



**NOUVEAUX LIGANDS DU RÉCEPTEUR B<sub>2</sub> DE  
LA BRADYKININE :  
Endocytose dirigée et catabolisme sélectif**

**Mémoire**

**Caroline Roy**

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

Québec, Canada

© Caroline Roy, 2013



## RÉSUMÉ

Les récepteurs  $B_2$  ( $RB_2$ ) sont impliqués dans une multitude de réponses cellulaires notamment reliées à l'inflammation. Les  $RB_2$  font partie du système kallikréine-kinine qui est en relation directe avec les composantes du système rénine-angiotensine. Une des composantes de ce dernier est l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui métabolise la bradykinine (BK) et la rend inactive. Un premier volet des travaux visait à étudier et caractériser de nouveaux agonistes du  $RB_2$  qui sont prolongés en amino-terminal (N-terminal) ou conjugués à un épitope myc. Ces constructions révèlent de nouveaux outils d'imagerie cellulaire et permettent d'entrevoir la possibilité de pouvoir larguer un médicament conjugué aux ligands endogènes. Dans une seconde partie des travaux, un des agonistes prolongés en N-terminal, la cétirizine- $\epsilon$ -aminocaproyl-BK (CTZ- $\epsilon$ ACA-BK) et un peptide produit par le neutrophile humain (Met-Lys-BK-Ser-Ser) sont employés pour mettre à l'épreuve l'étendue du catabolisme de l'ECA. Seule Met-Lys-BK-Ser-Ser s'est révélée être un substrat fonctionnel de l'ECA.



# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES .....	ix
ABBREVIATIONS .....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xv
1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Le système rénine-angiotensine (SRA) .....	1
<b>1.1.1 L'angiotensinogène</b> .....	3
<b>1.1.2 La rénine</b> .....	3
<b>1.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (L'ECA)</b> .....	4
<b>1.1.4 L'angiotensine II</b> .....	5
1.2 Le système kallikréine-kinine(SKK) .....	6
<b>1.2.1 Les kininogènes</b> .....	6
<b>1.2.2 Les kallikréines</b> .....	8
<b>1.2.3 Les kinines</b> .....	8
<b>1.2.4 Le métabolisme des kinines</b> .....	10
<b>1.2.5 Les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines</b> .....	14
1.3 Interactions entre le SKK et le SRA .....	17
1.4 La famille des récepteurs couplés aux protéines G .....	18
<b>1.4.1 Activation et signalisation des RCPGs</b> .....	19
<b>1.4.2 Désensibilisation et endocytose des RCPGs</b> .....	22
<b>1.4.3 Dégradation et recyclage des RCPGs</b> .....	25
<b>1.4.4 Le récepteur B<sub>2</sub> des kinines</b> .....	29
<b>1.4.5 Récepteurs de l'histamine</b> .....	35
1.5 Objectifs des travaux .....	37
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	39
2.1 Synthèse peptidique .....	39
<b>2.1.1 Peptides fluorescents</b> .....	39
<b>2.1.2. Peptides détenant un épitope myc</b> .....	40
<b>2.1.3 Peptides cargos</b> .....	40

