

Les protéines de fusion EGFP-MK, APEX2-(NG)₁₅-MK (Fig. 4) et cyto myc-HSA-MK (Fig. 6) ont toutes été produites en tant que lysat cellulaire. Brièvement, des cellules HEK 293a ont été transfectées transitoirement avec le vecteur approprié avec le réactif de transfection PEI. Quarante-huit heures après la transfection, le milieu des cellules productrices a été retiré et puis ces cellules ont été rincées 2 fois avec du 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 (15,000 g; 10 minutes) et le surnageant (le lysat) fut utilisé comme solution concentrée de protéines de fusion. Des cellules transfectées avec APEX2, pcDNA3.1 ou EGFP-N3 ont été utilisées comme contrôles dans diverses expériences. Pour les cellules productrices transfectées avec APEX2 ou APEX2-(NG)₁₅-MK, une variante de ce protocole a été utilisée afin d'optimiser l'activité enzymatique de ces constructions. En effet, 24 heures après la transfection, le milieu de culture des cellules productrices a été supplémenté avec de l'hémine (concentration finale 7 µM; basé sur le

protocole de supplémentation en hème publié par Martell et al., 2016). L'hémine est une forme oxydée de l'hème, une molécule au cœur du site catalytique de la peroxydase APEX2. L'ajout d'hémine, qui sera éventuellement convertie en hème par les cellules productrices, permet l'optimisation de la production de protéines APEX2 actives.

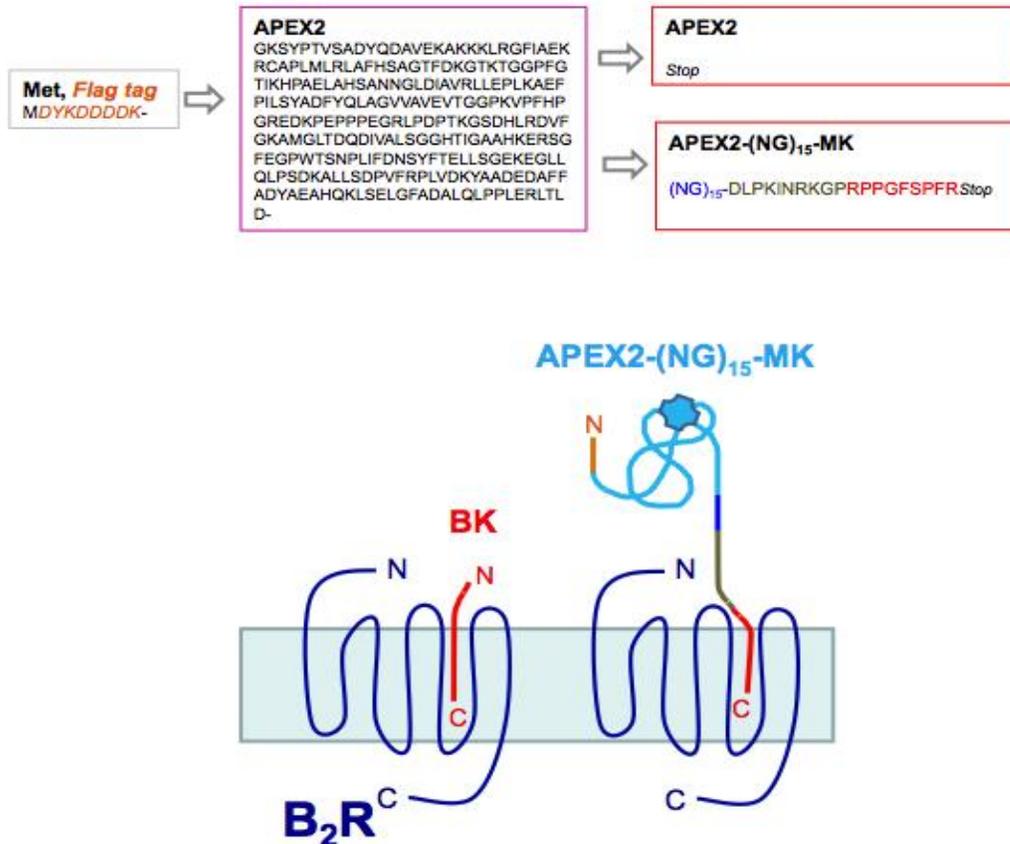


Figure 4. Représentation schématique de la protéine de fusion APEX2-(NG)₁₅-MK. Séquences en acides aminés des différents domaines de la protéine de fusion APEX2-(NG)₁₅-MK et représentation hypothétique de la liaison de cette protéine de fusion au récepteur B₂.

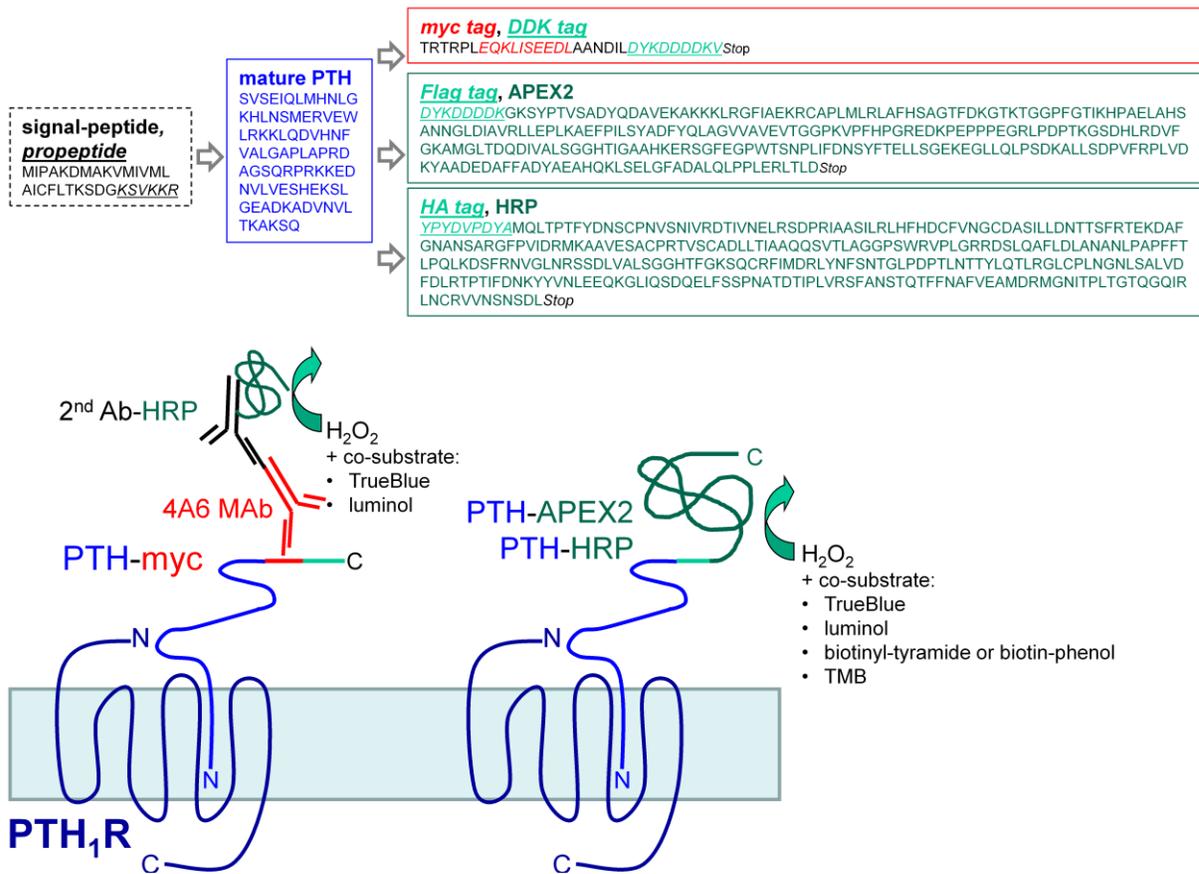


Figure 5. Représentation schématique des protéines de fusion avec un domaine peroxydase (intrinsèque ou assemblé) évaluées pour la détection du récepteur PTH₁.

Les protéines de fusion avec domaine peroxydase évaluées sont composées de la séquence complète de la prepro-PTH₁₋₈₄ fusionnée à l'extrémité N-terminale d'une peroxydase (PTH-APEX2 ou PTH-HRP) ou d'un domaine antigénique reconnu par des anticorps monoclonaux disponibles commercialement (PTH-myc). Le domaine peroxydase de ces constructions est détecté à l'aide de substrats colorimétriques (TrueBlue™ ou TMB) ou d'un substrat luminescent (luminol). La détection des peroxydases est aussi rendue possible par la biotine-phénol ou la biotine-tyramide, des substrats des peroxydases qui lorsqu'oxydés forment des liaisons covalentes avec les protéines proximales. Les molécules de biotines liées de manière covalentes sont quant à elles détectées à l'aide de conjugués de streptavidine.

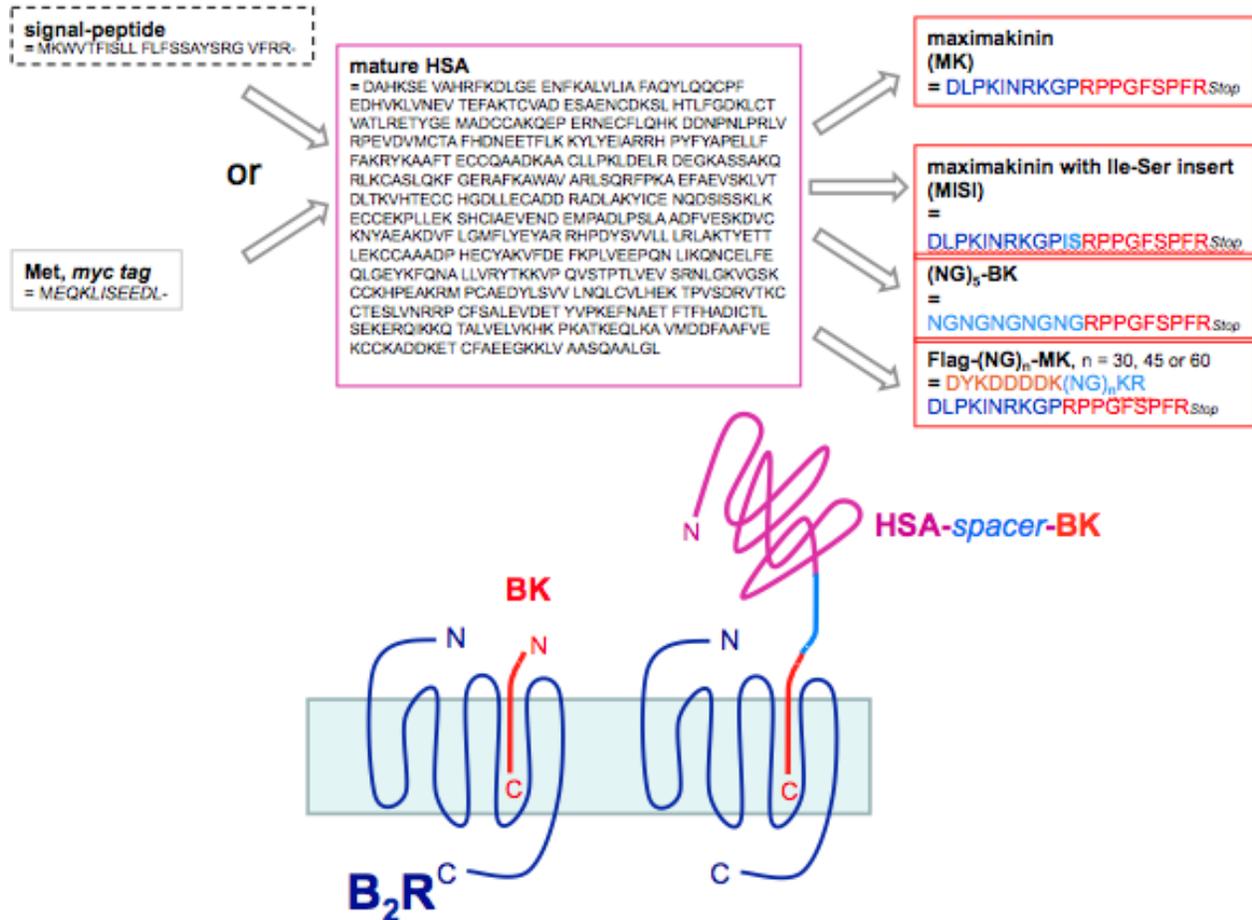


Figure 6. Représentation schématique des protéines de fusion HSA.

Séquences en acides aminés des différents domaines des protéines de fusion HSA et représentation hypothétique de la liaison de ces protéines de fusion au récepteur B₂.

2.2.2 Production des protéines de fusion sécrétées

Plusieurs ligands biotechnologiques rapportés dans cette thèse ont été produits sous forme de milieu conditionné (MC); c'est à dire le milieu de culture dans lequel la protéine de fusion a été sécrétée par les cellules productrices. Cela est rendu possible par la conservation de la séquence prépro- de la PTH₁₋₈₄ dans les ligands biotechnologiques du PTH₁R et par la conservation du signal sécrétoire de la HSA. En effet, cette séquence qui est hydrolysée lors des processus de synthèse et de sécrétion, permet à la protéine de fusion de s'accumuler dans le milieu de culture des cellules productrices.

Brièvement, afin de générer des protéines de fusion agonistes du PTH₁R (Fig. 5), des cellules HEK 293a ont été transfectées avec le vecteur approprié puis incubées à 37 °C durant 72 heures. Après cette période, le milieu de culture, maintenant milieu conditionné,

est récolté et centrifugé à vitesse maximale durant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le milieu conditionné ainsi obtenu est utilisé soit tel quel ou dilué.

Les protéines de fusion sécrétées basées sur la HSA (Fig. 6) ont été produites par un protocole semblable à celui décrit plus haut, mais avec quelques différences. Vingt-quatre heures suite à la transfection des cellules productrices, le milieu de culture de ces cellules a été remplacé par du milieu de culture sans FBS, supplémenté avec 10% Cell-Ess®. Le Cell-Ess® est une solution contenant plusieurs facteurs de croissance d'origine synthétique conçue pour remplacer le FBS dans la culture cellulaire. Le Cell-Ess® a été utilisé dans la production des protéines de fusion HSA, car le FBS est riche en albumine sérique bovine (BSA), l'équivalent de la HSA chez le veau. Il était donc préférable d'utiliser le Cell-Ess®, car la BSA présente dans le sérum aurait pu interférer avec les processus de quantification et de purification subséquents. Une fois le milieu de culture remplacé, les cellules productrices ont été incubées 72 heures à 37 °C. Après cette incubation, le milieu conditionné a été centrifugé afin de le débarrasser des débris cellulaires. Les protéines de fusion HSA ont par la suite été purifiées et concentrées à l'aide de colonnes Mimetic Blue® SA HL P6XL et une pompe pousse-seringue à infusion. Les colonnes Mimetic Blue® sont des colonnes de chromatographie par affinité contenant une résine qui lie sélectivement l'albumine et les protéines apparentées à celle-ci. Brièvement, à l'aide de la pompe pousse-seringue à infusion, la colonne Mimetic Blue® (1 ml) a été équilibrée avec 20 ml de PBS pH 7,4 avant d'être chargée avec le MC ou le lysat contenant une protéine de fusion HSA (50-100 ml pour les MCs et 1-2 ml pour les lysats). Ensuite, la colonne a été lavée avec 30 ml de PBS et les protéines de fusion HSA ayant liées la colonne ont été éluées avec une solution d'octanoate de sodium (60 mM dans PBS pH 7,4). Plusieurs fractions de 5 ml ont été éluées et la présence de protéines de fusion HSA a été déterminée par un dosage protéique et un immunobuvardage. Suite à l'éluion des ligands biotechnologiques, la colonne a été nettoyée avec 15 ml de NaOH 1 M, rincée avec 15 ml de PBS puis remplie de tampon d'entreposage (éthanol 20%/NaCl 0,1 M 80% (v/v)). Chaque colonne a été utilisée plusieurs fois selon ce protocole.

2.2.3 Validation de l'identité des protéines de fusion par immunobuvardage

Toutes les protéines de fusion ont été validées par immunobuvardage suite à la migration des lysats ou des MCs sur gels de polyacrylamide (7-15 % selon le poids moléculaire de la protéine de fusion; selon le protocole rapportée par Bawolak et al., 2007). Celles-ci ont été détectées par une panoplie d'anticorps correspondant aux différents domaines des protéines de fusion à l'étude. La liste des anticorps utilisés pour la caractérisation des protéines de fusion est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Anticorps utilisés pour les immunobuvardages

Anticorps	Origine	Fournisseur	Dilution	# catalogue
anti-BK	polyclonal de lapin	Phoenix Pharmaceuticals	1:5000	H-009-01
anti- β -actine AC-15	monoclonal de souris	Sigma Aldrich	1:50 000	A5441
anti-cFos K-25	polyclonal de lapin	SantaCruz Biotechnologies	1:50 000	sc-253
anti-FLAG 4C5	monoclonal de souris	Origene	1:500	TA50011
anti-GFP JL8	monoclonal de souris	Clontech	1:1000	632380
anti-HSA 6B11, conjugué à la HRP	monoclonal de souris	Abcam	1:100 000	ab24458
anti-myc 4A6	monoclonal de souris	EMD Millipore	1:1000	05-724MG
anti-PTH, conjugué à la HRP	polyclonal de lapin	GenWay Biotech	1:100	GWB-AF2CC0
anti-mouse IgG, conjugué à la HRP	polyclonal de chèvre	SantaCruz Biotechnologies	1:12 000	sc-2005
anti-rabbit IgG, conjugué à la HRP	polyclonal de chèvre	SantaCruz Biotechnologies	1:12 000	sc-2030

2.2.4 Dosage des protéines de fusion

Les différentes protéines de fusion ont été dosées à l'aide d'ELISA. Les protéines de fusion PTH ont toutes été dosées avec un ELISA anti-PTH (Genway Biotech) alors que les protéines de fusion basée sur la HSA ont toutes été dosées avec un ELISA anti-HSA (Abcam). Les dosages ont tous été fait en duplicata et sont représentatifs de plusieurs expériences.

2.3 Microscopie

L'ensemble des expériences de microscopie ont été effectuées à l'aide du microscope Olympus BX51 couplé à une caméra digitale CoolSnap HQ ou à une caméra couleur QImaging MicroPublisher 3.3 RTV.

2.3.1 Microscopie à fluorescence

Pour les expériences de microscopie à fluorescence, des cellules HEK 293a ont été ensemencées dans des pétris de 35 mm et transfectées ou non avec le récepteur approprié.

Dans certains cas, les cellules exprimaient aussi un second transgène fluorescent. Dans la majorité des expériences, les cellules ont été stimulées 30 minutes à 37 °C avec les protéines de fusion comme indiqué dans la légende des figures. Dans le cas où des antagonistes ont été utilisés, ceux-ci ont été ajoutés 15 minutes avant l'ajout des agonistes. Après les stimulations, les cellules furent rincées au PBS puis observées en microscopie avec un microscope Olympus BX51 couplé à la caméra digitale CoolSnap HQ (filtre pour GFP ou AlexaFluor488 (AF488): excitation 460-500 nm, émission 510-660 nm; filtre pour mCherry, QDots-705 ou AlexaFluor594 (AF594) : excitation 525-555 nm, émission 600-660 nm). L'objectif utilisé était le 100x oil UPlanApo.

Un protocole basé sur le *Tyramide signal amplification kit* a été utilisé pour une expérience. Des cellules HEK 293a non-transfectées ou exprimant le PTH₁R ainsi que des cellules MG-63 ont été stimulées avec une combinaison de PTH-myc et d'anti-myc 4A6. Après une incubation de 30 minutes à 37 °C, les cellules ont été rincées puis fixées avec du paraformaldéhyde (concentration finale 1%, 10 minutes à température pièce suivi de trois rinçage avec du PBS) avant d'être perméabilisées avec une solution de Triton-X-100 5% (5 minutes à TP suivi de 3 rinçage avec PBS). Après avoir bloqué les sites de liaisons non-spécifiques, (BSA 1%, 1 heure à TP), les cellules ont été incubées 1 heure avec un anticorps anti-mouse IgG couplé à la HRP. Suite à 3 rinçage avec du PBS, les cellules ont été incubées 15 minutes avec un conjugué fluorescent de la tyramide : Tyramide-AF488. Après un dernier rinçage avec du PBS, les cellules ont été observées avec la caméra digitale CoolSnap.

Un protocole apparenté a été appliqué aux protéines de fusion PTH-HRP et PTH-APEX2. En effet, des cellules HEK 293a transfectées (pcDNA3.1 ou PTH₁R) ou des cellules HOS ont été stimulées 30 minutes avec l'une de ces protéines de fusion. Les cellules ont par la suite été incubées avec le réactif biotine-phénol ou biotinyl-tyramide (concentration finale 1 µM, 30 min, TP) avant d'être incubées avec un conjugué de streptavidine (SA). La biotine-phénol et la biotinyl-tyramide, tout comme la tyramide-AF-488, forme un radical phenoxy très réactif lorsqu'oxydées par une peroxydase (Mayer et Bendayan, 1997). Ce radical va très rapidement former des liens covalents avec des protéines avoisinantes de la peroxydase (à l'intérieur d'un rayon de 20 nm). La présence de biotine liée de manière covalente a été détectée avec SA-Qdots-705 (observation en fluorescence avec la caméra digitale CoolSnap

HQ) ou SA-HRP (observation en transmission suite à une incubation avec le substrat des peroxydases TrueBlue™ (voir prochaine section)).

2.3.2 Détection optique des protéines de fusion avec domaine peroxydase liées à leur récepteur cible

Un des avantages de l'utilisation des peroxydases pour la détection des GPCRs est la grande disponibilité d'une variété de substrats de ces enzymes. Parmi ceux-ci, le TrueBlue™ est rapporté comme étant l'un des substrats les plus sensibles, plus sensible que le 3,3-diaminobenzidine (DAB). Lorsque le TrueBlue™ est oxydé par une peroxydase, celui-ci forme un précipité insoluble bleu foncé facilement détectable.

Des cellules HEK 293a transfectées avec le récepteur approprié ou un vecteur vide ainsi que des cellules HOS ont été stimulées avec une protéine de fusion avec un domaine peroxydase (30 minutes, 37 °C). Suite à 3 rinçages avec du PBS, ces cellules ont été incubées avec la solution de TrueBlue™ jusqu'à ce que la coloration soit optimale. Les cellules ont été observées avec la caméra couleur QImaging MicroPublisher 3.3 RTV à un grossissement final de 100x. Ce protocole correspond au protocole A pour les protéines de fusion PTH alors que celui mentionné dans la section précédente correspond au protocole B.

2.4 Essais de liaison de la [³H]BK à son récepteur

Les essais de liaison ont été faits sur des cellules adhérentes, intactes et présentant une confluence quasi maximale,ensemencées dans des plaques de 24 puits. La version tritiée de l'agoniste naturel BK ([³H]BK ; PerkinElmer,90 Ci/mmol) a été utilisée pour la réalisation des essais sur le B₂R. Le tampon employé pour la réalisation des essais de liaison au niveau du B₂R est composé de PBS supplémenté avec 0,02% azoture de sodium, 0,1 % BSA, 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) et 1 μM captopril. Ce tampon a été utilisé comme pour empêcher la dégradation des ligands grâce à la présence d'inhibiteurs de peptidases et de protéases, tout en conservant toutefois des caractéristiques physiologiques. Puisque ces essais avaient comme objectifs d'élucider les propriétés des récepteurs au niveau de la membrane plasmique, il était nécessaire d'empêcher le phénomène d'endocytose auquel est soumis le B₂R activé en maintenant la température sous 4 °C et par

la présence d'azoture de sodium dans le tampon de liaison. Deux expériences distinctes ont été effectuées avec la [³H]BK : des essais de saturation et des essais de compétition.

2.4.1 Essais de saturation

Les nouvelles constructions myc-B₂R (rat et humain) exprimées de manière stable par des cellules HEK 293a ont d'abord été validées pour leur expression et leur capacité à lier la BK par la réalisation de courbes de saturation. Pour ce faire des quantités croissantes de [³H]BK (0,5 à 7 nM) ont été ajoutées aux puits. Dans cette expérience, la moitié des puits contenaient un excès de ligand non radiomarqué, afin d'évaluer la liaison non spécifique pour une concentration donnée de [³H]BK. Les valeurs ainsi obtenues pouvaient ensuite être soustraites de la liaison totale obtenue dans les puits appariés ne contenant que le ligand radiomarqué, afin de permettre le calcul de la liaison spécifique. Suivant une période d'incubation permettant l'atteinte de l'équilibre de liaison (90 minutes sur glace), les cellules ont été rapidement lavées à 3 reprises avec du PBS. L'ajout de 1 ml de NaOH 0,1 M a servi à solubiliser les membranes cellulaires afin de récupérer la radioactivité. La solution de NaOH a été récoltée avant d'être mélangée avec 7 volumes de liquide de scintillation et chaque échantillon a été compté par scintillation afin de quantifier la radioactivité présente dans les suspensions cellulaires. Les essais de saturation ont permis d'obtenir les paramètres pharmacologiques suivants des nouvelles constructions : l'affinité (K_d) et la quantité de récepteur exprimés (B_{max}).

2.4.2 Essais de compétition

La construction des courbes de compétition pour les nouveaux ligands du B₂R a été réalisée par l'ajout de concentrations croissantes des ligands à l'étude en compétition à une concentration constante de radioligand (3 nM de [³H]BK). Après une période d'incubation permettant l'atteinte de l'équilibre de liaison (90 minutes sur glace), les cellules furent rapidement rincées avec du PBS et solubilisées dans du NaOH 0,1 M. Les suspensions ainsi obtenues ont ensuite été récoltées et comptées. L'affinité des nouveaux ligands pour un

récepteur donné est exprimée en terme de K_i , une constante de dissociation calculée à partir du K_d déjà connu du ligand radioactif de référence. L'équation servant à calculer cette valeur est $K_i = IC_{50}/(1+ L/K_d)$, où le terme IC_{50} est la concentration du nouveau ligand nécessaire pour déplacer de la moitié des sites spécifiques le ligand radiomarqué, le terme L est la concentration du ligand radiomarqué et le terme K_d est la constante de dissociation du ligand.

2.5 Évaluation de l'activité pharmacologique des protéines de fusion

2.5.1 Mobilisation calcique

La mobilisation calcique induite par des agonistes du B₂R a été quantifiée grâce aux colorants fluorescents FURA2-AM et FLUO4-AM. Le groupement acetoxymethyl (AM) de ces deux colorants leur permet de diffuser à l'intérieur des cellules, où le groupement AM sera clivé par des estérases intracellulaires piégeant ainsi le colorant à l'intérieur de la cellule. Lorsque les cellules sont activées par un stimulus entraînant une réponse calcique, le colorant va lier le calcium ce qui va induire une augmentation de sa fluorescence de manière transitoire. Des cellules HEK 293a non-transfectées ou exprimant stablement l'un des récepteurs myc-B₂ ont d'abord été décollées à l'aide du *Enzyme-Free Cell Dissociation Buffer* (Invitrogen), puisqu'il a été démontré que la trypsine pouvait cliver et activer le récepteur B₂ (Bachvarov et al., 2001). Après avoir été décollées, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans le tampon de mobilisation calcique (HBSS pH 7,4 supplémenté avec 10 mM HEPES et 1,6 mM CaCl₂). Chaque flacon de 75 cm² supporte 3 déterminations. Ensuite, le FURA2-AM ou le FLUO4-AM ont été ajoutés aux cellules à une concentration finale de 1 µM. Les cellules ont par la suite été incubées 30 minutes à 37 °C sous légère agitation afin de permettre l'entrée et la capture du marqueur calcique à l'intérieur des cellules. Après cette incubation, les cellules ont été centrifugées puis resuspendues dans un volume approprié. La mobilisation calcique a été enregistrée à partir de 2 ml de suspension cellulaire dans un spectrofluorimètre thermostaté (37 °C; FURA2-AM : excitation 340 nm, émission 510 nm; FLUO4-AM : excitation 496 nm, émission 506 nm). Dans chaque cuvette se trouvait un aimant sous contrôle d'un agitateur, ce qui assurait de maintenir les cellules en suspension tout en permettant une diffusion rapide et égale des stimuli. Après avoir enregistré le signal de base pendant 15 secondes, l'agoniste ou le

ligand putatif a été ajouté dans la cuvette et la fluorescence de la suspension cellulaire a été enregistrée sur une période de 2 minutes. Dans la situation où un antagoniste était nécessaire, celui-ci était ajouté à la suspension cellulaire 1 minute avant l'ajout de l'agoniste. Suite à la lecture, la fluorescence maximale (Fmax) était enregistrée en ajoutant 15 µL de Triton-X-100 10%, puis la fluorescence minimale (Fmin) était à son tour observée en ajoutant 15 µL de NaOH 1 M et 100 µL d'EGTA 100 mM. Les concentrations de calcium intracellulaire mobilisées ont été calculées à l'aide de la formule suivante : $[Ca^{2+}]_i = K_d((y - F_{min}) / (F_{max} - y))$ où K_d représente l'affinité du colorant pour le calcium (FURA2 : 224 nM et FLUO4 : 335 nM; d'après la formule proposée par Grynkiewicz et al., 1985). Dans cette équation y représente la lecture de fluorescence à un moment donné. Afin de permettre une meilleure comparaison entre les différentes expériences, les résultats de mobilisation calcique ont été exprimés en *fold-increase* de la concentration de calcium intracellulaire de base en fonction du temps.

2.5.2 Évaluation de l'accumulation d'AMP cyclique par ELISA

Puisque le récepteur PTH₁ est principalement couplé à la protéine G G_α et non G_q comme pour le récepteur B₂, il était impossible d'évaluer l'activité pharmacologique des protéines de fusion PTH *via* un essai de mobilisation calcique. C'est pourquoi, l'étude de l'activité pharmacologique de ces protéines de fusion a été approfondie *via* la quantification de l'accumulation d'AMP_c suite à la stimulation du PTH₁R. Pour ce faire, des cellules HEK 293a transfectées avec PTH₁R ont été ensemencées dans des pétris de 8 cm² puis traitées avec différentes concentrations de PTH₁₋₃₄, PTH₁₋₈₄, PTH-myc ou PTH-HRP. Les cellules ont été stimulées sur une période de 10 minutes (37 °C), puis lysées avec la solution de lyse fournie dans le kit d'ELISA anti-AMP_c (Cell BioLabs). Les échantillons ont par la suite été quantifiés grâce à la plaque d'ELISA anti-AMP_c. Chaque échantillon a été analysé en duplicata.

2.5.3 Immunobuvardages anti-c-Fos

L'expression du facteur transcription c-Fos est un évènement de signalisation commun à de nombreux GPCRs (Syme et al., 2005). L'accumulation de c-Fos après la stimulation des

récepteurs B₂ et PTH₁ a été démontrée de nombreuses fois dans le passé (McCauley et al., 1997; Bawolak et al., 2009). Des cellules HEK 293a non-transfectées, ou exprimant le récepteur approprié (stablement ou transitoirement) ont été stimulées avec des agonistes ou des protéines de fusion sur des périodes variant de 30 minutes à 6 heures (37 °C). Par la suite, les cellules ont été lysées et les extraits cellulaires totaux ont été migrés sur des gels de polyacrylamide. Un protocole d'immunobuvardage semblable à celui décrit plus tôt a été appliqué et la protéine c-Fos a été détectée grâce à l'anticorps polyclonal de lapin anti-c-Fos K25 (Tableau 6).

2.6 Cytométrie en flux (FACS)

Afin de pouvoir quantifier l'internalisation de l'anticorps anti-myc fluorescent conjugué à PTH-myc, des cellules HEK 293a non-transfectées ou transfectées transitoirement avec le récepteur PTH₁ ont été décollées de leur flacon à l'aide d'un tampon de dissociation sans protéase. Ces cellules ont été centrifugées, puis resuspendues dans du milieu de culture DMEM sans sérum avant d'être distribuées dans des tubes coniques Eppendorfs de 1,5 ml. C'est dans ces tubes que les cellules ont été stimulées avec PTH-myc ou PTH₁₋₈₄ ainsi qu'avec l'anticorps anti-myc 4A6 conjugué à l'AF488. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C sous légère agitation, les cellules ont été centrifugées, lavées, puis resuspendues dans du PBS. Les différentes suspensions cellulaires ont ensuite été analysées grâce à l'appareil de cytofluorimétrie *BD SORP LSR II cell analyzer*. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel *BD FACS DIVA*.

2.7 Quantification de l'activité enzymatique des protéines de fusion avec domaine peroxydase liées à leur récepteur cible

À l'aide d'un lecteur de plaque, une approche plus quantitative a été utilisée afin de quantifier l'activité enzymatique des protéines de fusion avec domaine peroxydase liées à leur récepteur cible.

2.7.1 Détection chimiluminescente

Des cellules exprimant le récepteur approprié, de manière transitoire, stable ou endogène, ainsi que des cellules transfectées avec un vecteur vide ont étéensemencées dans des plaques 24 puits blanches et opaques (pour limiter la diffusion de la luminescence). Ces cellules ont par la suite été stimulées avec la protéine de fusion appropriée (30 minutes, 37 °C). Après 3 rinçages avec de l'HBSS, ces cellules ont été mises en contact avec une solution de luminol (Western Lightning Plus ECL substrate), et elles ont été immédiatement lues à l'aide d'un lecteur de plaque (TECAN® Infinite 200 PRO microplate reader). Les résultats sont exprimés en *relative luminescence units* (RLU). Afin de prouver la spécificité des protéines de fusion, leur liaison a été compétitionnée avec un excès d'un ligand de leur récepteur cible (HOE-140 pour B₂R et PTH₁₋₃₄ pour PTH₁R).

2.7.2 Détection colorimétrique

Des cellules exprimant le récepteur approprié, de manière transitoire, stable ou endogène, ainsi que des cellules transfectées avec un vecteur vide ont étéensemencées dans des plaques 24 puits. Celles-ci ont été traitées comme lors de la détection chimiluminescente à l'exception qu'après avoir été rincées 3 fois, elles ont été incubées 30 minutes supplémentaire avec une solution de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) à l'abri de la lumière. Après cette seconde incubation, la réaction enzymatique a été arrêtée avec un volume égal d'une solution d'HCl 0,2 M, ce qui a eu comme effet de faire passer le produit d'oxydation bleu du TMB au jaune. L'absorbance de chaque puits a été lue à 450 nm à l'aide du lecteur de plaque.

Étant donné le faible bruit de fond rencontré avec cette méthode, elle fut utilisée afin de générer des courbes de compétition avec les protéines de fusion utilisées comme ligands non-isotopiques. Pour ce faire, des concentrations croissantes de ligands ont été mises en compétition avec une concentration constante de protéines de fusion avec un domaine enzymatique.

2.8 Essais de contractilité de la veine ombilicale humaine

Le comité d'éthique du CHU de Québec a approuvé l'utilisation anonyme de cordons ombilicaux obtenus après césarienne élektive (numéro de projet : 2012-323). Suite à l'obtention du cordon ombilical, la veine ombilicale a été isolée puis coupée en anneaux de

2 à 3 mm. Les anneaux de veine ombilicales ont été utilisés dans un système de bains à organes isolés en tant qu'essai contractile pour les récepteurs B₂ de la BK et H₁ de l'histamine (Marceau et al., 1994; Gera et al., 2011; Charest-Morin et al., 2015). La veine ombilicale humaine peut être contractée par la stimulation du B₂R par son agoniste de façon répétée, tout en présentant une réponse contractile stable (Marceau et al., 1994). Brièvement, après avoir été coupés en anneaux, les tissus ont été fixés dans les bains sous une tension basale. Les tissus ont été maintenus à une température de 37 °C, dans une solution de Krebs (117,5 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,18 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ et 5,5 mM D-glucose) oxygénée (95 % O₂: 5% CO₂). Les changements de tonus vasculaire suivant les traitements avec les différents agents contractiles ont été mesurés par des transducteurs couplés à des enregistreurs.

L'essai de contractilité de la veine ombilicale humaine a été utilisé afin de déterminer la puissance de différents agents contractiles à l'étude (histamine, MK et BK). De plus, cet essai a permis d'étudier les effets de certains antagonistes des récepteurs H₁ et B₂, ainsi que ceux d'inhibiteurs de peptidases/protéases, sur la contraction de la veine ombilicale humaine induite par la MK. Brièvement, après une période d'équilibration initiale de 3 heures suite au montage des tissus dans les bains, des courbes concentration-réponse ont été construites par l'ajout successif de quantités croissantes d'agent contractile dans le tampon de Krebs. Lorsque des antagonistes ou des inhibiteurs de peptidases sont utilisés, ceux-ci sont ajoutés aux bains 30 minutes avant la réalisation de la courbe concentration-effet.

2.9 Essais *in vivo*

Toutes les procédures expérimentales exécutées sur des animaux ont été revues et approuvées par le comité de protection des animaux de l'Université Laval, en accord avec les politiques et lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux (dossier #2012-223). L'ensemble des expériences a été effectué sur des rats Sprague-Dawley mâles (300-375 g; Charles River Laboratories). Les rats étaient logés dans une pièce avec température contrôlée (22 ± 1 °C) et avaient accès à une diète normale de moulée et d'eau. Préalablement à leur utilisation, les rats ont bénéficiés d'une période d'acclimatation d'une semaine. À la fin de l'acclimatation, la journée de l'expérience, les rats ont été anesthésiés

avec du pentobarbital de sodium (50 mg/kg, i.p.). Suite à l'anesthésie, un cathéter a été inséré dans la veine jugulaire droite (pour les traitements i.v.) et un autre dans l'artère fémorale gauche (pour les mesures directes et continues de la pression artérielle et du rythme cardiaque). Le cathéter implanté dans l'artère fémorale gauche était connecté à un transducteur couplé à un ordinateur pour l'acquisition des données. Durant la durée de l'expérience, l'animal était maintenu sous anesthésie, et celui-ci était gardé au chaud avec une plate-forme chauffante.

2.9.1 Mesure des effets hémodynamiques *in vivo* de divers stimulants

À la suite d'une période d'au moins 20 minutes, afin de permettre à l'animal de se stabiliser, le rythme cardiaque et la pression artérielle de l'animal ont été enregistrés pendant 15 minutes pour documenter le seuil de signal. Une courbe dose-réponse a été générée en enregistrant les variations dans la pression artérielle et dans le rythme cardiaque suite à une injection intraveineuse de doses croissantes de MK ou de BK. Les peptides avaient été dissouts dans une solution isotonique de saline (0,9% NaCl) supplémenté avec 0,1% de BSA afin de prévenir l'adsorption des peptides sur les surfaces de verre et de plastique. Toutes les injections de peptides ont été administrées sous forme de bolus i.v. (100 µL), puis rincées avec un volume égal de saline (100 µL; le volume mort du cathéter). Un seul peptide a été testé par rat, et chaque injection débutait avec une injection de saline-BSA 0,1% suivi de la plus faible dose de peptide. La dose suivant était uniquement administrée lorsque les effets de la dose précédente sur les différents paramètres cardiovasculaires étaient revenus à leur niveau de base (généralement entre 2 et 10 minutes). Après avoir généré la courbe dose-réponse, les animaux étaient euthanasiés avec une surdose de pentobarbital de sodium (240 mg/kg, i.v.).

Les mécanismes responsables des effets cardiovasculaires de la MK chez le rat anesthésié ont d'abord été étudiés à l'aide d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE; enalaprilat). Pour ce faire, l'enalaprilat a été administré sous forme de bolus i.v. (0,1 mg/kg) suite à une période d'enregistrement du niveau de base de la pression artérielle et du rythme cardiaque de 10 minutes. Après avoir observé les effets de l'inhibiteur pendant 15 minutes, une courbe dose-réponse de la MK a été générée comme mentionné plus haut. Des expériences supplémentaires ont été conduites avec des rats anesthésiés prétraités avec

l'antagoniste persistant du B₂R, l'icatibant (HOE-140, D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK). Dans ces expériences, l'icatibant a été administré sous forme d'un bolus i.v. (25 µg/kg), 15 minutes avant l'injection de doses croissantes de MK. D'autres courbes dose-réponse de la MK ont été obtenues chez des rats prétraités avec la pyrillamine, un antagoniste du récepteur H₁ de l'histamine. Chez ces rats, la pyrillamine a été injectée sous forme d'un bolus i.v. (5 mg/kg), 15 minutes avant la génération d'une courbe dose-réponse pour la MK. Afin de valider l'activité pharmacologique de la pyrillamine, l'effet d'une forte dose d'histamine (6,4 µg/kg) sur la pression artérielle et le rythme cardiaque a été enregistré chez des rats anesthésiés ayant reçus ou non un prétraitement avec l'antagoniste.

2.9.2 Mesure par effet Doppler des effets hémodynamiques au niveau des membres postérieurs chez le rat anesthésié

Après avoir préparé le rat comme mentionné plus haut, une sonde pulsée miniaturisée Doppler (*miniaturized pulsed Doppler flow probe*; Haywood et al., 1981) a été implantée autour de l'aorte abdominale distale afin d'enregistrer les changements dans les paramètres hémodynamiques au niveau des membres postérieurs (Gardiner et Benett, 1988; Jean et al., 2016a). Les expériences ont été effectuées 30 minutes après l'installation de la sonde, et une seconde période de 30 minutes a été consacrée à l'enregistrement des signaux de bases. Les rats ainsi équipés ont été traités selon le protocole décrit plus haut.

2.10 Étude du métabolisme de la MK par chromatographie liquide couplé à de la spectrométrie de masse (LC-MS)

Le peptide synthétique MK a été incubé dans un tube contenant 2 ml de tampon de Krebs en présence d'un anneau de veine ombilicale humaine fraîchement préparé (37 °C, 5-15 minutes). Suite à cette incubation, les tissus ont été enlevés et 5 volumes d'éthanol glacial ont été ajoutés au tampon de Krebs contenant le peptide afin de précipiter les protéines. Ce tube a été incubé pendant 1 heure sur glace, puis centrifugé à vitesse maximale pendant 10 minutes afin d'éliminer les protéines précipitées. Le surnageant, contenant les kinines, a été collecté, puis évaporé jusqu'à l'obtention d'un dépôt solide à l'aide d'un évaporateur sous vide. Le dépôt a été solubilisé dans un petit volume d'eau stérile puis l'échantillon a été dessalé à l'aide d'une colonne C18. Suite à l'élution, le peptide a de nouveau été séché

avec un évaporateur sous vide puis resuspendu dans une solution d'acide formique 0,1%. Cent femtomoles de chaque échantillon ont été analysés. Les échantillons ont ensuite été séparés par online *reversed-phase nanoscale capillary liquid chromatography* puis analysé par *electrospray mass spectrometry* comme décrit précédemment (Charest-Morin et al., 2017).

2.11 Analyse statistique

Les valeurs numériques sont rapportées en tant que moyenne \pm 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 suivi d'un test de comparaisons multiples (Dunn). Les groupes de valeurs suivant une distribution normale ont été comparées par une ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples (Tukey ou Dunnett's si les valeurs sont comparées à un groupe contrôle commun) ou d'un test t de Student (pour les paires de valeurs isolées). Ces tests ont été effectués à l'aide du programme InStat 3.05 (Graphpad Software). Les résultats des essais de liaison ont été analysés avec le logiciel Prism5.0 (Graphpad Software) à l'aide d'une régression non-linéaire appliqué à une équation de compétition à un site. Les IC₅₀ des différents nouveaux peptides ont été obtenus par cette méthode.

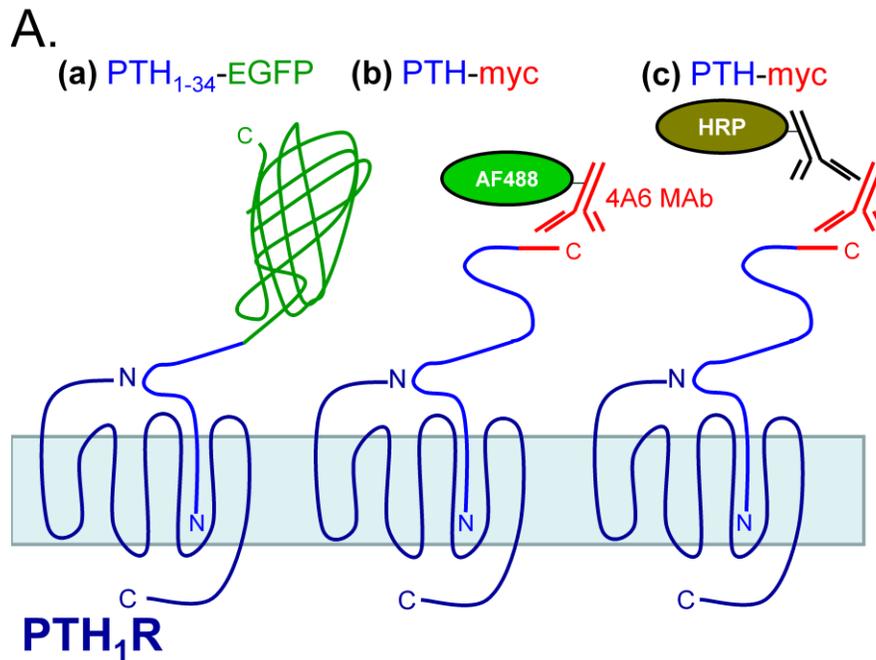
RÉSULTATS

1. Caractérisation des protéines de fusion agonistes du récepteur PTH₁ de la parathormone

Afin d'améliorer la sensibilité de la détection du récepteur PTH₁ par PTH₁₋₃₄-EGFP (Charest-Morin et al., 2013), 3 protéines de fusion avec un domaine peroxydase ont été générées. En effet, les protéines de fusion PTH-myc, PTH-APEX2 et PTH-HRP ont été sécrétées par des cellules productrices suite à la transfection de ces dernières avec le vecteur approprié. Le milieu de culture de ces cellules contenant une ou l'autre de ces protéines de fusion, nommé milieu conditionné (MC), a été utilisé dans diverses expériences.