<b>2.1.4 Met-Lys-BK-Ser-Ser</b> .....	41
2.2 Culture cellulaire et transfections .....	41
2.3 Microscopie à fluorescence.....	42
2.4 Essais de contractilité .....	43
<b>2.4.1 Mesure de l'activité antagoniste des ligands</b> .....	44
<b>2.4.2 Études de ligands agonistes du RB<sub>2</sub> présentant une extension en N-terminal</b> .....	44
<b>2.4.3 Études de la Met-Lys-BK-Ser-Ser</b> .....	45
<b>2.4.4 Études du ligand latent du récepteur H<sub>1</sub> libéré à partir de CTZ-ε-ACA-BK</b> .....	46
2.5 Essais de liaison .....	47
2.6 Fractionnement cellulaire .....	48
2.7 Essai enzymatique .....	49
3. RÉSULTATS .....	50
3.1 Peptides détenant une extension en N-terminal .....	50
3.2 Étude des nouvelles versions fluorescentes des peptides B-9430 et B-9972 .....	51
<b>3.2.1 Caractérisation pharmacologique des ligands fluorescents FTC du RB<sub>2</sub></b> .....	51
3.3 Étude de la liaison ligand-récepteur des agonistes détenant un épitope myc.....	55
<b>3.3.1 Caractérisation pharmacologique de myc-KGP-BK et myc-KGP-B-9972</b> .....	55
<b>3.3.2 Évaluation de la complémentarité moléculaire des agonistes détenant un épitope myc</b> .....	57
<b>3.3.3. Effet d'une pré-incubation anticorps-agoniste</b> .....	63
<b>3.3.4 Désensibilisation modifiée du RB<sub>2</sub>-GFP</b> .....	63
3.4 Étude de peptides analogues à la BK : addition de cargos fonctionnels.....	68
<b>3.4.1 Étude pharmacologique des peptides cargos</b> .....	68
<b>3.4.2 Confirmation de la nature agoniste des peptides cargos</b> .....	70
<b>3.4.3 Exploitation en épifluorescence du peptide AF350-ε-ACA-BK</b> .....	70
3.5 Évaluation additionnelle du peptide cargo CTZ-ε-ACA-BK comme ligand direct ou latent du RH <sub>1</sub> .....	75
<b>3.5.1 Caractérisation de la liaison de CTZ-ε-ACA-BK à deux récepteurs impliqués dans l'inflammation</b> .....	75
<b>3.5.2 Essais de liaison testant une activation métabolique de la CTZ-ε-ACA-BK</b> .....	76
<b>3.5.3 Essais de contractilité</b> .....	78
3.6 Caractérisation de Met-Lys-BK-Ser-Ser.....	83
<b>3.6.1 Mesure de l'affinité de Met-Lys-BK-Ser-Ser pour deux cibles pharmacologiques principales présentes dans les vaisseaux sanguins</b> .....	83
<b>3.6.2 Mesure de l'activité des deux sites actifs de l'ECA par essai enzymatique</b> .....	85

<b>3.6.3 Essais de contractilité basés sur deux systèmes biologiques : la veine ombilicale humaine et la veine jugulaire de lapin</b> .....	85
4. DISCUSSION.....	91
4.1 Caractérisation des peptides détenant une extension en N-terminal.....	91
<b>4.1.1 Paire agoniste/antagoniste de ligands fluorescents FTC</b> .....	92
<b>4.1.2 Peptides bifonctionnels liant un récepteur et un anticorps</b> .....	93
<b>4.1.3 Peptides cargos : molécules cycliques</b> .....	95
4.2 Exploitation de systèmes biologiques et cellulaires pour libérer un peptide actif.....	96
<b>4.2.1 Évaluation de la libération de cétirizine de manière enzymatique</b> .....	96
<b>4.2.2 Nouveau substrat endogène de l'ECA : Met-Lys-BK-Ser-Ser</b> .....	98
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	101
BIBLIOGRAPHIE .....	105
ANNEXE.....	123



# LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

## Tableaux

**Tableau 1.** Séquences alignées des substitutions effectuées et des acides aminés des peptides détenant une extension en N-terminal comparés aux peptides parents ..... 50

**Tableau 2.** Valeurs d'affinité ( $IC_{50}$ ) et de puissance contractile ( $EC_{50}$ ) de la Met-Lys-BK-Ser-Ser et de la BK pour différentes cibles moléculaires et biologiques. .... 89

## Figures

**Figure 1.** Résumé schématique du système rénine-angiotensine (SRA) classique... ..... 2

**Figure 2.** Résumé schématique du système kallikréine-kinine. .... 7

**Figure 3.** Représentation schématique des enzymes principales dégradant la bradykinine..... 12

**Figure 4.** Représentation des processus de désensibilisation et de l'endocytose médié par le complexe associé à la  $\beta$ -arrestine..... 25

**Figure 5.** Représentation des voies de dégradation ou de recyclage lors de l'internalisation médiée par les molécules de clathrine..... 28

**Figure 6.** Représentation de l'action moléculaire de la cétirizine (agoniste inverse) sur le récepteur  $H_1$  de l'histamine.. ..... 37

**Figure 7.** Relation des séquences des agonistes détenant un épitope myc avec la maximakinine. .... 51

**Figure 8.** Compétition de la liaison de 3 nM de [ $^3H$ ]BK sur des HEK293-RB<sub>2</sub>-GFP par les peptides B-9972, B-9430 et leur analogues fluorescents..... 53

**Figure 9.** Essais de contractilité basés sur la veine ombilicale humaine de l'agoniste FTC-B-9972 et de l'antagoniste FTC-B-9430. .... 54

<b>Figure 10.</b> Distribution de la fluorescence des peptides FTC-B-9972 et FTC-B-9430 sur différents RB <sub>2</sub> recombinants.....	56
<b>Figure 11.</b> Essais de contractilité de la veine ombilicale humaine, un essai biologique pour mesurer la puissance des ligands du RB <sub>2</sub> détenant une séquence myc.....	58
<b>Figure 12.</b> Essais de compétition du radioligand [ <sup>3</sup> H]bradykinine au RB <sub>2</sub> conjugué à une protéine verte fluorescente par différents ligands non radiomarqués .....	59
<b>Figure 13.</b> Liaison de l'anticorps monoclonal anti-myc conjugué avec le fluorophore AlexaFluor 488 à des cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec myc-RB <sub>2</sub> ou le RB <sub>2</sub> de type sauvage.....	60
<b>Figure 14.</b> Endocytose de RB <sub>2</sub> de type sauvage de lapin exprimé par des cellules HEK 293a transfectées transitoirement médiée par une stimulation par différents agents pharmacologiques.....	62
<b>Figure 15.</b> Influence d'une pré-incubation de 15 min de l'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 avec le peptide myc-KGP-B-9972 sur la présence de fluorescence intracellulaire.....	64
<b>Figure 16.</b> Effets d'une pré-incubation de 15 min de l'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 avec le peptide myc-KGP-B-9972 sur deux systèmes impliquant le RB <sub>2</sub> .....	65
<b>Figure 17.</b> Endocytose et recyclage du RB <sub>2</sub> -GFP stimulé par la BK ou myc-KGP-B9972.....	67
<b>Figure 18.</b> Représentation d'un complexe tétramoléculaire : anticorps (anti-myc-AF488), agoniste (myc-KGP-B-9972), récepteur (RB <sub>2</sub> de type sauvage de lapin) et une arrestine ( $\beta$ -arrestin <sub>1</sub> -cherryFP). .....	69
<b>Figure 19.</b> Effets des différentes extensions en N-terminal de la BK (AF350- $\epsilon$ -ACA-BK, FeC- $\epsilon$ -ACA-BK et CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK) lors des essais de contractilité et de liaison. ....	71
<b>Figure 20.</b> Confirmation du statut d'agoniste pour les différents peptides cargos par stimulation de cellules exprimant stablement le RB <sub>2</sub> -GFP.....	72
<b>Figure 21.</b> Présence simultanée d'une protéine impliquée dans le processus d'endocytose ( $\beta$ -arrestine <sub>2</sub> -GFP ou EEA1-FYVE-GFP) et du peptide AF350- $\epsilon$ -ACA-BK dans des cellules HEK 293a co-transfectées .....	74
<b>Figure 22.</b> Caractérisation du RH <sub>1</sub> ou du myc-RB <sub>2</sub> exprimé transitoirement par des cellules CHO.....	77

<b>Figure 23.</b> Histogrammes représentant les effets d'une pré-incubation de CTZ-ε-ACA-BK avec des cellules HEK 293 RB <sub>2</sub> -GFP ou HEK 293a ECA lors d'essais de compétition de la liaison de 2 nM de [ <sup>3</sup> H]pyrilamine aux RH <sub>1</sub> exprimés par des cellules CHO. ....	80
<b>Figure 24.</b> Vérification de l'inhibition spécifique de la cétirizine sur la contraction induite par l'histamine par la réalisation du protocole 1 sur la veine ombilicale humaine.....	81
<b>Figure 25.</b> Antagonisme de l'histamine par CTZ-ε-ACA-BK dans la veine ombilicale humaine et dépendance possible de cet antagonisme de peptidases endogènes. ....	82
<b>Figure 26.</b> Essais de compétition de la Met-Lys-BK-Ser-Ser et de la bradykinine effectués sur des cellules HEK 293 transfectées stablement avec le RB <sub>2</sub> -GFP ou transitoirement avec l'ECA.. ....	84
<b>Figure 27.</b> Compétition de l'hydrolyse de Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH par la BK et la Met-Lys-BK-Ser-Ser dans des essais enzymatiques basés sur les deux mutants de l'ECA. L'énalaprilate, un inhibiteur de l'ECA, empêche l'hydrolyse du substrat fluorogénique.....	86
<b>Figure 28.</b> Essais de contractilité de la veine ombilicale humaine, un essai biologique pour mesurer la puissance de contraction de Met-Lys-BK-Ser-Ser.....	88
<b>Figure 29.</b> Essais de contractilité de la veine jugulaire de lapin, un essai biologique pour mesurer la puissance de contraction de Met-Lys-BK-Ser-Ser.....	89