PTH-myc est une protéine de fusion composée de la PTH intacte à laquelle deux épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux disponibles commercialement ont été ajoutés en position C-terminale. En effet, on retrouve les épitopes FLAG (aussi appelé DDK ; DYKDDDDK) et myc (EQKLISEEDL). La présence de ces épitopes, et plus particulièrement de l'épitope myc, a permis l'assemblage d'un domaine fluorescent (avec des anticorps anti-myc couplés à des fluorophores) ou d'un domaine enzymatique à activité peroxydase (à l'aide d'un anticorps anti-myc et d'un anticorps secondaire reconnaissant le précédent et couplé à la HRP; Fig. 7).

PTH-APEX2 est une protéine de fusion contenant aussi l'entièreté de la séquence de la PTH qui a été fusionnée par son extrémité C-terminale à la peroxydase modifiée génétiquement APEX2. APEX2 dérive de la peroxydase de soya APX, une peroxydase avec une excellente activité enzymatique au niveau du cytosol. La peroxydase APEX2 a été obtenue par plusieurs cycles d'évolution dirigés chez la levure à partir de la peroxydase native APX (Lam et al., 2015 ; Martell et al., 2012). L'insertion de plusieurs mutations dans APX (K14D, W41F, E112K, A134P) a permis d'obtenir APEX2, une peroxydase avec une plus grande stabilité, une meilleure activité catalytique et une meilleure expression dans les cellules de mammifères (Lam et al., 2015).



B. PTH-myc =
prepro-PTH₁₋₈₄, human, tagged (OriGene)

MIPAKDMAKVMIVMLAICFLTKSDGKSVKKR
SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAP
RDAGSQRPRKEDNVLVESHEKSLGEADKADVNLTKAKSQ
TRTRPLEQKLISEEDLAANDILDYKDDDDKV_{stop}

31 first residues = signal peptide

84 next residues = mature PTH

cloning sites + joining peptides

myc tag

DDK tag

mature protein 13.0 kDa

Figure 7. PTH-myc : ligand bi-fonctionnel du récepteur PTH₁ de la parathormone.

(A) Représentation schématique du récepteur PTH₁ et de son ligand bi-fonctionnel : PTH-myc. PTH-myc peut être utilisé pour transporter divers cargos à l'aide de l'interaction entre l'épitope présent en C-terminal et l'anticorps monoclonal anti-myc 4A6. PTH-myc peut être couplé à un anticorps conjugué à un fluorophore (b) ou participer à la formation d'un complexe trimoléculaire avec un anticorps anti-myc et anticorps secondaire couplé à la HRP (c). (B) Séquence d'acides aminés formant le ligand biotechnologique PTH-myc.

Ces trois protéines de fusion présentant des domaines différents, mais avec une activité enzymatique semblable ont été d'abord caractérisées (expression, dosage et activité pharmacologique), et ensuite les différentes applications découlant de leur domaine fonctionnel ont été étudiées.

1.1 Validation de l'expression des différentes protéines de fusion

Afin de valider la sécrétion et l'expression des protéines de fusion PTH, les protéines sécrétées dans le MC des cellules transfectées ont été caractérisées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-PTH couplé à la HRP et d'un anticorps anti-myc dans le cas de PTH-myc (Fig. 8). Ces immunobuvardages ont confirmés que PTH-myc, PTH-APEX2 et PTH-HRP étaient toutes trois correctement sécrétées dans leur milieu conditionné respectif grâce à la présence de la séquence prépro- présente dans chaque vecteur. Chaque protéine de fusion avait un profil de migration cohérent avec le poids moléculaire estimé (PTH-APEX2 : 38,7 kDa ; PTH-HRP : 44,9 kDa et PTH-myc 13,1 kDa). Pour PTH-myc et PTH-HRP, une seule bande a été détectée par les anticorps, ce qui suggère l'intégrité totale des protéines de fusion. Pour ce qui est de PTH-APEX2, l'anticorps anti-PTH a détecté quelques bandes correspond à des produits de dégradation autour d'une bande principale correspondant sans aucun doute à la forme intacte de PTH-APEX2. Malgré la présence de quelques produits de dégradation, la majorité des protéines détectées correspondent à la forme intacte de PTH-APEX2. Pour les trois protéines de fusion, la présence du domaine PTH, qui est d'une importance cruciale pour la liaison au PTH₁R, a été confirmée. Les trois protéines de fusion contiennent aussi un domaine FLAG, mais celui-ci n'a pas été détecté par l'anticorps anti-FLAG lors d'expériences d'immunobuvardages. Cela peut être dû à la fréquente sulfatation post-traductionnelle de l'épitope FLAG, ce qui peut nuire à la reconnaissance de la séquence par les anticorps (Hunter et al., 2016).

Les MCs utilisés dans cette figure ont été dosés avec un ELISA anti-PTH. Cette expérience a confirmé que les protéines de fusion étaient présentes dans les MCs aux concentrations suivantes : PTH-myc 35 nM, PTH-APEX2 6,1 nM et PTH-HRP 6,9 nM. Le MC contrôle ne contenait pas de PTH immunoréactive (< 0,1 nM). Ces résultats sont représentatifs de trois dosages.

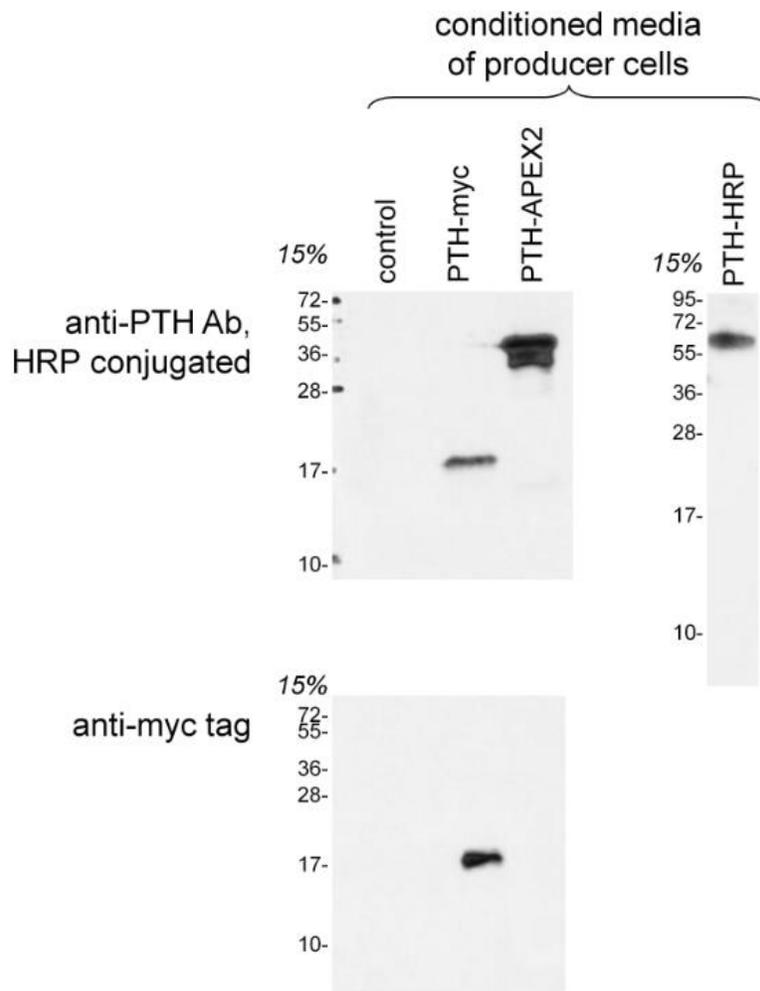


Figure 8. Validation de l'identité des protéines de fusion PTH avec domaine peroxydase. Immunobuvardages des MCs de cellules HEK 293a productrices exprimant transitoirement pcDNA3.1, PTH-myc, PTH-APEX2 ou PTH-HRP. La présence des protéines de fusion a été validée à l'aide d'un anticorps anti-PTH et d'un anticorps anti-myc dans le cas de PTH-myc.

Dans le cas de PTH-myc, certaines expériences ont été réalisées 1 à 3 années avant celles sur PTH-APEX2 et PTH-HRP et à cette époque un ELISA anti-PTH avait estimé la concentration de PTH-myc à 187 nM (basée sur trois dosages distincts). Pour les résultats à venir, la concentration de PTH-myc sera mentionnée afin d'éviter toute confusion. De plus, il semble y avoir une légère incohérence entre l'immunobuvardage et le dosage des protéines de fusion PTH par ELISA. En effet, cela laisse croire que la présence d'une extension C-terminale de la PTH de haut poids moléculaire (-APEX2 ou -HRP) pourrait mener à une sous-estimation de la quantité réelle de protéines de fusion puisque l'ELISA a été conçu pour détecter la PTH intacte et non des grosses protéines de fusion.

1.2 Caractérisation de l'activité pharmacologique des différentes protéines de fusion PTH

1.2.1 Induction de c-Fos par les protéines de fusion PTH

Après avoir confirmé l'expression et la sécrétion des trois protéines de fusion PTH, l'étape suivante a été de confirmer si PTH-myc, PTH-APEX2 et PTH-HRP conservaient les propriétés agonistes de la PTH native. En premier lieu l'activité pharmacologique des trois constructions a été évaluée par des immunobuvardages pour le facteur de transcription c-Fos. L'induction de l'expression du facteur de transcription c-Fos est une réponse cellulaire commune à l'activation de nombreux récepteurs (Syme et al., 2005).

Chez des cellules HEK 293a exprimant transitoirement le PTH_{1R}, la stimulation avec le peptide synthétique PTH₁₋₈₄ (10 nM) a induit une forte expression de cette protéine nucléaire (Fig. 9). En effet, ce peptide induit une accumulation de ce facteur de transcription aux temps 1 h et 3 h, quoique le signal optimal soit à 1 h. Il semble en effet, que c-Fos s'accumule jusqu'à 1 heure, pour ensuite décroître lentement jusqu'au temps 3 h pour finalement être non détectable au temps 12 h. PTH-myc (187 nM) de son côté semble entraîner une accumulation de c-Fos plus persistante et plus intense que PTH₁₋₈₄, probablement due à une plus forte concentration de PTH-myc que d'hormone native (Fig. 9).

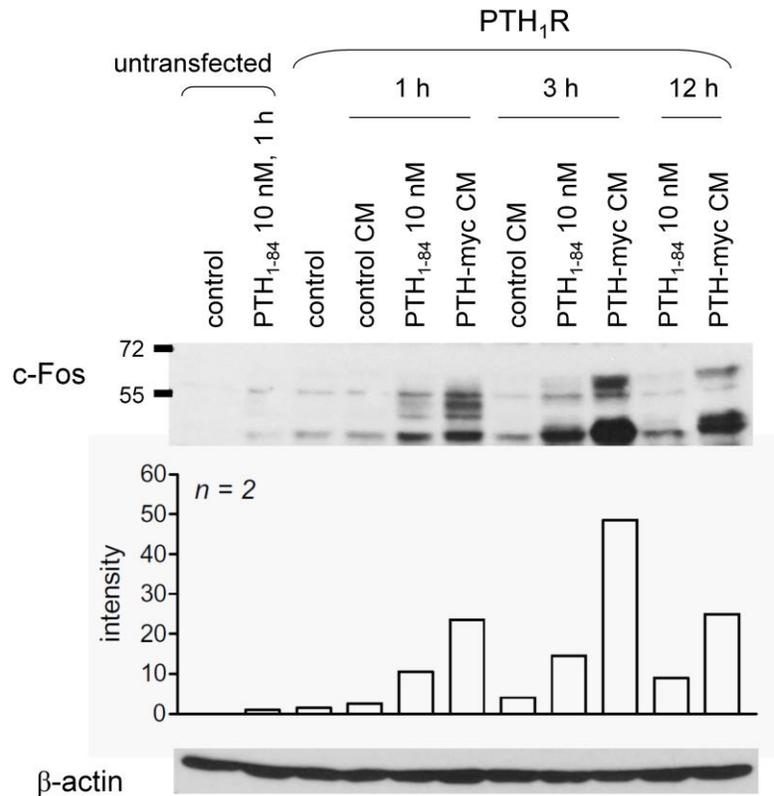


Figure 9. Validation de l'effet pharmacologique de PTH-myc *via* le récepteur PTH₁ : Induction de c-Fos.

Induction du facteur de transcription c-Fos suite à la stimulation de cellules HEK 293a non-transfectées ou transfectées transitoirement avec le récepteur PTH₁. Les cellules ont été stimulées sur des périodes variant de 1 h à 12 h avec du MC contrôle, du MC PTH-myc ou l'agoniste endogène du PTH_{1R}; PTH₁₋₈₄. Les bandes qui ont été quantifiées sont celles se situant entre 45 et 72 kDa, les bandes plus lourdes correspondant à des formes hyperphosphorylées de c-Fos. Résultats représentatifs de deux expériences.

En effet, l'accumulation de c-Fos suite à la stimulation avec le MC PTH-myc a duré jusqu'à 12 heures et l'immunobuvardage a révélé des bandes de plus haut poids moléculaires qui pourraient correspondre à des formes hyper-phosphorylées de c-Fos (Gilley et al., 2009).

Un protocole semblable a aussi été appliqué aux deux autres constructions, à la simple différence que seul le temps 1 heure a été utilisé puisqu'il semblait être optimal pour ce genre d'expériences. Donc, des cellules HEK 293a transfectées avec pcDNA3.1 ou PTH₁R ont été stimulées sur une période de 1 heure avec les trois constructions PTH (PTH-HRP, PTH-APEX2 et PTH-myc (35 nM)) et l'agoniste PTH₁₋₃₄ 10 nM (Fig. 10). Le traitement des cellules exprimant transitoirement le PTH₁R avec PTH₁₋₃₄ 10 nM a induit l'accumulation de c-Fos, tout comme le traitement avec chacune des constructions PTH. Cela démontre que PTH-myc, PTH-APEX2 et PTH-HRP sont toutes trois des agonistes du récepteur PTH₁. En effet, la stimulation des cellules exprimant transitoirement le PTH₁R avec le MC contrôle n'a pas causé l'accumulation de c-Fos. De plus, la stimulation de cellules transfectées avec le vecteur vide (pcDNA3.1) avec les trois protéines de fusion et PTH₁₋₃₄ n'a pas induit l'expression de c-Fos en aucun cas. Cela démontre que les trois constructions sont des agonistes spécifiques du PTH₁R tout comme PTH₁₋₃₄.

1.2.2 Stimulation de la production d'AMP_c par PTH-myc et PTH-HRP

À l'aide d'un ELISA anti-AMP_c, il a été possible d'étudier d'avantage les propriétés agonistes de PTH-Myc (187 nM; Fig. 11). En effet, la stimulation de cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec PTH₁R et stimulées avec des doses croissantes de PTH₁₋₈₄ ou de MC PTH-myc a permis de générer une courbe dose-réponse. En effet, cette expérience a permis de comparer la puissance des deux agonistes. Selon les résultats obtenus, PTH-myc serait environ 4 fois moins puissant que le ligand endogène PTH₁₋₈₄ pour stimuler la production d'AMP_c *via* PTH₁R.

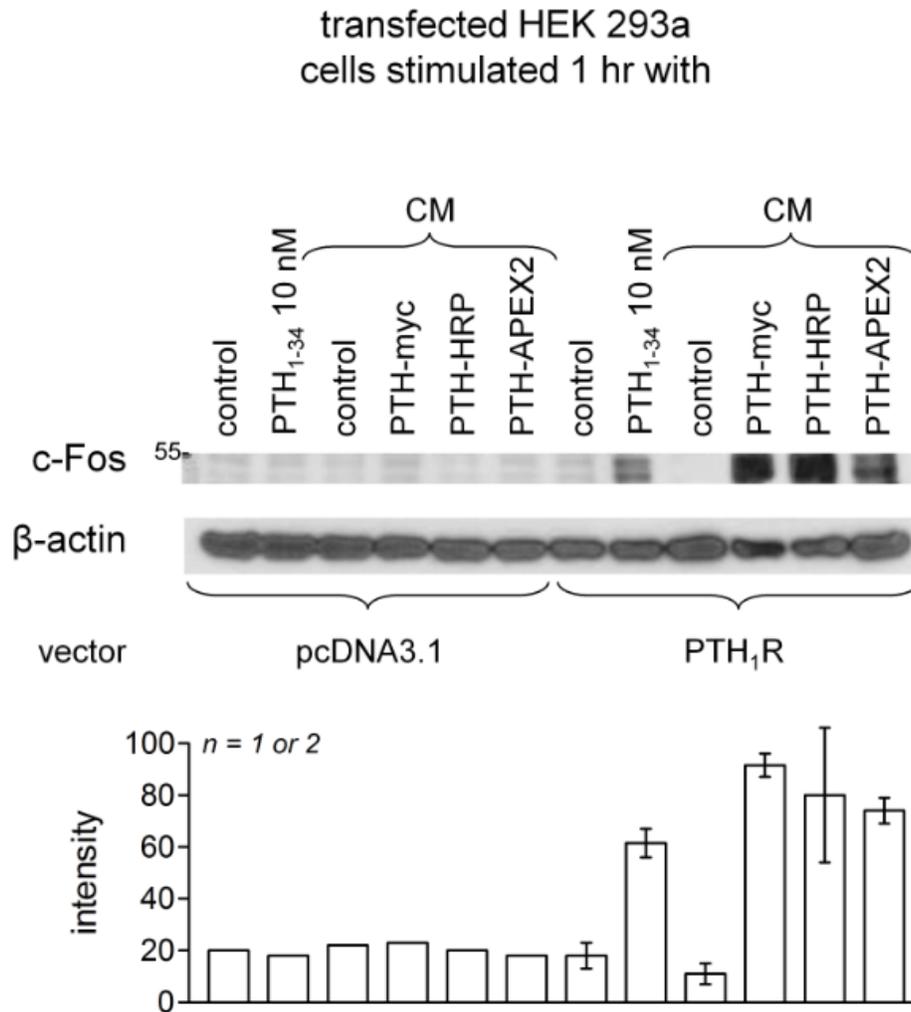


Figure 10. Validation de l'activité pharmacologique des protéines de fusion PTH avec domaine peroxydase. L'activité pharmacologique des différents MCs a été validée par immunobuvardage à l'aide de l'accumulation de c-Fos suite au traitement de cellules HEK 293a (transfectées avec pcDNA3.1 ou PTH₁R; 1 heure, 37 °C).

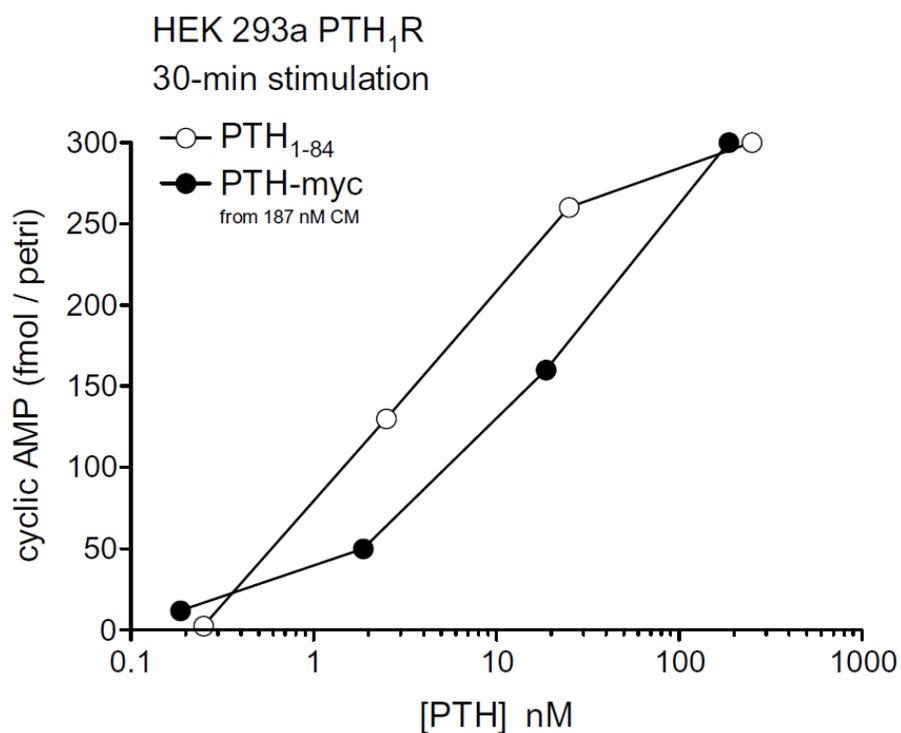


Figure 11. Validation de l'effet pharmacologique de PTH-myc *via* le récepteur PTH₁ : Accumulation d'AMP_c.

Production d'AMP_c par des cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec PTH₁R et stimulées avec un agoniste de ce récepteur (10 minutes, 37 °C). Résultats représentatifs de deux expériences distinctes. Voir section Matériel et méthodes pour le protocole détaillé.

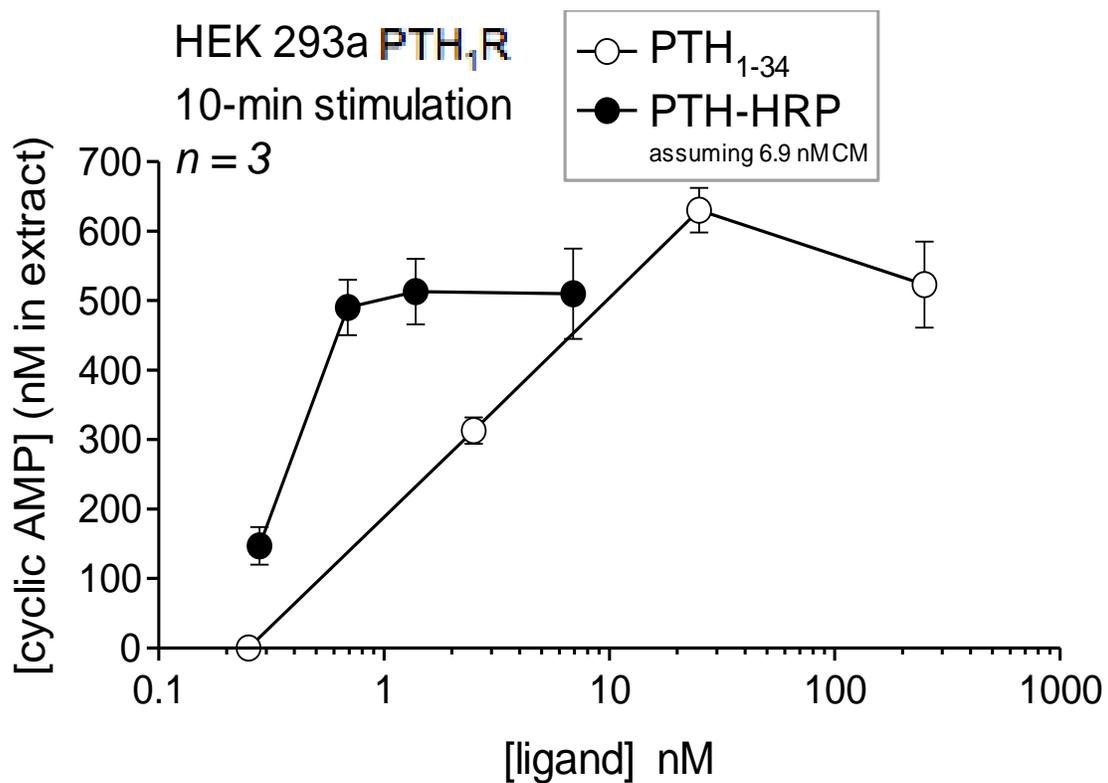


Figure 12. Caractérisation supplémentaire de l'activité pharmacologique de PTH-HRP. La stimulation de cellules HEK 293a exprimant transitoirement le récepteur PTH₁ (10 minutes, 37 °C) avec l'agoniste PTH₁₋₃₄ ou le MC PTH-HRP a permis la génération de courbes dose-réponse démontrant la puissance de cette construction sur le PTH₁R.

Une stratégie semblable a été mise de l'avant afin de mieux caractériser l'activité pharmacologique de PTH-HRP (Fig. 12). Pour ce faire, le même ELISA a été utilisé afin de générer deux courbes dose-réponse : une pour la PTH₁₋₃₄ et une pour PTH-HRP. Cet essai a démontré que PTH₁₋₃₄ était équipotent à PTH₁₋₈₄ conformément à ce qui est rapporté dans la littérature (Gardella et Vilardaga, 2015). De plus, cet essai a indiqué que PTH-HRP serait 5 fois plus puissant que PTH₁₋₃₄ pour stimuler la production d'AMP_c *via* PTH_{1R}. Toutefois, les limitations dans le dosage de la protéine de fusion peuvent influencer les résultats (sous-estimation de la concentration de PTH-HRP).

1.3 Adaptation du ligand PTH-myc pour l'étude de l'internalisation du récepteur PTH₁

L'épitope myc en position C-terminale de PTH-Myc permet le recrutement d'un anticorps anti-myc fluorescent. En effet le co-traitement de cellules réceptrices avec PTH-myc et l'anticorps anti-myc 4A6 conjugué à l'AlexaFluor-488 (4A6-AF488) permet l'étude de l'internalisation du PTH_{1R}, en plus de permettre d'étudier le devenir du ligand suite à l'endocytose. L'ensemble des expériences décrites au point 1.3 reposent sur PTH-myc 187 nM.

1.3.1 Étude de l'internalisation du récepteur PTH₁

L'internalisation du complexe PTH-myc/4A6-AF488 a été étudié d'abord en microscopie, de manière qualitative, puis par cytométrie en flux, de manière plus quantitative. En premier lieu, des cellules HEK 293a non transfectées ou transfectées avec PTH_{1R} ont été stimulées avec le MC contrôle, le MC PTH-myc ou PTH₁₋₈₄ 100 nM. L'internalisation de l'anticorps fluorescent 4A6-AF488 a été observé uniquement chez les cellules exprimant le récepteur PTH₁ et ayant été stimulées avec PTH-myc (Fig. 13A). Il est intéressant de noter que la présence de l'agoniste PTH₁₋₈₄ n'était pas suffisante pour causer l'endocytose (pinocytose) de milieu de culture contenant l'anticorps fluorescent. De plus, l'anticorps anti-myc 9E10-AF488 peut lui aussi former des complexes avec PTH-myc et être internalisé de manière PTH_{1R}-dépendante (Fig. 13B).

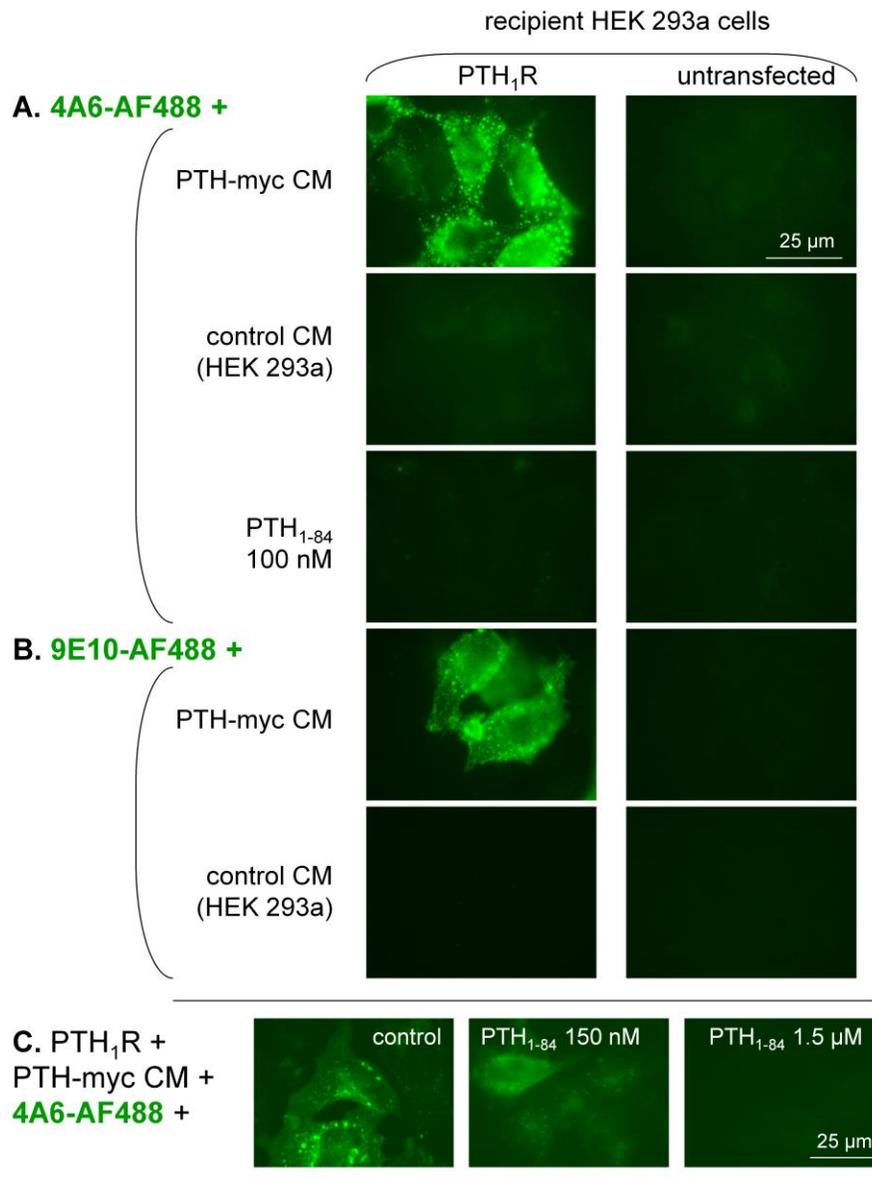


Figure 13. Transport de l'anticorps monoclonal anti-myc conjugué à l'AlexaFluor-488 à l'intérieur de cellules exprimant le récepteur PTH₁. Des cellules HEK 293a transfectées ou non avec le PTH₁R ont été stimulées avec le MC PTH-myc supplémenté avec un anticorps monoclonal anti-myc conjugué à l'AlexaFluor-488 (30 minute, 37 °C). (A) MC PTH-myc supplémenté avec l'anticorps monoclonal anti-myc 4A6 conjugué à l'AlexaFluor-488 (concentration finale 3.3 nM). (B) MC PTH-myc supplémenté avec l'anticorps monoclonal anti-myc 9E10 conjugué à l'AlexaFluor-488 (concentration finale 3.3 nM). (C) Compétition de l'internalisation du complexe PTH-myc/4A6-AF488 par des doses croissantes de PTH₁₋₈₄. Magnification originale 1000x.

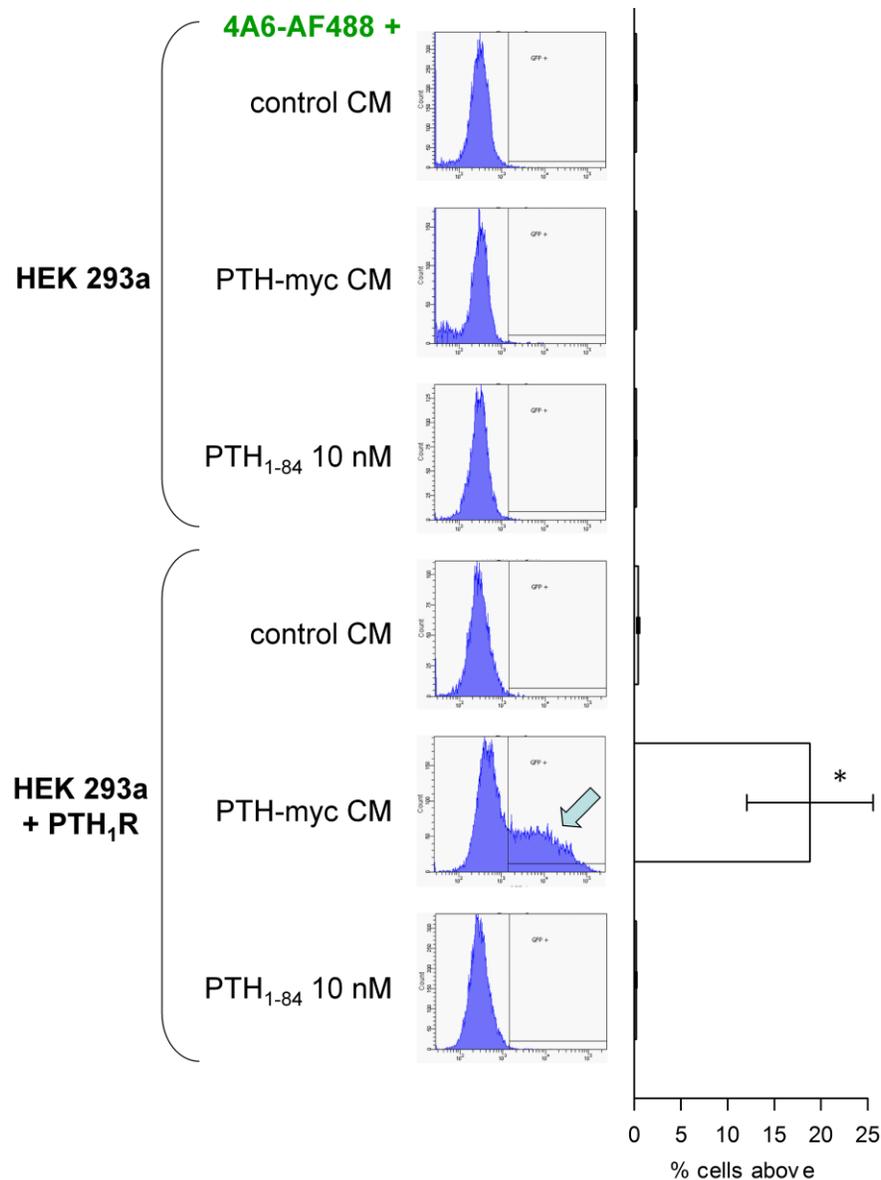


Figure 14. Quantification de l'endocytose du complexe PTH-myc/4A6-AF488 *via* PTH_{1R} par cytométrie en flux.

Des cellules, exprimant de manière optionnelle le récepteur PTH₁ (transfection transitoire), ont été stimulées tel qu'indiqué plus haut (30 minutes, 37 °C). L'anticorps monoclonal anti-myc 4A6-AF488 a été ajouté à chacune des conditions en même temps que la stimulation principale et ce à une concentration finale de 3.3 nM. Gauche : Distribution de la fluorescence obtenue à partir du compte de 10 000 cellules. Un seuil de fluorescence a été établi à partir des cellules contrôles traitées avec l'anticorps fluorescent. Ce seuil a permis la détermination de la population de cellules ayant endocytosé l'anticorps fluorescent. Droite : Proportion de cellules au-dessus du seuil de fluorescence pour chaque condition expérimentale. L'analyse de variance (ANOVA) a permis de déterminer que les données étaient hétérogènes ($P < 0,01$. * $P < 0,01$ vs. contrôles exprimant ou non PTH_{1R} (test de comparaisons multiples de Tukey).

Cela est intéressant, car l'anticorps 9E10 reconnaît une version plus longue de l'épitope myc (EEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA), ce qui rend son comportement dans cet essai plus imprévisible. Finalement, un co-traitement des cellules exprimant le récepteur PTH₁ avec des doses élevées de PTH₁₋₈₄ (0,15-1,5 μM) a été utilisé pour évaluer la spécificité de l'interaction entre PTH-myc et PTH₁R (Fig. 13C). En effet, une concentration élevée de ligand non-marqué est venue empêcher la liaison du complexe fluorescent, démontrant ainsi la nature spécifique de la relation entre PTH-myc et PTH₁R.

Par la suite l'expérience précédente a été en partie transposée en cytométrie de flux. Encore une fois, seules les cellules transfectées avec PTH₁R et traitées avec PTH-myc ont internalisé l'anti-myc fluorescent (Fig. 14). En effet, près de 20% des cellules traitées ont endocytosé l'anticorps fluorescent, alors qu'aucun autre traitement n'a causé l'internalisation de l'anticorps fluorescent au-delà du seuil de fluorescence non spécifique.

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

Des cellules HEK 293a exprimant transitoirement le récepteur PTH₁ ont été co-transfectées avec diverses protéines du système endosomal fusionnée à la protéine fluorescente rouge mCherry. Cela a permis de suivre le trajet du complexe PTH-myc/4A6-AF488 dans le système endosomal en fonction du temps.

La protéine de fusion PTH-myc a été utilisée pour étudier l'interaction moléculaire entre le récepteur PTH₁ et la forme fluorescente rouge de la β-arrestine₁ (Fig. 15). En effet, la β-arrestine₁-mCherry est exprimée de manière uniforme au niveau du cytosol et semble se condenser au niveau de structures qui s'apparentent à endosomes suite à la stimulation avec PTH₁₋₈₄ ou encore PTH-Myc. Plus intéressant, ces zones de condensation de l'arrestine fluorescente colocalisent avec le complexe PTH-myc/4A6-AF488 suite à l'internalisation de ce dernier par le récepteur PTH₁.

La colocalisation du complexe PTH-myc/4A6-AF488 a aussi documentée chez des cellules co-transfectées avec PTH₁R et une forme fluorescente rouge du marqueur endosomal précoce Rab5 (Fig. 16). Deux constructions ont été étudiées, la forme native de Rab5 (Rab5-mCherry) et la forme constitutivement active (Rab5-GTP-locked-mCherry).

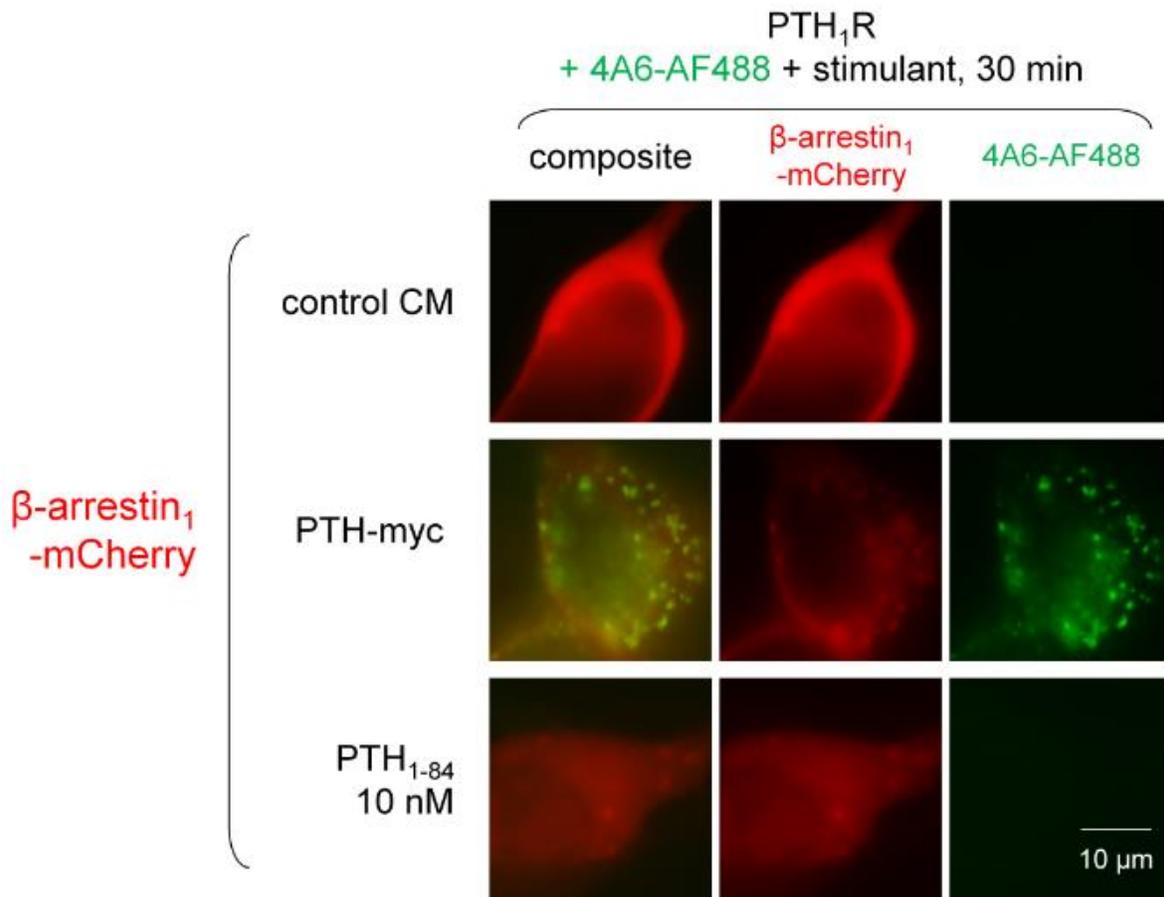


Figure 15. Étude de la colocalisation entre PTH-myc/4A6-AF488 et la β-arrestine₁ conjuguée à mCherry.

Des cellules co-transfectées avec PTH₁R et β-arrestine₁-mCherry ont été stimulées avec du MC contrôle, du MC PTH-myc ou avec PTH₁₋₈₄ 10 nM. La fluorescence verte résulte de l'endocytose de l'anticorps anti-myc 4A6 couplé à l'AF488 suite à la formation d'un complexe immun avec PTH-myc. Magnification originale 1000x

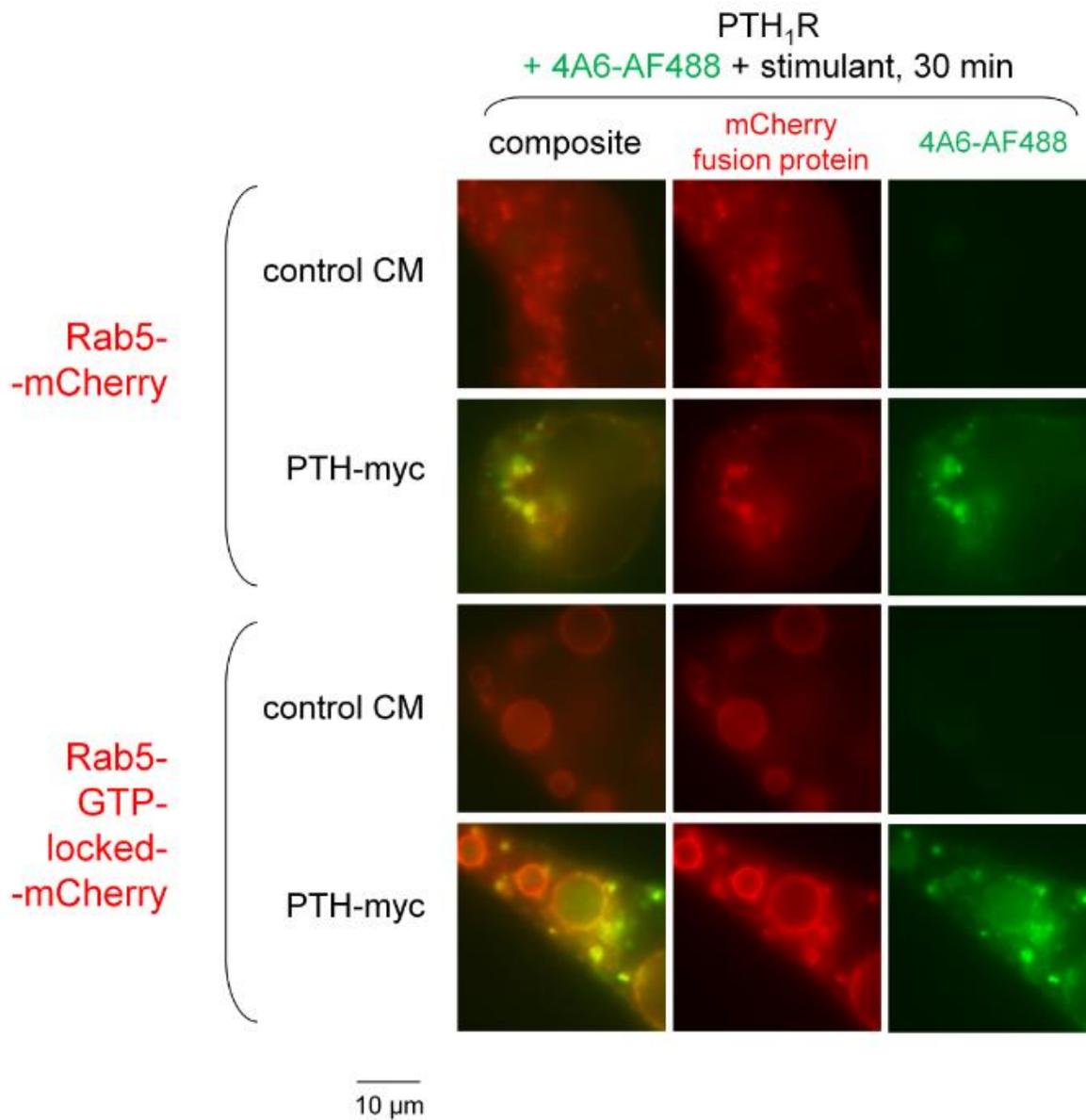


Figure 16. Étude de la colocalisation entre PTH-myc/4A6-AF488 et le marqueur d'endosomes précoces Rab5 conjugué à la protéine fluorescente rouge mCherry. Des cellules co-transfectées avec PTH₁R et Rab5-mCherry ou avec la forme mutante constitutivement active, Rab5-GTP LOCKED-mCherry, ont été stimulées tel que mentionné à la figure 15. Magnification originale 1000x.

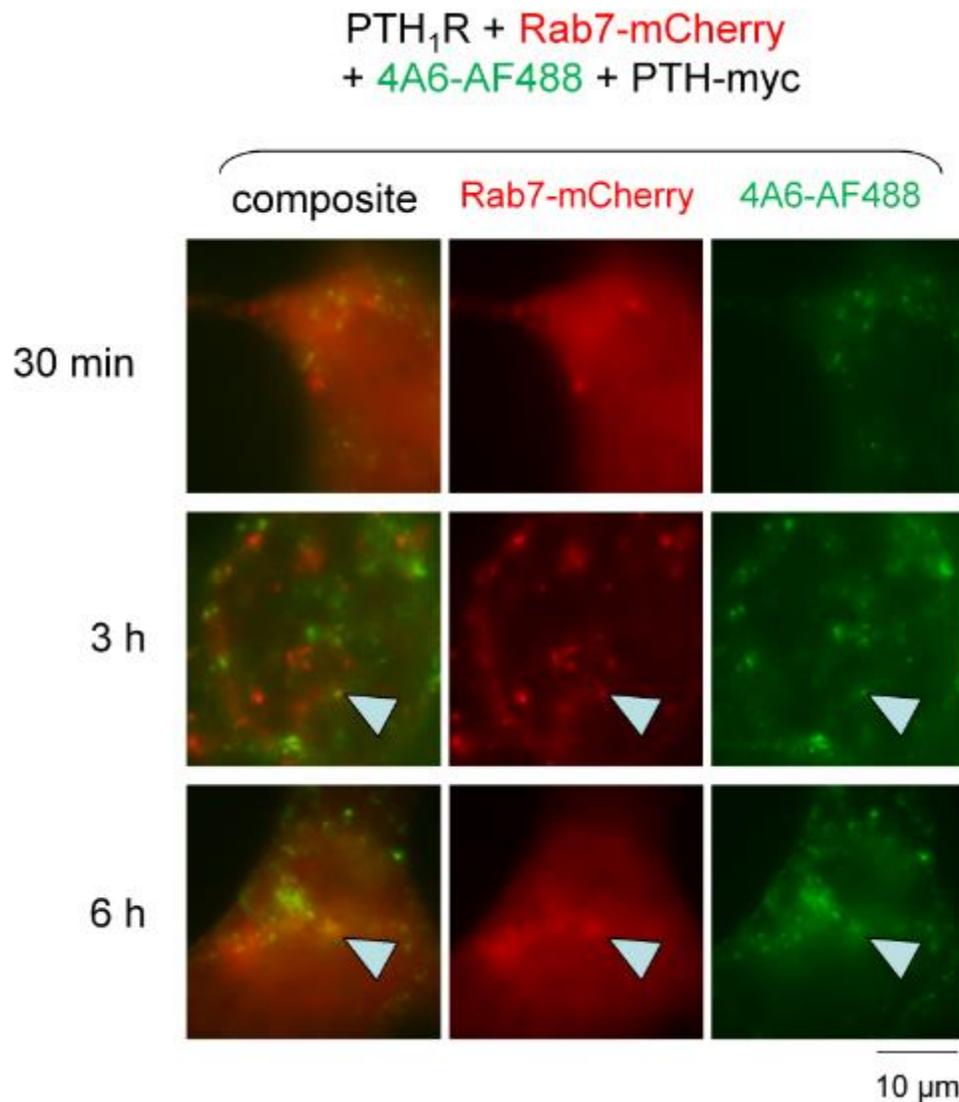


Figure 17. Étude de la colocalisation entre PTH-myc/4A6-AF488 et le marqueur d'endosomes tardifs Rab7 conjugué à la protéine fluorescente rouge mCherry.

Des cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec PTH₁R et Rab7-mCherry ont été stimulées simultanément avec le MC PTH-myc et l'anti-myc 4A6 conjugué à l'AlexaFluor488 sur des périodes de temps variant de 30 minutes à 6 heures afin d'étudier la progression du complexe PTH-myc/4A6-AF488 vers les endosomes tardifs et les lysosomes. Magnification originale 1000x.

Les cellules exprimant Rab5-GTP-locked-mCherry sont caractérisées par la présence d'endosomes géants dans lesquelles se séquestrent les molécules internalisées (Stenmark et al., 1994). La colocalisation de PTH-myc/4A6-AF488 avec les deux formes de Rab5 suggère que suite à son internalisation le complexe PTH-myc/4A6-AF488 lié au PTH₁R va progresser vers les endosomes précoces. Finalement, une étude de colocalisation a démontré que le complexe PTH-myc/4A6-AF488 progressait vers les endosomes tardifs positifs pour Rab7 (Fig. 17). En effet, de 3 à 6 heures après stimulation sur des cellules HEK 293a co-transfectées avec PTH₁R et Rab7-mCherry, une colocalisation a été observée entre le ligand fluorescent et le marqueur endosomal Rab7. De plus, le fait qu'aucune colocalisation n'ait été rapportée entre PTH-myc/4A6-AF488 et le marqueur endosomal tardif au temps 30 minutes suggère que PTH-myc progresse lentement des endosomes précoces (positifs pour Rab5 à 30 minutes et négatif pour Rab7 au même moment) vers les endosomes tardifs (positifs pour Rab7 au-delà de 3 heures).

1.4 Détection des populations endogènes de PTH₁Rs à l'aide de PTH-myc par immunohistochimie

Le traitement de cellules HEK 293a exprimant transitoirement le récepteur PTH₁ avec PTH-myc/4A6 ultimement révélé à l'aide du système d'amplification TSA a produit un fort marquage fluorescent intracellulaire (Fig. 18A ; voir section matériel et méthodes 2.3.1). En effet, la présence du complexe PTH-myc/4A6 internalisé par le PTH₁R a été détectée par un anticorps secondaire anti IgG de souris conjugué à la HRP. Cet anticorps a permis la liaison de plusieurs molécules de tyramide-AF488 de manière covalente suite à la réaction de ces dernières avec la HRP. Un tel marquage était complètement absent de cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA3.1. Les cellules MG-63 sont des cellules isolées d'un ostéoblastome qui expriment le récepteur PTH₁ et qui répondent à la parathormone (Yamamoto et al., 2007). Cette lignée cellulaire semble internaliser une quantité faible, mais constante, de l'anticorps anti-myc conjugué à l'AF488 lorsque co-stimulée avec le MC PTH-myc, mais pas lorsque stimulée avec le MC contrôle (Fig. 18B). En utilisant le système d'amplification TSA, il a été possible de visualiser de manière nettement plus intense l'internalisation du complexe PTH-myc/4A6 par les cellules MG-63.

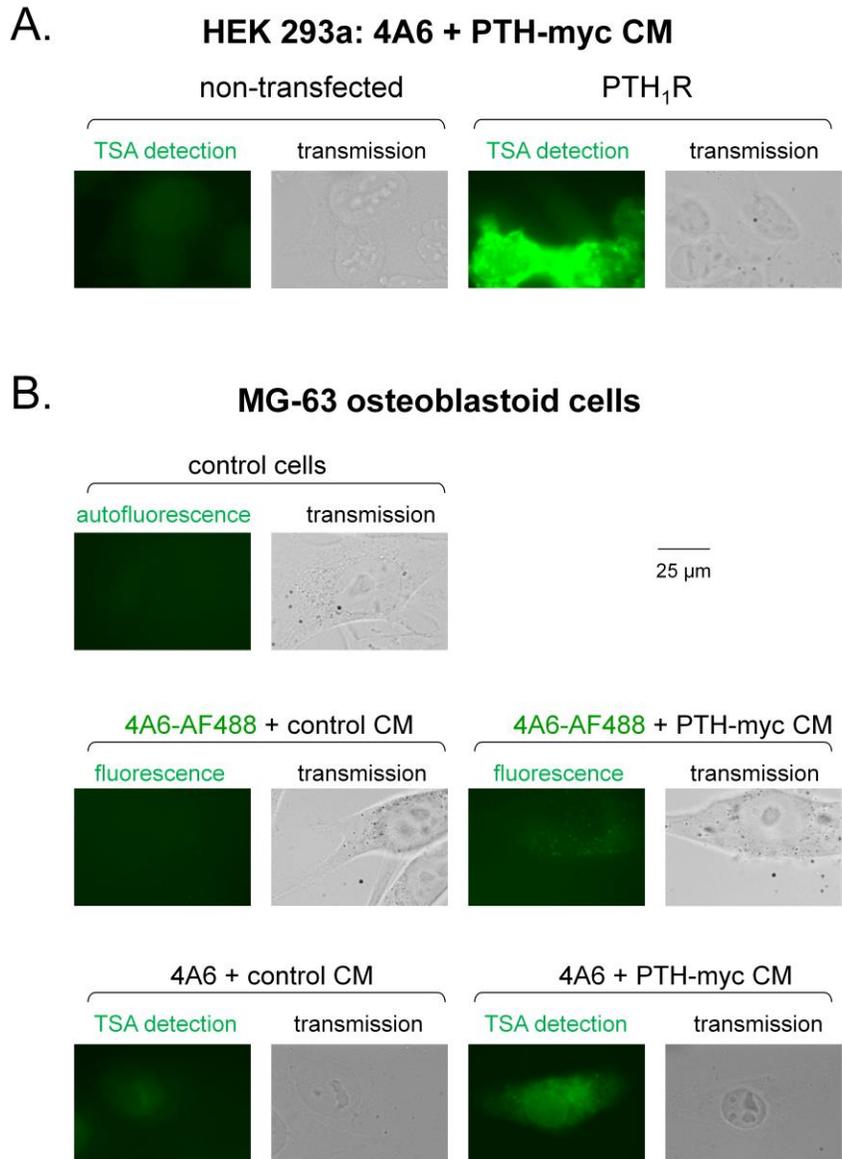


Figure 18. Détection du récepteur PTH₁ recombinant ou endogène à l'aide du système *tyramide signal amplification* (TSA).

Préalablement à l'amplification du signal à l'aide du système TSA, les cellules réceptrices ont été stimulées simultanément avec une combinaison de MC (PTH-myc ou contrôle) et d'anticorps monoclonal anti-myc 4A6 (concentration finale 3.3 nM; 30 minutes, 37 °C). (A) Validation du système TSA sur des cellules HEK 293a exprimant ou non le PTH₁R de manière transitoire. (B) Application du système TSA à des cellules MG-63 exprimant des niveaux endogènes de PTH₁Rs et comparaison de ce système avec la détection en une seule étape basée du 4A6-AF488. Magnification original 1000x.

À l'aide de cette stratégie, il a donc été possible détecter les niveaux endogènes du récepteur PTH₁ exprimés par les cellules MG-63. Cette expérience a aussi permis de visualiser la différence entre les niveaux d'expression des récepteurs recombinants (HEK 293a) et endogènes (MG-63).

1.5 Détection du PTH₁R à l'aide de l'activité enzymatique des protéines de fusion PTH

L'expérience décrite au point 1.4 a laissé entrevoir tout le potentiel des peroxydases pour la détection des GPCRs. Toutefois, le protocole était fort laborieux et nécessitait de nombreuses étapes d'incubations et de rinçages pouvant affecter l'intégrité des cellules. Il y avait aussi un marquage non négligeable du noyau avec le kit TSA. Afin de simplifier le protocole, et peut-être d'augmenter la spécificité, des protéines de fusion contenant ou pouvant recruter directement une peroxydase ont été évaluées pour détecter le PTH₁R.

1.5.1 Détection du PTH₁R à l'aide du domaine enzymatique recruté par PTH-myc

Contrairement aux deux autres constructions, PTH-myc n'a pas de domaine enzymatique intrinsèque ; c'est à dire qu'il doit le recruter par des interactions dépendantes de son domaine antigénique myc. En effet, les expériences suivantes sont basées sur la formation d'un complexe trimoléculaire formé de PTH-myc (35 nM), de l'anticorps monoclonal de souris anti-myc 4A6 et d'un anticorps secondaire anti-mouse IgG conjugué à la HRP (PTH-myc/4A6/HRP). Le domaine peroxydase assemblé sur PTH-myc a d'abord été utilisé afin de tenter de détecter le récepteur PTH₁ recombinant (HEK 293a transfectées) ou endogène (cellules HOS) à l'aide du réactif TrueBlue™. Le complexe trimoléculaire PTH-myc/4A6/HRP a détecté avec succès le récepteur PTH₁ recombinant, et ce de manière spécifique puisqu'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ a complètement inhibé le marquage bleu chez ces cellules (Fig. 19). De plus, les cellules n'exprimant pas le PTH₁R (HEK 293a transfectées avec pcDNA3.1) n'ont pas été marquées. La détection du récepteur PTH₁ requiert les trois membres du complexe trimoléculaire, puisqu'en absence de PTH-myc ou de l'anticorps anti-myc, il n'y a pas de détection colorimétrique du récepteur PTH₁. Ce protocole a par la suite été appliqué à lignée cellulaire HOS, une lignée isolée d'un ostéoblastome exprimant une population endogène de récepteur PTH₁ (Yang et al., 2007).

Malgré la forte spécificité du marquage et l'absence de bruit de fond, le complexe PTH-myc/4A6/HRP a échoué à détecter les populations endogènes de PTH₁R exprimées par les cellules HOS (Fig. 19).

Après l'échec de la détection du PTH₁R sur les cellules HOS, un différent substrat de la peroxydase HRP a été testé ; le luminol. En effet, certains rapportent que la détection basée sur la luminescence serait plus sensible que la détection colorimétrique (Veitch NC, 2004). Des cellules HEK 293a ont d'abord été ensemencées dans des plaques 24 puits puis transfectées transitoirement avec le PTH₁R ou pcDNA3.1 avant d'être stimulées avec le complexe trimoléculaire PTH-myc/4A6/HRP (Fig. 20A). Un intense signal luminescent a été mesuré pour les cellules exprimant le PTH₁R recombinant et traitées avec le complexe trimoléculaire basé sur PTH-myc. Ce signal a été réduit de manière significative par un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ (1 μ M). Les cellules transfectées avec le vecteur vide et le complexe trimoléculaire étaient aussi associées à une luminescence significativement au-dessus de celle du contrôle non-traité. Toutefois, cette luminescence n'était pas diminuée par un excès de PTH₁₋₃₄, indiquant qu'elle était de nature non spécifique.

Après avoir été validé sur des cellules exprimant le récepteur recombinant, ce protocole a été appliqué aux cellules HOS exprimant le récepteur PTH₁ endogène (Fig. 20B). Le même protocole a permis de démontrer que le complexe trimoléculaire PTH-myc/4A6/HRP est capable de détecter de manière significative le récepteur PTH₁, et que ce marquage du récepteur est significativement réduit en présence d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄.

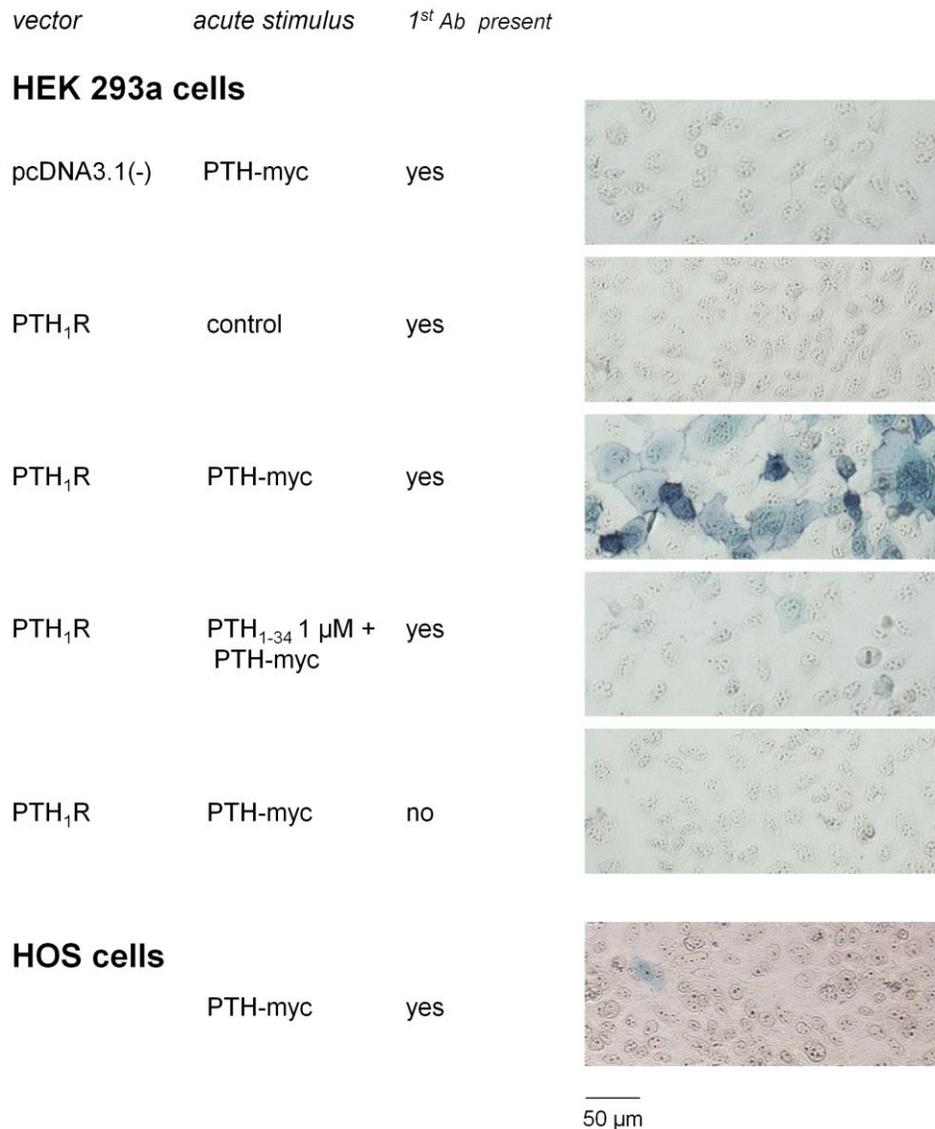


Figure 19. Marquage des cellules exprimant le PTH₁R recombinant ou endogène par le TrueBlue™ suite au traitement avec PTH-myc.

Des cellules HEK 293a transfectées (pcDNA3.1 ou PTH₁R) ou des cellules HOS ont été stimulées avec le MC PTH-myc ou le MC contrôle. Dans le cadre de cette expérience, les MCs avaient été supplémentés avec un anticorps monoclonal anti-myc (4A6; concentration finale 7 nM) et un anticorps anti-IgG de souris conjugué à la HRP (concentration finale 5.6 nM) afin de générer un ligand du récepteur PTH₁ avec un domaine peroxydase assemblé. Suite à l'incubation avec ce complexe trimoléculaire (30 minutes, 37 °C), les cellules ont été rincées puis incubées avec le substrat des peroxydases TrueBlue™ (10 minutes, température pièce). Observation en transmission (magnification originale 100x).

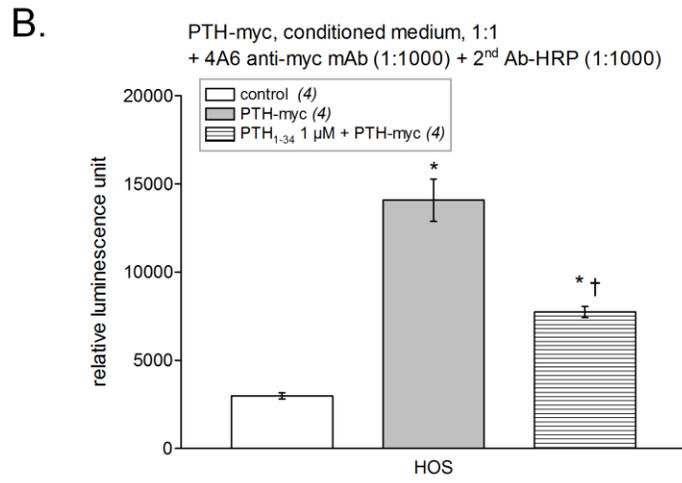
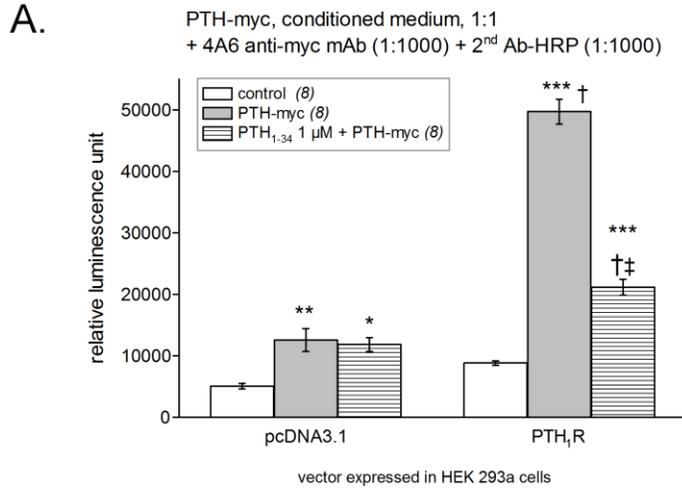


Figure 20. Détection lumineuse du récepteur PTH₁ à l'aide de PTH-myc via l'assemblage d'un domaine peroxydase (anti-myc + anticorps secondaire couplé à la HRP) à l'extrémité N-terminale du ligand.

(A) Détection du récepteur PTH₁ recombinant exprimé par des cellules HEK 293a. L'analyse de variance (ANOVA) indique que les valeurs sont hétérogènes ($P < 10^{-4}$) et un test de comparaisons multiples de Tukey a par la suite été appliqué afin de comparer chaque paire de valeurs. Pour chaque vecteur vs. leur contrôle respectif : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-myc : ‡ $P < 0,001$. Comparaison de chaque conditions expérimentales entre les vecteurs : † $P < 0,001$. (B) Détection des populations endogènes de récepteurs PTH₁ exprimées à la surface de cellules HOS. L'ANOVA a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 10^{-4}$). Chaque traitement vs. contrôle : * $P < 0,001$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-myc : † $P < 0,001$. Le nombre de réplicas est indiqué entre parenthèses.

1.5.2 Détection du PTH₁R à l'aide de la protéine de fusion PTH-APEX2

Par la suite, la protéine de fusion PTH-APEX2, possédant une activité intrinsèque a été, évaluée selon un processus similaire à PTH-myc. Il était raisonnable de croire que PTH-APEX2 pourrait offrir un meilleur ratio signal/bruit que PTH-myc/4A6/HRP, puisqu'aucun anticorps n'était impliqué et que toute l'activité peroxydase serait confinée au ligand. En premier lieu, des cellules HEK 293a transfectées (pcDNA3.1 ou PTH₁R) ont été stimulées avec PTH-APEX2 puis incubées avec le TrueBlue™ (Fig. 21). Les cellules HEK 293a exprimant le récepteur PTH₁ recombinant étaient fortement marquées par le précipité bleu résultant de l'oxydation du TrueBlue™ par le ligand PTH-APEX2 lié au PTH₁R. En effet, la coloration bleue était principalement localisée au niveau de la membrane plasmique de manière cohérente avec la distribution du PTH₁R. La spécificité du marquage a été confirmée par l'inhibition complète de celui-ci par un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄. De plus, les cellules transfectées avec le vecteur vide n'étaient pas marquées, corroborant ainsi la spécificité de PTH-APEX2. Aussi, les cellules stimulées avec le MC contrôle ou le MC PTH-myc n'étaient pas positives pour le marquage avec le TrueBlue™. L'ensemble de ces observations a été répliqué à l'aide du protocole B basé sur l'amplification du signal avec la biotine-phénol (Fig. 21). En effet, la spécificité de PTH-APEX2 a été confirmée de nouveau par ce protocole. Comme on pouvait s'y attendre, le marquage des cellules est moins localisé que dans le protocole A, mais il est nettement plus intense. Cela est causé par la diffusion des réactifs biotin-phenoxy. Toutefois, aucune de ces deux stratégies n'a réussi à marquer de façon évidente le récepteur PTH₁ exprimé par les cellules HOS.

La capacité de la protéine de fusion PTH-APEX2 de détecter le récepteur PTH₁ a ensuite été évaluée par luminescence. Le traitement de cellules HEK 293a exprimant transitoirement le récepteur PTH₁ avec PTH-APEX2 (diluée 1 :5 afin de réduire le signal non-spécifique) a entraîné une forte oxydation du luminol qui s'est traduite par un fort signal luminescent (Fig. 22A). Ce signal a toutefois été réduit au niveau de celui des cellules n'exprimant pas le récepteur par un traitement avec PTH₁₋₃₄ 1 µM, prouvant la spécificité de PTH-APEX2 dans cet essai. Le ratio signal/bruit était nettement meilleur qu'avec le complexe trimoléculaire PTH-myc/4A6/HRP avec un bruit de fond plus faible, mais tout de même significatif.

HEK 293a cells

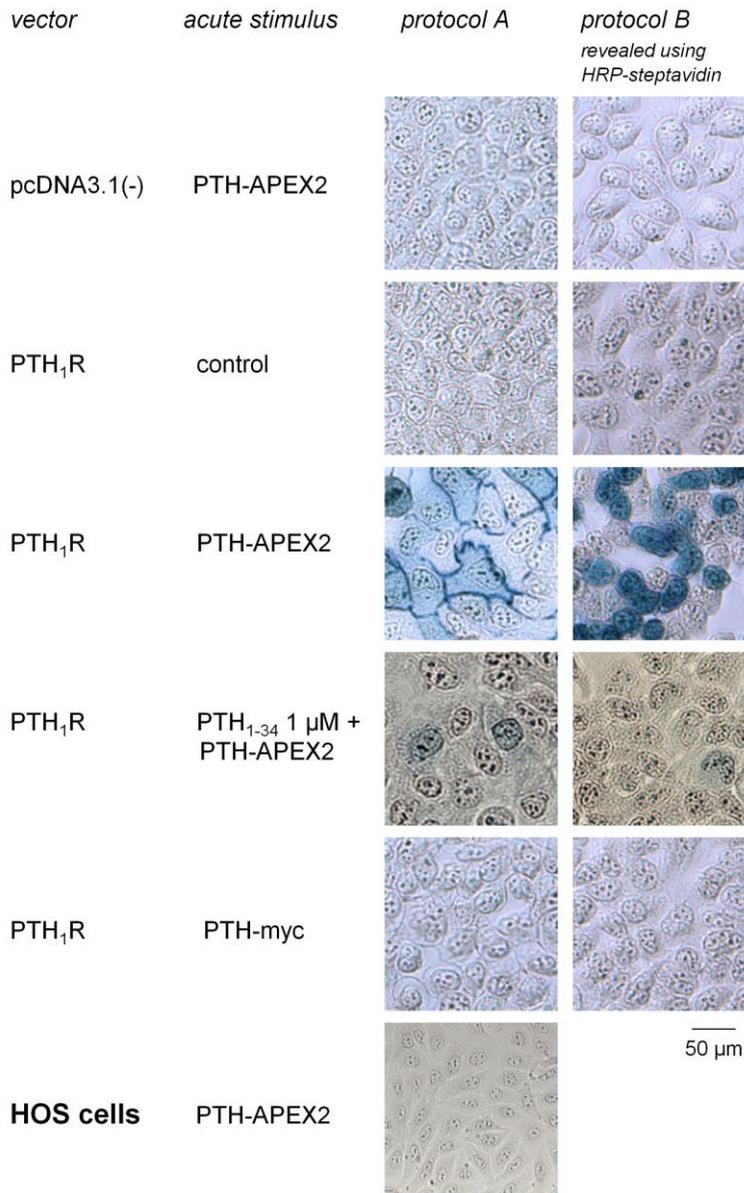


Figure 21. Marquage des cellules exprimant le PTH₁R recombinant ou endogène par le TrueBlue™ suite au traitement avec PTH-APEX2.

Protocole A : Des cellules HEK 293a transfectées avec pcDNA3.1 ou PTH₁R ont été traitées avec PTH-APEX2 (30 minutes, 37 °C) suivi par une incubation avec le substrat des peroxydases TrueBlue™ (10 minutes, température pièce). Alternativement, les cellules ont été co-stimulées avec un excès de PTH₁₋₃₄ afin de confirmer la spécificité de la protéine de fusion PTH-APEX2. Magnification finale 100x. Protocole B : Ajout d'une étape d'amplification du signal. Brièvement, suite à un traitement similaire au protocole A avec PTH-APEX2, les cellules ont été incubées avec le réactif biotine-phénol (30 minutes, température pièce), suivi d'une autre incubation avec streptavidine-HRP (SA-HRP; 1 heure, température pièce). La liaison de SA-HRP a par la suite été révélée à l'aide du TrueBlue™ comme dans le protocole A.

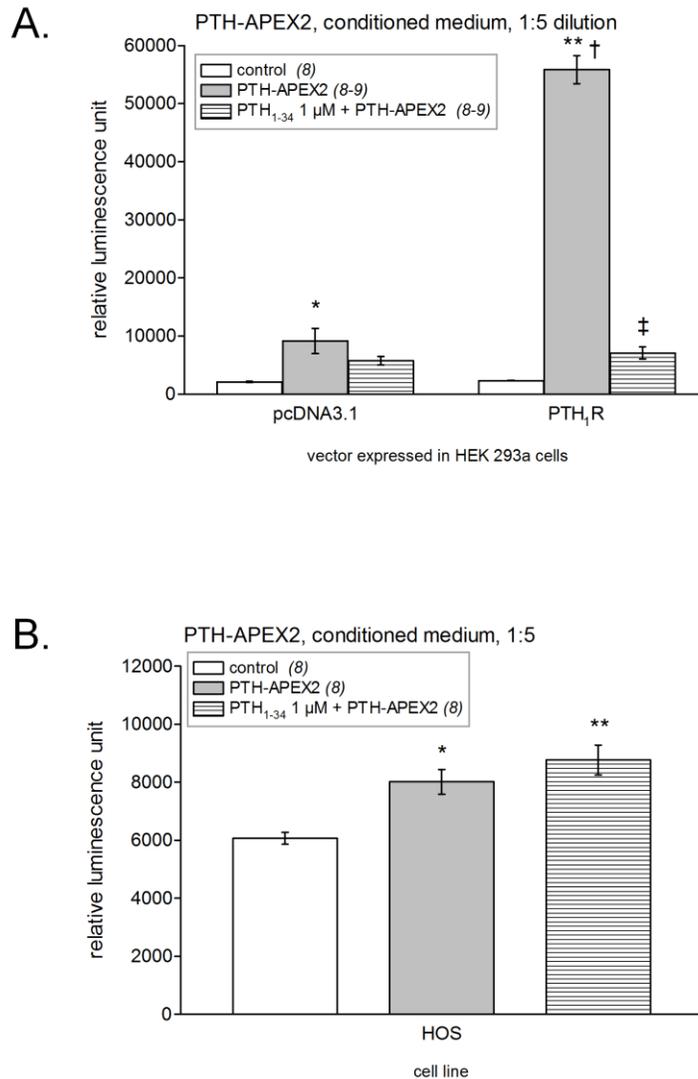


Figure 22. Détection lumineuse du récepteur PTH₁ à l'aide de PTH-APEX2.

(A) Cellules HEK 293a (transfectées avec pcDNA3.1 ou PTH_{1R}) stimulées avec PTH-APEX2 (30 minutes, 37 °C). Ces cellules ont par la suite été mise en contact avec une solution de luminol, un substrat des peroxydases qui émet de la lumière lorsqu'oxydé, ce qui a permis de détecter la présence du récepteur PTH₁ recombinant en présence de PTH-APEX2. L'ANOVA indique que les valeurs sont hétérogènes ($P < 10^{-4}$) et un test de comparaisons multiples de Tukey a par la suite été appliqué afin de comparer chaque paire de valeurs. Pour chaque vecteur vs. leur contrôle respectif : * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-APEX2 : ‡ $P < 0,001$. Comparaison de chaque conditions expérimentales entre les vecteurs : † $P < 0,001$. (B) Tentative de détection du PTH_{1R} exprimé de manière endogène à la surface des cellules HOS. L'ANOVA a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 0,001$). Chaque traitement vs. contrôle : * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-APEX2 : non significatif.

Malheureusement, la réaction faible mais significative de PTH-APEX2 avec le PTH₁R exprimé par les cellules HOS n'a pas été diminuée par un excès de PTH₁₋₃₄, ce qui n'a pas permis de confirmer une liaison spécifique de cette protéine de fusion au récepteur endogène (Fig. 22B).

1.5.3 Détection du PTH₁R à l'aide de la protéine de fusion PTH-HRP

La seconde protéine enzymatique avec un domaine peroxydase intrinsèque à avoir été évaluée fut la PTH-HRP. Cette protéine de fusion a d'abord été étudiée sur des cellules exprimant le récepteur PTH₁ recombinant à l'aide du substrat des peroxydases TrueBlue™. PTH-HRP a marquée avec intensité les membranes des cellules exprimant le PTH₁R recombinant sans toutefois marquer celles des cellules transfectées avec pcDNA3.1 (Fig. 23). Le co-traitement avec PTH₁₋₃₄ 1 µM a confirmé la spécificité en diminuant drastiquement la coloration résultant de l'interaction entre PTH-HRP et le TrueBlue™. La protéine de fusion PTH-HRP a produit le marquage des cellules le plus fort des 3 constructions évaluées, et était capable de détecter les cellules même lorsque diluée 100x avec du milieu de culture sans sérum. Toutefois, comme pour les deux autres protéines de fusion, PTH-HRP a été incapable de détecter les récepteurs PTH₁ endogènes exprimés à la surface des cellules HOS avec ce protocole.

Néanmoins, ces résultats ont suggéré que PTH-HRP était la protéine de fusion avec le plus grand potentiel pour détecter le récepteur PTH₁. Le protocole B basé sur l'amplification du signal avec la biotine-phénol fut donc appliqué avec PTH-HRP. En premier lieu, cette technique a été validée par la détection de la biotinylation de plusieurs protéines de surface par la streptavidine-HRP (SA-HRP) lors d'une expérience d'immunobuvardage (Fig. 24). Des cellules HEK 293a transfectées (PTH₁R ou pcDNA3.1) ont été stimulées tel que décrit dans Matériel et Méthodes section 2.3.1, puis les lysats cellulaire ont été migrés sur un gel de polyacrylamide. C'est seulement chez les cellules exprimant le récepteur PTH₁ et traitées avec PTH-HRP, qu'a été détecté par la SA-HRP un complexe assortiment de bandes associées à la biotinylation des protéines de surface. Un co-traitement avec PTH₁₋₃₄ 1 µM a complètement empêché la réaction de PTH-HRP avec la biotine-phénol. Une fois ce protocole validé, il fut appliqué à des cellules en culture et d'abord révélé avec la SA-HRP. Ce protocole a permis la détection du PTH₁R recombinant de manière intense et

spécifique (absence de marquage en présence d'un excès de PTH₁₋₃₄ ou en absence du PTH_{1R}) sans toutefois permettre la détection des récepteurs PTH₁ exprimés par les cellules HOS (Fig. 25). Une seconde stratégie de détection des protéines biotinylées par HRP a été utilisée ; la SA-QDots. Les Qdots sont des nanomatériaux fluorescents avec des propriétés optiques nettement supérieures à celles des fluorophores conventionnels (Szymanski et al., 2013). La détection avec la SA-Qdots a permis de détecter de manière nette les récepteurs PTH₁ recombinants et endogènes de façon spécifique, tel que démontré par l'absence de fluorescence en présence d'un excès de PTH₁₋₃₄ (Fig. 25).

Le potentiel de PTH-HRP pour détecter le récepteur PTH₁ a par la suite été confirmé à l'aide de l'essai luminescent. Le MC PTH-HRP (dilué 1 :5) a généré un intense signal luminescent chez les cellules exprimant transitoirement le PTH_{1R} (Fig. 26A). La spécificité de la protéine de fusion dans cet essai a été confirmée par le co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄, traitement qui a ramené la luminescence au niveau des cellules non-transfectées. Néanmoins, la protéine de fusion a produit un signal luminescent faible, mais significatif chez les cellules transfectées avec le vecteur vide. Cependant, il faut noter que PTH-HRP a produit le signal luminescent le plus intense (> 4 fois celui de PTH-APEX2 et PTH-myc), tout en offrant le meilleur ratio signal/bruit dans cet essai. La détection luminescente du PTH_{1R} a par la suite été utilisée afin de détecter les populations endogènes de ce récepteur à la surface des cellules HOS (Fig. 26B). La protéine de fusion PTH-HRP a produit un signal lumineux intense, qui était au moins en partie spécifique puisqu'un co-traitement avec PTH₁₋₃₄ 1 µM a réduit de manière significative le signal produit par PTH-HRP.

Un protocole alternatif de détection du PTH_{1R} a été appliqué à des cellules (HEK 293a transfectées ou HOS)ensemencées dans des plaques 24 puits. Après la stimulation avec PTH-HRP, celles-ci ont été incubées avec le substrat colorimétrique des peroxydases TMB. L'avantage d'une telle stratégie est que les cellules peuvent être incubées sur de longues périodes sans que le signal ne décline, au contraire il s'accumule sans cesse avec le temps. Le traitement de cellules HEK 293a exprimant transitoirement le récepteur PTH₁ avec PTH-HRP a produit une forte accumulation du produit d'oxydation du TMB (Fig. 27A). De plus, aucune accumulation de colorant n'a été observée chez les cellules contrôles ni chez les cellules exprimant le PTH_{1R} en présence d'un excès de PTH₁₋₃₄ prouvant hors de tout doute la spécificité de la protéine de fusion.

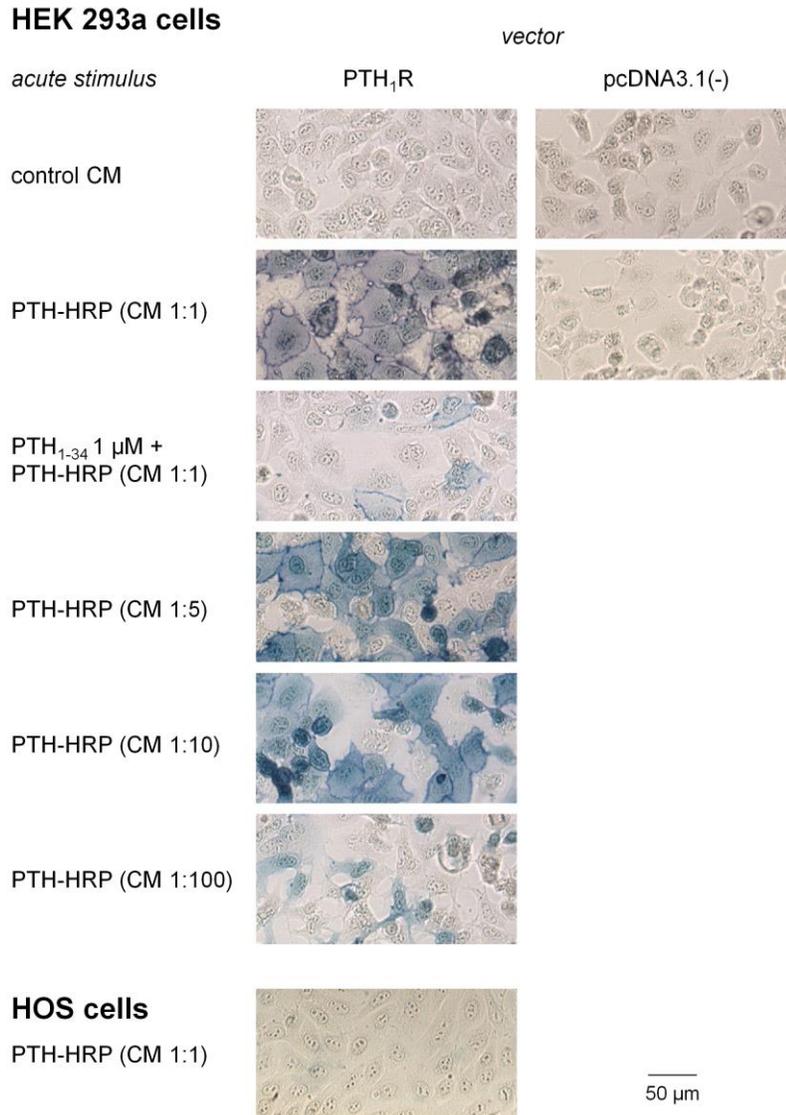


Figure 23. Marquage des cellules exprimant le PTH₁R recombinant ou endogène par le TrueBlue™ suite au traitement avec PTH-HRP.

La protéine de fusion PTH-HRP liée au récepteur PTH₁ (recombinant ou endogène) a été détectée avec le TrueBlue™. Les dilutions successives du MC PTH-HRP ont été utilisées afin d'évaluer la sensibilité de cette protéine de fusion et la spécificité de celle-ci a été confirmée par l'inhibition du marquage en présence d'un excès de PTH₁₋₃₄. Toutefois, le MC PTH-HRP n'a pu détecter les niveaux endogènes du PTH₁R exprimés par les cellules HOS.

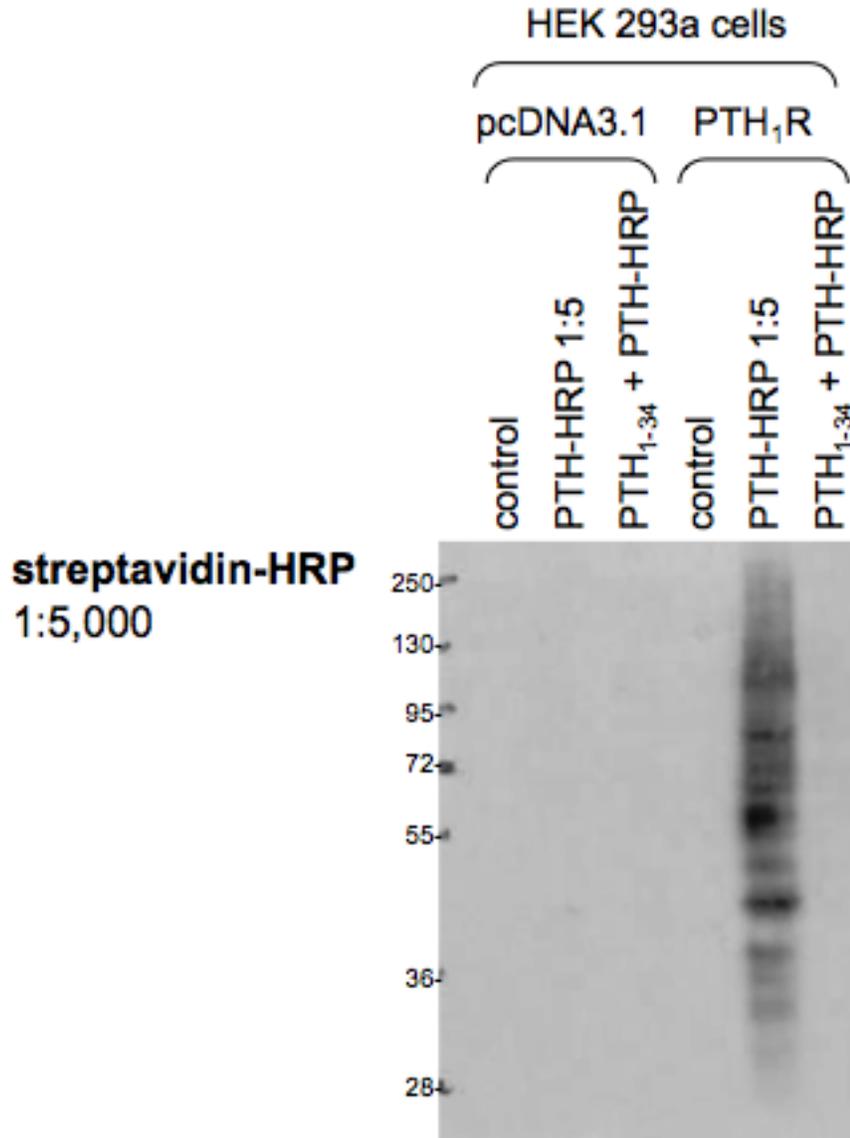


Figure 24. Validation de l'amplification du signal avec la biotine-phénol. Des cellules HEK 293a transfectées avec soit pcDNA3.1 ou PTH₁R ont été stimulées avec PTH-HRP et optionnellement avec un excès de PTH₁₋₃₄ avant d'être incubées avec un mélange de biotine-phénol et d'H₂O₂ (1 μM et 1 % dans le PBS respectivement) sur une période de 15 minutes. Après cette incubation, les cellules ont été lysées et les extraits cellulaires totaux ont été migrés sur des gels de polyacrylamide 9%. Ensuite, le gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose, puis les protéines biotinylées ont été détectées avec SA-HRP (1 :5000).