## ABBREVIATIONS

<sup>3</sup> H	Tritium
AF	AlexaFluor
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang-(1-7)	Angiotensine 1-7
Ang-(1-9)	Angiotensine 1-9
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
APN	Aminopeptidase N
APP	Aminopeptidase P
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Asparagine
AT <sub>1</sub>	Récepteur de l'angiotensine II type 1
AT <sub>2</sub>	Récepteur de l'angiotensine II type 2
β-arr	β-arrestine
BAR	Bin–Amphiphysin–Rvs
BE	Boucle extracellulaire
BI	Boucle intracellulaire
BK	Bradykinine
B <sub>max</sub>	Nombre maximal de sites de liaison
CCSTC	Carcinome des cellules squameuses de la tête et du cou
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
Ci	Curie
Cl	Chlorure
cm	Centimètre
COOH	Groupement carboxyle
COX	Cyclo-oxygénase
CpG	α-cyclopentylglycine
CPM	Carboxypeptidase M
CPN	Carboxypeptidase N
C-terminale	Carboxy terminale
CTZ	Cétirizine
D-	Dextrogyre
DAG	Diacylglycérol
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
DIPP IV	Dipeptidyl peptidase IV
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
E	Histidine
ε-ACA	ε-aminocaproyl
EC <sub>50</sub>	Concentration efficace médiane
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EEA1	<i>Early endosomal autoantigen 1</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPN	Endopeptidase neutre

ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	fluorescéine-5-isothiocyanate
FeC	Ferrocényl
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Electron Transfert</i>
FTC	N $\alpha$ -fluorescéine-thiocarbamoyle ou fluorescéine-5-thiocarbamoyle
G, Gly	Glycine
g	Gramme
G $\alpha$	Sous-unité alpha de la protéine G
GDP	Guanidine diphosphatase
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRK	<i>G-protein coupled receptor kinase</i>
GTP	Guanidine triphosphatase
h	Heure
HEK	<i>Human epithelial kidney cells</i>
Hyp	<i>trans</i> -4-hydroxyproline
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane
Igl	$\alpha$ -(2-indanyl)glycine
IL-1 $\beta$	Interleukine-1 $\beta$
Ile	Isoleucine
INF- $\gamma$	Interféron gamma
IP3	Inositol triphosphate
JAK	<i>Janus kinase</i>
K, Lys	Lysine
Kd	Constante de dissociation à l'équilibre
kDa	Kilodalton
KBPM	Kininogène de bas poids moléculaire
kg	Kilogramme
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
KP	Kallikréine plasmatique
KT	Kallikréine tissulaire
Leu	Leucine
Lys-BK	Lys-bradykinine ou kallidine
Lys-des-Arg <sup>9</sup> -BK	Lys-des-Arg <sup>9</sup> -bradykinine
M 199	<i>Medium 199</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Met	Méthionine
mg	Miligramme
min	Minute
M-K-BK-S-S	Met-Lys-bradykinine-Ser-Ser
ml	Millilitre
mm	Milimètre
mmol	Milimole
MMP-9	<i>Matrix metalloproteinases 9</i>
MVB	<i>Multivesicular body</i>

NaOH	Hydroxyde de sodium
NEP	Endopeptidase neutre
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
N-terminale	Amino terminale
Oic	acide (3 $\alpha$ s, 7 $\alpha$ s)-octahydroindole-2-carboxylique
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
P53	Protéine tumorale 53
PC	Phosphatidyl choline
Phe	Phénylalanine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKK	Prékallikréine
PLA2	Phospholipase A2
PLC $\beta$	Phospholipase C $\beta$
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
POP	Prolyl oligopeptidase
PRKP	Peptidase reliée à la kallikréine plasmatique
PRMC	Puits recouvert d'un manteau de clathrine
Pro	Proline
PTH1	<i>Parathyroid hormone receptor 1</i>
RB <sub>1</sub>	Récepteur B <sub>1</sub> des kinines
RB <sub>2</sub>	Récepteur B <sub>2</sub> des kinines
RH <sub>1</sub>	Récepteur H <sub>1</sub> de l'histamine
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
s	Seconde
Ser	Sérine
SKK	Système kallikréines-kinines
SNX-9	<i>Sorting nexin-9</i>
SRA	Système rénine-angiotensine
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
t <sub>1/2</sub>	Demi-vie
Thr	Thréonine
TM	Domaines Transmembranaires
(TNF)- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
$\mu$ g	Microgramme
$\mu$ l	Microlitre
$\mu$ M	Micromolaire
uPAR	<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i>
USP	<i>Ubiquitin-specific peptidase</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine



# REMERCIEMENTS

Pour ces études de maîtrise, j'ai eu une énorme chance de travailler dans le laboratoire du Dr. François Marceau et je le remercie d'avoir pu me guider dans les méandres de la science fondamentale. J'ai singulièrement adoré rencontrer un homme qui est passionné par son travail, persistant, toujours à l'affût des nouvelles percées scientifiques et sans cesse en génération d'idées. De plus, j'admire sa disponibilité infaillible et le fait qu'il soit toujours prêt à discuter et à argumenter si oui ou non une future expérience est viable! Je ne pouvais souhaiter rien de mieux pour mes études.

Incontournable Johanne, sans toi je n'aurais pas autant apprécié les nuances des exécutions techniques avec tous tes conseils dans le laboratoire et avoir pu observé de la rigueur, du dévouement, de l'excellence et du savoir-faire dans les manipulations lors des expériences. Je pense toujours à toi, même si tu es présentement absente. En plus de l'aide apportée, j'ai adoré te côtoyer, recevoir tes conseils, discuter de la vie et je vais chérir ses moments. Merci pour ton soutien constant.

J'aimerais aussi remercier Marie-Thérèse Bawolak, avec qui j'ai eu de bons moments (Bonne continuité à Ottawa), Xavier Charest-Morin, à qui j'aimerais souhaiter bonne chance dans ses études de maîtrise. De plus, il y a tellement de personnes à remercier, en ce qui concerne les collaborations, que j'en nommerai que quelques-unes, notamment le Dr. Lajos Gera du Colorado pour la synthèse de nombreux peptides, le Dr. Marc Pouliot qui nous a laissé utiliser son microscope et tous les membres du Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie (CRRI).

Finalement, je remercie ma maman, mon papa et ma petite soeur que j'aime énormément et qui me soutiendront toujours. Un gros merci pour mon conjoint Guillaume qui me soutient et m'encourage tous les jours dans mes études. Je t'aime.