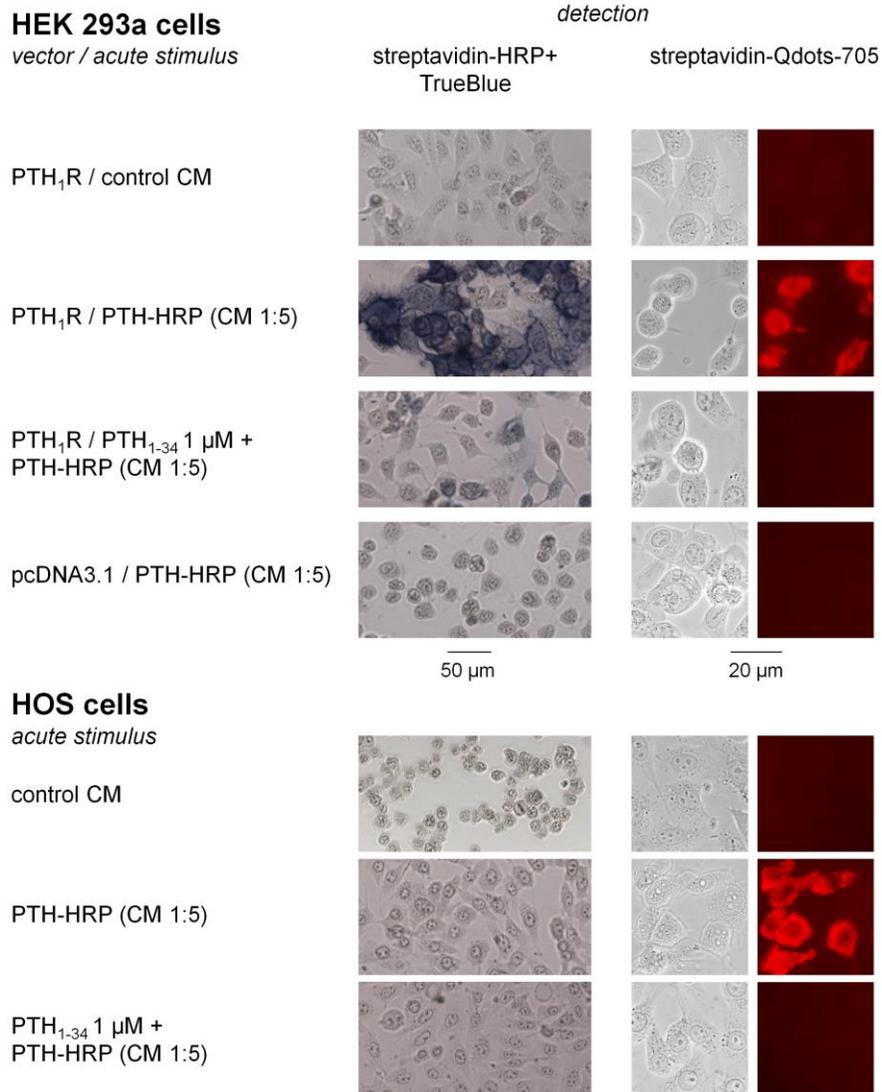


Figure 25. Amplification de la sensibilité de détection des récepteurs PTH₁ par PTH-HRP. Un protocole semblable à celui de la figure 21 a été appliqué à la fois à des cellules HEK 293a transfectées (pcDNA3.1 ou PTH₁R) ou à des cellules HOS à la différence que deux stratégies différentes ont été mise de l'avant pour la détection finale à l'aide de la streptavidine (SA). En effet, deux conjugués de cette molécule ont été utilisés; soit la SA-HRP ou la SA-QDots705. Magnification finale : 100x (TrueBlue™) ou 1000x (QDots705).

Cette stratégie de détection combine une forte intensité de signal et une absence de bruit de fond, ce qui résulte avec un ratio signal/bruit de fond supérieur à 30x.

L'absence de signal non-spécifique avec cette technique a mené à l'élaboration d'un protocole de compétition de liaison avec PTH-HRP utilisée comme un ligand non-isotopique. Une quantité constante de PTH-HRP a été incubée avec des concentrations croissantes de PTH₁₋₃₄ afin d'établir des courbes de compétition pour déterminer les paramètres d'affinité de la protéine de fusion (Fig. 27B). L'incubation de concentrations de PTH₁₋₃₄ variant de 0,1 nM à 1000 nM en compétition avec une concentration fixe de 1,38 nM de PTH-HRP (concentration déterminée par ELISA) a permis de déterminer que PTH-HRP avait une très forte affinité pour le PTH₁R considérant que le PTH₁₋₃₄ a un K_i de 2 nM (Eggenberger et al., 1996). Cela est cohérent avec les résultats obtenus dans l'essai pharmacologique d'accumulation de l'AMP_c. Finalement, l'utilisation du TMB pour la détection de PTH-HRP liée à son récepteur a permis de détecter la présence des PTH₁Rs endogènes exprimés par les cellules HOS (Fig. 27C). Un excès de PTH₁₋₃₄ a significativement réduit le signal, prouvant qu'au moins en partie, le signal généré par PTH-HRP était de nature spécifique.

En conclusion, PTH-HRP a détecté les récepteurs PTH₁ exprimés de façon endogène par les cellules HOS selon trois stratégies distinctes, soit en microscopie, en luminescence et avec le substrat colorimétrique TMB.

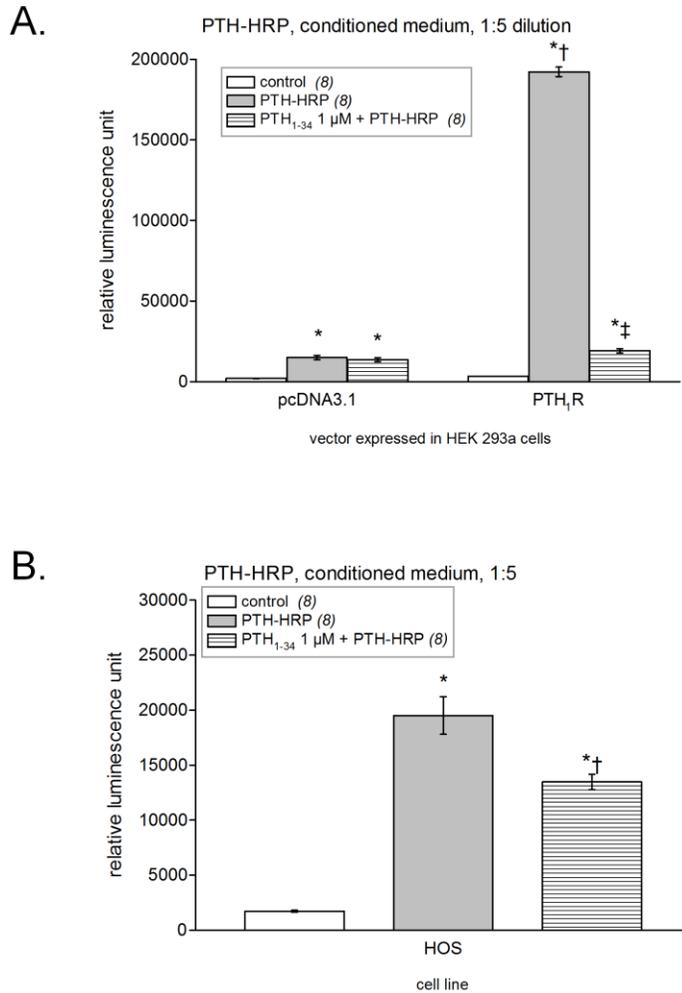


Figure 26. Détection lumineuse du récepteur PTH₁ à l'aide de PTH-HRP.

(A) Cellules HEK 293a transfectées (pcDNA3.1 ou PTH₁R) stimulées avec PTH-HRP (30 minutes, 37 °C). L'ANOVA a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 10^{-4}$) et un test de comparaisons multiples de Tukey a par la suite été appliqué afin de comparer chaque paires de valeurs. Pour chaque vecteur vs. leur contrôle respectif : * $P < 0,001$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-HRP: ‡ $P < 0,001$. Comparaison de chaque condition expérimentale entre les vecteurs: † $P < 0,001$. (B) Détection de la population endogène de récepteurs PTH₁ exprimée à la surface des cellules HOS. L'ANOVA a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 10^{-4}$). Chaque traitement vs. contrôle : * $P < 0,001$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-HRP : † $P < 0,001$.

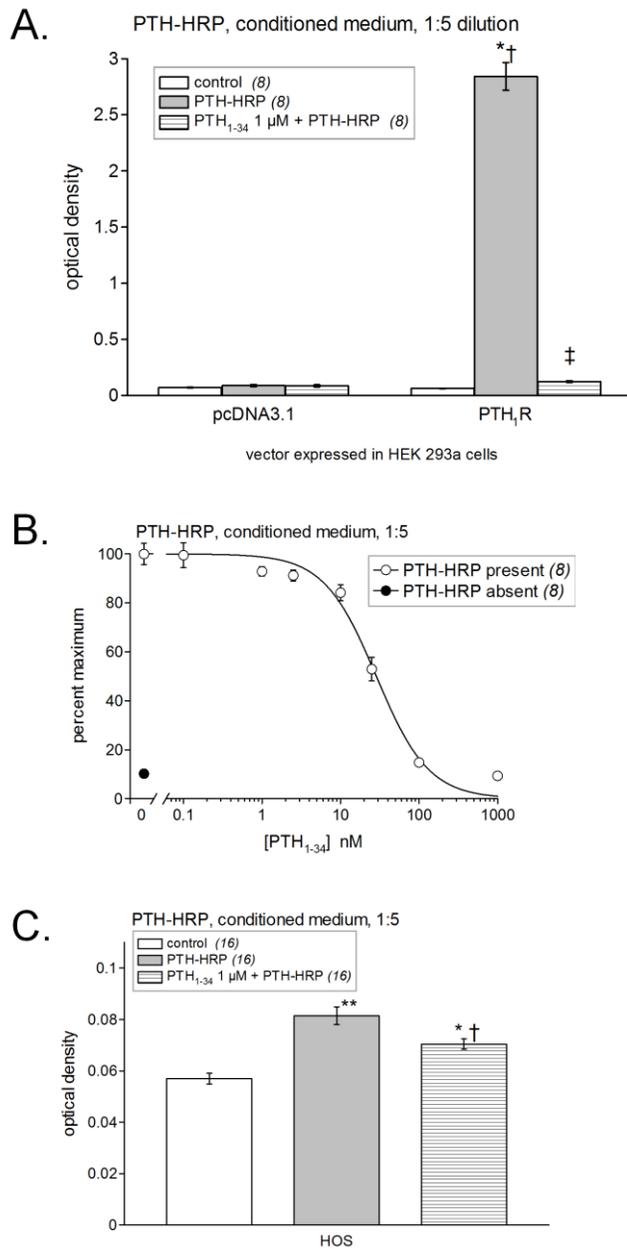


Figure 27. Détection colorimétrique (TMB) du récepteur PTH₁ avec le ligand biotechnologique PTH-HRP (dilué 1:5).

(A) Cellules HEK 293a (transfectées transitoirement avec pcDNA3.1 ou PTH_{1R}) stimulées avec PTH-HRP (30 minutes, 37 °C) puis incubées 30 minutes supplémentaires avec le substrat colorimétrique des peroxydases TMB. L'ANOVA a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 10^{-4}$) et un test de comparaisons multiples de Tukey a par la suite été appliqué afin de comparer chaque paire de valeurs. Pour chaque vecteur vs. leur contrôle respectif : * $P < 0,001$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-HRP: ‡ $P < 0,001$. Comparaison de chaque conditions expérimentales entre les vecteurs : † $P < 0,001$.

(B) Génération d'une courbe de compétition pour la liaison de PTH-HRP par l'ajout de concentration croissante de PTH₁₋₃₄ sur des cellules HEK 293a exprimant transitoirement le PTH_{1R}. Les résultats sont exprimés en % de la densité optique maximale.

(C) La détection colorimétrique au TMB a aussi été appliquée à des cellules HOS traitées avec PTH-HRP (30

minutes, 37 °C). L'ANOVA a indiqué que les valeurs étaient hétérogènes ($P < 10^{-4}$) et un test de comparaisons multiples de Tukey a par la suite été appliqué afin de comparer chaque paires de valeurs. Chaque traitement vs. contrôle : * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$; effet d'un co-traitement avec un excès de PTH₁₋₃₄ vs. PTH-HRP : † $P < 0,05$.

2. Études sur la MK : Caractérisation *in vivo* et potentiel comme ligand en position C-terminale de protéines de fusion

Les propriétés de la MK ont été étudiées sur les récepteurs B₂ humain et de rat, afin d'obtenir le maximum d'information pour générer des protéines de fusion avec la MK en position C-terminale. Les connaissances acquises par l'expérimentation *in vitro* et *in vivo* étaient complémentaires aux études sur la conception et l'évaluation des protéines de fusion agonistes du B₂R.

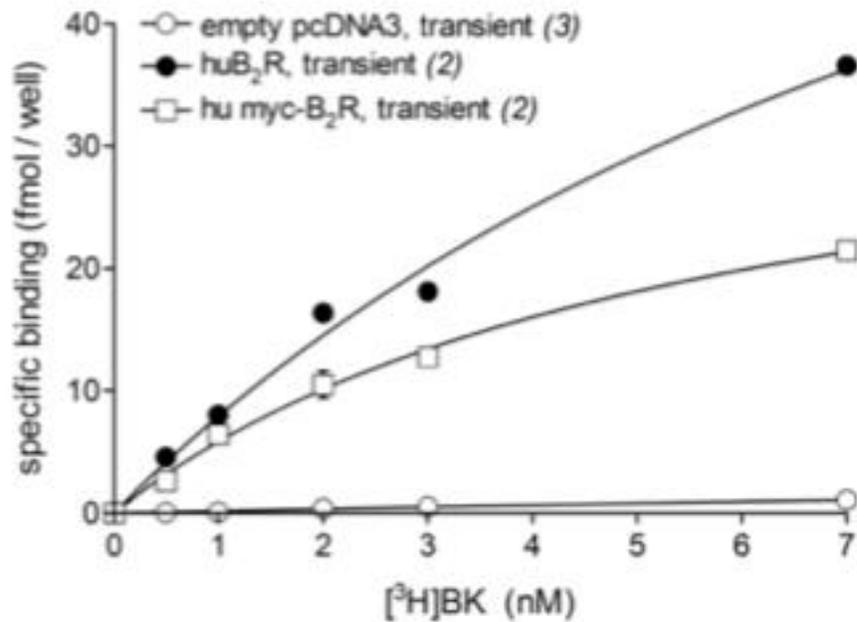
2.1 Validation des nouvelles constructions myc-B₂R humain et myc-B₂R de rat

Comme mentionné dans la section Matériel et Méthodes, de nouvelles constructions des récepteurs B₂ humain et de rat avec ou sans épitope myc (hu B₂R, hu myc-B₂R ; rt B₂R, rt myc-B₂R) en position N-terminale ont été générées. Afin de confirmer l'identité de ces constructions, des courbes de saturation ont été réalisées.

La première expérience a été réalisée sur des cellules exprimant les récepteurs hu B₂R, hu myc-B₂R ou transfectées avec le vecteur vide (Fig. 28A). L'ajout de concentrations croissantes de BK tritiée a permis d'établir des courbes de saturation. Ces courbes ont permis de confirmer que ces deux constructions étaient bel et bien des récepteurs de haute affinité de la BK. En effet, par ces expériences il a été possible de déterminer les K_d et B_{max} pour chaque récepteur. Pour le récepteur hu B₂R, le K_d était de 10,43 nM alors pour le récepteur hu myc-B₂, le K_d était de 5,58 nM. Cela confirme que l'ajout de l'épitope myc en position N-terminale n'affecte pas significativement l'affinité du récepteur pour son ligand, comme précédemment rapporté pour la version myc du récepteur B₂ de lapin (Gera et al., 2011).

La seconde expérience a mis en valeur les nouvelles constructions rt B₂R et rt myc-B₂R exprimées par des cellules HEK 293a (Fig. 28B). Par la génération de courbes de saturation, il a été possible de déterminer l'affinité de ces deux nouveaux récepteurs. Le récepteur rt B₂R a un K_d de 17,3 nM alors que le récepteur rt myc-B₂ a un K_d de 8,69 nM.

A.



B.

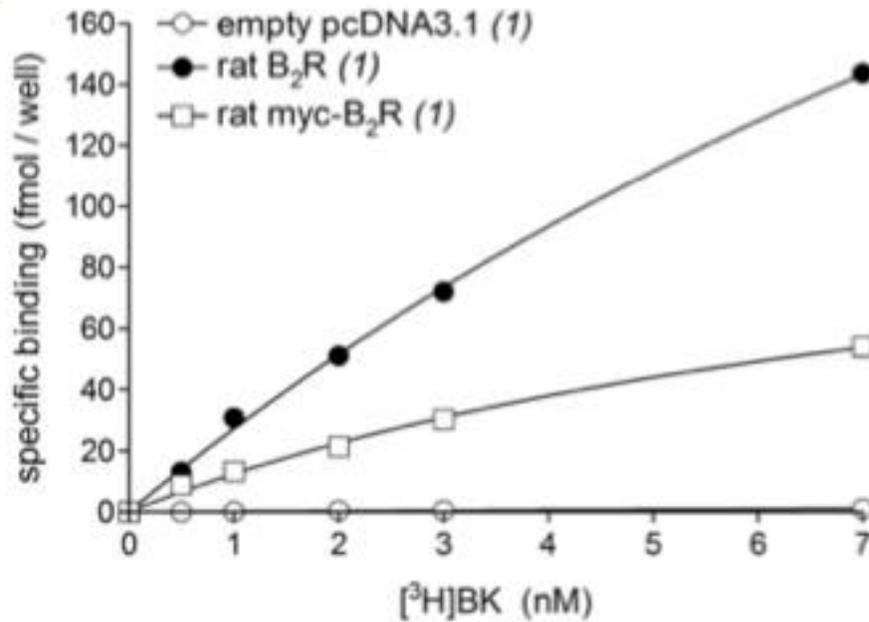


Figure 28. Validation des nouveaux vecteurs codant pour les récepteurs B₂ et myc-B₂ humain et de rat.

(A) L'expression des récepteur B₂ et myc-B₂ humain dans des cellules HEK 293a a été mesurée par la génération de courbes de saturation (0,5 nM à 7 nM de [³H]BK). (B) L'expression des récepteur B₂ et myc-B₂ de rat dans des cellules HEK 293a a été mesurée par la génération de courbes de saturation (0,5 nM à 7 nM de [³H]BK). Les résultats représentent la liaison spécifique de la BK tritiée au récepteur étudié et sont la moyenne de 2-3 valeurs par point. Les paramètres pharmacologiques des récepteurs sont rapportés dans le texte.

Comme pour les récepteurs B₂ humain et de lapin, l'ajout de la séquence myc en position N-terminale du récepteur B₂ de rat ne change pas significativement l'affinité de celui-ci pour la BK. Dans les deux expériences, les cellules HEK 293a transfectées avec le vecteur vide ne liaient pas de quantités significatives de BK tritiée.

2.2 Affinité de la MK pour les récepteurs myc-B₂ humain ou de rat

Un essai de compétition de liaison de la [³H]BK a permis de déterminer la véritable affinité de la MK pour les récepteurs myc-B₂ humain et de rat (Fig. 29A et 29B). Au niveau du récepteur myc-B₂ humain, cette expérience a démontré que la MK avait une très faible affinité avec un IC₅₀ de 7560 nM, alors que celui de la BK dans cet essai était de 5,16 nM. Cela signifie que la MK est près de 1500 fois moins puissante que la BK sur le récepteur hu myc-B₂R. Pour le récepteur recombinant rt myc-B₂R, l'affinité de la MK était plus faible que celle de la BK, mais dans une plus faible mesure (IC₅₀ MK : 120 nM ; IC₅₀ BK : 19,2 nM). L'extension N-terminale de la MK (DLPKINRKGP) entraîne donc une perte d'affinité de 1 log au niveau du récepteur rt myc-B₂, ce qui est une perte d'affinité nettement moins drastique qu'au niveau de la version humaine de cette construction. De plus, le peptide MK-desArg n'a pas déplacé de manière significative la liaison de la [³H]BK au récepteur hu myc-B₂ (Fig. 29A). Cela est cohérent avec le fait que les kinines doivent absolument posséder le résidu arginine en position C-terminale pour être des ligands du récepteur B₂ (Leeb-Lundberg et al., 2005).

2.3 Activité pharmacologique *in vitro* de la MK

La capacité de la MK de stimuler le B₂R (humain ou rat) a été évaluée par un essai de mobilisation calcique sur des cellules exprimant stablement l'une ou l'autre de ces constructions (Fig. 30A). La BK (10 nM, contrôle positif) a entraîné une rapide et intense mobilisation calcique tant chez les cellules exprimant le hu myc-B₂R que chez celles exprimant le rt myc-B₂R. En accord avec les résultats de l'essai de compétition, seulement les cellules exprimant le rt myc-B₂R ont mobilisées d'importantes concentrations de calcium suite au traitement avec la MK (10 nM). La réponse du rt myc-B₂R à la MK était d'intensité égale à celle de la BK, mais celle-ci était légèrement retardée dans le temps vs. le peptide contrôle.

Étant donné le grand nombre de résidus chargés positivement présent dans la séquence de la MK (5 ; **DLPKINRKGPRGGGFSPFR**), il a été suggéré que ce peptide pourrait être agoniste du récepteur MRGPRX2. Ce récepteur a été récemment décrit comme un récepteur pour les polymères et les drogues cationiques qui induisent la dégranulation des mastocytes (McNeil et al., 2015). Plusieurs drogues utilisées en clinique, dont l'icatibant à des concentrations micromolaires (atteintes au site d'injections s.c.) ont le potentiel d'activer ce récepteur (McNeil et al., 2015). La capacité de la MK de stimuler le récepteur MRGPRX2 a été testée par un essai de mobilisation calcique avec des cellules exprimant transitoirement ce récepteur (Fig. 30B). La MK n'a que très marginalement activé ce récepteur, et ce uniquement à la plus forte concentration de ce peptide (10 μ M). Le composé 48/80, un polymère produit par une réaction de condensation du N-méthyl-p-méthoxyphénéthylamine avec le formaldéhyde, a été utilisé comme contrôle positif dans cette expérience et a entraîné une mobilisation calcique significative dépendante du récepteur MRGPRX2.

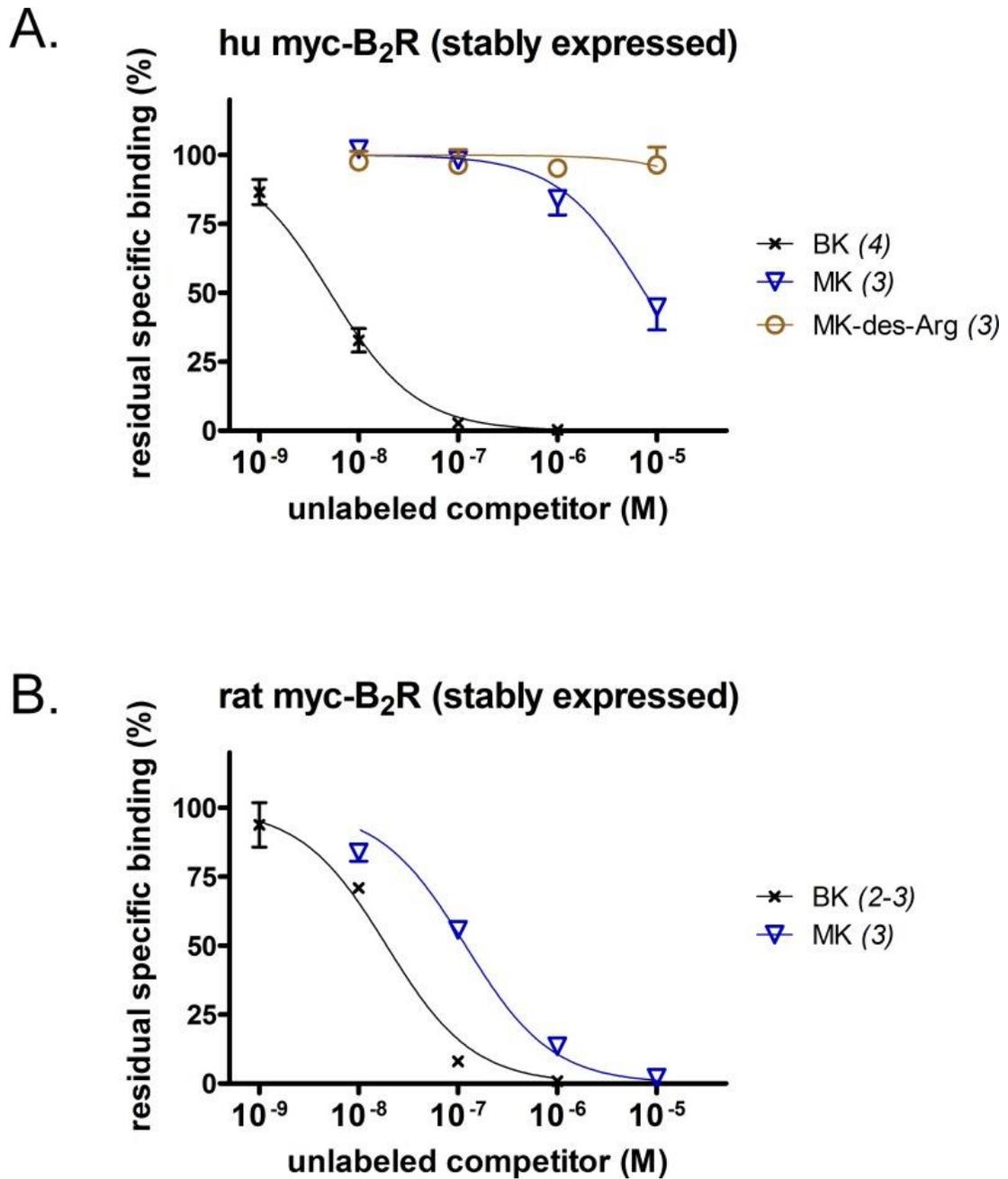


Figure 29. Profil pharmacologique de divers peptides analogues à la BK prolongés à l'extrémité N-terminale.

Compétition de la liaison de [³H]BK (3 nM) au récepteur myc-B₂R (A : humain; B : rat) par divers peptides non radiomarqués. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique maximale (moyennes ± écart-types; nombre de répliques indiqué entre parenthèses). Les IC₅₀ des différents peptides pour chacun des récepteurs sont rapportés dans le texte.

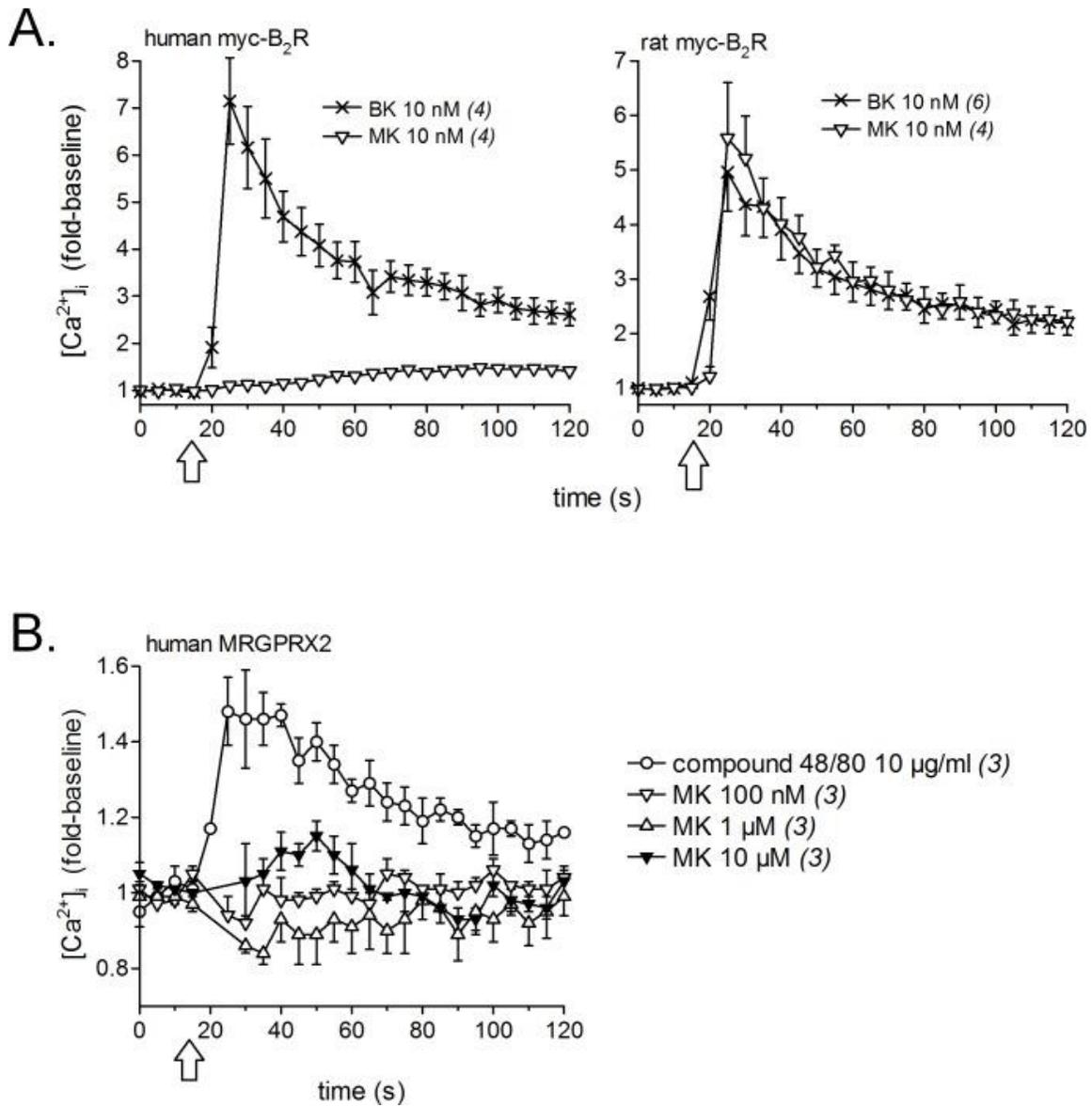


Figure 30. Pharmacologie de la MK chez des cellules HEK 293a : Mobilisation calcique. (A) Effets de la BK (contrôle positif) ou de la MK sur des cellules HEK 293a exprimant stablement le récepteur myc-B₂R humain ou de rat. (B) Effet de ces peptides sur des cellules exprimant de manière transitoire le récepteur MRGPRX2 humain. Dans cette expérience, le composé 48/80 est utilisé comme contrôle positif pour l'activation de ce récepteur. Ces tracés, obtenus *via* la fluorescence émise par le marqueur calcique FURA-2, représentent la mobilisation calcique exprimée en augmentation de l'émission du FURA-2 versus le niveau initial. Le nombre de répliques est indiqué entre parenthèses.

2.4 Essai de contractilité de la veine ombilicale humaine isolée appliqué à la MK

L'ensemble des effets induits par la MK a été étudié d'avantage à l'aide de la veine ombilicale humaine, un essai contractile pour le récepteur B₂ exploité par plusieurs laboratoires (Marceau et al., 2010 ; Gobeil et al., 1996).

En premier lieu, la capacité de la MK et de la BK à induire la contraction de la veine ombilicale humaine a été documentée par la génération de courbes concentration-effet (Fig. 31A). Dans cet essai, la BK induit la contraction de la veine ombilicale humaine à des concentrations nanomolaires avec un EC₅₀ de 6,9 nM. Comme prédit par les résultats de l'essai de compétition, la courbe concentration-effet de la MK est rapportée vers la droite *vs.* la BK ce qui signifie une perte de puissance. Toutefois, la perte de puissance est nettement moins drastique que prévue par l'essai de compétition. En effet, la MK a un EC₅₀ de 145 nM ce qui correspond à une perte de puissance de 20x *vs.* la BK ce qui est nettement moins que celle de 1500x observée dans l'essai de liaison. Cela suggère donc que la MK est activée, probablement par des protéases présentes à la surface de la veine ombilicale humaine, afin de régénérer un agoniste du B₂R.

Afin de valider cette théorie, des concentrations équipotentes de kinines (équivalentes approximativement à l'EC₅₀ estimé à la Fig. 31A) ont été administrées dans les bains à organes isolés afin de comparer la cinétique de contraction au niveau de la veine ombilicale humaine. La comparabilité des doses de BK (10 nM) et de MK (200 nM) a été confirmée (Fig. 31B droite). La contraction induite par la BK a rapidement atteint un plateau alors que celle induite par la MK a été nettement plus lente à atteindre son maximum (Fig. 31B). Cela vient renforcer l'idée qu'un agoniste de plus haute affinité que la MK est généré progressivement lors de l'incubation avec la veine ombilicale humaine.

Afin d'éliminer la possibilité que les effets de la MK soient dépendants d'un autre récepteur, une courbe concentration-effet a été produite avec des anneaux de veine ombilicale prétraité avec l'icatibant (1 µM; Fig. 31C gauche). Le puissant effet antagoniste de cette drogue sur la contraction induite par la MK vient confirmer hors de tout doute que l'effet mesuré suite au traitement avec la MK est bel et bien dépendant du B₂R exprimé par la veine ombilicale humaine. Ensuite, afin d'éliminer la possibilité que l'histamine, *via* la dégranulation des mastocytes peut-être présents dans la veine ombilicale humaine, contribue à la contraction induite par la MK, une seconde courbe concentration-effet a été

réalisée. Celle-ci a été générée sur des tissus prétraités avec la pyrilamine, un antagoniste du récepteur H₁ de l'histamine (Fig. 31C droite). Cet antagoniste n'a eu aucun effet sur la contraction dépendante de la MK tout en réduisant de manière drastique le pouvoir contractile de l'histamine.

Par la suite, différents inhibiteurs de protéases et de peptidases ont été testés dans ce système afin d'identifier l'enzyme ou les enzymes responsables de l'activation de la MK (Fig. 31D). Chaque inhibiteur a été testé sur un groupe de tissus différents et était administré dans les bains 30 minutes avant la génération d'une courbe concentration-effet. La combinaison des inhibiteurs d'aminopeptidases bestatine et puromycine (Hitzerd et al., 2014) n'avait aucun effet sur la contraction induite par la MK. L'inhibiteur de métallopeptidases EDTA de calcium disodique, un agent qui a été rapporté pour moduler la puissance des kinines dans un essai semblable basé sur l'aorte de rat (Babiuk et al., 1982,) n'avait aucun effet sur la réponse contractile à la stimulation avec la MK. L'inhibiteur de protéases à large spectre leupeptine (Zhang et al., 2005), l'inhibiteur de cystéine-protéases E-64 ainsi que l'inhibiteur de sérine-protéases Pefabloc SC ont tous trois échoués à déplacer la courbe concentration-effet de la MK vers la droite. L'omapatrilat, un inhibiteur de l'ACE et de l'endopeptidase neutre, a aussi été incapable de modifier la réponse contractile à la MK. Ces observations permettent d'exclure l'activation métabolique de la MK par diverses sérine-protéases, incluant les kallikréines.

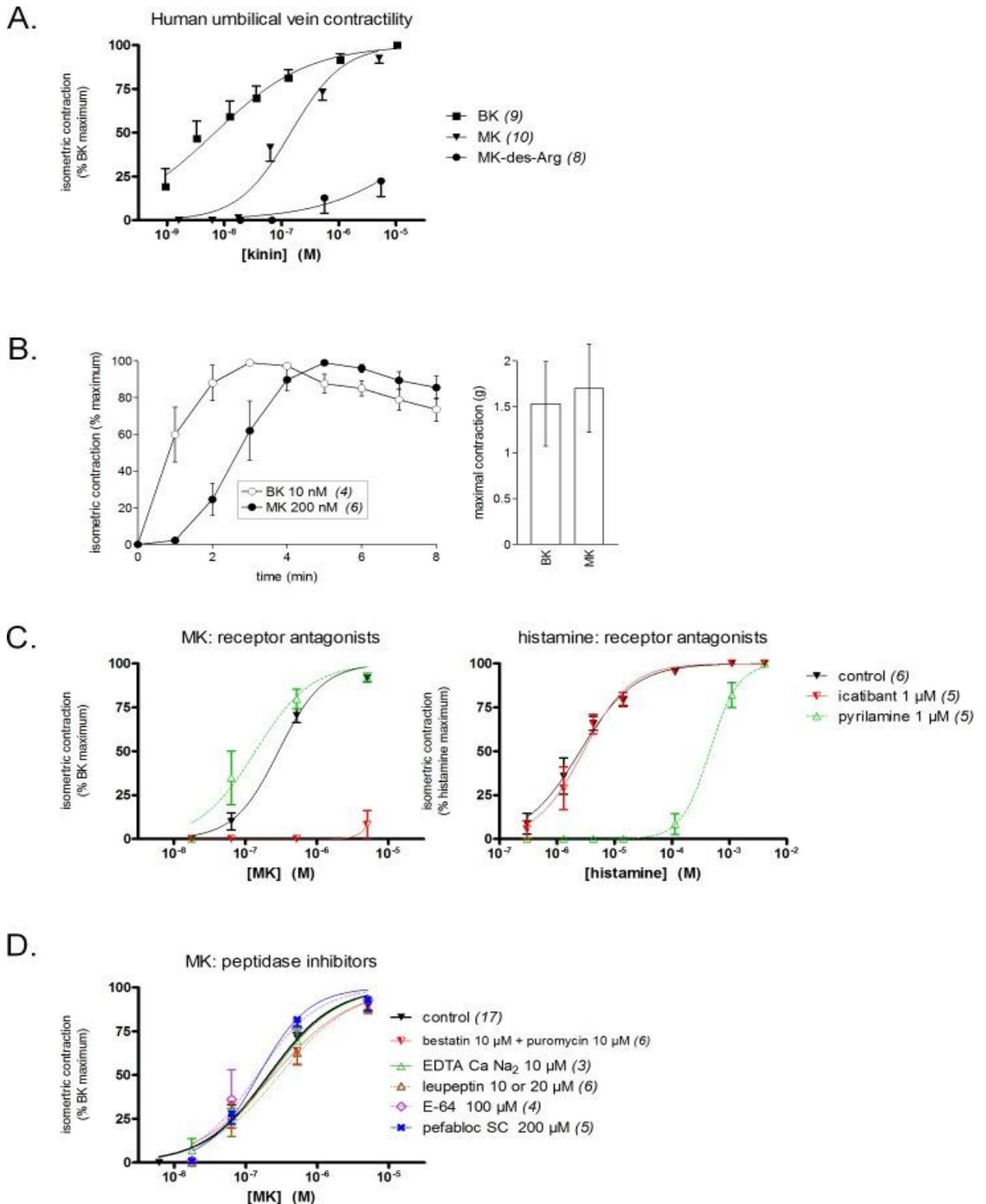


Figure 31. Études de contractilité au niveau de la veine ombilicale humaine isolée appliquées à la BK ainsi qu'à son homologue prolongé en N-terminal, la MK.

(A) Des courbes concentration-effet ont été construites pour chacun des peptides indiqués. Pour les peptides de plus faible efficacité, l'effet maximal induit par les récepteurs B₂ n'étant jamais atteint, celui-ci a été enregistré suite à l'injection d'une forte dose de BK (9.4 μM) après l'injection de toutes les autres doses de peptides. (B) Cinétique de la contraction

de la veine ombilicale humaine isolée suite au traitement avec des doses équipotentes de BK et de MK. Les concentrations utilisées sont indiquées entre parenthèses. La similarité des contractions maximales induites (en gramme) par chacune des doses de peptides a été vérifiée (droite). (C) Effet du prétraitement de la veine ombilicale avec un antagoniste (appliqué 30 minutes avant la MK) sur la courbe concentration-effet de la MK. (D). Effet de divers inhibiteurs de peptidases (appliqués 30 minutes avant la MK) sur la génération d'une courbe concentration-effet pour la MK. Pour chaque courbe, les résultats sont représentatifs de plusieurs réplicas (nombre entre parenthèse; les valeurs présentées correspondent à la moyenne \pm l'écart-type).

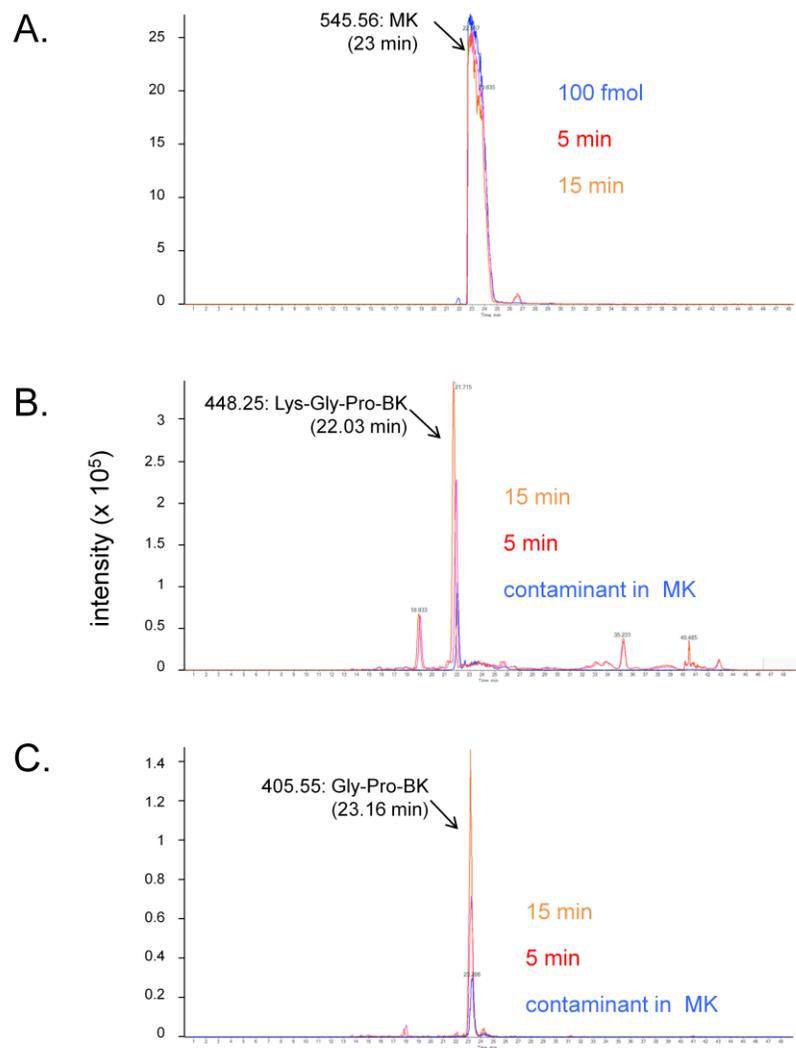


Figure 32. Détermination par LC-MS des fragments C-terminaux de la MK produits par l'incubation à 37 °C de ce peptide en présence d'un anneau de veine ombilicale humaine pendant 5 ou 15 minutes.

(A) La MK (100 fmol) est métabolisée durant l'incubation. (B) Lys-Gly-Pro-BK est le métabolite C-terminal majeur de la MK. (C) Gly-Pro-BK est aussi un métabolite qui s'accumule de manière significative.

2.5 Identification des peptides générés par l'activation métabolique de MK par LC-MS

La conversion de la MK en kinines plus courtes et de plus haute affinité est une nécessité en raison de l'affinité marginale de MK pour le récepteur B₂ et de la lenteur de la contraction induite par ce peptide. Toutefois, l'inhibition de plusieurs protéases n'a pas permis d'identifier une voie d'activation de la MK. Afin de contourner ce problème, le peptide MK a été incubé avec des anneaux de veine ombilicale humaine puis analysé par LC-MS après quelques étapes de purification (voir Matériel et Méthodes section 2.10). L'analyse par LC-MS a permis d'identifier deux fragments C-terminaux de la MK (Fig. 32). La génération de Lys-Gly-Pro-BK et de Gly-Pro-BK par l'incubation avec la veine ombilicale humaine a été observée et ce de manière temps-dépendante ce qui est cohérent avec la génération graduelle d'analogues de la BK à proximité des tissus. Étonnamment, la MK commerciale contenait de petites quantités des deux fragments C-terminaux, mais l'incubation avec la veine ombilicale a fortement augmenté l'intensité de ces fragments dans l'analyse LC-MS. De nombreux fragments N-terminaux tels que DLPKINRKGPRPP et DLKINRKGPRPPGF ont aussi été identifiés démontrant l'abondance de sites de clivage dans la MK et aussi l'abondance des peptidases présentes dans le tissu étudié.

2.6 Réponses hémodynamiques *in vivo* à la MK

Les valeurs de base pour la pression artérielle moyenne (MAP) et pour le rythme cardiaque (HR) présentées dans le Tableau 7 ont été enregistrées dans le groupe contrôle ou 15 minutes après le prétraitement avec l'énalaprilat, l'icatibant ou la pyrilamine. Bien qu'il n'y ait pas de changement significatif dans la MAP entre les groupes, il y avait une augmentation significative du HR chez les rats traités avec l'énalaprilat vs. le groupe contrôle.

Tableau 7 : Paramètres cardiovasculaires de base chez les rats anesthésiés suite au prétraitement

Pré-traitement	Pression artérielle moyenne (MAP)	Rythme cardiaque (HR)	n
Contrôle	96,5 ± 2,5	351 ± 10	25
Enalaprilat 0,1 mg/kg	94,9 ± 4,6	417 ± 13 *	6
Icatibant 25 µg/kg	90,3 ± 4,6	362 ± 28	6
Pyrilamine 5 mg/kg	87,4 ± 2,7	335 ± 6,1	16
ANOVA	P = 0,13	P = 0,009	

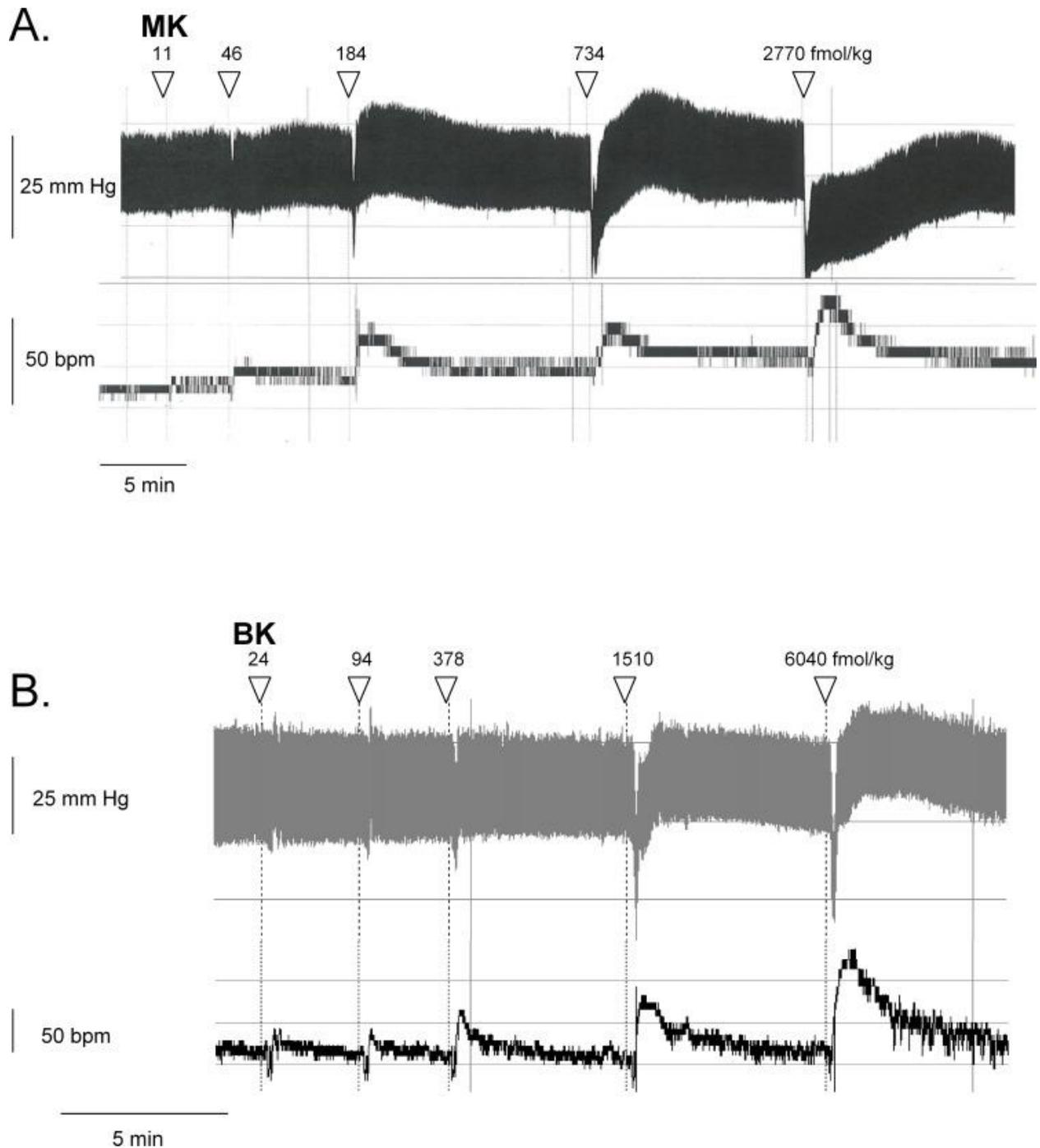


Figure 33. Réponses hémodynamiques chez le rat anesthésié suite à l'injection d'un bolus intraveineux de doses croissantes d'agonistes du récepteur B₂ de la BK.

Tracés représentatifs montrant l'effet dose-réponse de la MK (A) ou de BK (B) sur la tension artérielle et sur le rythme cardiaque. Les doses de MK et de BK sont exprimées en fmol/kg afin de permettre une comparaison efficace entre les deux peptides, car ceux-ci ont des poids moléculaires très différents.

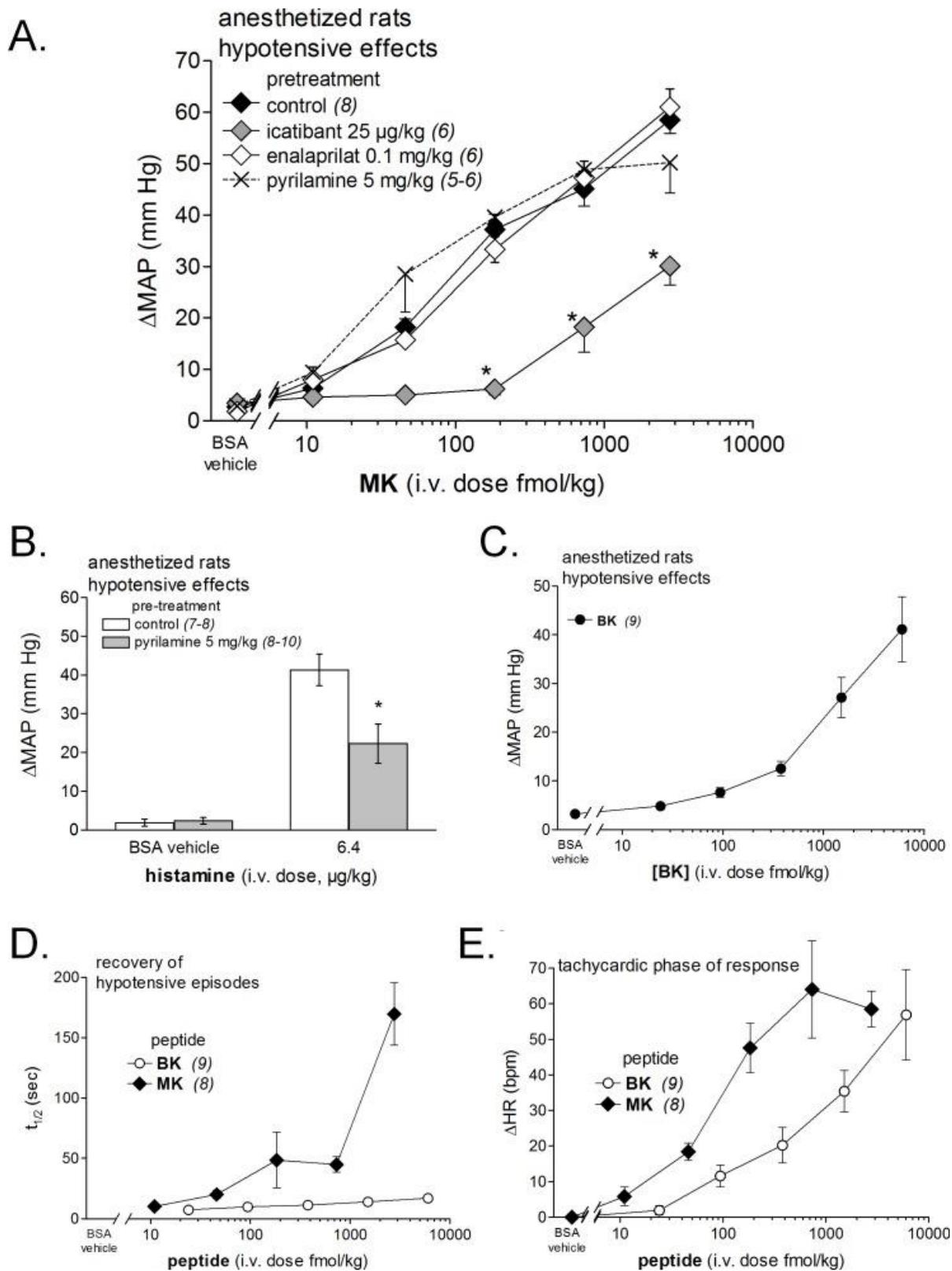


Figure 34. Réponses hémodynamiques chez le rat anesthésié suite à l'injection d'un bolus intraveineux de doses croissantes d'agonistes du récepteur B₂.

(A) Courbes dose-réponse de l'effet hypotensif de la MK et effet d'un prétraitement avec l'icatibant, l'enalaprilat ou la pyrilamine (administré sous forme de bolus intraveineux 15 minutes avant l'injection de MK) sur la réponse hypotensive induite par la MK. Les effets

de la MK étaient significativement différents de ceux de la saline-BSA aux quatre doses supérieures utilisées (ANOVA suivie d'un test de Dunnett, $P < 0,01$. *, $P < 0,01$: effet des prétraitements sur la réponse hypotensive induite par la MK (test de Dunnett effectué pour chaque dose de MK où l'ANOVA était significative). (B) Histogrammes démontrant l'effet antagoniste de la pyrilamine chez le rat anesthésié traité ou non avec une dose de $6,4 \mu\text{g/kg}$ d'histamine. L'effet de l'histamine était significativement différent de celui de la saline-BSA (*, $P < 0,01$, test t de Student). (C) Courbes dose-réponse pour l'effet hypotensif de la BK; résultats présentés comme en (A). Les effets de la BK étaient significativement différents de la saline-BSA seulement aux deux doses supérieures. (D) Temps nécessaire pour la demi-récupération de l'épisode hypotensif suite à l'administration de doses croissantes de BK ou de MK rapportées dans les panneaux A et C. (E) Réponses tachycardiques maximales lors des épisodes hypotensifs induits par la BK ou la MK rapportés dans les panneaux A et C. Pour chaque panneau, les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'écart-type et le nombre de répliques est indiqué entre parenthèse.

Il a été rapporté récemment que l'administration de BK causait de brèves réponses hypotensives couplés à de la tachycardie et que ces réponses étaient fortement amplifiées dans le cas d'une inhibition pharmacologique de l'ACE (Jean et al., 2016a). À l'aide du même protocole, il a été démontré que la MK était plus puissante que la BK pour causer l'hypotension (Figs. 33 et 34). De plus, les épisodes hypotensifs causés par la MK étaient de plus longue durée et la tachycardie qui y était associée était généralement plus intense que chez les rats traités avec la BK. Contrairement à la BK, la MK n'était pas potentialisée par l'énalaprilat, mais tout comme ceux de la BK les effets hypotensifs de la MK étaient significativement inhibés en présence d'icatibant (Fig. 34A).

L'antagoniste du récepteur H₁ de l'histamine, la pyriline, n'avait aucun effet sur les réponses hémodynamiques à l'injection de MK chez le rat anesthésié (Fig. 34C). Toutefois, le même prétraitement avec la pyriline a significativement réduit la réponse hypotensive de l'histamine (Fig. 34B).

Le flot circulatoire moyen mesuré par effet Doppler dans les membres postérieurs permet de quantifier l'effet vasodilatateur de l'injection i.v. de drogues chez le rat anesthésié comme décrit dans Matériel et Méthodes section 2.9.2. La Figure 35 montre les changements simultanés dans la MAP, le HR et le *Doppler shift* au niveau des membres postérieurs induits par l'injection i.v. de véhicule, de BK ou de MK. Cela démontre que les effets hypotensifs causés par la BK et la MK étaient accompagnés d'une augmentation du flot circulatoire moyen au niveau de membres postérieurs et d'une augmentation du rythme cardiaque. L'augmentation mesurée du flot circulatoire moyen par effet Doppler au niveau des membres postérieurs pourrait signifier une diminution de la résistance vasculaire ; c'est à dire une vasodilatation. Toutes les réponses causées par la MK et la BK ont été significativement réduites par un prétraitement avec l'icatibant, prouvant que les effets observés sont bel et bien dépendants de la stimulation du B₂R.

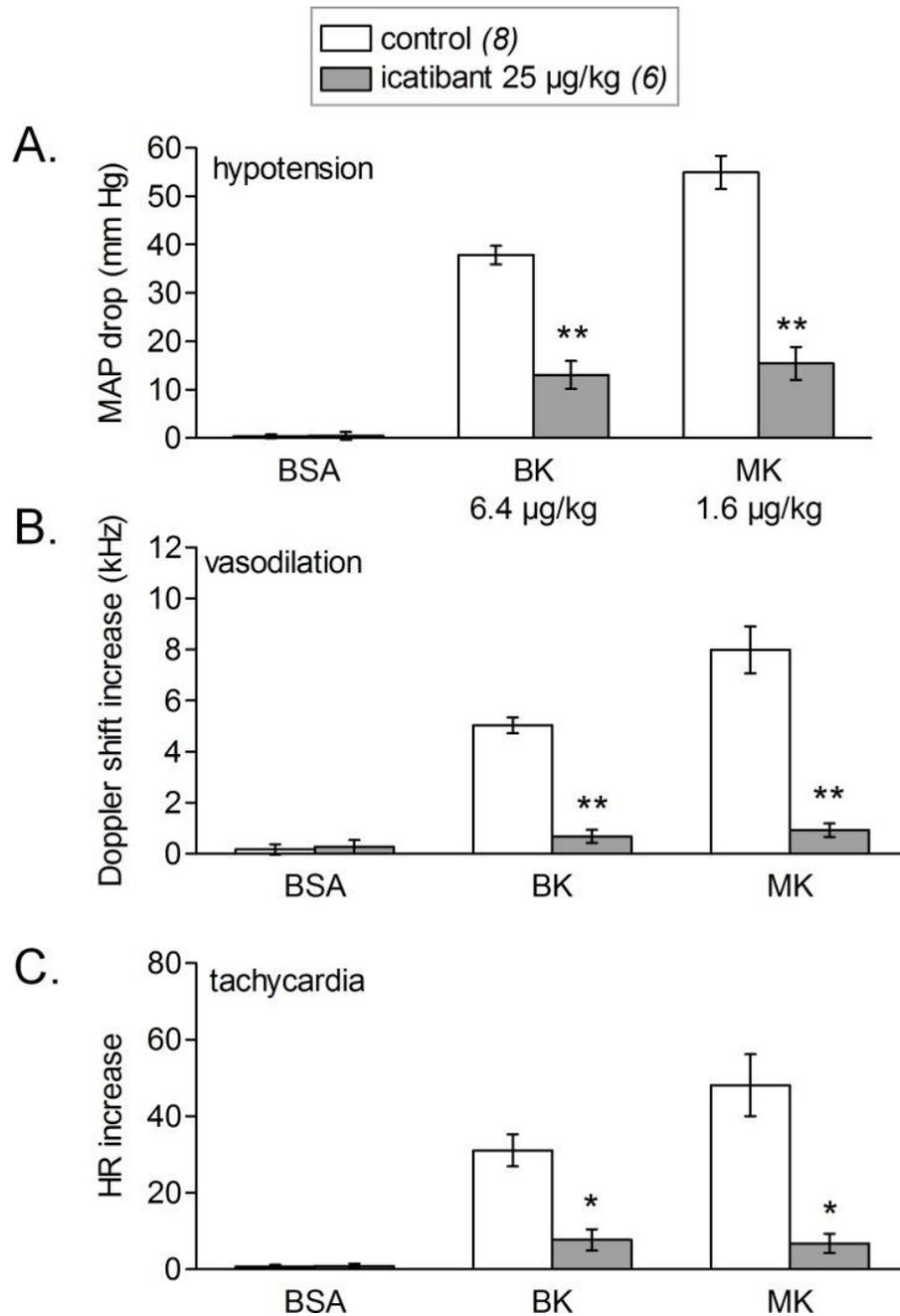


Figure 35. Effets simultanés de la BK ou de la MK sur divers paramètres hémodynamiques.

(A) Effets des agonistes du B_2R sur la tension artérielle moyenne (MAP (*mean arterial pressure*; mm Hg). (B) Effet des deux peptides sur le *mean hindquarter Doppler shift signal* (kHz; effet vasodilatateur). (C) Effets de la BK et de la MK sur le rythme cardiaque (*heart rate*; HR; battements par minutes, phase tachycardique). Les réponses hémodynamiques présentées ci-dessus ont été générées suite à l'administration intraveineuse de saline-BSA, de BK ou de MK sous forme de bolus chez le rat anesthésié. Un groupe de rats avait été préalablement traité avec une dose d'icatibant, afin de valider la spécificité des réponses induites par les agonistes du B_2R . L'icatibant a significativement réduit l'ensemble des réponses induites par les deux kinines (test t de Student, * $P < 0,01$; ** $P < 10^{-4}$). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'écart-type et le nombre de répliques est indiqué entre parenthèses.

2.7 Caractérisation supplémentaire d'EGFP-MK en tant que modèle pour une protéine de fusion ligand du B₂R

Malgré la caractérisation extensive préalablement effectué sur EGFP-MK (Charest-Morin et al., 2013), certaines questions concernant cette protéine de fusion restaient en suspens.

Premièrement, la préparation de protéine fluorescente EGFP-MK a été revalidée par immunobuvardage avec les anticorps anti-GFP et anti-BK (Fig. 36). Cet immunobuvardage a démontré la présence d'une bande relativement homogène correspondant à une protéine ayant un poids légèrement plus lourd que la protéine native EGFP. Cette variation dans la migration des deux bandes est consistante avec l'insertion de la séquence de la MK en C-terminal de l'EGFP, confirmé par la réactivité d'EGFP-MK avec l'anticorps anti-BK.

2.7.1 Évaluation de l'internalisation d'EGFP-MK par les récepteurs hu et rt myc-B₂Rs

Ensuite, puisque la capacité d'EGFP-MK d'interagir avec les récepteurs B₂ humain et de rat n'avait jamais été documentée, celle-ci fut étudiée. La Figure 37 présente une comparaison de l'internalisation de différentes concentrations d'EGFP-MK par les récepteurs myc-B₂ humain et de rat. Dans cette expérience les récepteurs possédant l'épitope myc avaient été pré-marqués avec un anticorps anti-myc conjugué à un fluorophore rouge, l'AlexaFluor 594, afin de confirmer leur expression membranaire. Cette expérience a démontré que la protéine de fusion EGFP-MK avait nettement plus d'affinité pour le rt myc-B₂R. En effet, ce dernier a médié l'internalisation d'EGFP-MK à toutes les concentrations testées et il y avait colocalisation avec l'anticorps anti-récepteur rouge de manière convaincante. De son côté, le récepteur hu myc-B₂R n'a pas internalisé EGFP-MK, malgré une endocytose partielle du récepteur marqué avec l'anticorps fluorescent et ce sans internalisation significative d'EGFP-MK (diluée 1 :50 ; réponse inférieure à celle d'EGFP-MK 1 :1250 vs. rt myc-B₂R).

La spécificité d'EGFP-MK pour le récepteur B₂ de rat a par la suite été confirmée en microscopie (Fig. 38). Pour ce faire, des cellules ont été optionnellement prétraitées avec l'antagoniste icatibant puis stimulées avec EGFP-MK (1 :250, 30 minutes). Alors que les cellules stimulées uniquement avec la protéine de fusion démontraient une forte endocytose d'EGFP-MK, celles traitées également avec l'icatibant (1 µM) avaient la même intensité de marquage fluorescent que les cellules non-stimulées.

Lysates of HEK 293a producer cells

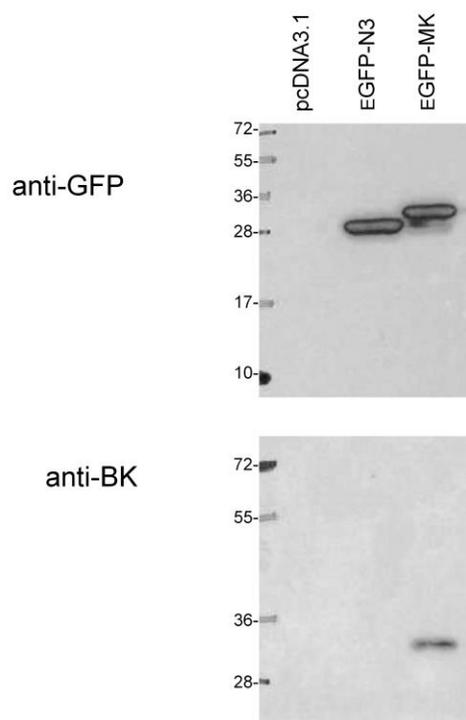


Figure 36. Validation de l'identité d'EGFP-MK par immunobuvardage.

Immunobuvardages des lysats de cellules HEK 293a productrices transfectées transitoirement avec le vecteur vide pcDNA3.1, le vecteur EGFP-N3 codant pour la EGFP authentique ou le vecteur EGFP-MK. EGFP-MK migre plus lentement que la EGFP authentique de par la présence de son extension C-terminale, laquelle réagit aussi avec l'anticorps anti-BK.

HEK 293a cells stably expressing myc-B₂R
 + anti-myc tag 9E10-AF594

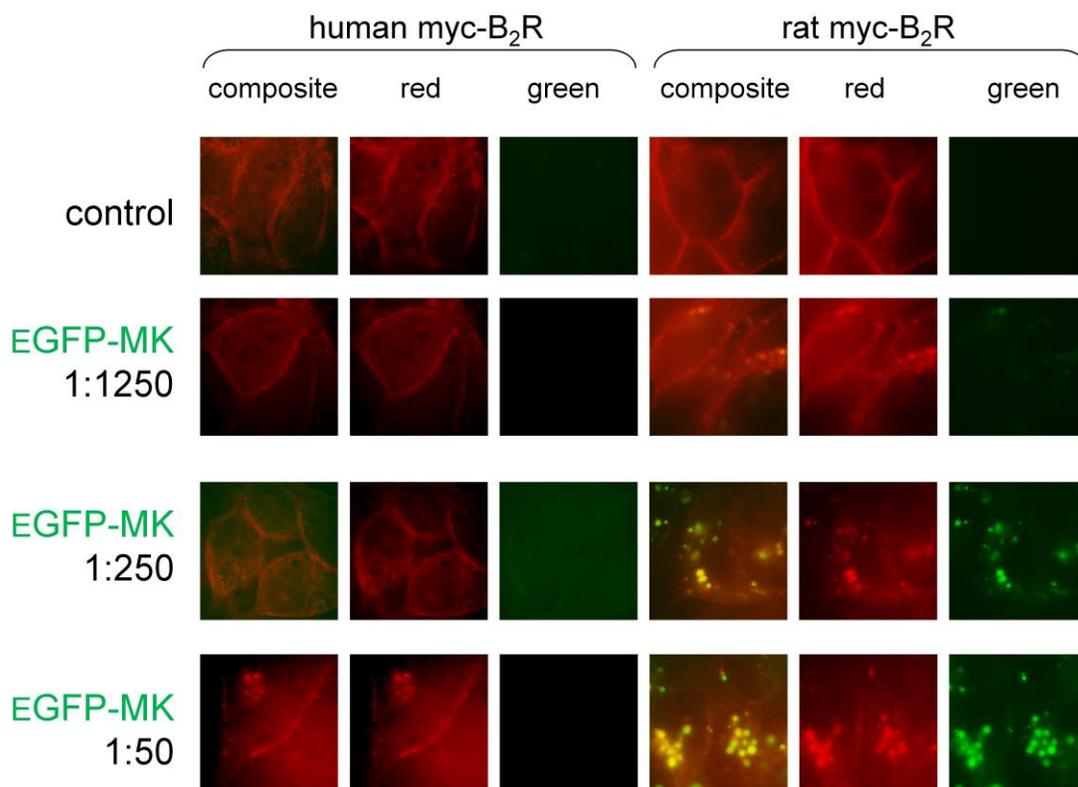


Figure 37. Marquage différentiel de cellules HEK 293a exprimant stablement une construction myc-B₂R (humain ou rat) par EGFP-MK. Préalablement à la stimulation avec EGFP-MK (30 minutes, 37 °C), les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-myc conjugué à l'AlexaFluor-594.

Recipient HEK 293a cells stably expressing rat myc-B₂R

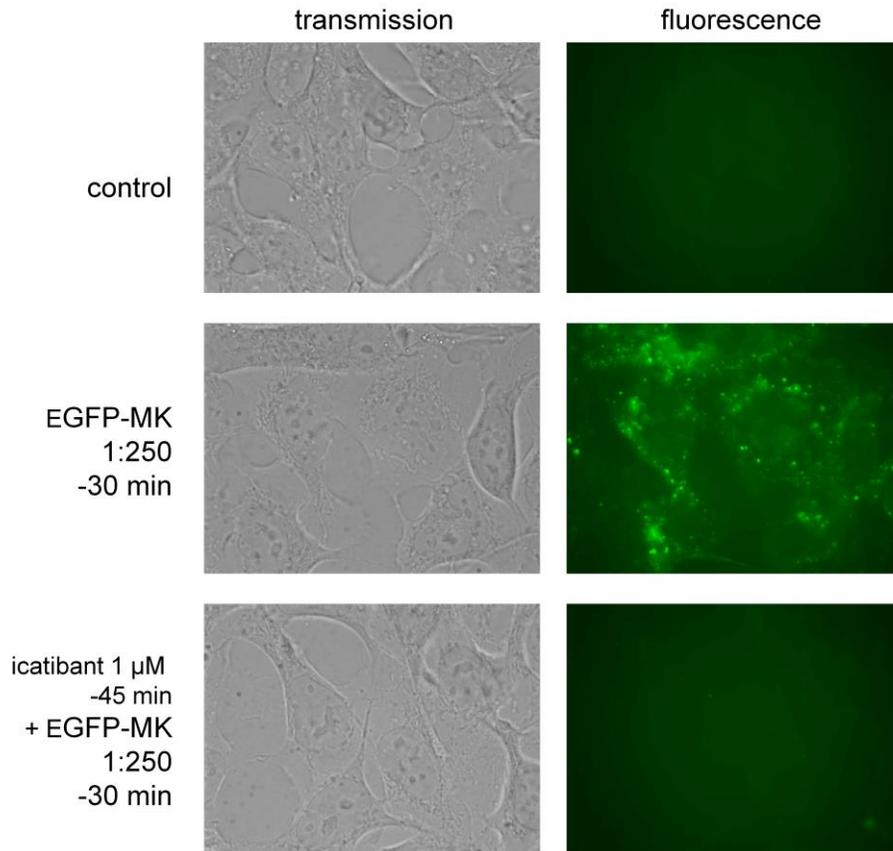


Figure 38. Validation de la spécificité d'EGFP-MK au niveau du rt myc-B₂R. L'endocytose d'EGFP-MK (1 :250, 30 minutes à 37 °C) par le récepteur rt myc-B₂R est caractérisée par une forte fluorescence verte endosomale. Un prétraitement avec l'icatibant vient inhiber complètement l'internalisation de la protéine de fusion. Observation en transmission et en fluorescence verte (magnification finale 1000x).

L'absence de liaison d'EGFP-MK au rt myc-B₂R en présence d'icatibant démontre la spécificité de cette protéine de fusion pour ce récepteur.

2.7.2 Études de la signalisation et de la localisation tardives d'EGFP-MK (30 minutes à 24 heures)

Le destin d'EGFP-MK après l'internalisation par des cellules exprimant stablement le récepteur rt myc-B₂ a été étudié au moyen de la transfection de ces cellules avec des marqueurs endosomaux fluorescents rouges (Fig. 39). Cette expérience a démontré que l'internalisation d'EGFP-MK était persistante même 24 heures après la stimulation. L'expression de la protéine fluorescente rouge cytosolique mCherry n'a pas interféré avec l'endocytose d'EGFP-MK. Le marqueur des endosomes précoces Rab5-mCherry a colocalisé avec EGFP-MK aux temps 30 minutes et 6 heures, mais la colocalisation était absente 24 heures post-stimulation. De plus, les cellules co-exprimant Rab5-GTP-locked-mCherry ont concentré, de manière temps-dépendante, EGFP-MK dans des endosomes géants à tous les temps étudiés dans cette expérience. LAMP₁-mCherry est un marqueur des lysosomes et des endosomes tardifs (Parks et al., 2015). Il n'y avait pas de colocalisation entre LAMP₁-mCherry et EGFP-MK après 30 minutes d'incubation. Toutefois, une densité croissante de vésicules marquées avec LAMP₁-mCherry contenant le cargo fluorescent vert a été observée aux temps d'incubation plus tardifs, 6 h et 24 h, indiquant une lente progression vers le système lysosomal.

Une étude par immunobuvardage a également été réalisée afin d'étudier l'internalisation et la signalisation tardive causées par EGFP-MK (Fig. 40). L'immunobuvardage a révélé qu'après 30 minutes d'incubation avec EGFP-MK, les cellules HEK 293 exprimant le rt myc-B₂R contenaient à la fois la forme intacte d'EGFP-MK (bande supérieure positive avec anti-BK et anti-GFP) et une forme dégradée ressemblant à EGFP, négative avec l'anti-BK. De plus longues incubations en présence d'EGFP-MK ont menées à l'accumulation de cette forme dégradée, alors que la forme intacte de cette protéine de fusion semblait être réapprovisionnée de façon continue par le milieu de culture contenant celle-ci. Les mêmes extraits cellulaires ont été testés pour l'accumulation de c-Fos et les deux peptides synthétiques, BK et MK, ont tous deux induit l'accumulation de ce facteur de transcription, et ce de manière plus intense dans le cas de la MK.

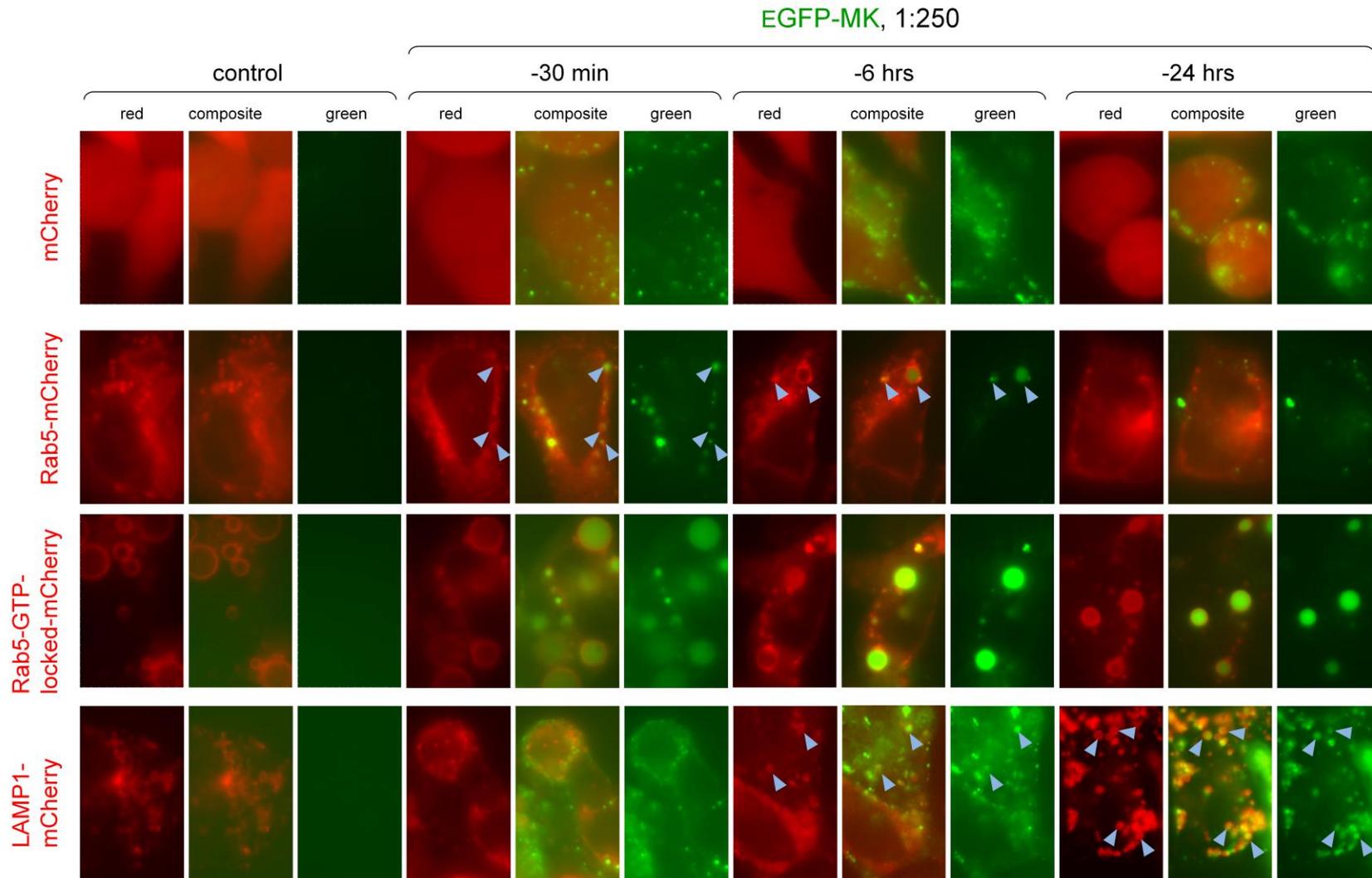


Figure 39. Colocalisation d'EGFP-MK avec divers marqueurs endosomaux en fonction du temps.

Les stimulations ont été effectuées dans des cellules co-transfectées avec le récepteur rt myc-B₂ et avec un marqueur endosomal fluorescent rouge (mCherry a été utilisée comme contrôle et n'a aucun effet sur l'internalisation d'EGFP-MK). Les incubations de durée variable suite aux traitements ont été effectuées à 37 °C.

Recipient HEK 293a cells stably expressing rat myc-B₂R:
signaling and fate

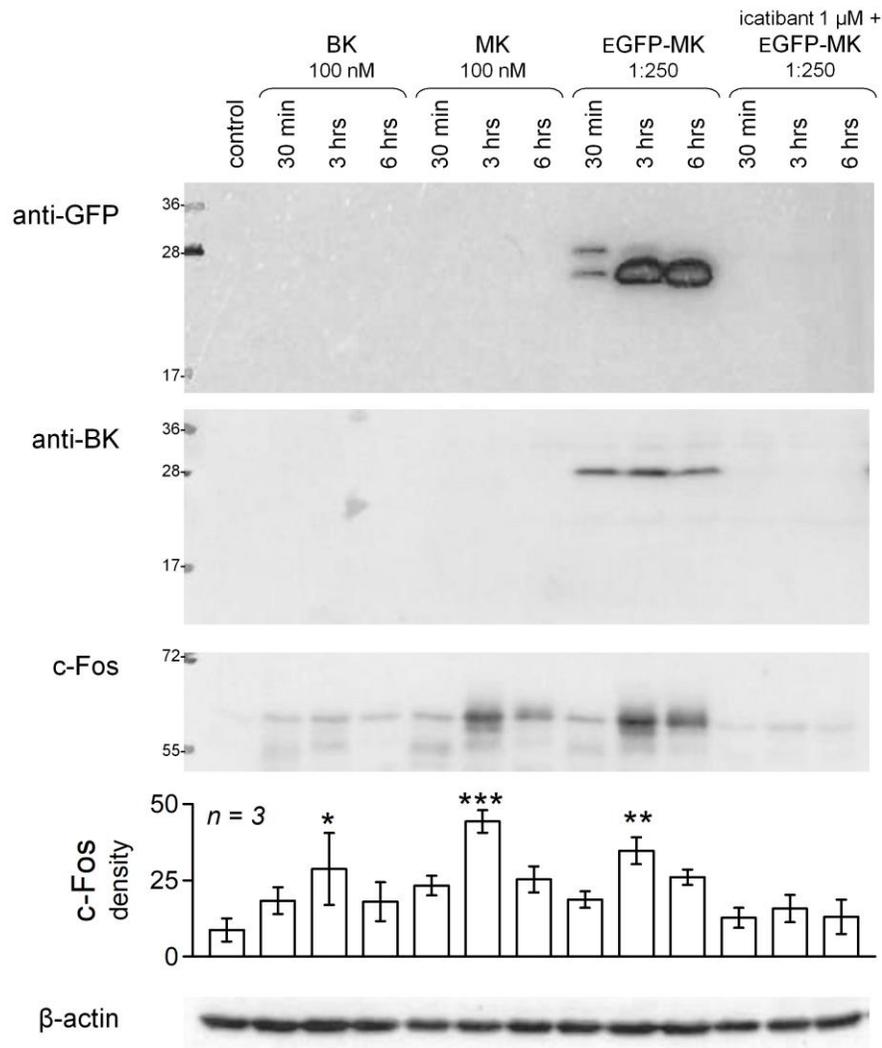


Figure 40. Internalisation et signalisation d'EGFP-MK sur cellules HEK 293 exprimant stablement le rt myc-B₂R.

Des extraits cellulaires totaux ont été migrés sur gel de polyacrylamide puis transférés sur membrane de nitrocellulose avant d'être incubés avec des anticorps anti-GFP, anti-BK, anti-c-Fos et anti-β-actine. Les anticorps anti-GFP et anti-BK ont révélés une accumulation d'une protéine apparentée à la EGFP qui semble être un produit de dégradation de EGFP-MK, ne contenant pas la séquence intacte de la BK. L'accumulation de c-Fos est stimulée par la BK, la MK et la EGFP-MK (signal maximal au temps 3 heures pour les trois stimulants; histogrammes générés à partir de la densité des bandes). Une analyse de variance a indiqué que les valeurs de densité des bandes étaient hétérogènes ($P < 0,01$); les valeurs différaient du contrôle selon le test de Dunnett : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences distinctes.

Les cellules traitées avec EGFP-MK ont accumulées c-Fos de manière très similaire à celles stimulées avec MK. Conformément à ce qui a été observé plus tôt, les cellules traitées avec l'icatibant n'ont pas internalisé EGFP-MK et n'ont pas accumulé c-Fos en réponse au traitement avec cette protéine.

2.8 Étude de la protéine de fusion APEX2-(NG)₁₅-MK

L'ensemble des connaissances acquises sur la MK et sur EGFP-MK a été utilisé afin de générer une nouvelle protéine de fusion avec domaine enzymatique, APEX2-(NG)₁₅-MK. Cette protéine de fusion a d'abord été caractérisée par un immunobuvardage avec des anticorps anti-FLAG et anti-BK (Fig. 41). L'immunobuvardage avec l'anticorps anti-FLAG a révélé la présence d'une protéine de fusion relativement homogène avec un poids moléculaire supérieur à celui de la forme native d'APEX2 découlant de la fusion de la séquence (NG)₁₅-MK en position C-terminale d'APEX2. La nouvelle protéine de fusion a aussi réagi avec l'anticorps anti-BK prouvant l'intégrité de l'extension C-terminale.

2.8.1 Caractérisation de l'activité pharmacologique d'APEX2-(NG)₁₅-MK

L'activité pharmacologique d'APEX2-(NG)₁₅-MK a été étudiée à l'aide de deux protocoles distincts. En premier, lieu l'activité agoniste d'APEX2-(NG)₁₅-MK a été confirmée par un essai de mobilisation calcique sur des cellules HEK 293a rt myc-B₂R (Fig. 42). La stimulation avec le lysat APEX2-(NG)₁₅-MK (dilué 1 :250) a entraîné une mobilisation calcique significative, quoique moindre que celle engendrée par la BK (10 nM). Le prétraitement avec l'antagoniste icatibant (1 µM) a complètement inhibé la mobilisation calcique dépendante du B₂R, prouvant par le fait même la spécificité d'APEX2-(NG)₁₅-MK. Ensuite, l'activité pharmacologique a été confirmée par immunobuvardage *via* l'accumulation de c-Fos (Fig. 43). Cette expérience a été un succès et a confirmé la spécificité d'APEX2-(NG)₁₅-MK pour le récepteur B₂, puisqu'il n'y avait pas d'accumulation de c-Fos en absence de ce récepteur ou lorsque les cellules avaient été traitées avec l'icatibant. De plus, la protéine APEX2 était inactive tant chez les cellules exprimant le récepteur rt myc-B₂ que chez celle non-transfectées.

Lysates of HEK 293a producer cells

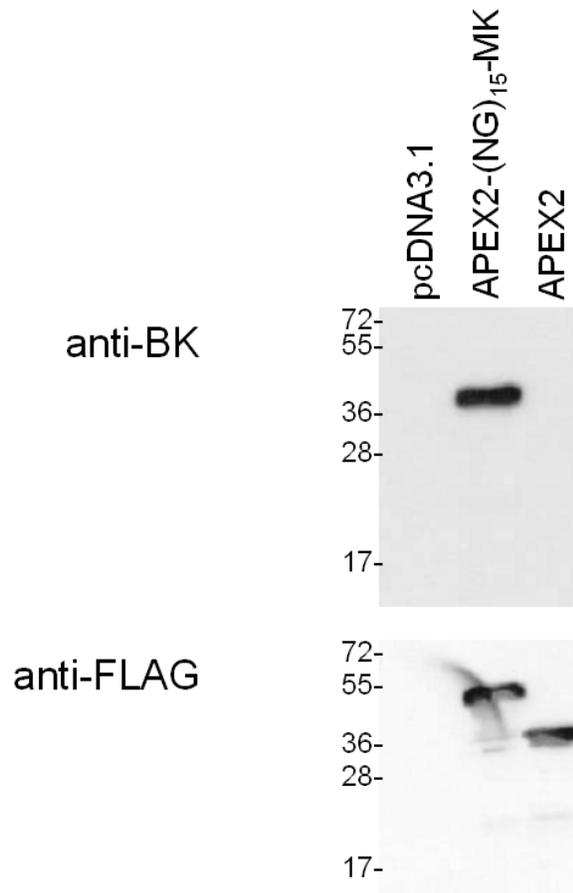


Figure 41. Validation de l'identité de APEX2-(NG)₁₅-MK par immunobuvardage. Immunobuvardages des lysats de cellules HEK 293a productrices transfectées transitoirement avec le vecteur vide pcDNA3.1, le vecteur codant pour l'APEX2 authentique ou un vecteur codant pour APEX2-(NG)₁₅-MK. Les deux derniers vecteurs codent pour des peroxydases possédant un épitope FLAG en position N-terminale. APEX2-(NG)₁₅-MK a une migration différente que l'APEX2 authentique, de manière cohérente avec la présence d'une extension de 4,7 kDa, et réagit avec l'anticorps anti-BK, indiquant un domaine C-terminal intact.

Effect of lysate (1:250) on recipient HEK 293a cells

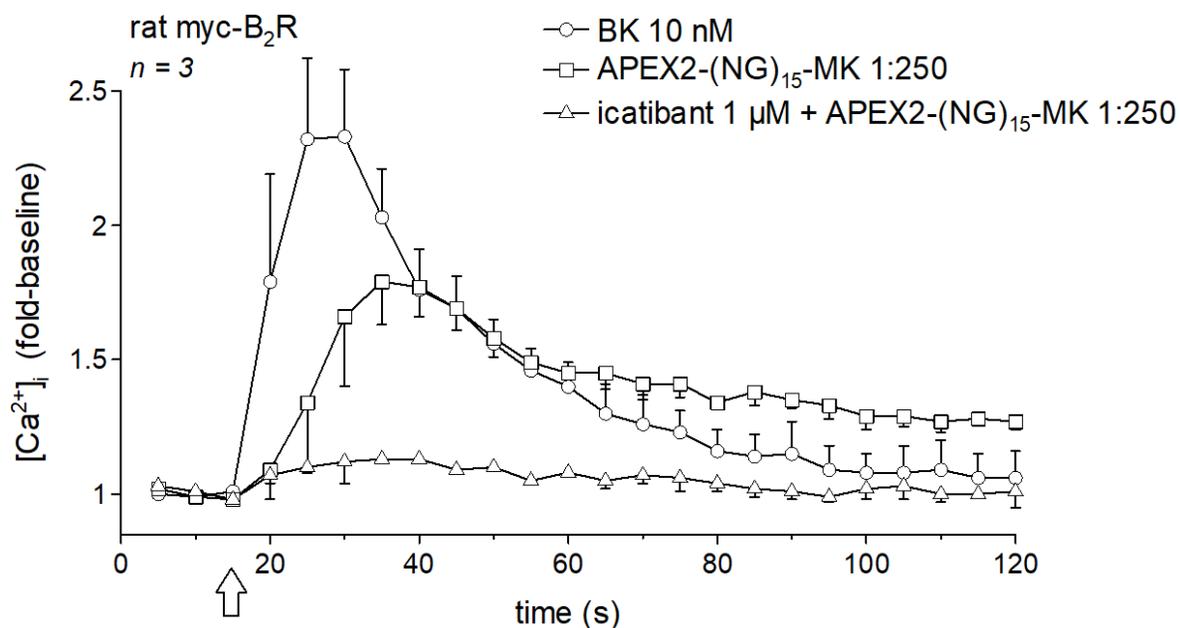


Figure 42. Mobilisation calcique induite par APEX2-(NG)₁₅-MK.

La stimulation de cellules HEK 293a rt myc-B₂R avec la BK ou APEX2-(NG)₁₅-MK a entraîné une mobilisation calcique significative. Un prétraitement avec l'icatibant a complètement inhibé la réponse induite par APEX2-(NG)₁₅-MK. Les résultats sont représentatifs de la moyenne de triplicatas pour chaque condition.

Effect of lysates (1:250) on recipient HEK 293a cells

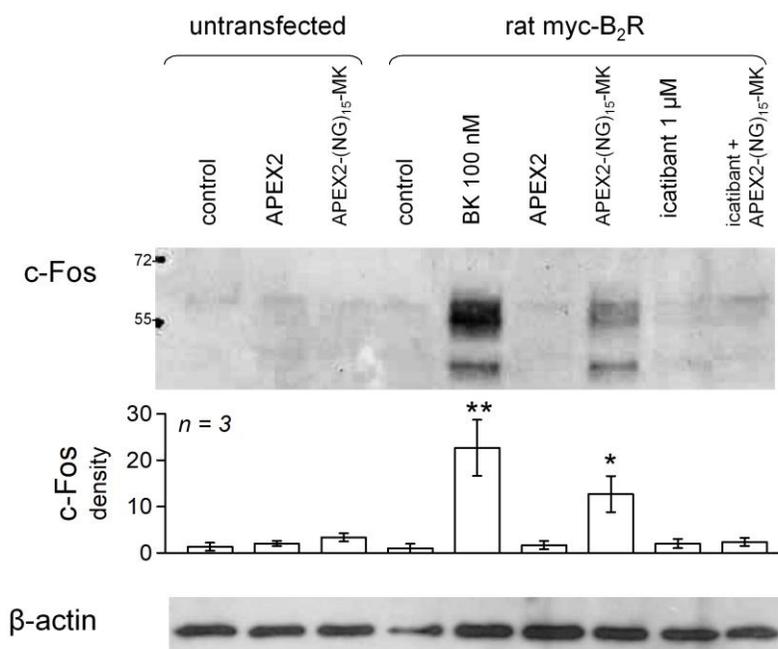


Figure 43. Immunobuvardage de l'accumulation de c-Fos dépendante de la stimulation du rt myc-B₂R par APEX2-(NG)₁₅-MK.

Accumulation de c-Fos suite au traitement de cellules non-transfectées ou exprimant stablement le rt myc B₂R avec la BK, APEX2 ou APEX2-(NG)₁₅-MK (traitement de 1 heure avec ou sans prétraitement avec l'icatibant; résultats présentés sous forme d'histogrammes générés à partir de la densité des bandes). Résultats représentatifs de 3 expériences. Une analyse de variance a indiqué que les valeurs de densité étaient hétérogènes ($P < 10^{-4}$). Les valeurs diffèrent des contrôles non transfectés selon le test de Dunnett : * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

Cela démontre que l'activité pharmacologique d'APEX2-(NG)₁₅-MK lui est conférée par son domaine C-terminal contenant la séquence complète de la BK. L'immunobuvardage de la β -actine est venu confirmer qu'une quantité égale de protéine avait été migrée sur le gel.

2.8.2 Détection du rt myc-B₂R avec APEX2-(NG)₁₅-MK

Des cellules HEK 293a exprimant stablement les récepteurs hu ou rt myc-B₂ ou aucune de ces constructions ont été utilisées afin d'étudier le marquage espèce-dépendante par APEX2-(NG)₁₅-MK à l'aide du substrat des peroxydases TrueBlue™ (Fig. 44). L'expression des récepteurs avec l'épitope myc en position N-terminale a été confirmée à l'aide de l'anticorps anti-myc 4A6 et d'un anticorps secondaire anti-mouse IgG conjugué à la HRP.

Le traitement des cellules exprimant le récepteur de rat avec APEX2-(NG)₁₅-MK a produit un marquage intense de ces cellules alors que les cellules n'exprimant pas de récepteur ou exprimant le récepteur humain n'ont pas été colorées par ce traitement. Le prétraitement avec l'antagoniste icatibant a complètement bloqué la coloration des cellules HEK 293a rt myc-B₂R prouvant qu'APEX2-(NG)₁₅-MK permet la détection spécifique du B₂R.

Le protocole de détection basé sur le luminol a par la suite été appliqué aux trois mêmes lignées cellulaires afin de quantifier la liaison d'APEX2-(NG)₁₅-MK à son récepteur (Fig. 45). Après 30 minutes d'incubation avec la protéine de fusion, les cellules ont été incubées avec une solution de luminol, puis analysées avec un lecteur de plaque. L'incubation avec APEX2-(NG)₁₅-MK a résulté en une luminescence supérieure à celle des cellules non-traitées chez les trois lignées cellulaires. Toutefois, les cellules exprimant le rt myc-B₂R avaient un signal de très forte intensité et ce signal était réduit de manière significative par un co-traitement avec l'icatibant. L'icatibant n'a pas réduit la luminescence associée avec APEX2-(NG)₁₅-MK chez les cellules contrôles ou chez celles exprimant le récepteur hu myc-B₂ démontrant que ce signal correspond à une liaison non spécifique de la protéine de fusion.

Le protocole de détection alternatif basé sur l'oxydation du TMB a par la suite été appliqué sur des cellules HEK 293a ainsi que sur des cellules HEK 293a exprimant stablement les récepteurs hu ou rt myc-B₂ (Fig. 46A). Les cellules HEK 293a rt myc-B₂R, lorsque traitées avec APEX2-(NG)₁₅-MK, étaient associées avec un signal significativement supérieur à

celui des cellules non-traitées. De plus, un co-traitement avec l'icatibant a complètement inhibé le signal dépendant de la protéine de fusion en le ramenant au niveau des cellules non-traitées. La détection colorimétrique avec APEX2-(NG)₁₅-MK n'a pas généré de signal au-dessus de celui des cellules non traitées chez les cellules contrôles ou chez celles exprimant le hu myc-B₂R. L'absence de signal non spécifique dans la détection d'APEX2-(NG)₁₅-MK avec le TMB a rendu possible une expérience dans laquelle APEX2-(NG)₁₅-MK serait utilisée comme ligand non-isotopique capable de déterminer l'affinité d'autres ligands dans un essai de compétition effectué sur des cellules HEK 293a rt myc-B₂R (Fig. 46B). Pour ce faire, ces cellules ont été incubées avec une concentration fixe d'APEX2-(NG)₁₅-MK et des concentrations croissantes du ligand à l'étude, dans ce cas-ci l'icatibant ou la MK. Cette expérience a démontré que l'icatibant a une affinité 30x supérieure à celle de la MK mettant ainsi en évidence le potentiel de ce système pour la caractérisation de nouveaux ligands de ce récepteur.

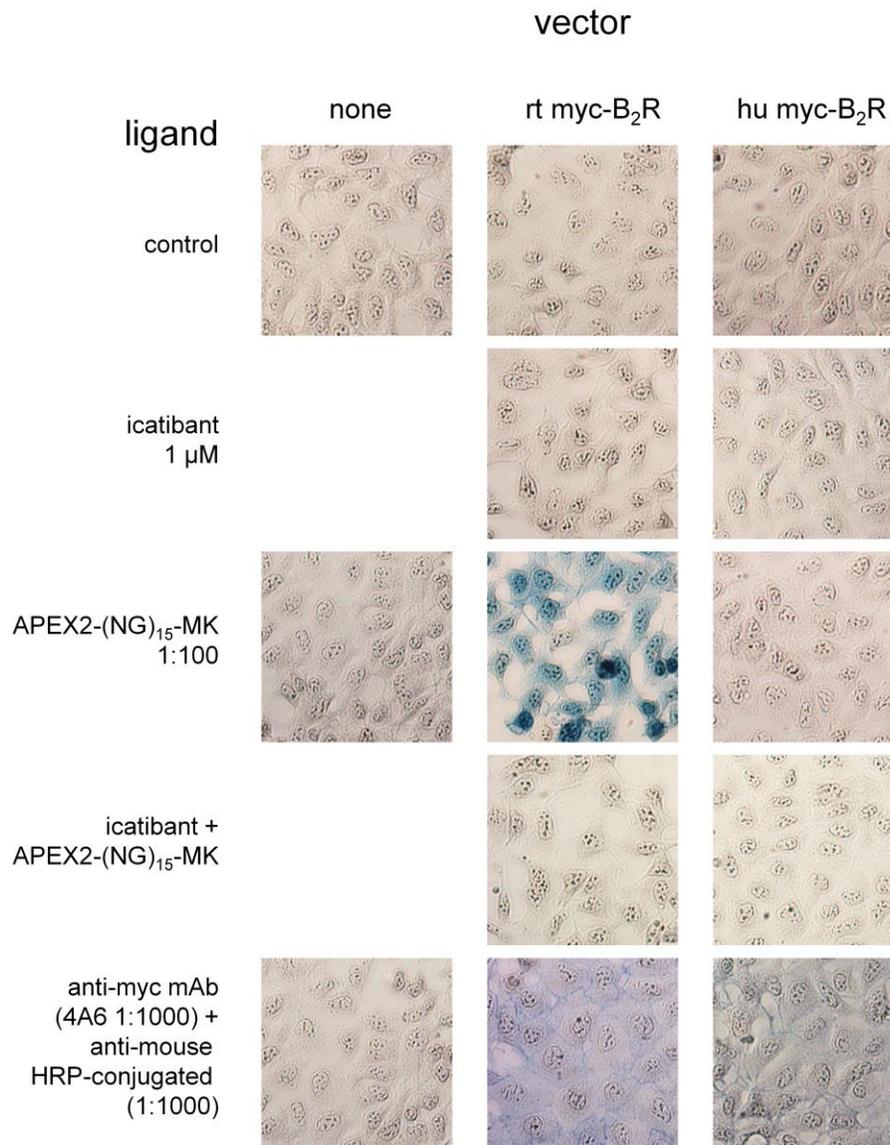


Figure 44. Marquage par le TrueBlue™ suite à la stimulation avec APEX2-(NG)₁₅-MK. Des cellules (non-transfectées, rt myc-B₂R ou hu myc-B₂R) ont été stimulées avec APEX2-(NG)₁₅-MK (30 minutes, 37 °C avec traitement optionnel d'icatibant) puis incubées 10 minutes à température pièce avec le réactif TrueBlue™. L'expression des récepteurs avec un épitope myc en position N-terminale a été validée par les anticorps anti-myc et anti IgG de souris conjugué à la HRP. Les cellules ont été observées en transmission (magnification originale 100x).

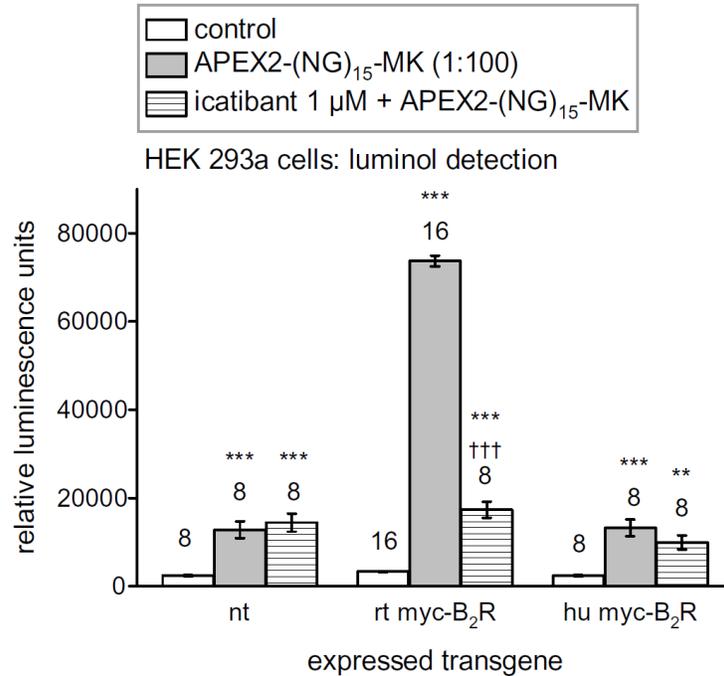


Figure 45. Détection par luminescence de l'activité peroxydase d'APEX2-(NG)₁₅-MK liée à son récepteur.

Des cellules HEK 293a non transfectées ou exprimant une des deux constructions myc-B₂R (hu ou rt) ont été stimulées 30 minutes avec APEX2-(NG)₁₅-MK à 37 °C. Certaines cellules avaient été prétraitées avec 1 μM d'icatibant. Après cette stimulation, les cellules ont été rincées et incubées avec un réactif à base de luminol. Une analyse de variance a révélé que les valeurs étaient hétérogènes pour chaque lignée cellulaire ($P < 10^{-4}$). Le test de comparaisons multiples de Tukey a ensuite été appliqué pour chaque paire de valeurs. Pour chaque lignée cellulaire, valeur vs. leur contrôle respectif : *** $P < 0,01$; effet d'un co-traitement avec l'icatibant : ††† $P < 0,001$. Le nombre de répliques est indiqué au-dessus de chaque barre de l'histogramme.

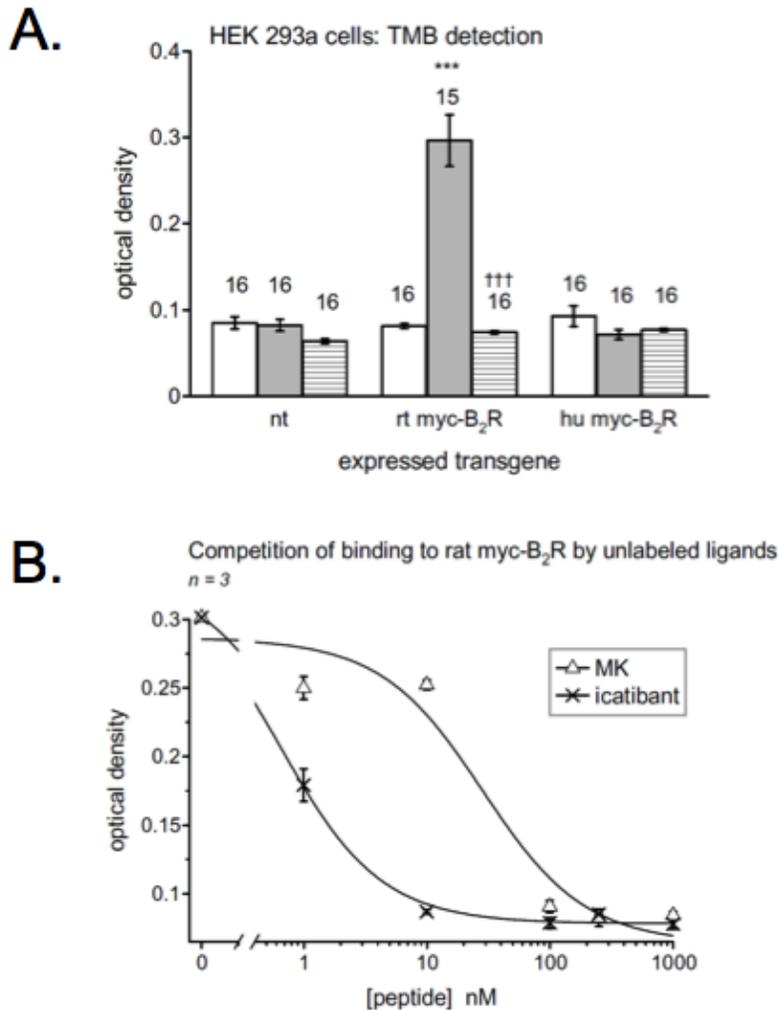


Figure 46. Détection colorimétrique (TMB) de l'activité peroxydase d'APEX2-(NG)₁₅-MK liée à son récepteur.

(A) Le même protocole qu'à la figure 45 a été appliqué, à la différence que les cellules ont été incubées 30 minutes à température pièce avec une solution de TMB après la stimulation avec APEX2-(NG)₁₅-MK. Une analyse de variance a révélé que les valeurs étaient hétérogènes pour chaque lignées cellulaire ($P < 10^{-4}$). Le test de comparaisons multiples de Tukey a ensuite été appliqué pour chaque paire de valeurs. Pour chaque lignée cellulaire, APEX2-(NG)₁₅-MK vs. contrôle: *** $P < 0,01$; effet d'un co-traitement avec l'icatibant : ††† $P < 0,001$. (B) Utilisation d'APEX2-(NG)₁₅-MK comme ligand non-isotopique pour déterminer l'affinité de ligands non-marqués avec une détection finale basée sur une solution de TMB comme en A.

2.9 Génération et évaluation de protéines de fusion de haut poids moléculaire basées sur la HSA

La génération de protéine de fusion HSA offre en théorie de nombreux avantages thérapeutiques. Tout d'abord, il s'agit d'une protéine de haut poids moléculaire (≈ 66 kDa) sans activité pharmacologique et qui est abondante dans le plasma. Le haut poids moléculaire de cette protéine de fusion peut être d'un grand intérêt puisque qu'elle empêcherait le ligand de quitter la circulation sanguine en évitant les filtrations glomérulaires et capillaires. De plus, la HSA ayant une longue demi-vie dans le plasma, c'est une bonne stratégie pour prolonger la demi-vie d'une drogue. On retrouve dans la littérature des protéines de fusion basées sur la HSA avec des visées thérapeutiques (Bao et al., 2011 ; Smith et al., 2016). Plusieurs protéines de fusion HSA avec des domaines C-terminaux contenant la BK ont été générées et évaluées pour leur capacité à activer le B₂R.

2.9.1 Relation structure activité des analogues de la BK prolongés en position N-terminale

La génération de protéines de fusion ligands du récepteur B₁ de la BK a démontré que la séquence du *spacer* reliant le ligand au domaine fonctionnel était de la plus haute importance pour l'affinité de la protéine de fusion résultante (Charest-Morin et Marceau, 2016). Afin de déterminer une combinaison *spacer*-agoniste optimale, certaines de ces combinaisons ont été testées dans un essai de compétition *vs.* les récepteurs hu myc-B₂ ou rt myc-B₂ (Fig. 47). Les combinaisons *spacer*-agoniste testées sont toutes composées d'un *spacer* relativement hydrophile prolongé en position N-terminale par la séquence intacte de la BK. La MK contient un tel *spacer* sélectionné naturellement. Ile-Ser-BK, une séquence retrouvée dans le T-kininogène des rongeurs, a été rapporté comme étant un agoniste de haute affinité du récepteur B₂ de rat (David et Burguess, 2002). Le dipeptide Ile-Ser a été inséré entre le domaine hydrophile de la MK et la BK, une position possiblement cruciale située à l'interface du fluide extracellulaire et du récepteur. Le peptide résultant a été nommé MISI (*MK with Ile-Ser insert*). La troisième combinaison est inspirée du dimère Asn-Gly répété 5 fois (NG)₅ récemment utilisé avec succès dans une construction fluorescente agoniste du récepteur B₁ de la BK. La combinaison *spacer*-agoniste utilisée dans cette construction a été adaptée au récepteur B₂ pour obtenir (NG)₅-BK au lieu de (NG)₅-Lys-desArg⁹-BK.

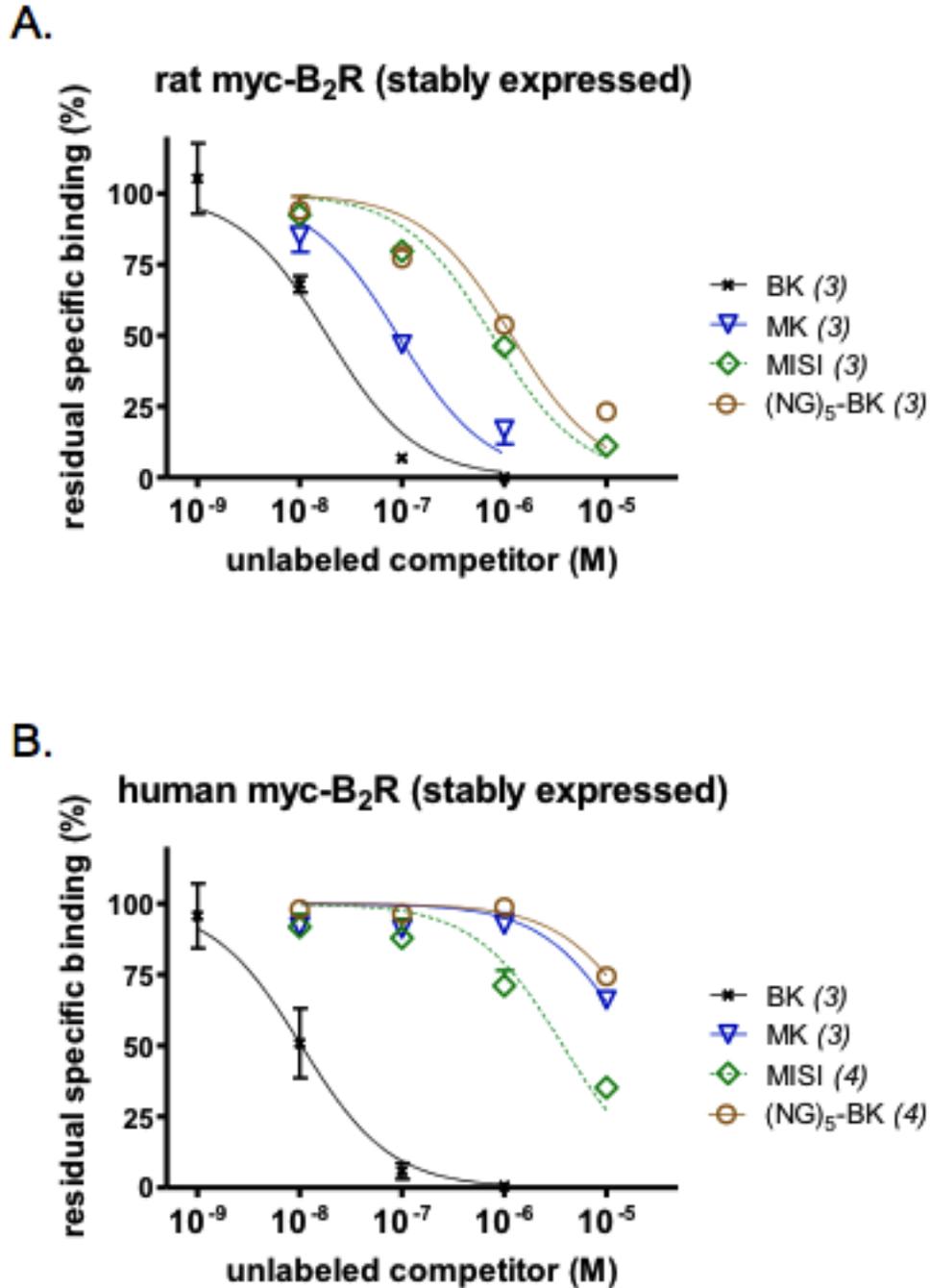


Figure 47. Évaluation de l'affinité des nouveaux peptides analogues de la BK prolongés en position N-terminale.

Essai de compétition de la liaison de la BK tritiée (3 nM) au récepteur myc-B₂R de rat (A) ou humain (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et représentent la moyenne \pm l'écart type du nombre de répliques indiqué entre parenthèses. Les valeurs estimées de l'affinité de ces peptides sont rapportées dans le texte.

Au niveau du récepteur rt myc-B₂, la MK a déplacé la BK tritiée avec une puissance 4,9 fois inférieure à celle de la BK (IC₅₀ pour la BK et la MK respectivement : 18,6 nM et 91,8 nM) alors que les autres ligands putatifs de ce récepteur n'étaient pas caractérisés par une forte affinité (IC₅₀ pour MISI et (NG)₅-BK : 767 nM et 1183 nM ; Fig. 47A). En effet, il s'agit d'une perte de puissance de 41 fois pour MISI et de 63 fois pour (NG)₅-BK comparativement à la BK. Au niveau du récepteur humain, des expériences précédentes avaient suggérées que les kinines prolongées en position N-terminale avaient peu d'affinité pour ce récepteur. Cela a été confirmé de nouveau par un essai de compétition sur le récepteur hu myc-B₂ qui a révélé que tous les peptides prolongés en position N-terminale avaient un IC₅₀ supérieur à 2,5 µM dans cet essai ; c'est à dire qu'elles avaient toutes une très faible affinité pour ce récepteur (fig. 47B).

2.9.2 Production, purification et caractérisation pharmacologique des protéines de fusion HSA sécrétées

L'homogénéité et l'intégrité des protéines de fusion HSA sécrétées ont été validées par une expérience d'immunobuvardage avec des anticorps anti-HSA, anti-BK et anti-FLAG (Fig. 48). L'ensemble des constructions HSA (HSA native, HSA-MK, HSA-MISI, HSA-(NG)₅-BK, HSA-(NG)₃₀-MK, HSA-(NG)₄₅-MK et HSA-(NG)₆₀-MK) a été détecté dans le milieu conditionné des cellules productrices tant par l'anticorps anti-HSA que l'anticorps anti-BK (à l'exception de HSA native). La détection de la BK en position C-terminale de ces constructions suggère l'intégrité de ce domaine, puisque cet anticorps ne reconnaît pas les métabolites de la BK comme des-Arg⁹-BK. L'intégrité du domaine BK est une information très intéressante, puisque la fusion avec la HSA semble conférer une forte résistance aux peptidases à un peptide qui autrement est dégradé extrêmement rapidement dans le milieu de culture. Les combinaisons *spacer*-agoniste fusionnées à l'extrémité C-terminale de la HSA ont entraîné une migration différentielle conséquente avec la taille de la dite extension. De plus, les trois constructions HSA-(NG)_x-MK ont été détectées avec l'anticorps monoclonal anti-FLAG.

Comme mentionné dans la section Méthodes, les protéines de fusion HSA ont toutes été purifiées avec la colonne Mimetic Blue®. En effet, ces colonnes ont permis de concentrer et de purifier les protéines de fusion HSA sécrétées de manière efficace (Fig. 49 et 50). Ces

immunobuvardages ont montrées que le *flow through* (le milieu conditionné passé à travers la colonne et qui n'a pas lié la résine) contenait nettement moins de protéines apparentées à la HSA que le milieu conditionné initial. De plus, le premier éluat (1 à 5 ml) était fortement enrichi en protéine de fusion HSA et la protéine présente dans cet éluat était immunoréactive avec les anticorps appropriés (anti-HSA, anti-BK et optionnellement anti-FLAG).

Après la purification, les différentes protéines de fusion HSA ont été dosées à l'aide d'un ELISA anti-HSA. Cet ELISA a dévoilé que les éluats obtenus à l'étape précédente contenaient les protéines de fusion à des concentrations variant entre 5 et 20 μM .

Les différentes protéines de fusion HSA sécrétées ont par la suite été testées dans un essai de mobilisation calcique afin d'évaluer leur activité agoniste sur le rt myc-B₂R. Toutes les constructions, utilisées à des concentrations variant de 50 à 600 nM, ont échoué à entraîner une mobilisation calcique significative dans ces cellules, alors que la BK et la MK ont généré une mobilisation calcique intense et reproductible à seulement 10 nM (Fig. 51A et B).

2.9.3 Production, purification et caractérisation de la forme cytosolique de HSA-MK

Une hypothèse pour expliquer l'échec des différentes constructions HSA sécrétées à stimuler le récepteur rt myc-B₂ était que la structure globulaire de la HSA interférait avec la liaison au récepteur. Afin de valider cette hypothèse, une forme cytosolique de la HSA-MK, cyto HSA-MK a été produite et caractérisée pharmacologiquement. La logique derrière ce raisonnement est que la HSA contient 17 ponts disulfures absolument nécessaires pour adopter la conformation requise pour son activité et lier ses ligands (Sugio et al., 1999). Des ponts disulfures stables se forment très rarement dans l'environnement réducteur qu'est le cytoplasme (Woycechowsky et Raines, 2000 ; Cumming et al., 2004). De plus, les protéines sécrétées circulent par le réticulum endoplasmique, endroit où les ponts disulfures sont généralement formés. Donc, la forme cytosolique de la HSA-MK aura la même séquence que HSA-MK, mais n'aura pas la même structure globulaire que celle-ci.

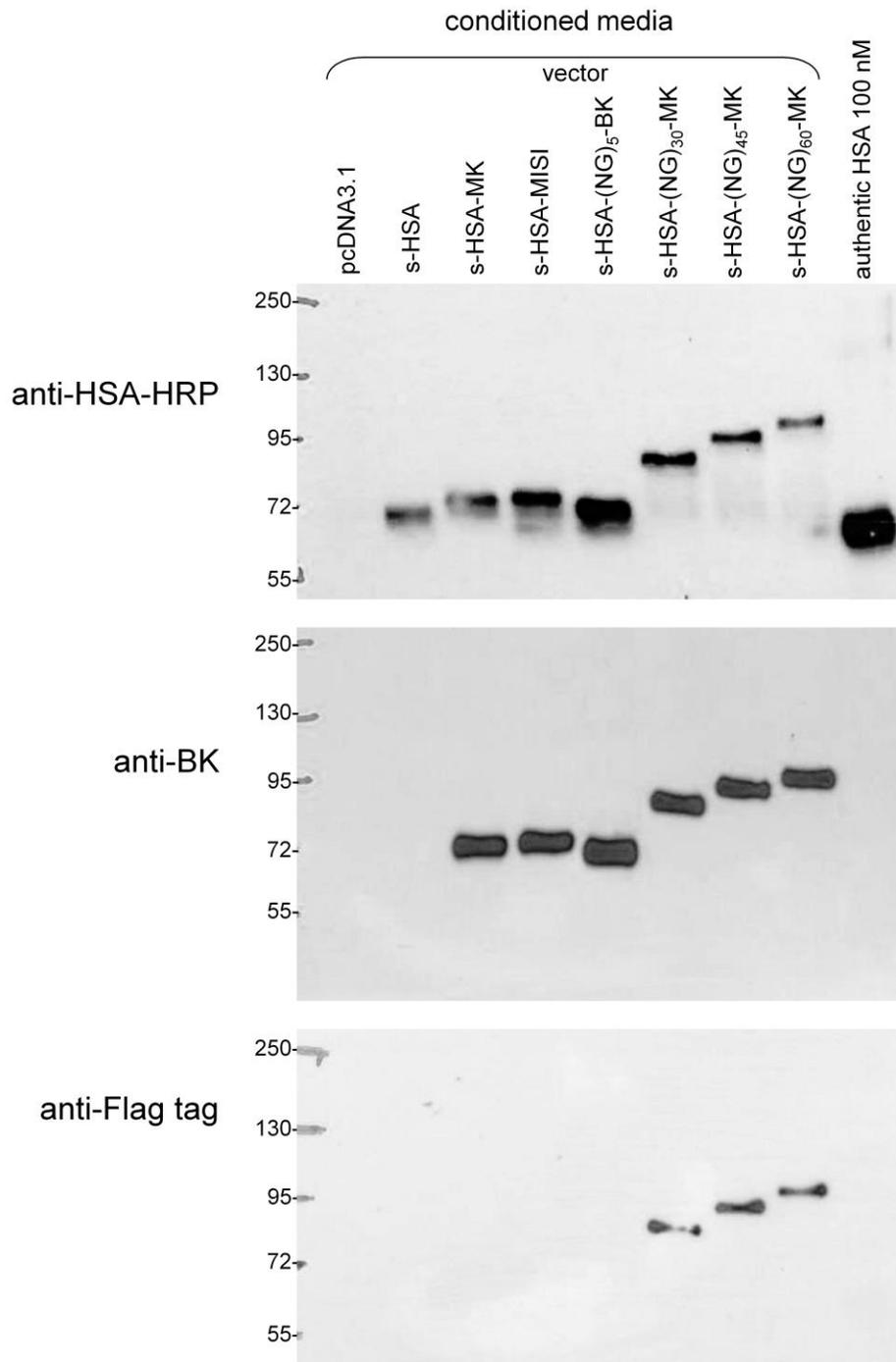


Figure 48. Immunobuvardage des milieux conditionnés contenant des protéines de fusion HSA sécrétées.

Pour cette expérience, 10 μ L de milieu conditionné (avant la purification) ou un volume équivalent d'une solution contenant la HSA authentique ont été migrés sur des gels faits de 7% de polyacrylamide. Pour chaque protéine de fusion, la bande observée est plus lourde que celle de la HSA authentique et ce de manière cohérente avec l'extension C-terminale des protéines de fusion.

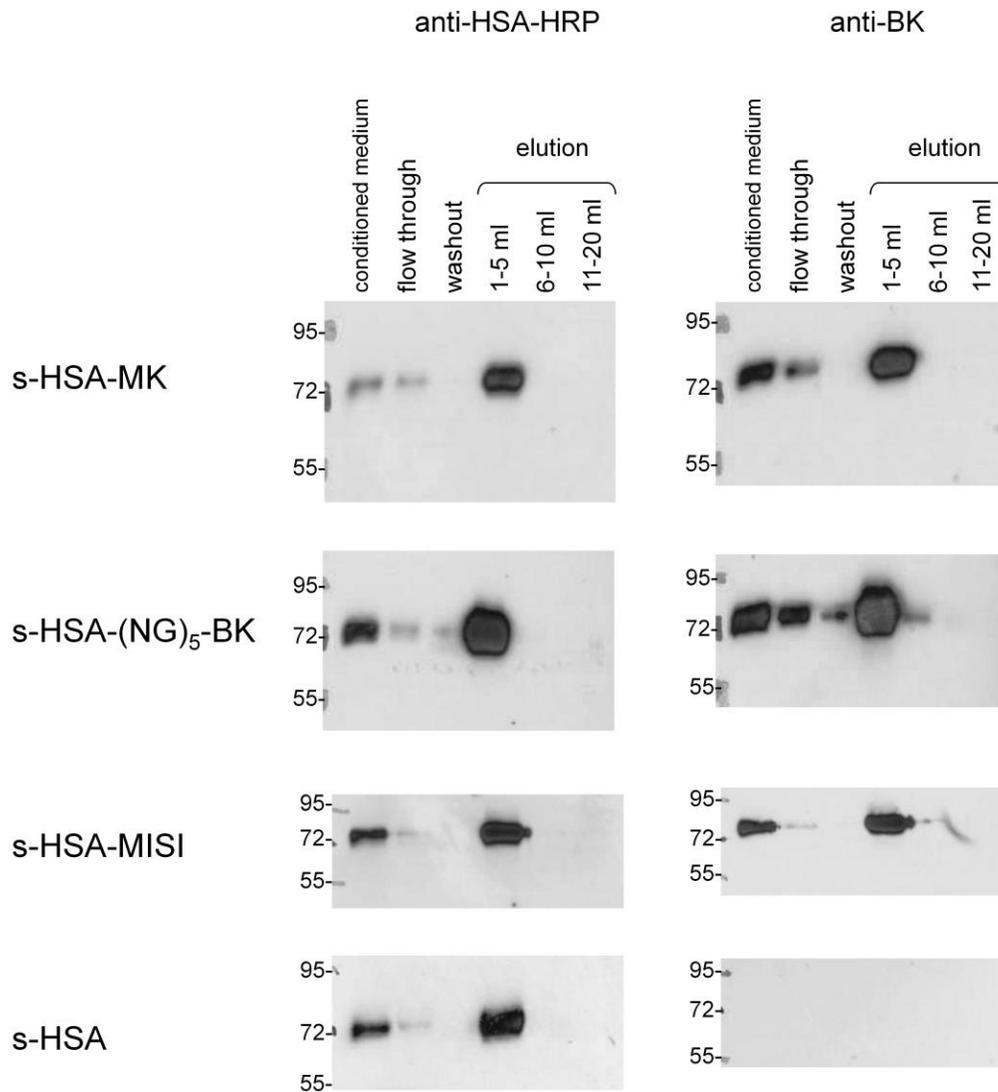


Figure 49. Purification et concentration des protéines de fusion HSA sécrétées (1^{ère} partie). Les protéines de fusion ont toutes été purifiées et concentrées à partir des milieux conditionnés obtenus à partir des cellules productrices transfectées, à l'aide des colonnes Mimetic Blue®. Les protéines de fusion ont toutes été récoltées dans la première fraction d'éluion avec l'octanoate de sodium.

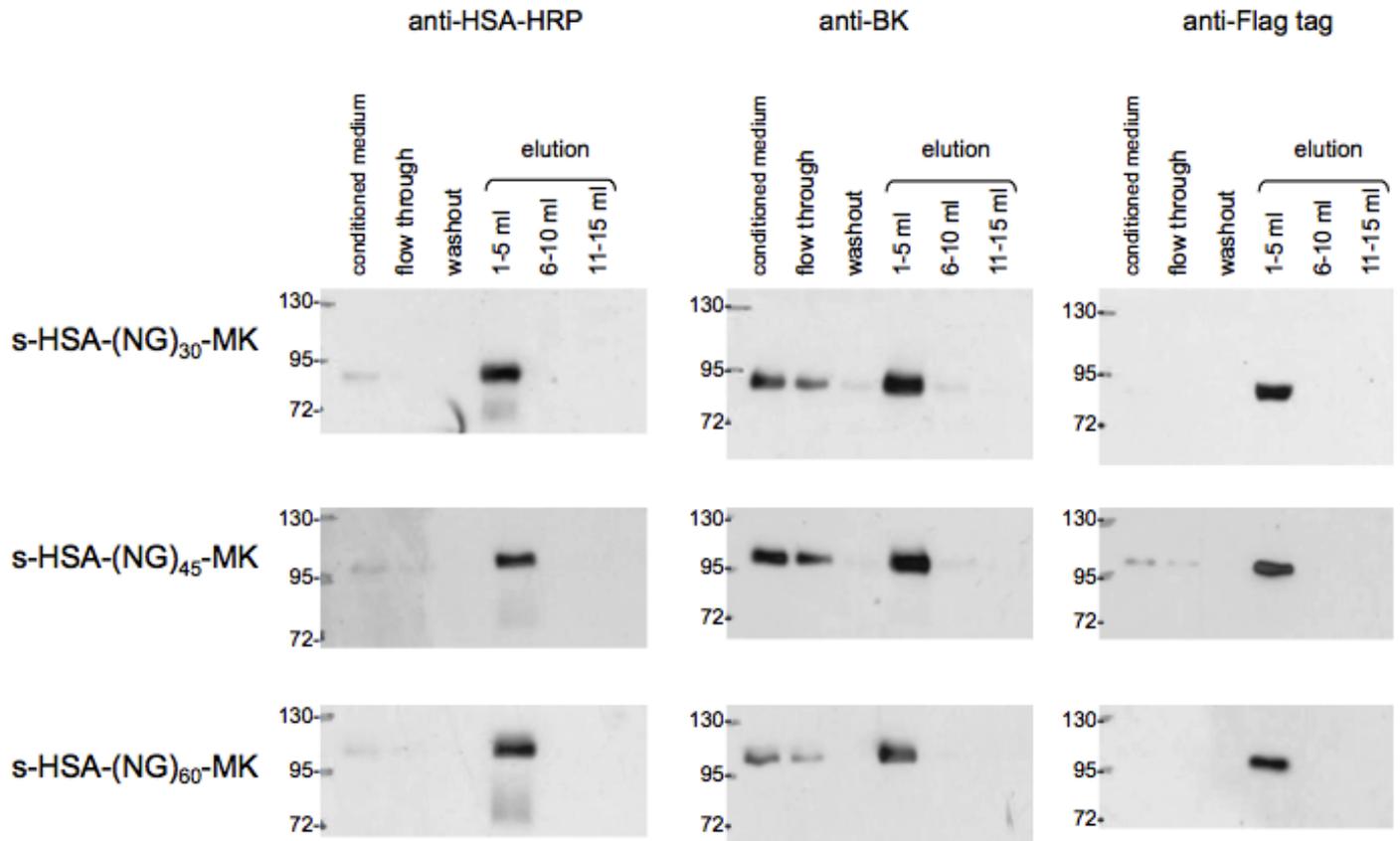


Figure 50. Purification et concentration des protéines de fusion HSA sécrétées (2^{ème} partie). Les protéines de fusion ont toutes été purifiées et concentrées à partir des milieux conditionnés obtenus à partir des cellules productrices transfectées, à l'aide des colonnes Mimetic Blue®. Les protéines de fusion ont toutes été récoltées dans la première fraction d'éluion avec l'octanoate de sodium.

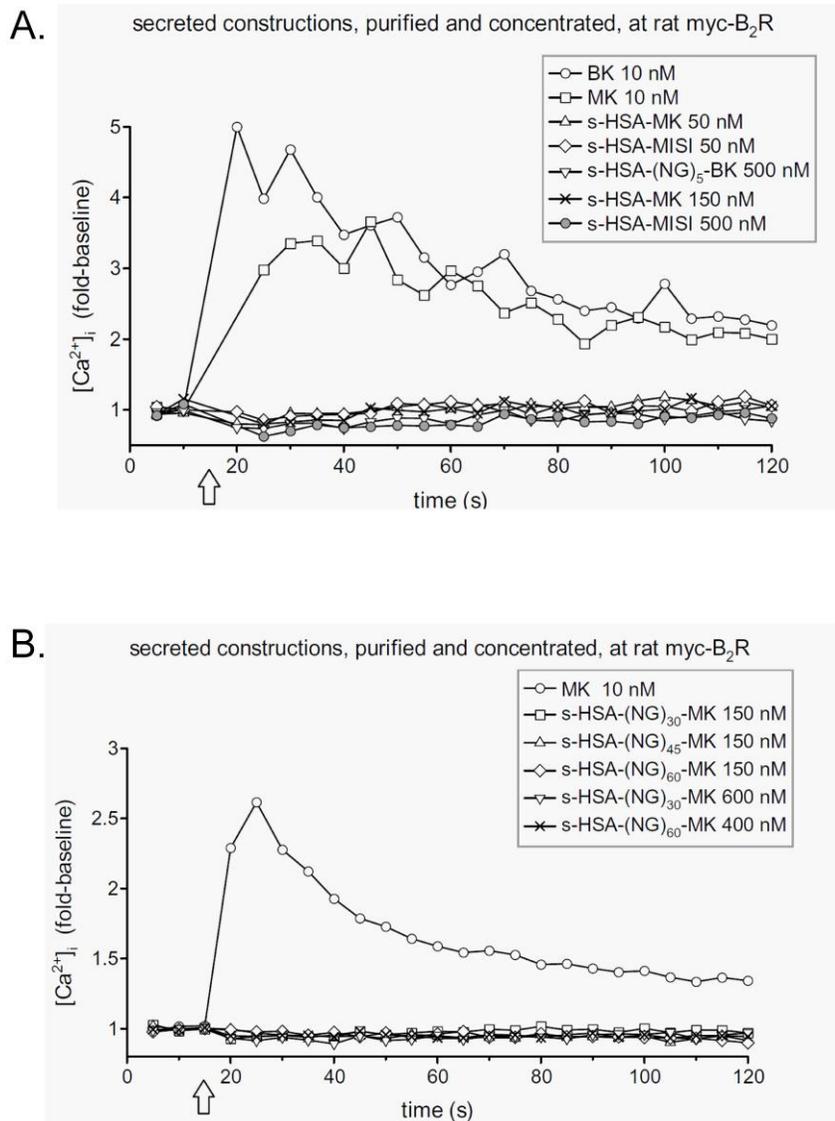
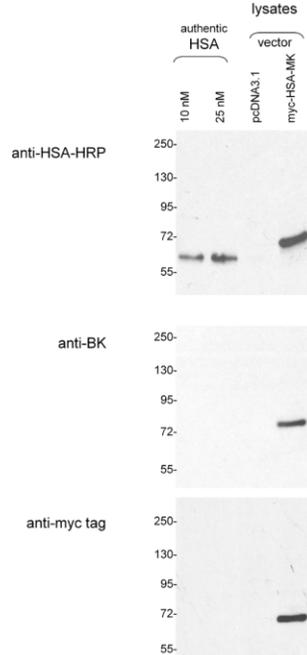


Figure 51. Essai de mobilisation calcique avec les protéines de fusion HSA sécrétées. Absence de signalisation calcique suite à la stimulation de cellules rt myc-B₂R avec les différentes protéines de fusion sécrétées. La concentration protéique des constructions HSA a été déterminée par un ELISA anti-HSA (la concentration finale dans l'essai est celle indiquée à droite). Les cellules répondaient de manière intense et répétée à la BK et/ou la MK.

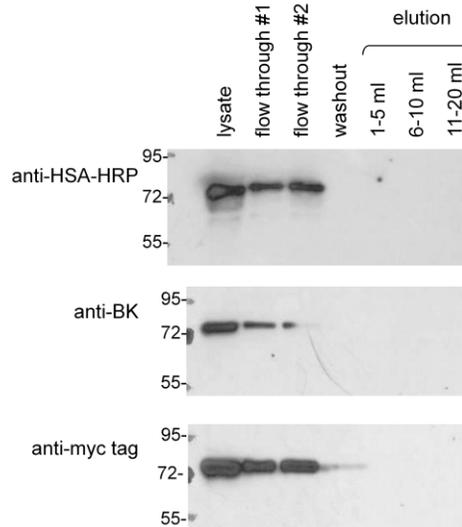
En premier lieu, l'identité de la protéine cyto myc-HSA-MK a été confirmée par un immunobuvardage (Fig. 52A). En effet, celui-ci a révélé que la protéine de fusion accumulée dans le cytosol des cellules productrices contenait la séquence de la HSA, un épitope myc en position N-terminale et un domaine BK en position C-terminale prouvant ainsi l'intégrité de cyto myc-HSA-MK. Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle, une protéine de fusion HSA produite dans le cytosol serait dénaturée, une tentative de purification avec la colonne Mimetic Blue® a été effectuée (Fig. 52B). En effet, puisque les ponts disulfures ne se sont pas formés correctement, la pochette de liaison pour l'interaction avec la résine de ces colonnes ne devrait pas être présente sur la protéine de fusion cyto myc-HSA-MK. L'immunobuvardage utilisé pour valider l'étape de purification a révélé que cyto myc-HSA-MK ne liait pas du tout la colonne Mimetic Blue®. En effet, on retrouve presque autant de cette protéine de fusion dans le *flow through* que dans le lysat initial et l'élution avec l'octanoate de sodium ne permet pas de récupérer le peu de cyto myc-HSA-MK manquant. Il est fort probable que cette différence se retrouve dans le liquide de rinçage (*wash out*) ou qu'elle provient de l'interaction de la protéine de fusion avec les surfaces de plastiques présentes dans cette expérience.

La protéine de fusion cyto myc-HSA-MK a généré une mobilisation calcique significative chez les cellules exprimant stablement le récepteur rt myc-B₂ (Fig. 52C). Cette mobilisation calcique par cyto myc-HSA-MK était spécifique, puisqu'un co-traitement avec l'antagoniste non peptidique anatibant a extensivement inhibé celle-ci. De plus, une stimulation des cellules HEK 293a rt myc-B₂R avec le lysat de cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA3.1 n'a pas causé de mobilisation calcique significative, excluant ainsi que la mobilisation puisse dépendre de quelconques protéines, peptides ou ions présents dans le cytosol des cellules productrices. Cet effet agoniste dérive donc hors de tout doute du domaine C-terminal de cyto myc-HSA-MK. Cela laisse croire que l'hypothèse selon laquelle les domaines BK et MK des protéines de fusion HSA sécrétées étaient incapables de lier le récepteur de par l'encombrement stérique causé par la structure globulaire de la HSA était valide.

A. myc-HSA-MK in lysates



B. Attempted purification of myc-HSA-MK



C.

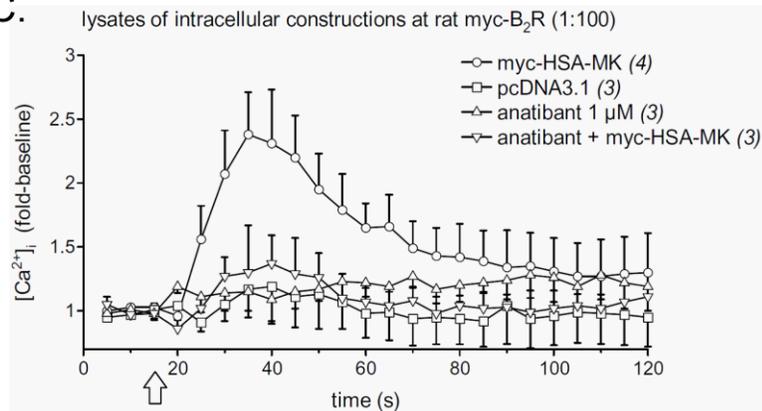


Figure 52. Production, purification et évaluation de l'activité pharmacologique de la forme cytosolique de myc-HSA-MK.

(A) Validation de l'identité de la protéine de fusion avec un immunobuvardage réalisé avec des anticorps anti-HSA, anti-BK et anti-myc. Un volume égal d'une solution de HSA authentique a été migré afin de pouvoir estimer la concentration de la protéine de fusion. (B) Tentative de purification de la protéine de fusion cytosolique myc-HSA-MK afin de valider l'hypothèse selon laquelle celle-ci serait dénaturée de par sa localisation cytoplasmique. (C) Évaluation de l'activité pharmacologique de cette protéine de fusion par un essai de mobilisation calcique performé sur des cellules HEK 293a rt myc-B₂R. La forme cytosolique de myc-HSA-MK stimule spécifiquement ces cellules. Le nombre de répliques est indiqué entre parenthèses.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux présentés plus haut ont permis d'approfondir de manière significative les connaissances relatives à la production et à la caractérisation de ligands biotechnologiques pour les récepteurs couplés aux protéines G. Des ligands liant des récepteurs appartenant à deux classes de GPCRs différentes ont été étudiés en profondeur et leur fusion à diverses protéines avec des domaines fonctionnels a permis de conférer de nouvelles propriétés très intéressantes à ces nouvelles protéines de fusion.

1. Protéines de fusion ligand du récepteur PTH₁ de la parathormone

Il a été démontré dans le passé que la parathormone pouvait être prolongée en position N-terminale sans perdre sa capacité de liaison au récepteur PTH₁ (Fortin et al., 2011 ; Charest-Morin et al., 2013). Cela est conséquent avec le modèle de liaison *two-domain* proposé pour les récepteurs couplés aux protéines G de classe B dont fait partie le PTH₁R. Dans ce modèle, le récepteur possède un domaine extracellulaire impliqué dans la liaison de haute affinité du ligand et un domaine transmembranaire qui est requis pour l'activation du récepteur par son agoniste (Pal et al., 2012). Cela suggère que le domaine N-terminal de la PTH interagit avec le domaine extracellulaire du récepteur et que le domaine C-terminal du ligand va lier le domaine transmembranaire du PTH₁R ce qui va entraîner un changement de conformation menant à une réponse intracellulaire au stimulus extracellulaire. De plus des études sur la structure du PTH₁R lié à la PTH par cristallographie ont révélées que le domaine C-terminal de la PTH n'interagissait pas directement avec le récepteur (Pioszak et al., 2009). Cela vient appuyer le fait que la version courte de la PTH, PTH₁₋₃₄, lie le récepteur PTH₁ avec autant d'affinité que la version intacte PTH₁₋₈₄ (K_i de 4 nM pour PTH₁₋₃₄ vs. 2 nM pour PTH₁₋₈₄ dans un essai de compétition de liaison ; Eggenberger et al., 2016). Conséquemment, une protéine de fusion agoniste du PTH₁R a été précédemment rapportée dans la littérature. Il s'agit de la protéine de fusion PTH₁₋₃₄-EGFP, un agoniste fluorescent du récepteur PTH₁ (Charest-Morin et al., 2014). Cette protéine de fusion permettait de détecter les récepteurs PTH₁ recombinant exprimés de manière transitoire par les cellules HEK 293a tant en microscopie qu'en cytométrie de flux. Toutefois, cette

protéine de fusion était incapable de détecter les niveaux endogènes de PTH₁R exprimés par des lignées ostéoblastiques. De plus le marquage produit par PTH₁₋₃₄-EGFP était de très faible intensité et n'était que marginalement supérieur à la fluorescence intrinsèque des cellules. Malgré la faiblesse du signal associée à cette protéine de fusion, celle-ci a démontrée hors de doute la faisabilité de créer un ligand biotechnologique de haut poids moléculaire agoniste du PTH₁R.

En s'appuyant sur ces découvertes, il a été possible de générer trois nouvelles protéines de fusion agoniste du PTH₁R capable de détecter ce récepteur avec plus de sensibilité, et dans deux cas sur trois capable de détecter des populations endogènes de ce récepteur. En effet, les protéines de fusion PTH-APEX2 et PTH-HRP ont été produites et caractérisées. La protéine de fusion PTH-myc, codée par un vecteur disponible commercialement, a également été caractérisée, et ce pour la première fois. En premier lieu, l'expression, la sécrétion et la présence des divers domaines fonctionnels ont été validés par des expériences d'immunobuvardages. Ces expériences ont confirmées l'identité des différentes protéines de fusion ainsi que la sécrétion de celles-ci dans le milieu conditionné. Il a été rapporté que le peptide PTH₁₋₃₄ est rapidement dégradé en présence de sérum (Seibel et al., 1996), mais cela ne semble pas être le cas pour les trois protéines de fusion. En effet, les immunobuvardages ont révélés la présence de bandes homogènes pour PTH-myc et PTH-HRP alors que le milieu conditionné de PTH-APEX2 contenait certains produits de dégradation de cette protéine de fusion. Puisque les protéines de fusion s'accumulent dans le MC pendant plusieurs jours, cela vient suggérer que la fusion de l'hormone peptidique PTH à une protéine de haut poids moléculaire ou même à une courte séquence d'acides aminés vient protéger le peptide de la dégradation par les peptidases. De plus, le fait que l'ajout de deux épitopes en position N-terminale rend l'hormone résistante à la dégradation, corrobore l'idée que cette hormone est dégradée pas des peptidases agissant préférentiellement sur l'extrémité N-terminale de ce peptide (Hruska et al., 1977). Les différents MCs ont par la suite été dosés avec un ELISA anti-PTH et une observation attentive de l'expérience précédente révèle une légère contradiction entre les résultats de l'ELISA et ceux des immunobuvardages. Cela pourrait s'expliquer par l'hypothèse que l'ELISA détecte l'extrémité C-terminale de la séquence de la PTH ce qui pourrait mener à

une sous-estimation de la quantité réelle de protéine de fusion PTH dépendamment de la séquence fusionnée en position C-terminale.

Par la suite, le profil pharmacologique des trois nouvelles constructions a été étudié par immunobuvardage (c-Fos) et par ELISA (AMP_c). L'expérience d'immunobuvardage a permis de confirmer que les 3 constructions étaient capables d'induire l'accumulation du facteur de transcription c-Fos, et ce d'une manière dépendante de la présence du récepteur PTH₁. Cette expérience a démontré que les protéines de fusion ont conservé au moins une partie de l'activité pharmacologique de l'hormone peptidique. Ensuite, les deux constructions les plus prometteuses, PTH-myc et PTH-HRP, ont été étudiées dans un essai d'accumulation d'AMP_c afin de générer des courbes dose-réponse. Ces courbes permettent de comparer la puissance des protéines de fusion avec des agonistes de références (PTH₁₋₈₄ pour PTH-myc et PTH₁₋₃₄ pour PTH-HRP). Les courbes découlant de cet essai ont permis d'observer que PTH-myc n'avait subi qu'une mineure perte de puissance vs. PTH₁₋₈₄ alors qu'il semblerait que dans le même essai PTH-HRP aurait une puissance environ 5 fois supérieure à celle de PTH₁₋₃₄. En gardant en tête que les estimés de concentration effectués avec l'ELISA puissent être légèrement biaisés, la conclusion principale de cet essai est que les deux constructions évaluées pour leur capacité à induire la production d'AMP_c sont des agonistes avec des puissances relativement comparables à celle des agonistes endogènes du PTH₁R.

La protéine de fusion PTH-myc est capable de recruter des anticorps conjugués avec diverses molécules d'intérêt. Pour la vaste majorité des expériences l'anticorps anti-myc 4A6 a été utilisé afin de détecter l'épitope myc exprimé en position C-terminale de PTH-myc puisque l'internalisation de cet anticorps avait été précédemment rapportée. En effet, un article publié en 2011 a rapporté que cet anticorps avait été internalisé après avoir formé des complexes avec un récepteur myc-B₂ activé par un agoniste (Bawolak et al., 2011). De plus, un peptide synthétique analogue de la BK prolongé en N-terminal avec l'épitope myc avait aussi transporté l'anticorps anti-myc 4A6 fluorescent à l'intérieur de cellules exprimant le récepteur B₂, mais de façon peu efficace (Gera et al., 2013). Finalement, un agoniste du récepteur de chimiokine CCR₇ prolongé en position C-terminale avec l'épitope myc (CCL19-myc) avait lui aussi démontré qu'il était possible d'internaliser spécifiquement l'anticorps 4A6-AF488 lorsque celui-ci était complexé avec un agoniste

(Charest-Morin et al., 2013). L'épitope FLAG présent dans la construction PTH-myc n'a pas été utilisé puisque les anticorps anti-FLAG testés étaient à la fois moins sensibles et moins spécifiques dans les applications visées. Le complexe PTH-myc/4A6-AF488 supporte la détection des récepteurs PTH₁ recombinants tant en microscopie que par cytométrie en flux, mais ne semble pas être internalisé de manière significative par les cellules MG-63 exprimant une population endogène de PTH₁R. Toutefois, le complexe formé de PTH-myc et de l'anticorps 4A6 peut être internalisé par ces cellules, puis détecté par le système d'amplification TSA. Finalement, la protéine de fusion PTH-myc peut être utilisée afin de visualiser l'endocytose et la dégradation du ligand du PTH₁R en tirant parti de la colocalisation du ligand fluorescent avec divers marqueurs fluorescents des systèmes endosomaux ou lysosomaux.

La protéine de fusion PTH-myc a ensuite été utilisée pour sa capacité à recruter des anticorps conjugués avec la peroxydase HRP. Le complexe trimoléculaire PTH-myc/4A6/HRP, présentant un domaine peroxydase assemblé, a été comparé avec les protéines de fusion PTH-APEX2 et PTH-HRP présentant des domaines peroxydases intrinsèques. Ces trois constructions ont été évaluées pour leur capacité à détecter les récepteurs PTH₁ recombinants et endogènes à l'aide de divers substrats des peroxydases (TrueBlue™, TMB, luminol). Les trois protéines de fusion PTH ont détectées avec succès le récepteur PTH₁ recombinant exprimé par des cellules HEK 293a tant avec le TrueBlue™ qu'avec le luminol. La détection chimiluminescente offrait l'avantage d'être nettement plus quantitative et aussi plus sensible, car elle permettait de détecter les PTH₁Rs endogènes là où la détection avec le TrueBlue™ avait échoué. Plusieurs publications ont également rapportées que la détection chemiluminescente offrait une meilleure sensibilité que la détection colorimétrique (Zhang et al., 2012 ; Yu et al., 2011). En effet, la détection avec le TrueBlue™ ne permettait que de détecter les récepteurs recombinants, mais ne souffrait pas du fort signal non-spécifique présent dans la détection luminescente. La spécificité des différentes protéines de fusion a été démontrée à maintes reprises grâce à deux approches distinctes. La stimulation de cellules n'exprimant pas le récepteur PTH₁ (immunobuvardage c-Fos et détection enzymatique) ainsi que la compétition de la liaison des protéines de fusion par un excès de PTH₁₋₃₄ ont confirmé hors de doute que PTH-myc, PTH-APEX2 et PTH-HRP étaient des ligands spécifiques du PTH₁R.

Toutefois, une autre stratégie de détection colorimétrique basée sur le TMB offrait des avantages intéressants. Dans cette stratégie, l'oxydation du TMB ne résultait pas en un produit d'oxydation insoluble comme le TrueBlue™, mais plutôt un produit d'oxydation soluble coloré détectable avec un lecteur de plaque. Bien que cette stratégie nécessite une plus longue incubation et génère un signal de moindre intensité, elle offrait l'avantage de produire un signal essentiellement spécifique. En effet, la détection des PTH₁R endogènes par PTH-HRP avec cette stratégie, bien que significative, est de très faible intensité. Toutefois, la détection colorimétrique au TMB a permis de générer des courbes de compétitions avec PTH-HRP utilisée comme ligand non-isotopique. En effet, cette protéine de fusion peut être utilisée dans une procédure de *high throughput screening* efficace, sécuritaire et abordable afin d'identifier de nouveaux ligands du PTH₁R sans avoir à utiliser des radioligands moins sécuritaires et plus dispendieux.

Somme toute, il semblerait que PTH-HRP soit la protéine de fusion PTH avec le plus grand potentiel pour la détection du récepteur PTH₁. Les expériences conduites ont démontrées que PTH-myc est associée à un signal spécifique plutôt intense, probablement parce que l'assemblage du domaine peroxydase requiert un co-traitement avec deux anticorps. De plus, la protéine de fusion PTH-myc a démontré une activité pharmacologique plus faible que PTH-HRP dans l'essai de génération d'AMP_c. Il a aussi été démontré que PTH-HRP était nettement supérieure à la protéine de fusion PTH-APEX2, et ce dans toutes les différentes applications. En effet, PTH-APEX2 est inférieure à PTH-HRP tant dans l'intensité du signal, dans le rapport signal-bruit ainsi que dans la spécificité du signal. Par surcroît, PTH-APEX2 a été incapable de détecter le récepteur PTH₁ endogène, et ce avec l'ensemble des différentes méthodes de détection. La supériorité de PTH-HRP peut s'expliquer par le fait qu'APEX2 est une peroxydase génétiquement modifiée conçue pour être active dans les conditions réductrices du cytosol ce qui la rend moins compatible avec l'environnement extracellulaire plus oxydant (Lam et al., 2015). En effet, APEX2 a été générée afin de suppléer à la HRP dans le compartiment intracellulaire, puisque celle-ci y est inactive. L'activité de la HRP dépend de sa structure, qui comprend de nombreux ponts disulfures en plus de nécessiter du calcium pour l'assemblage correct de cette peroxydase. Le compartiment intracellulaire, étant réducteur et pauvre en calcium, ne permet pas la synthèse correcte de la HRP, mais convient parfaitement à la peroxydase APEX2. Au

surplus, APEX2 est une enzyme qui est nettement plus susceptible que la HRP à l'auto-inhibition irréversible découlant de son activité enzymatique oxydante (Lam et al., 2015). En effet, dans des conditions standards, l'enzyme APEX2 peut catalyser entre 3000 et 4000 réactions avant d'être inactivée de façon définitive alors que la peroxydase HRP peut catalyser plus de 130 000 réactions dans les mêmes conditions. Cette différence majeure entre les deux enzymes peut s'expliquer, entre autre, par l'absence chez APEX2 du domaine catalase présent dans HRP ce qui protège cette enzyme de ses produits de réaction (Lam et al., 2015).

La protéine de fusion PTH-HRP a permis de détecter le récepteur PTH₁ exprimé de façon endogène par les cellules HOS, et ce de trois manières différentes (luminol, TMB, SA-QDots). Cette protéine de fusion est donc une sonde nettement plus sensible que la construction PTH-EGFP rapportée précédemment (Charest-Morin et al., 2013). La détection de populations de PTH₁Rs endogènes par la protéine de fusion PTH-HRP pourrait avoir des applications diagnostiques dans certaines conditions. Par exemple, PTH-HRP pourrait être utilisé pour confirmer le diagnostic de la manière fonctionnelle de la forme 1b du pseudohypoparathyroïdisme qui est caractérisée par une mutation dans le PTH₁R (R186H) entraînant une perte d'affinité significative du récepteur pour son ligand (Guerreiro et al., 2016). Une autre application intéressante serait d'utiliser les récepteurs PTH₁ pour identifier des sous-populations de cellules dans des tissus. Il a été récemment rapporté que le récepteur PTH₁ était exprimé dans les cellules satellites du muscle squelettique et que ce récepteur était un biomarqueur spécifique de ce type cellulaire dans ce tissu (Kimura and Yoshioka, 2014). La protéine PTH-HRP pourrait aussi avoir une application thérapeutique directe : un co-traitement avec l'acide indole 3-acétique (*indole-3 acetic acid* ; IAA). L'IAA est un puissant régulateur de la croissance des végétaux impliqué dans la régulation de la division cellulaire et la différenciation. Toutefois, lorsque qu'incubé avec une peroxydase l'IAA va subir une décarboxylation oxydative qui va mener à la formation de la molécule réactive 3-méthylène-2-oxindole qui peut se lier de façon covalente à l'ADN et aux thiols présents dans la cellule (Folkes et Wardman, 2001). Le traitement de cellules humaines avec l'IAA seul ou avec la HRP seule n'entraîne pas de cytotoxicité (Gazaryan et al., 1996 ; Wardman et al., 2002). Il a été démontré qu'un traitement combiné d'IAA et de peroxydase pouvait induire l'apoptose dans les cellules de

carcinomes de la vessie TCCSUP *in vitro* (Jeong et al., 2010). Le traitement de cellules isolées chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë ou de leucémie myéloïde chronique avec la combinaison d'IAA et d'HRP a aussi induit l'apoptose (quantifiée par cytométrie en flux par liaison de l'annexine-V ; Dalmazzo et al., 2011). La contrainte majeure de cette approche expérimentale est le ciblage de la HRP aux cellules que l'on souhaite éliminer. Avec PTH-HRP, il serait possible de cibler spécifiquement des cellules cancéreuses surexprimant le récepteur PTH₁. Ce récepteur est surexprimé dans de nombreux cancers : certains cancers gastriques, carcinomes colorectaux, cancer de la prostate, carcinomes dérivant de cellules rénales et, bien entendu, au niveau des ostéosarcomes et ostéocarcinomes (Ito et al., 1997 ; Lupp et al., 2010 ; Yang et al., 2007). La sécrétion et la validation de l'activité pharmacologique de PTH-HRP viennent confirmer qu'il est possible de générer des ligands de hauts poids moléculaires agonistes du PTH₁R. La PTH-HRP a un poids moléculaire significativement supérieur à celui de la construction précédemment rapportée PTH₁₋₃₄-EGFP (44,9 kDa pour PTH-HRP et 30 kDa pour PTH₁₋₃₄-EGFP). L'internalisation du complexe PTH-myc/4A6-AF488 par le PTH₁R prouve que ce récepteur peut internaliser des molécules ayant un poids supérieur à 150 kDa. Cela pourrait ouvrir des portes pour la génération de protéines de fusion HSA avec un potentiel thérapeutique très intéressant notamment dans le traitement de l'hypoparathyroïdisme, une maladie causée par une déficience en PTH entraînant une hypocalcémie et une hyperphosphatémie. Il a été démontré que l'administration d'une faible dose de LA-PTH (*long acting PTH*) permettait d'augmenter les concentrations sériques de calcium et de diminuer celles de phosphate à des niveaux normaux pendant 48 heures alors que la PTH et la PTH₁₋₃₄ ne modifiaient ces concentrations sériques que de manière modeste et transitoire (Shimizu et al., 2016). La génération d'une protéine de fusion PTH-HSA permettrait de générer un agoniste de longue durée, comme cela a été observée pour d'autres protéines de fusion (Chuang et al., 2002). De plus l'utilisation d'agoniste du PTH₁R de longue durée tel que le LA-PTH est préférable à celle de la PTH et de la PTH₁₋₃₄, car ces deux derniers causent irrémédiablement de la résorption osseuse qui peuvent nuire au patient, ce qui ne semble pas être le cas avec la LA-PTH (Shimizu et al., 2016). Finalement, un agoniste de haut poids moléculaire pourrait être injecté localement dans les articulations de patients souffrant d'arthrose, car il a été démontré que la PTH avait des propriétés

chondroregénératives (Sampson et al., 2011). Une telle stratégie, limiterait les effets indésirables, tel que la résorption osseuse, car la protéine de fusion ne pourrait pas aisément diffuser hors de l'articulation de par son haut poids moléculaire.

Une dernière adaptation des protéines de fusion PTH concerne PTH-myc : les *antibody drug conjugates* (ADCs ; Panowski et al., 2013). Les ADCs sont des anticorps couplé à une molécule cytotoxique par un *spacer* qui relâchera la dite molécule cytotoxique dans l'environnement acide des endosomes. En effet, PTH-myc pourrait être complexé avec un anticorps anti-myc conjugué à un groupement cytotoxique qui serait relâché à l'intérieur de la cellule suite à l'endocytose du complexe ligand/anticorps. Cette stratégie pourrait elle aussi s'appliquer aux autres ligands des GPCRs de classe B ainsi qu'à certains ligands des récepteurs de classe A, comme par exemple CCL19-myc, un agoniste du récepteur CCR7 (Charest-Morin et al., 2015).

Puisque l'ensemble des ligands des récepteurs couplés aux protéines G de classe B lient leur récepteur de la même façon, il est raisonnable d'assumer que cette stratégie de génération de protéine de fusion puissent être appliquée aux autres récepteurs de classe B (Cardoso et al., 2006). Aussi, il serait intéressant de remplacer la peroxydase dans ces constructions par une autre enzyme moins susceptible à l'auto-inhibition. Par l'exemple, la β -galactosidase est une enzyme qui pourrait améliorer la qualité de la détection. En effet, il s'agit d'une hydrolase qui contrairement aux peroxydases, pourrait accumuler le produit de réaction en fonction du temps. De plus, de nombreux substrats tant colorimétriques que luminescents sont disponibles pour cette enzyme. Aussi, plusieurs substrats chimiluminescent extrêmement sensibles ont été développés et validés pour une panoplie d'enzymes qui pourraient être fusionnées à l'extrémité C-terminale de la PTH. Parmi les enzymes avec de tels substrats on retrouve : la phosphatase alcaline, la β -glucuronidase, la β -glucosidase et la neuraminidase (NA; Aymard et al., 2003 ; Zhao et al., 2000 ; Kirby et Ruoff, 1995 ; Mariscal et al., 1995).

2. Protéines de fusion ligands du récepteur B₂ de la BK

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'approfondir les connaissances sur les propriétés pharmacologique de la MK tant *in vitro* (cellules en culture et bains à organes

isolés) qu'*in vivo* (effets hémodynamiques chez le rat anesthésié) et d'utiliser ces connaissances dans la conception de protéines de fusion (Fig. 53). Certaines données étaient déjà disponibles dans la littérature concernant ce peptide d'origine amphibienne (Chen et al., 2003; O'Rourke et al., 2004; Chen et al., 2005 ; Bawolak et al., 2012). Notamment, on savait ce peptide aurait une activité vasorelaxante plus persistante que celle de la BK dans un essai basé sur le muscle lisse de rat. De plus, il a été démontré que ce peptide entraînait une signalisation prolongée au niveau du B₂R de lapin et que cette activité prolongée menait à la dégradation d'une partie des récepteurs internalisés. Il a également été proposé par les auteurs de ces différents articles, que les modifications présentes dans la séquence de la MK protègent ce peptide de la dégradation, et que la MK constitue un exemple de mécanisme de défense amphibien provenant de l'évolution. L'importance de la MK comme mécanisme de défense est illustrée par le fait que ce peptide est présent dans 2 protéines en 5 copies clivables chez le crapaud *Bombina maxima*. Toutefois les données concernant l'affinité et l'activité biologique de la MK au niveau des récepteurs B₂ humain et de rat étaient très incomplètes. De plus, aucune caractérisation *in vivo* de la MK n'avait été réalisée, ce qui fut fait chez le rat.

En premier lieu l'affinité de la MK a été évaluée pour les récepteurs B₂ humain et de rat avec un essai de compétition. Cet essai a démontré que la MK avait une affinité plus faible d'un log que celle de la BK pour le récepteur B₂ de rat, ce qui est semblable à l'affinité du peptide amphibien pour le récepteur B₂ de lapin (Bawolak et al., 2012). Toutefois, l'affinité de la MK pour le récepteur B₂ humain était nettement plus faible avec un IC₅₀ autour de 7,5 µM. Cela différait grandement des valeurs d'EC₅₀ rapporté plus tôt (veine ombilicale humaine isolée ; Bawolak et al., 2012), et la cause de cette différence a été investiguée davantage. La génération de nouvelles courbes dose-réponse avec la MK sur la veine ombilicale humaine dans des bains à organes isolés a permis de confirmer l'écart significatif entre l'IC₅₀ mesuré par l'essai de compétition et l'EC₅₀ dans cet essai. Une expérience réalisée dans ce même système avec des doses équipotentes de MK et de BK a fait ressortir que la contraction induite par la MK est nettement plus lente à se développer et à atteindre son maximum que celle de la BK. Cette lente contraction suggère que la MK serait une pro-drogue dans ce système.

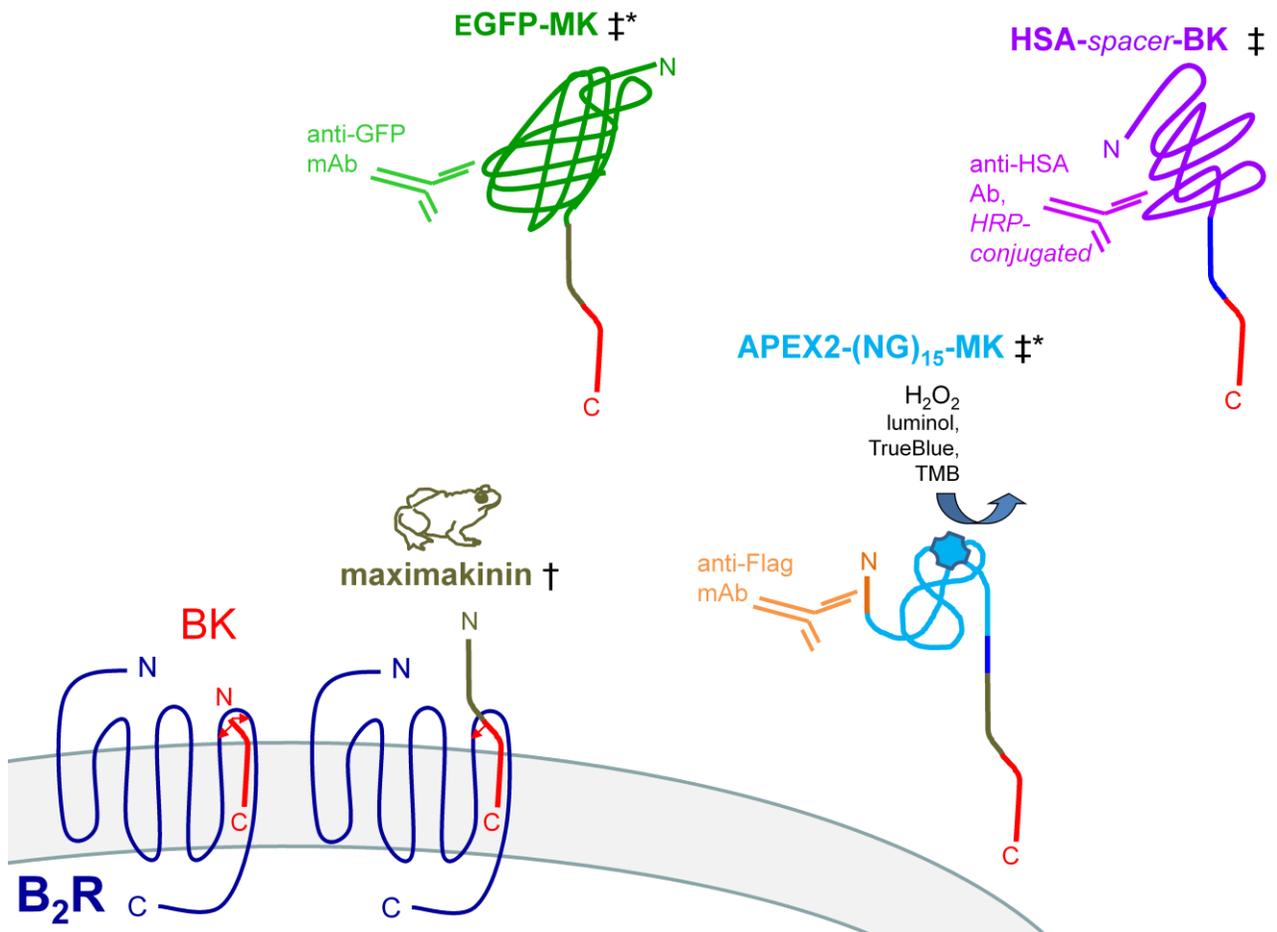


Figure 53. Représentation schématique des divers ligands biotechnologiques du récepteur B₂ de la BK.

De gauche à droite : Représentation de la liaison de la BK au récepteur B₂; l'extrémité N-terminale interagit avec deux résidus présents dans le domaine extracellulaire #3 alors que l'extrémité C-terminale interagit avec les domaines transmembranaires #6 et 7 (Leeb-Lundberg et al., 2005). La MK est un peptide d'origine amphibienne, qui contient la séquence complète de la BK en position C-terminale. L'extension N-terminale de ce peptide devrait être accessible dans le milieu extracellulaire, à l'extérieur du récepteur. La MK a été utilisée pour générer différentes protéines de fusion. EGFP-MK est une protéine de fusion fluorescente d'affinité nanomolaire au niveau du récepteur B₂ de lapin, et qui suite à sa liaison à ce récepteur, est transportée à l'intérieur des cellules dans des structures endosomales (Charest-Morin et al., 2013). D'autres constructions sont rapportées pour la première fois : la peroxydase APEX2 et l'albumine sérique humaine (HSA) ont été fusionnées à l'extrémité N-terminale de la MK dans de nouvelles constructions qui peuvent contenir d'autres épitopes reconnus par des anticorps commerciaux. † peptide résistant aux peptidases; ‡ construction bifonctionnelle; * protéine non-sécritée et produite dans le cytosol de cellules productrices (une variante de HSA-MK est produite sous une forme cytosolique et extraite en tant que lysat cellulaire).

De plus, la conversion de la MK en peptide actif n'a pas été documentée dans les cellules HEK 293a, puisque ce peptide a échoué à entraîner une mobilisation calcique chez des cellules exprimant le récepteur B₂ humain. Cette activation de la MK semble dépendre de peptidases ou de protéases présentes dans la veine ombilicale humaine. De façon pertinente, il a été démontré dans le passé que l'essai de contractilité de la veine ombilicale humaine était capable de prouver l'activation métabolique de pro-drogues analogues à la BK. En effet, il a été démontré que les peptides BK-His-Leu, BK-Arg et Met-Lys-BK-Ser-Ser étaient activés par l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou par les arginine-carboxypeptidases exprimées par la veine ombilicale (Gera et al., 2011 ; Charest-Morin et al., 2014). Dans ces expériences, les courbes dose-réponse de ces peptides étaient déplacées vers la droite (perte de puissance, augmentation de l'EC₅₀) en présence de l'inhibiteur de l'enzyme responsable de leur activation. Des expériences similaires ont donc été conduites pour la MK sur des tissus prétraités avec une panoplie d'inhibiteurs de peptidases/protéases, et ce sans aucune modification significative sur la courbe dose-réponse de la MK. Cela suggère que l'activation métabolique de la MK dépendrait de plusieurs voies protéolytiques différentes actives parallèlement. L'utilisation d'un système de LC-MS a permis d'identifier 2 métabolites C-terminaux principaux de la MK générés par l'incubation de ce peptide avec un anneau de veine ombilicale humaine : Lys-Gly-Pro-BK et Gly-Pro-BK. Ce sont des agonistes directs potentiels du récepteur B₂ humain.

Après une étude extensive dans les bains à organes isolés, la MK a été injectée à des rats anesthésiés afin d'observer les effets hémodynamiques de ce peptide *in vivo*. L'expérimentation *in vivo* a permis de confirmer que contrairement à la BK, l'effet hypotensif de la MK n'est pas potentialisé par un prétraitement avec l'inhibiteur de l'ACE enalaprilat (Jean et al., 2016a). Cela est cohérent avec la très faible affinité de ce peptide pour l'ACE (Bawolak et al., 2012). Les effets hémodynamiques de la MK était plus persistants et plus intenses que ceux de la BK, un point commun avec l'agoniste du B₂R résistant à la dégradation, le B-9972 (Jean et al., 2016a).

L'ensemble des expériences précédentes a été mis à profit pour évaluer la capacité de la MK à exercer des effets non-dépendants du récepteur B₂. Comme mentionné plus tôt, plusieurs analogues des kinines retrouvés dans le monde animal représenteraient un mécanisme de défense et ces peptides auraient co-évolué avec le récepteur d'espèces

prédatrices à des fins dissuasives (Xi et al., 2015). La *Polistes* kinine, retrouvée dans le venin de guêpe, est un peptide comparable à la MK ; c'est à dire qu'il est composé de la séquence intacte de la BK prolongée en N-terminal par une extension hydrophile (Johnson and Erdös, 1973). Une étude a révélé que ce peptide pouvait stimuler le relâchement d'histamine par les mastocytes de rats, mais pas la BK. Un mode d'action commun pour les peptides cationiques est *via* l'activation du récepteur MRGPRX2, un GPCR exprimé à la surface des mastocytes matures (McNeil et al., 2015). La *Polistes* kinine est un excellent candidat pour ce récepteur puisqu'elle possède 5 charges positives. La MK avec ses quatre charges positives pourrait elle aussi activer ce récepteur. Toutefois, une expérience de mobilisation calcique avec des cellules exprimant transitoirement le récepteur MRGPRX2 a révélé que la MK stimulait de manière marginale ce récepteur même à 10 μ M. De plus, toute contribution de l'histamine dans les effets hypotensifs (*in vivo*) ou contractiles (bains à organes isolés) a été exclue de par l'absence d'effet d'un prétraitement avec la pyrilamine, un antagoniste de ce récepteur. Le composé 48/80, dont les effets sur la dégranulation des mastocytes dépendent de l'interaction avec l'équivalent du récepteur MRGPRX2, est inhibé par un antagoniste H₁ au niveau du lit vasculaire mésentérique du rat (Jin et al., 2016), permettant d'exclure la contribution *in vivo* de ce récepteur. Le récepteur B₁ de la BK n'est pas exprimé de manière significative chez le rat adulte en santé (Jean et al., 2016a), et il est absent de la veine ombilicale humaine en condition normale (Jean et al., 2016b). Cela permet d'exclure la contribution du B₁R dans les effets de la MK, surtout si l'on considère que MK-desArg, un métabolite putatif de MK avec un profil compatible avec la liaison au B₁R, n'a qu'une affinité marginale pour ce récepteur (Charest-Morin et al., 2016). Finalement, la possibilité que MK stimule une cible cellulaire autre que le B₂R est extrêmement faible puisqu'un prétraitement avec l'antagoniste icatibant a considérablement réduit l'effet de cette kinine tant *in vivo* que dans le système de bains à organes isolés.

Puisque la BK et ses analogues lient le récepteur B₂ *via* leur extrémité C-terminale, il était donc possible de générer des protéines de fusion ligands de ce récepteur en les prolongeant à partir de leur extrémité N-terminale. Ce raisonnement a été confirmé par la protéine de fusion EGFP-MK, qui possède une affinité d'ordre nanomolaire au niveau du B₂R de lapin (Charest-Morin et al., 2013). De plus, l'ajout d'une extension en position C-terminale de la

BK résulte dans une perte d'affinité majeure pour le B₂R, comme démontré par les peptides BK-His-Leu ou BK-Arg (Charest-Morin et al., 2014), et est donc incompatible avec la génération de protéines de fusion. Malgré la caractérisation extensive d'EGFP-MK précédemment publiée, celle-ci avait été réalisée sur un B₂R de lapin et ne permettait pas de comparaisons directes avec les études réalisées sur la MK au niveau du B₂R de rat et d'humain. La capacité de cette protéine de fusion de détecter ces deux récepteurs a été évaluée, et conformément aux résultats décrits plus haut, EGFP-MK était un agoniste spécifique du B₂R de rat et n'interagissait que marginalement avec le B₂R humain, un résultat inattendu. Malgré l'échec de la détection du récepteur humain, les expériences ont été poursuivies sur le récepteur de rat afin de démontrer la faisabilité et les exigences de la génération de protéines de fusion. Éventuellement, si une combinaison *spacer*-BK adaptée au récepteur B₂ humain était identifiée (voir point suivant dans la discussion), ces travaux pourraient facilement être considérés comme une *proof of concept* et ainsi accélérer le processus pour le récepteur humain. Par la suite, il a été démontré qu'EGFP-MK était un agoniste persistant du B₂R de rat et que cette protéine de fusion s'accumulait progressivement dans le système endosomal en fonction du temps avec une transition lente vers le système lysosomal (co-localisation avec LAMP1). L'accumulation endosomale d'EGFP-MK pourrait être adaptée à des molécules du type ADCs, où l'accumulation dans l'environnement acide des endosomes permettrait la libération intracellulaire de molécules cytotoxique labiles dans ces conditions. De plus, l'activité pro-mitotique d'EGFP-MK pourrait sensibiliser les cellules à l'action de telles drogues. L'inactivation d'EGFP-MK, tant dans le milieu extracellulaire que dans le système endosomal, est significativement retardée vs. celle de la BK ; un peptide instable rapidement dégradé tant dans le milieu extracellulaire que dans la voie endosomale. Le lent processus d'inactivation d'EGFP-MK suggère qu'il serait possible de créer des agonistes persistants du B₂R de haut poids moléculaires qui seraient résistants tant à la filtration glomérulaire qu'à la filtration capillaire. Ce type de molécule aurait donc une demi-vie prolongée dans la circulation. Pour atteindre ces objectifs, la HSA semblait un choix approprié afin de conférer une longue demi-vie plasmatique à un ligand de haut poids moléculaire agoniste du B₂R. En effet, de nombreuses constructions basées sur la HSA, telles que l'Albiglutide ou des protéines de fusion formées de la HSA et des interférons α ou β ont été rapportées comme

ayant une très longue demi-vie plasmatique comparativement à l'hormone native (Bao et al., 2011 ; Osborn et al., 2002 ; Sung et al., 2003). Il a été rapporté que les protéines de fusion HSA étaient très peu immunogènes, en effet moins de 1% des patients traités avec l'Albiglutide ont développé des anticorps contre cette drogue (Sleep, D., 2015). Toutefois, l'introduction de nouveaux épitopes (sites de fusion et *linkers*), pourrait entraîner le développement d'anticorps contre certaines protéines de fusion HSA. Malgré que, dans la littérature, la grande majorité des ligands fusionnés à la HSA soient liés à l'extrémité N-terminale de celle-ci, il existe certaines constructions avec des ligands en position C-terminale de la HSA. En effet, une protéine de fusion composée de la HSA prolongée en position C-terminale par le peptide BNP conserve sa capacité de lier et d'activer son récepteur, un GPCR (Ding et al., 2014). Il est intéressant de mentionner que le ligand BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) est un court peptide de seulement 32 acides aminés. Il est fort probable que le récepteur de ce peptide soit plus tolérant aux protéines de fusion que le récepteur B₂. Cela vient démontrer que la faisabilité de la prolongation en position C-terminale de la HSA par un ligand peptidique d'un GPCR. Une stimulation des cellules endothéliales de faible intensité, mais persistante, pourrait avoir de nombreux effets cardiovasculaires bénéfiques *via* le relâchement d'oxyde nitrique ou de l'activateur du plasminogène tissulaire causant entre autre de la vasodilatation (Leeb-Lundberg et al., 2005 ; Pretorius et al., 2003). Une telle classe de nouveaux agents thérapeutiques aurait le potentiel de reproduire les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ACE basés sur la potentialisation des effets de la BK endogène (Pretorius et al., 2003 ; Gainer et al., 1998 ; Squire et al., 2000). De plus, une telle stimulation pourrait avoir des effets métaboliques bénéfiques, notamment *via* l'augmentation de la sensibilité à l'insuline (Frigolet et al., 2017). Toutes les constructions basées sur la HSA sécrétée ont échouées à stimuler le B₂R de rat, malgré le fait que ces protéines de fusion exprimaient correctement le ligand (immunobuvardage anti-BK) et qu'elles étaient homogènes (immunobuvardages). Toutefois, la forme cytosolique de HSA-MK, qui contrairement aux formes sécrétées ne liait pas la résine Mimetic Blue ®, a réussi à stimuler de manière spécifique le B₂R de rat. Comme mentionné dans la section Résultats, la HSA requiert 17 ponts disulfures pour adopter la structure adéquate, et l'environnement réducteur du cytoplasme ne permet pas la formation de ces ponts disulfures (Sugio et al., 1999 ; Woycechowsky et Rainer., 200 ;

Cumming et al., 2014). Cela explique pourquoi la protéine de fusion cyto myc-HSA-MK ne peut lier la colonne Mimetic Blue®, car la ou les pochettes de liaison nécessaires pour interagir avec la résine ne se sont pas formées correctement. L'ensemble des résultats confirment que la large structure globulaire de la HSA ne peut lier le récepteur B₂ de par l'encombrement stérique entre les deux macromolécules. Une autre hypothèse expliquant l'échec des protéines de fusion HSA au niveau du B₂R prend en compte la charge des protéines fusionnées à la MK. Peut-être que le récepteur B₂ de rat ne peut interagir avec HSA-MK, car la HSA est une protéine plus anionique que l'EGFP (point isoélectrique HSA : 4,7; point isoélectrique EGFP : 6,2; Vlasova et Saletzy, 2009; Gurunathan et al., 2014). D'autres protéines de fusion basées sur de plus petites globulines comme l'EGFP ou l'APEX2 sont néanmoins capable d'interagir avec ce récepteur, et ce avec une excellente affinité. L'APEX2 a été préférée à la HRP dans cette situation pour deux raisons. Premièrement, la HRP ne peut être synthétisée correctement dans le cytosol car il s'agit d'un environnement réducteur et pauvre en calcium (Martell et al., 2016). Tout comme pour EGFP, l'APEX2 est extrêmement stable dans le cytosol (Lam et al., 2015 ; Corish et Taylor-Smith, 1999). La seconde raison est, qu'historiquement, les constructions sécrétées agonistes du récepteur B₂ étaient incapables de détecter ou de stimuler ce récepteur (Charest-Morin et al., 2013). En effet, la forme sécrétée de EGFP-MK (s-EGFP-MK) n'interagissait pas avec le B₂R, même lorsqu'elle avait été concentrée 100x. La nouvelle construction APEX2-(NG)₁₅-MK est un agoniste spécifique du B₂R de rat, et est capable de détecter la présence de ce récepteur grâce à son domaine peroxydase. De plus, cette protéine de fusion peut être utilisée comme ligand non-isotopique dans un essai de compétition afin de déterminer l'affinité de nouveaux ligands du B₂R de rat. APEX2-(NG)₁₅-MK, EGFP-MK et même cyto myc-HSA-MK illustre la faisabilité de générer des agonistes de haut poids moléculaires pour le récepteur B₂, un GPCR de classe A ayant comme ligands endogènes des peptides de 9-10 acides aminés. Ces ligands biotechnologiques sont caractérisés par une inactivation intracellulaire retardée, une spécificité espèce-dépendante et un possible encombrement stérique entre le récepteur et les protéines de très hauts poids moléculaires adoptant une structure tertiaire tridimensionnelles complexe. Une solution afin de générer un ligand du récepteur B₂ qui ne serait pas éliminé par la filtration glomérulaire serait de fusionner le peptide CTP en position C-terminale de

la MK. Le peptide CTP provenant de la sous-unité β de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (QSSSS*KAPPPS*LSPS*RLPGPS*DTPILPQ; où les * représentent des sites d'O-glycosylation se terminant par une molécule d'acide sialique) est composé de seulement 31 acides aminés. Le peptide CTP permet de prolonger la demi-vie d'une protéine dans le sérum humain, car la charge de ce peptide en plus de la présence d'acide sialique, vient empêcher la clairance rénale (Birken et Canfield, 1977; Fares et al., 1992). Une protéine de fusion basée sur la CTP a été approuvée par la FDA et la EMA et est présentement prescrite comme un traitement de longue action pour stimuler la fertilité (Elonva®; Croxtall et McKeage, 2011). Avec une protéine de fusion CTP-MK, il serait possible de générer un agoniste du B₂R résistant à la dégradation enzymatique et à la clairance rénale. Une telle protéine de fusion pourrait probablement agir sur le B₂R animal avec une bonne affinité, puisque ce récepteur tolère les extensions en position N-terminale.

La principale limitation de ce projet réside dans l'incapacité actuelle de transférer ces connaissances au récepteur B₂ humain afin d'éventuellement pouvoir tester le potentiel thérapeutique ou diagnostique des ligands biotechnologiques. Certains essais ont été effectués afin de développer une protéine de fusion agoniste du B₂R humain. Conformément aux faibles affinités de MISI et de (NG)₅-BK pour le récepteur B₂ humain, l'identification d'une combinaison *spacer*-agoniste compatible avec le récepteur B₂ humain a été un échec. Un *Blast* des séquences du B₂R humain et de rat révèle que ces deux récepteurs ont 80,1% d'homologie entre eux, conformément avec ce qui est rapporté dans la littérature (Hess et al., 1992). Une étude plus attentive des séquences révèle qu'une forte proportion des différences entre ces récepteurs se situe dans la région correspondant aux domaines transmembranaires #6 et #7, régions impliquées dans la liaison de l'extrémité N-terminale de la BK (Leeb-Lundberg et al., 2005). Des expériences de mutagenèse dans cette région pourraient permettre d'identifier les résidus qui limitent l'affinité de la MK au niveau du B₂R humain. L'identification de ces résidus pourrait guider la création d'un *spacer* compatible avec le récepteur B₂ humain, permettant ainsi de générer des protéines de fusion de haute affinité pour ce récepteur.

Néanmoins, si l'adaptation de ces ligands biotechnologiques aux récepteurs humains était rendu possible, de tels ligands de haut poids moléculaire agonistes du B₂R pourrait mener à la stimulation directe des récepteurs B₂ endothéliaux comme mentionné à la fin de l'introduction. Les protéines de fusion de haut poids moléculaire agonistes du B₂R pourraient avoir d'intéressantes applications chez les patients ayant souffert d'un infarctus, car il a été démontré sur des modèles animaux que la BK avait des effets cardioprotecteurs importants. En effet, l'administration de BK lors de la reperfusion après un infarctus du myocarde réduit la taille de celui-ci (Potier et al., 2013 ; Bell et al., 2003). Aussi, la stimulation des récepteurs B₂ de la BK après un accident ischémique, entraîne une protection du myocarde par la génération de prostacyclines et d'oxyde nitrique (Penna et al., 2007 ; Marketou et al., 2010). Puisque l'administration rapide de BK après un infarctus protège le cœur des dommages causés par la reperfusion, l'utilisation de protéines de fusion de haut poids moléculaire agonistes du B₂R pourrait être bénéfique chez les patients hospitalisés suite à une crise cardiaque sans entraîner les effets négatifs associés à la stimulation extravasculaire du B₂R.

Il a aussi été démontré dans le passé que le récepteur B₁ humain tolérait bien les prolongations en position N-terminale (Charest-Morin et Marceau, 2016). Dans l'éventualité où le ligand APEX2-(NG)₁₅-MK pourrait être adapté au récepteur B₁ humain, cela pourrait avoir des applications diagnostiques très intéressantes. En effet, cette protéine de fusion pourrait participer à la détection des récepteurs B₁ surexprimés au niveau des cellules sanguines périphériques mononucléaires chez les patients atteints de sclérose en plaque (Prat et al., 2005). 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 au niveau des leucocytes chez les patients schizophréniques (Boneberg et al., 2006; Rodrigues et al., 2005).

Finalement, les deux constructions APEX2 pourraient être utilisées afin d'identifier les partenaires moléculaires des récepteurs couplés aux protéines G ciblés. En effet, une étude récente a rapporté qu'une protéine de fusion APEX2 du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR-APEX2) a permis l'identification de nouveaux partenaires moléculaires de ce récepteur (Paek et al., 2017). Cela a été réalisé par une courte incubation de cellules exprimant ce récepteur chimérique avec de la biotine-phénol et du peroxyde d'hydrogène suivie d'une

analyse par spectrométrie de masse des peptides biotinylés. Cette approche expérimentale pourrait aussi être appliquée aux récepteurs PTH₁ et B₂ avec les ligands PTH-APEX2 et APEX2-(NG)₁₅-MK afin d'identifier de nouveaux partenaires moléculaires de ces récepteurs.

Les connaissances provenant de la littérature sur les GPCRS et les protéines de fusion, conjuguées à l'expertise développée au cours de mes études, ont permis de générer des protéines de fusions avec des applications diagnostiques ou thérapeutiques potentielles. J'espère que mes travaux ont pu démontrer l'énorme potentiel de l'utilisation des protéines de fusion dans l'étude des récepteurs couplés aux protéines G.

BIBLIOGRAPHIE

- Abate, E.G., Clarke, B.L. (2017). *Review of hypoparathyroidism*. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7:172.
- 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.
- Aymard, M., Ferraris, O., Gerentes, L., Jolly, J., Kessler, N. (2003). *Neuraminidase assays*, *Dev. Biol. (Basel)*. 115: 75-83.
- Babiuk, C., Marceau, F., St-Pierre, S., Regoli, D. (1982). *Kininases and vascular responses to kinins*. *Eur J Pharmacol.* 78: 167-74
- 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.
- Baldo, B.A. (2015). *Chimeric fusion proteins used for therapy : indications, mechanisms, and safety*. *Drug Saf.* 38(5): 455-479
- Bao, W., Aravindhan, K., Alsaid, H., Chendrimada, T., Szapacs, M., Citerone, D.R., Harpel, M.R., Willette, R.N., Lepore, J.J, Jucker, B.M. (2011). *Albiglutide, a long lasting glucagon-like peptide-1 analog, protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury: evidence for improving cardiac metabolic efficiency*. *PLoS ONE* 6(8) :e23570.
- Baram, M., Kommuri, A., Subhashini, A. (2013). *ACE inhibitor-induced angioedema*. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 1(5): 442–445.
- Barki-Harrington, L., Bookout, A.L., Wang, G., Lamb, M.E., Leeb-Lundberg, L.M., Daaka, Y. (2003). *Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells*. *Biochem. J.* 371: 581–587.
- Bas, M., Greve, J., Stelter, K., Havel, M., Strassen, U., Rotter, N., Veit, J., Schossow, B., Hapfelmeir, A., Kehl, V., Kodja, G., Hoffman, T.K. (2015). *A randomized trial of icatibant in ACE-inhibitor-induced angioedema*. *N. Engl. J. Med.* 372(5): 418–425.

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 B₂ 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 B₂ receptor stimulated with the amphibian peptide maximakinin: insight into the endosomal inactivation of kinins*. Pharmacol. Res. 65: 247–253.

Beck, C., Piontek, G., Haug, A., Bas, M., Knopf, A., Stark, T., Misslbeck, M., Rudelius, M., Reiter, R., Brandstetter, M., Pickhard, A. (2012). *The kallikrein-kinin-system in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its role in tumour survival, invasion, migration and response to radiotherapy*. Oral. Oncol. 48: 1208–1219.

Bell, R.M., Yellon, D.M. (2003). *Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS*. J. Mol. Cel. Cardiol. 35(2): 185-193

Berglund, L., Bjorling, E., Oksvold, P., Fagerberg, L., Asplund, A., Szigyarto, C.A., Persson, A., Ottosson, J., Wernerus, H., Nilsson, P., Lundberg, E., Sivertsson, A., Navani, S., Wester, K., Kampf, C., Hober, S., Pontén, F., Uhlén, M. (2008). *A genecentric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies*. Mol. Cell. Proteom. 7(10): 2019–2027.

Bilezikian, J.P., Khan, A.A., Potts, J.T., Jr Third International Workshop on the Management of Asymptomatic Primary Hyperthyroidism. (2009). *Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: summary statement from the third international workshop*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 94(2): 335–339.

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*. *Immunopharmacol.* 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.

Birken, S., Canfield, R.E. (1977). *Isolation and amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the beta subunit of human choriogonadotropin*. *J. Biol. Chem.* 252(15):5386-5392.

Blaes, N., Girolami, J.P. (2013). *Targeting the ‘Janus face’ of the B2-bradykinin receptor*. *Expert Opin. Ther. Targets.* 17(10): 1145-66.

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.

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 adenylate cyclase*. *J. Biol. Chem.* 259: 3560-3567.

Boneberg, E.M., von Seydlitz, E., Pröpster, K., Watzl, H., Rockstroh, B., Illges, H. (2006). *D3 dopamine receptor mRNA is elevated in T cells of schizophrenic patients whereas D4 dopamine receptor mRNA is reduced in CD4+-T cells*. *J. Neurimmunol.* 173(1-2): 180-187.

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.

Bork, K. (2010). *Diagnosis and treatment for hereditary angioedema with normal C1-inhibitor*. *Allergy/Asthma & Clin. Immunol.* 6: 15-23.

Bork, K. (2013). *Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor*. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 33(4): 457-470.

Bork, K., Hardt, J., Witzke, G. (2012). *Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130: 692-697.

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.

Brunnée, T., Reddigari, S.R., Shibayama, Y., Kaplan, A.P., Silverberg, M. (1997). *Mast cell derived heparin activates the contact system: a link to kinin generation in allergic reactions*. Clin. Exp. Allergy 27: 653-63.

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.

Caliceti, P., Veronese, F.M. (2003). *Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates*. Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10): 1261-1277.

Calvi, L.M., Schipani, E. (2000). *The PTH/PTHrP receptor in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia*. J. Endocrinol. Invest. 23:545–554.

Campbell, D.J. (1995). *Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and kinin metabolism: evidence that ACE inhibitors may inhibit a kininase other than ACE*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 22(12): 903–911.

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.

Carneiro-Pla, D.M., Irvin, G.L. 3rd, Chen, H. (2007). *Consequences of parathyroidectomy in patients with mild sporadic primary hyperparathyroidism*. Surgery. 142(6):795–799.

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

Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., Baty, D. (2009). *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. Br. J. Pharmacol. 157(2): 220–233.

Chan, D.C., Gera, L., Stewart, J.M., Helfrich, B., Zhao, T.L., Feng, W.Y., Chan, K.K., Covey, J.M., Bunn, P.A. Jr. (2002). *Bradykinin antagonist dimer, CU201, inhibits the growth of human lung cancer cell lines in vitro and in vivo and produces synergistic growth inhibition in combination with other antitumor agents*. Clin. Cancer. Res. 8(5): 1280–1287.

Charest-Morin X, Bachelard H, Jean M, Marceau F. (2017). Species-specific pharmacology of maximakinin, an amphibian homologue of bradykinin: putative prodrug activity at the human B₂ receptor and peptidase resistance in rats. *PeerJ*. 5: e2911.

Charest-Morin, X., Fortin, J.P., Bawolak, M.T., 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.

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., Marceau, F. (2016). *Biotechnological fluorescent ligands of the bradykinin B₁ receptor: protein ligands for a peptide receptor*. *PLoS One* 11: e0148246.

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.

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.* 3(2):e00119.

Charest-Morin, X., Roy, C., Fortin, E.J., Bouthillier, J., Marceau, F. (2014). *Pharmacological evidence of bradykinin regeneration from extended sequences that behave as peptidase-activated B₂ receptor agonists*. *Front. Pharmacol.* 5: 32-47.

Chee, J., Singh, J., Naran, N., Misso, N.L., Thompson, P.J., Bhoola, K.D. (2007). *Novel expression of kallikreins, kallikrein-related peptidases and kinin receptors in human pleural mesothelioma*. *Biol. Chem.* 388(11): 1235–1242.

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.

Chen, T., O'Rourke, M., McKenna, J., Hirst, D.G., Shaw, C. (2005). *Biotransformation of maximakinin, a bradykinin-related nonadecapeptide from toad venom, by mammalian kallikrein and salivary proteases*. *J. Pept. Res.* 66(Suppl 1): 106-13.

Chen, T., O'Rourke, M., Orr, D.F., Coulter, D.J., Hirst, D.G., Rao, P., Shaw, C. (2003). *Kinestatin: a novel bradykinin B₂ receptor antagonist peptide from the skin secretion of the Chinese toad, Bombina maxima*. *Regul. Pept.* 116: 147-54.

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

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

Chuang, V.T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. (2002). *Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin*. Pharm. Res. 19(5): 569–577.

Cicardi, M. (2014). *Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: Consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group*. Allergy 69: 602-616.

Cicardi, M., Agastoni, A. (1996). *Hereditary Angioedema*. N. Engl. J. Med. 334: 1666-1667.

Cicardi, M., Levy, R.J., McNeil, D.L., Li, H.H., Sheffer, A.L., Campion, M. (2010). *Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angioedema*. N. Engl. J. Med. 363: 523-531.

Cloutier, F., de Sousa, B.H., Ongali, B., Couture, R. (2002). *Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B(2) receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats*. Br. J. Pharmacol. 135(7): 1641-1654.

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.

Cole, S.W., Lundquist, L.M. (2013). *Icatibant for the treatment of hereditary angioedema*. Ann. Pharmacother. 47(1): 49–55.

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: 875–85.

Conlon, J.M., Aronsson, U. (1997). *Multiple bradykinin-related peptides from the skin of the frog, Rana temporaria*. Peptides 18: 361-5.

- Cordellat, I.M. (2012). *Hyperparathyroidism: primary or secondary disease?* Reumatol. Clin. 8(5): 287–291.
- Corish, P., Tyler-Smith, C. (1999). *Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells.* Protein. Eng. 12: 1035 – 1040.
- Cosman, F. (2008). *Parathyroid hormone treatment for osteoporosis.* Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 15(6): 495–501.
- Croxtall, J.D., McKeage, K. (2011). *Corifollitropin alfa: a review of its use in controlled ovarian stimulation for assisted reproduction.* BioDrugs. 25(4):243-54.
- Cumming, R.C., Andon, N.L., Haynes, P.A., Park, M., Fischer, W.H., Schubert, D. (2004). *Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress.* J. Biol. Chem. 279: 21749-21758.
- 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.
- da Costa, P.L., Sirois, P., Tannock, I.F., Chammas, R. (2014). *The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities.* Cancer Lett. 345(1): 27–38.
- Dalmazzo, L.F.F., Santana-Lemos, B.A., Jácomo, R.H., Garcia, A.B., Rego, E.M., da Fonseca, L.M., Falcão, R.P. (2010). *Antibody-targeted horseradish peroxidase associated with indole-3-acetic acid induces apoptosis in vitro in hematological malignancies.* Leuk. Res. 35(5): 657–662.
- 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.
- Davis, C., Burgess, G. (2002). *The pharmacology of T-kinin and des-Arg¹¹-T-kinin in primary cultures of rat bladder smooth muscle cells.* Eur. J. Pharmacol. 450: 123-130.
- Day, R.N., Davidson, M.W. (2009). *The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging.* Chem. Soc. Rev. 38(10): 2887–2921.
- 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.

- Dicpinigaitis, P.V. (2006). *Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough : ACCP evidence-based clinical practice guidelines*. Chest 129(suppl): 169S-73S.
- Ding, Y., Peng, Y., Deng, L., Wu, Y., Fu, Q., Jin, J. (2014). *The effects of fusion structure on the expression and bioactivity of human brain natriuretic peptide (BNP) albumin fusion proteins*. Curr. Pharm. Biotechnol. 15(9): 856-863.
- 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.
- Drube, S., Liebmann, C. (2000). *In various tumour cell lines the peptide bradykinin B(2) receptor antagonist, Hoe 140 (Icatibant), may act as mitogenic agonist*. Br. J. Pharmacol. 131(8): 1553–1560.
- Duchatelet, S., Ostergaard, E., Cortes, D., Lemainque, A., Julier, C. (2005). *Recessive mutations in PTHR1 cause contrasting skeletal dysplasias in Eiken and Blom- strand syndromes*. Hum. Mol. Genet. 14:1–5.
- Eggenberger, M., Flühmann, B., Muff, R., Lauber, M., Lichtensteiger, W., Hunziker, W., Fischer, J.A., Born, W. (1996). *Structure of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor of the human cerebellum and functional expression in human neuroblastoma SK-N-MC cells*. Mol. Brain Res. 36: 127-136.
- 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.
- Fares, F.A., Suganuma, N., Nishimori, K. (1992). *Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:4304–4308.
- Farkas, H., Czaller, I., Csuka, D., Vas, A., Valentin, S., Varga, L. (2010) *The effect of long-term danazol prophylaxis on liver function in hereditary angioedema-a longitudinal study*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 66: 419-426.
- 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.
- Fernandes, P.D., Gomes, Nde M., Sirois, P. (2011). *The bradykinin B1 receptor antagonist R-954 inhibits Ehrlich tumor growth in rodents*. Peptides 32(9): 1849–1854.

Fogaça, S.E., Melo, R.L., Pimenta, D.C., Hosoi, K., Juliano, L., Juliano, M.A. (2004). *Differences in substrate and inhibitor sequence specificity of human, mouse and rat tissue kallikreins*. *Biochem. J.* 380: 775-781.

Folkes, L.K., Wardman, P. (2001). *Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species- a potential new role for plant auxins in cancer therapy*. *Biochem. Pharmacol.* 61(2): 129-136.

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.

Frigolet, M.E., Thomas, G., Beard, K., Lu, H., Liu, L., Fantus, I.G. (2017). *The bradykinin (BK)-cGMP-PKG pathway augments insulin sensitivity via upregulation of MAPK phosphatase-5 and inhibition of Jun kinase (JNK)*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 313: E321-E334.

Gainer, J.V., Morrow, J.D., Loveland, A., King, D.J., Brown, N.J. (1998). *Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects*. *N. Engl. J. Med.* 339: 1285-1292.

Gardella, T.J., Vilaradaga, J.P. (2015). *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIII. The parathyroid hormone receptors--family B G protein-coupled receptors*. *Pharmacol. Rev.* 67(2): 310-337.

Gardiner, S.M., Bennett, T. (1988). *Regional haemodynamic responses to adrenoceptor antagonism in conscious rats*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 255: H813-H824.

Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., Ashby, G.A., Thorneley, N.F. (1996). *Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases*. *Biochem. J.* 313(Pt. 3): 841-7

- Gera, L., Bawolak, M.T., Roy, C., Lodge, R., Marceau, F. (2011). *Design of fluorescent bradykinin analogs: application to imaging of B 2 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., Bouthillier, J., Adam, A., Marceau, F. (2011) *Met-Lys-bradykinin-Ser-Ser, a peptide produced by the neutrophil from kininogen, is metabolically activated by angiotensin converting enzyme in vascular tissue*. Pharmacol. Res. 64: 528-534.
- 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 B 2 receptor*. Biol. Chem. 394: 379 – 383.
- 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.
- Gilley, R., March, N., Cook, S.J. (2009). *ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos*. Cell. Signal. 21(6): 969-77.
- 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.
- Gobeil, F., Pheng, L.H., Badini, I., Nguyen-Le, X.K., Pizard, A., Rizzi, A., Blouin, D., Regoli, D. (1996). *Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein*. Br. J. Pharmacol. 118: 289–294.
- Goddard, A.D., Watts, A. (2012). *Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol*. BMC Biol. 10: 27-35.
- Gohla, A.S., Offermanns, S., Wilkie, T.M., Schultz, G. (1999). *Differential involvement of G alpha12 and G alpha13 in receptor-mediated stress fiber formation*. J. Biol. Chem. 274: 17901–17907.
- Goeddel, D.V. (1979). *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 106–110.
- Golias, C., Charalabopoulos, A., Stagikas, D., Charalabopoulos, K., Batistatou, A. (2007). *The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications*. Hippokratia. 11(3): 124-128.

Gompels, M.M., Lock, R.J., Morgan, J.E., Osborne, J., Brown, A., Virgo, P.F. (2002). *A multicentre evaluation of the diagnostic efficiency of serological investigations for C1 inhibitor deficiency*. J. Clin. Pathol. 55: 145-147.

Gopinath, P., Sadler, G.P., Mihai, R. (2010). *Persistent symptomatic improvement in the majority of patients undergoing parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism*. Langenbeck's Archives of surgery/Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 395(7): 941–946.

Greenbaum, L.M., Howard, E., Albus, U., Gao, X.X. (1992). *T-kininogen, processing and functions*. Agents Action Suppl. 38(1): 300-306.

Gryniewicz, G., Poeniemi M., Tsien, R.Y. (1985). *A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties*. J. Biol. Chem. 260: 3440-50.

Guerreiro, R., Bras, J., Batista, S., Pires, P., Ribeiro, M.H., Almeida, R., Oliveira, C., Hardy, J., Santana, I. (2016). *Pseudohypoparathyroidism type I-b with neurological involvement is associated with a homozygous PTH1R mutation*. Genes, brain and behavior. 15: 669–677.

Gurunathan, S., Woong Han, J., Kim, E., Kwon, D.N., Park, J.K., Kim, J.H. (2014). *Enhanced green fluorescent protein-mediated synthesis of biocompatible graphene*. J. Nanobiotechnology 12: 41.

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 B_2 receptor in caveolae*. J. Cell. Sci. 111: 917–928.

Hansson, M.D., Rzezniczka, 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.

Haywood, J.R., Shaffer, R.A., Fastenow, C., Fink, G.D., Brody, M.J. (1981). *Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 241: H273–H278.

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.

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.

Hitzerd, S.M., Verbrugge, S.E., Ossenkoppele, G., Jansen, G., Peters, G.J. (2014). *Positioning of aminopeptidase inhibitors in next generation cancer therapy*. Amino Acids. 46: 793-808

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.

Hoogendam, J., Farih-Sips, H., Wynaendts, L.C., Löwik, C.W., Wit, J.M., Karperien, M. (2007). *Novel mutations in the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor type 1 causing Blomstrand osteochondrodysplasia types I and II*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 92: 1088–1095.

Hopkins, A.L., Groom, C.R., (2002). *The druggable genome*. Nat. Rev. Drug. Discov. 1(9): 727-30.

Hruska, K.A., Martin, K., Mennes, P., Greenwalt, A., Anderson, C., Klahr, S., Slatopolsky, E. (1977). *Degradation of parathyroid hormone and fragment production by the isolated perfused dog kidney. The effect of glomerular filtration rate and perfusate CA^{++} concentrations*. J. Clin. Invest. 60(3): 501–510.

Hunter, M.R., Grimsey, N.L., Glass, M. (2016). *Sulfatation of the FLAG epitope is affected by co-expression of G-protein-coupled receptors in a mammalian cell model*. Sci. Rep. 6: 27316.

Ito, M., Nakashima, M., Alipov, G.K., Matsuzaki, S., Ohtsuru, A., Yano, H., Yamashita, S., Sekine, I. (1997). *Gastric cancer associated with overexpression of parathyroid hormone-*

related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in relation to tumor progression. *J. Gastroenterol.* 32(3): 396–400.

Jean, M., Gera, L., Charest-Morin, X., Marceau, F., Bachelard, H. (2016a). *In vivo effects of bradykinin B2 receptor agonists with varying susceptibility to peptidases.* *Front. Pharmacol.* 6: 306-315.

Jean, M., Raghavan, A., Charles, M.L., Robbins, M.S., Wagner, E., Rivard, G.É., Charest-Morin, X., Marceau, F. (2016b). *The isolated human umbilical vein as a bioassay for kinin-generating proteases: an in vitro model for therapeutic angioedema agents.* *Life Sci.* 155: 180–188.

Jeong, Y.M., Oh, M.H., Kim, S.Y., Li, H., Yun, H.Y., Baek, K.J., Kwon, N.S., Kim, W.Y., Kim, D.S. (2010). *Indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase induces apoptosis in TCCSUP human urinary bladder carcinoma cells.* *Pharmazie.* 65(2) :122–126.

Jin, H., Li, Z., Takatori, S., Koyama, T., Jin, X., Zamami, Y., Kawasaki, H., Sun, P. (2016). *Vascular responses to compound 48/80 in rat mesenteric vascular beds.* *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94(6): 620-626.

Joesch, M., Mankus, D., Yamagata, M., Shahbazi, A., Shalek, R., Suissa-Peleg, A., Meister, M., Lichtman, J.W., Scheirer, W.J., Sanes, J.R. (2016). *Reconstruction of genetically identified neurons imaged by serial-section electron microscopy.* *eLife* 5: e15015.

Johnson, A.R., Erdös, E.G. (1973). *Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 1252-6.

Kahn, R., Hellmark, T., Leeb-Lundberg, L.M., Akbari, N., Todiras, M., Olofsson, T., Wieslander, J., Christensson, A., Westman, K., Bader, M., Muller-Esterl, W., Karpman, D. (2009). *Neutrophil-derived proteinase 3 induces kallikrein-independent release of a novel vasoactive kinin.* *J. Immunol.* 182: 7906-7915.

Kaplan, A.P., Joseph, K., Shibayama, Y., Reddigari, S., Ghebrehiwet, B., Silverberg, M. (1997). *The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation.* *Adv. Immunol.* 66: 225-272.

Kaplan, A.P., Joseph, K., Silverberg, M. (2002). *Pathways for Bradykinin Formation and Inflammatory Disease.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 195-209.

Kaplan, A.P., Silverberg, M. (1987). *The coagulation-kinin pathway of human plasma.* *Blood* 70: 1-15.

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.

- Keefe, A.D., Pai, S., Ellington, A. (2010). *Aptamers as therapeutics*. Nat. Rev. Drug Discov. 9(7): 537–550.
- Kelly, E., Bailey, C.P., Henderson, G. (2008). *Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization*. Br. J. Pharmacol. 153(Suppl. 1): S379-S338.
- Kimura, S. & Yoshioka, K. (2014). Parathyroid hormone and parathyroid hormone type-1 receptor accelerate myocyte differentiation. Sci. Rep. 4: 5066.
- Kirby, R., Ruoff, K. (1995). *Cost-effective, clinically relevant method for rapid identification of beta- hemolytic streptococci and enterococci*, J. Clin. Microbiol. 33(5): 1154-1157.
- Kolakowski, L.F. (1994) *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. Recept. Channels. 2: 1–7.
- Konno, K., Kazuma, K., Nihei, K. (2016). *Peptide toxins in solitary wasp venoms*. Toxins (Basel). 8(4):114.
- Koumbadinga, G. A., Désormeaux, A., Adam, A., Marceau, F. (2010). *Effect of interferon-gamma 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.
- Kratz, E. (2008). *Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*. J. Control Release. 132(3): 171-183.
- Kroeze, W.K., Sassano, M.F., Huang, X.P., Lansu, K., McCorvy, J.D., Giguere, P.M., Sciaky, N., Roth, B.L. (2015). *PRESTO-Tango as an open-source resource for interrogation of the druggable human GPCRome*. Nat. Struct. Mol. Biol. 22: 362-9.
- 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 arrestins in G protein-coupled receptor regulation*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38: 289-319.
- Kwok, H.F., Chen, T., O'Rourke, M., Ivanyi, C., Hirst, D., Shaw, C. (2008). *Helokinestatin: a new bradykinin B2 receptor antagonist decapeptide from lizard venom*. Peptides 29(1): 65-72.
- Lam, S.S., Martell, J.D., Kamer, K.J., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Mootha, V.K., Ting, A.Y. (2015). *Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling*. Nat. Methods 12: 51-54.

- 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.
- Levy, R.J., Lumry, W.R., McNeil, D.L., Li, H.H., Campion, M., Horn, P.T. (2010). *EDEMA4: a phase 3, double-blind study of subcutaneous ecallantide treatment for acute attacks of hereditary angioedema*. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 104: 523-529.
- 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.
- Linz, W., Wiemer, G., Gohlke, P., Unger, T., Schölkens, B.A. (1995). *Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors*. *Pharmacol. Rev.* 47: 25- 49.
- 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.
- Longhurst, H., Cicardi, M. (2012) *Hereditary angio-oedema*. *Lancet* 379: 474-81.
- Lumry, W.R., Farkas, H., Moldovan, D., Toubi, E., Baptista, J., Craig, T., Riedl, M. (2015). *Icatibant for Multiple Hereditary Angioedema Attacks across the Controlled and Open-Label Extension Phases of FAST-3*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 168(1): 44-55.
- Lupp, A., Klenk, C., Rocken, C., Evert, M., Mawrin, C., Schulz, S. (2010). *Immunohistochemical identification of the PTHR1 parathyroid hormone receptor in normal and neoplastic human tissues*. *Eur. J. Endocrinol.* 162(5): 979–986.
- 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.
- 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.
- Madkhali, T., Alhefdhi, A., Chen, H., Elfenbein, D. (2016). *Primary hyperparathyroidism*. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi.* 32(1): 58–66.
- Malbrán, A., Riedl, M., Ritchie, B., Smith, W.B., Yang, W., Banerji, A., Hébert, J., Hurewitz, D., Jacobson, K.W., Bernstein, J.A., Khan, D.A., Kirkpatrick, C.H., Resnick, D., Li, H., Fernandez-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): 544–553.
- 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, L.E. (1989). *Regulation of blood calcium in humans*. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 18: 601-610.
- Manolis, A.J., Marketou, M.E., Gavras, I., Gavras, H. (2010). *Cardioprotective properties of bradykinin: role of the B(2) receptor*. *Hypertens. Res.* 33: 112-123.
- 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., Hess, J.F., Bachvarov, D.R. (1998). *The B1 receptors for kinins*. *Pharmacol. Rev.* 50: 357-86.
- Marceau, F., Levesque, L., Drapeau, G., Rioux, F., Salvino, F.M., Wolfe, H.R., Seoane, P.R., Sawutz, D.G. (1994). *Effects of peptide and nonpeptide antagonists of bradykinin B2 receptors on the vasoconstrictor action of bradykinin*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 136-1143.
- 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.
- Mariscal, A., Garcia, A., Carnero, M., Gomez, E., Fernandez-Crehuet, J. (1994). *New toxicity determination method that uses fluorescent assay of Escherichia coli*. *Biotechniques* 16(5): 888- 892.

- Marketou, M., Kintsurashvili, E., Papanicolaou, K. N., Lucero, H. A., Gavras, I., Gavras, H. (2010). *Cardioprotective effects of a selective B2 receptor agonist of bradykinin post-acute myocardial infarct*. *Am. J. Hypertens.* 23(5): 562–568.
- 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.
- Martell, J.D., Deerinck, T.J., Sancak, Y., Poulos, T.L., Mootha, V.K., Sosinsky, G.E., Ellisman, M.H., Ting, A.Y. (2012). *Engineered ascorbate peroxidase as a genetically-encoded reporter for electron microscopy*. *Nat. Biotechnol.* 30: 1143–1148.
- Mayer, G., Bendayan, M. (1997). *Biotinyl-tyramide: a novel approach for electron microscopic immunocytochemistry*. *J. Histochem. Cytochem.* 45(11): 1449-54.
- McDonald, P. H., Lefkowitz, R. J. (2001). *Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions*. *Cellular Signalling* 13: 683–689.
- McCauley, L.K., Koh, A.J., Beecher, C.A., Rosol, T.J. (1997). *Proto-oncogene c-fos is transcriptionally regulated by parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein in a cyclic adenosine monophosphate-dependent manner in osteoblastic cells*. *Endocrinology* 138(12): 5427-5433.
- McNeil, B.D., Pundir, P., Meeker, S., Han, L., Udem, B.J., Kulka, M., Dong, X. (2015). *Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions*. *Nature* 519: 237-41.
- 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.
- Mekhaieel, D.N.A., Czajkowsky, D.M., Andersen, J.T., Shi, J., El-Faham, M., Doenhoff, M. (2011). *Polymeric human Fc-fusion proteins with modified effector functions*. *Sci. Rep.* 1:124.
- 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.
- Merlini, P.A., Cugno, M., Rossi, M.L., Agricola, P., Repetto, A., Fetiveau, R., Diotallevi, P., Canosi, U., Mannucci, P.M., Ardissino, D. (2004). *Activation of the contact system and inflammation after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction*. *Am. J. Cardiol.* 93: 822-825.

- Michel, M.C., Wieland, T., Tsujimoto, G. (2009). *How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies ?* Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 379(4): 385-8.
- 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. (2005a). *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. (2005b). *The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets.* J. Pharmacol. Sci. 99: 6–38.
- Mori, K., Sakamoto, W., Nagasawa, S. (1981). *Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. III. Cleavage of HMW kininogen by the action of human salivary kallikrein.* J. Biochem. 90: 503-509.
- Muller, F., Renne, T. (2008). *Novel roles for factor XH-driven plasma contact activation system.* Curr Opin Hematol 15:516-21.
- 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.
- Neo, J.H., Malcontenti- Wilson, C., Muralidharan, V. (2007). *Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in a mouse model of colorectal cancer liver metastases.* J. Gastroenterol. Hepatol. 22(4): 577–84.
- 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 adenylate cyclase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 6516-6520.

- O'Rourke, M., Chen, T., Hirst, D.G., Rao, P., Shaw, C. (2004). *The smooth muscle pharmacology of maximakinin, a receptor-selective bradykinin-related nonadecapeptide from the venom*. Reg. Pept. 121: 65-72.
- Osagie-Clouard, L., Sanghani, A., Coathup, M., Briggs, T., Bostrom, M., Blunn, G. (2017). *Parathyroid hormone 1-34 and skeletal anabolic action: The use of parathyroid hormone in bone formation*. Bone Joint Res. 6(1): 14-21.
- Osborn, B.L., Olsen, H.S., Nardelli, B., Murray, J.H., Zhou, J.X., Garcia, A., Moody, G., Zaritskaya, L.S., Sung, C. (2002). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 303: 540-548.
- Paek, J., Kalocsay, M., Staus, D.P., Wingler, L., Pascolutti, R., Paulo, J.A., Gygi, S.P., and Kruse, A.C. (2017). *Multidimensional Tracking of GPCR Signaling via Peroxidase-Catalyzed Proximity Labeling*. Cell. 169: 338–349.
- 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.
- Panowski, S., Bhakta, S., Raab, H., Polakis, P., Junutula, J.R. (2014). *Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy*. MAbs. 6(1): 34–45.
- Parks, A., Charest-Morin, X., Boivin-Welch, M., Bouthillier, J., Marceau, F. (2015). *Autophagic flux inhibition and lysosomogenesis ensuing cellular capture and retention of the cationic drug quinacrine in murine models*. PeerJ 3: e1314.
- Penna, C.M., Mancardi, D., Rastaldo, R., Losano, G., Pagliaro, P. (2007). *Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling*. Cardiovasc. Res. 75(1): 168-177.
- 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.
- Pioszak, A.A., Parker, N.R., Gardella, T.J., Xu, H.E. (2009). *Structural basis for parathyroid hormone-related protein binding to the parathyroid hormone receptor and design of conformation-selective peptides*. J. Biol. Chem. 284: 28382-28391.
- Pisano, J.J. (1968). *Vasoactive peptides in venoms*. Fed Proc. 27(1): 58–62.
- Potier, L., Waeckel, L., Vincent, M. P., Chollet, C., Gobeil, F., Marre, M. (2013). *Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 346(1): 23–30.

- Potts, J.T. (2005). *Parathyroid hormone: past and present*. J. Endocrinol. 187(3):311–325.
- 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.
- Pretorius, M., Rosenbaum, D., Vaughan, D.E., Brown, N.J. (2003). *Angiotensin converting enzyme inhibition increases human vascular-type plasminogen activator release through endogenous bradykinin*. Circulation 107: 579–585.
- 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*. Immunopharmacol. 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.
- Reddigari, S.R., Kaplan, A.P. (1989). *Monoclonal antibody to human high-molecular-weight kininogen recognizes its prekallikrein binding site and inhibits its coagulant activity*. Blood 74: 695-702.
- 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.
- Robinson, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W. (1967). *Adenyl cyclase as an adrenergic receptor*. Ann. NY Acad. Sci. 139: 703.

- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, H.M.J. (1971) *The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membrane of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action.* J. Biol Chem. 246: 1877-1882.
- Rodrigues, K.P., Souza, P.A., Lima, P.M., Dutra, W.O., Corrêa, H., Roma, M.A. (2005). *Expression of D3 and D4 dopamine receptors in leukocytes is related to schizophrenic symptoms.* Schizophr. Res. 80(2-3): 363-365.
- Ross, E.M, Gilman, A.G. (1977). *Resolution of some components of adenylate 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.
- Shcherbakova , D.M., Verkhusha, V.V. (2013). *Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging.* Nat. Methods. 10(8): 751–754.
- 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.
- Schneider, L., Lumry, W., Vegh, A., Williams, A.H., Schmalbach, T. (2007) *Critical role of kallikrein in hereditary angioedema pathogenesis: a clinical trial of ecallantide, a novel kallikrein inhibitor.* J. Allergy. Clin. Immunol. 120: 416-422.
- Schulte, S. (2008). *Use of albumin fusion technology to prolong the half-life of recombinant factor VIIa.* Thromb. Res. 122: S14-S19.
- Schroeder, C., Beug, H., Muller-Esterl, W. (1997). *Cloning and functional characterization of the omithokinin receptor. Recognition of the major kinin receptor antagonist, HOE 140, as a full agonist.* J. Biol. Chem. 272: 12475-81.

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.

Sheffer, A.L., Austen, K.F., Rosen, F.S. (1972). *Tranexamic acid therapy in hereditary angioneurotic edema.* *N. Engl. J. Med.* 287: 452-454.

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.

Sevcik, M.A., Ghilardi, J.R., Halvorson, K.G., Lindsay, T.H., Kubota, K., Mantyh, P.W. (2005). *Analgesic efficacy of bradykinin B1 antagonists in a murine bone cancer pain model.* *J. Pain.* 6(11): 771–775.

Shoback, D.M., Bilezikian, J.P., Costa, A.G., Dempster, D., Dralle, H., Khan, A.A. (2016). *Presentation of hypoparathyroidism: etiologies and clinical features.* *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101(6): 2300–2312.

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.

Shimizu, M., Joyashiki, E., Noda, H., Watanabe, T., Okazaki, M., Nagayasu, M., Adachi, K., Tamura, T., Potts, J.T., Gardella, T.J., Kawabe, Y. (2016). *Pharmacodynamic actions of a long-acting PTH analog (LA-PTH) in thyroparathyroidectomized (TPTX) rats and normal monkeys.* *J. Bone Miner. Res.* 31(7): 1405–1412.

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.

Sleep, D. (2015). *Albumin and its application in drug delivery.* *Expert Opin. Drug Deliv.* 12(5): 193-812.

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

Smith, L.L., Mosley, J.F. 2nd, Parke, C., Brown, J., Barris, L.S., Phan, L.D. (2016). *Dulaglutide (Trulicity): The Third Once-Weekly GLP-1 Agonist*. P T. 41: 357–360.

Spillmann, F., Graiani, G., Van Linthout, S., Meloni, M., Campesi, I., Lagrasta, C., Westermann, D., Tschöpe, C., Quaini, F., Emanuelli, C., Madeddu, P. (2006). *Regional and global protective effects of tissue kallikrein gene delivery to the peri-infarct myocardium*. Regen. Med. 1: 235- 54.

Squire, I.B., O’Kane, K.P., Anderson, N., Reid, J.L. (2000). *Bradykinin B₂ receptor antagonism attenuates blood pressure response to acute angiotensin-converting enzyme inhibition in normal men*. Hypertension 36: 132–136.

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.

Straka, B.T., Ramirez, C.E., Byrd, J.B., Stone, E., Woodgard-Grice, A., Nian, H., Banerji, A., Brown, N.J. (2017). *Effect of bradykinin receptor antagonism on ACE inhibitor-associated angioedema*. J. Allergy Clin. Immunol. 140(1): 232-248.

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

Strohl, W.R. (2015). *Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters*. BioDrugs. 29(4): 215–239.

Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. (1999). *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. Protein Eng. 12: 439-446.

Sung, C., Nardelli, B., LaFleur, D.W., Blatter, E., Corcoran, M., Olsen, H.S., Birse, C.E., Pickeral, O.K., Zhang, J., Shah, D., Moody, G., Gentz, S., Beebe, L., Moore, P.A. (2003). *An IFN-β-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates*. J. Interferon Cytokine Res. 23: 25-36.

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

Szymanski, C.J., Yi, H., Liu, J.L., Wright, E.R., Payne, C.K. (2013). *Imaging intracellular quantum dots: fluorescence microscopy and transmission electron microscopy*. Methods Mol. Biol.1026: 21–33.

Taddei, S., Bortolotto, L. (2016). *Unraveling the pivotal role of Bradykinin in ACE inhibitor activity*. Am. J. Cardiovasc. Drugs. 16(5): 309–321.

Tarzi, M.D., Hickey, A., Forster, T., Mohammadi, M., Longhurst, H.J. (2007). *An evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 Inhibitor Deficiency*:

Normal serum C4 does not exclude hereditary angioedema. *Clin. Exp. Immunol.* 49: 513-516.

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.* *Am. J. Nephrol.* 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.

Veitch, N.C. (2004). *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme.* *Phytochemistry.* 65(3): 249–259.

Vlasova, I.M., Saletsky, A.M. (2009). *Study of the denaturation of human serum albumin by sodium dodecyl sulfate using the intrinsic fluorescence of albumin.* *Appl. Spectrosc.* 76(4): 536-541.

Wardman, P. (2002). *Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: a new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy.* *Curr. Pharm. Des.* 8(15): 1363–1374.

Watanabe, A., Yoneyama, S., Nakajima, M., Sato, N., Takao-Kawabata, R., Isogai, Y. (2012). *Osteosarcoma in Sprague-Dawley rats after long-term treatment with teriparatide (human parathyroid hormone (1-34)).* *J. Toxicol. Sci.* 37(3):617–629.

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.

Whalley, E.T., Figueroa, C.D., Gera, L., Bhoola, K.D. (2012). *Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists*. Expert Opin. Drug Discov. 7(12): 1129-1148.

Woycechowsky, K.J., Raines, R.T. (2002). *Native disulfide bond formation in proteins*. Curr. Opin. Chem. Biol. 4: 533-539.

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*. J. Biol. Chem. 271: 24371–24381.

Xi, X., Bin, L., Tianbao, C., Kwok, H.F. (2015) *A review on bradykinin-related peptides isolated from amphibian skin secretion*. Toxins (Basel) 7(3): 851-970.

Yamamoto, T., Kambe, F., Cao, X., Lu, X., Ishiguro, N., Seo, N. (2006). *Parathyroid hormone activates phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bad cascade in osteoblast-like cells*. Bone 40(2): 354-359.

Yasuhara, T., Ishikawa, O., Nakajima, T., Araki, K., Tachibana, S. (1979). *The studies on the active peptide on smooth muscle in the skin of Rana rugosa, Thr6-Bradykinin and its analogous peptide, ranakinin-R*. Chem. Pharm. Bull. 27: 486-91.

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.

Yang, R., Hoang, B.H., Kubo, T., Kawano, H., Chou, A., Sowers, R., Huvos, A.G., Meyers, P.A., Healey, J.H., Gorlick, R. (2007). *Over-expression of parathyroid hormone Type 1 receptor confers an aggressive phenotype in osteosarcoma*. Int. J. Cancer. 121(5): 943–54.

Yu F.Y., Vdovenko M.M., Wang J.J., Sakharov I.Y. (2011). *Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of ochratoxin A in food*. J. Agric. Food Chem. 59(3): 809–813.

Yu, K., Liu, C., Kim, B.G., Lee, D.Y. (2015) *Synthetic fusion protein design and applications*. Biotechnol. Adv. 33(1): 155-164.

Zhang, H.C., Karata, K., Matsushita, K., Takahashi, S., Tong, X.B., Lu, J., Zhu, C.L., Sugaya, S., Suzuki, T., Suzuki, N. (2005). *Leupeptin-sensitive proteases involved in cell survival after X-ray irradiation in human R5a cells*. Cell. Biol. Int. 29: 662-8.

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.

Zhang, Q.Y., Chen, H., Lin, Z., Lin, J.-M. (2012). *Comparison of chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic microparticles with traditional colorimetric ELISA for the detection of serum α -fetoprotein*. J. Pharm. Anal. 2(2): 130–135.

Zhang, Z., Amouroux, G., Pan, J., Jenni, S., Zeisler, J., Zhang, C., Liu, Z., Perrin, D.M., Bénar, F., Lin, K.S. (2016). *Radiolabeled B9958 Derivatives for Imaging Bradykinin B1 Receptor Expression with Positron Emission Tomography: Effect of the Radiolabel-Chelator Complex on Biodistribution and Tumor Uptake*. Mol. Pharm. 13(8): 2823-2832.

Zhao, S., Zhu, Q., Somerville, R.L. (2000). *The (70) transcription factor TyrR has zinc-stimulated phosphatase activity that is inhibited by ATP and tyrosine*. J. Bacteriol. 182(4): 1053-1061.

Zuraw, B.L. (2008). *Clinical practice. Hereditary angioedema*. N. Engl. J. Med. 359:1027-1036.

ANNEXE I

Articles revus par les pairs publiés par l'auteur et couverts par la thèse

Charest-Morin, X., Poubelle, P.E., Marceau, F. (2017). *Production and evaluation of parathyroid hormone receptor1 ligands with intrinsic or assembled peroxidase domains*. Sci. Rep. Article sous presse.

Charest-Morin, X., Lodge, R., Marceau, F. (2017). *Bifunctional fusion proteins containing the sequence of the bradykinin homologue maximakinin at their C-termini: activities at the rat bradykinin B2 receptor*. Article soumis à Frontiers in pharmacology.

Charest-Morin X, Bachelard H, Jean M, Marceau F. (2017). *Species-specific pharmacology of maximakinin, an amphibian homologue of bradykinin: putative prodrug activity at the human B2 receptor and peptidase resistance in rats*. PeerJ. 5: e2911.

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.

Autres articles revus par les pairs publiés par l'auteur

Fortin, S., Charest-Morin, X., Turcotte, V., Lauvaux, C., Lacroix, J., Côté, M.F., Gobeil, S., C-Gaudreault, R. (2017). *Activation of Phenyl 4-(2-Oxo-3-alkylimidazolidin-1-yl)benzenesulfonates Prodrugs by CYP1A1 as New Antimitotics Targeting Breast Cancer Cells*. J. Med. Chem. 60(22): 4963-4982.

Gera, L., Charest-Morin, X., Jean, M., Bachelard, H., Marceau, F. (2016). *Infrared-emitting, peptidase-resistant fluorescent ligands of the bradykinin B2 receptor: application to cytofluorometry and imaging*. BMC Res. Notes 9(1): 452

Jean, M., Gera, L., Charest-Morin, X., Marceau, F., Bachelard, H. (2016). *In vivo effects of bradykinin B2 receptor agonists with varying susceptibility to peptidases*. Front. Pharmacol. 6: 306-315.

Jean, M., Raghavan, A., Charles, M.L., Robbins, M.S., Wagner, E., Rivard, G.É., Charest-Morin, X., Marceau, F. (2016). *The isolated human umbilical vein as a bioassay for kinin-generating proteases: an in vitro model for therapeutic angioedema agents*. Life Sci. 155: 180–188.

Charest-Morin, X., Marceau, F. (2016). *Biotechnological fluorescent ligands of the bradykinin B₁ receptor: protein ligands for a peptide receptor*. PLoS One 11: e0148246.

Parks, A., Charest-Morin, X., Boivin-Welch, M., Bouthillier, J., Marceau, F. (2015). *Autophagic flux inhibition and lysosomogenesis ensuing cellular capture and retention of the cationic drug quinacrine in murine models*. PeerJ 3: e1314.

Charest-Morin, X., Roy, C., Fernandes, M.J., Marceau, F. (2015). *Pharmacological profile of a bifunctional ligand of the formyl peptide receptor1 fused to the myc epitope*. Int. Immunopharmacol. 25(1): 229-234.

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. 3(2):e00119.

Charest-Morin, X., Roy, C., Fortin, E.J., Bouthillier, J., Marceau, F. (2014). *Pharmacological evidence of bradykinin regeneration from extended sequences that behave as peptidase-activated B₂ receptor agonists*. Front. Pharmacol. 5: 32-47.

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.

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

Charest-Morin, X., Fortin, J.P., Bawolak, M.T., 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.

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.

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].

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.