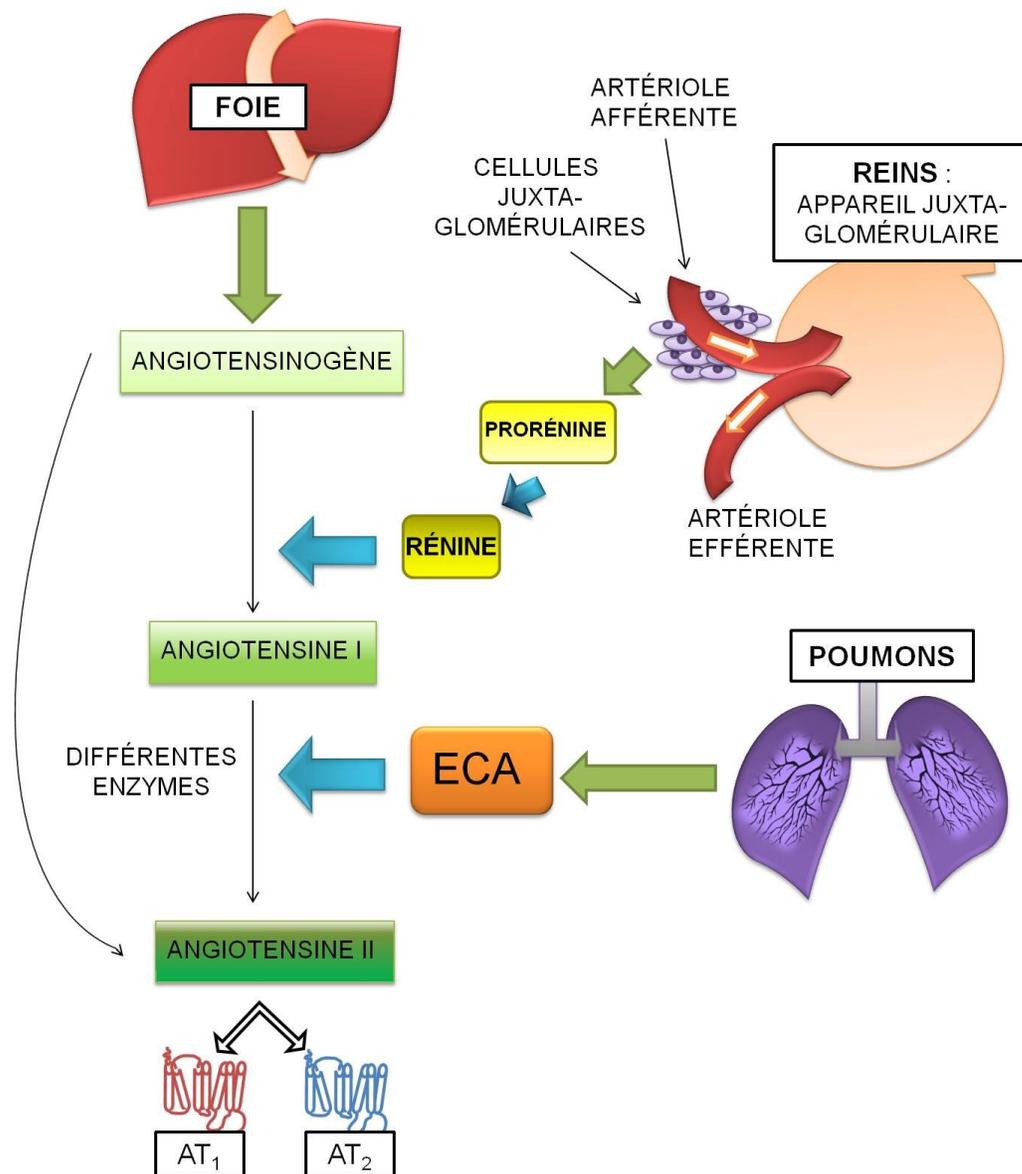


# 1. INTRODUCTION

Le système kallikréine-kinine (SKK) et le système rénine-angiotensine (SRA) agissent de concert pour balancer l'équilibre de la pression sanguine et des fonctions rénales. Il existe une protéine partagée par les deux systèmes : l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui hydrolyse la bradykinine (BK) provenant du SKK et l'angiotensine I (Ang I) du SRA pour engendrer la vasodilatation et la vasoconstriction respectivement. Ces deux systèmes permettent un équilibre des fonctions vasculaires. Les présents travaux précisent certains aspects concernant ces deux systèmes.

## 1.1 Le système rénine-angiotensine (SRA)

Le SRA est un système régulant certains des aspects les plus importants du corps humain; les réponses cellulaires qu'il engendre sont cruciales pour maintenir une multitude de fonctions cardiovasculaires, rénales et adrénaliennes (figure 1) (Underwood et Adler, 2013). Cette cascade hormonale est composée de plusieurs acteurs protéiques dont les principaux sont le précurseur peptidique de l'angiotensine I : l'angiotensinogène, des enzymes : la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et les 2 effecteurs (hormonal et peptidique) résultant de cette cascade protéique : l'aldostérone et l'angiotensine II (Carey et Siragy, 2003). À cet égard, l'aldostérone est un élément majeur du système, qui est produit par l'action de l'angiotensine II sur le cortex de la glande surrénale et qui engendre des effets au niveau du cœur, des reins et des vaisseaux sanguins (Briet et Schiffrin, 2010). Le SRA classique met en fonction les actions endocrines de l'angiotensine II sur les récepteurs de l'angiotensine ( $AT_1$  et  $AT_2$ ), mais de récentes découvertes mettent en lumière de nouvelles avenues empruntées par le SRA (Fyhrquist et Saijonmaa, 2008). Effectivement, la présence de SRA locaux a été récemment reconnue dans plusieurs tissus et la transmission locale des signaux cellulaires s'additionne à la transmission hormonale déjà connue en plus de l'attribution de nouveaux rôles pour certains métabolites et récepteurs (Kobori et coll., 2007).



**Figure 1.** Résumé schématique du système rénine-angiotensine (SRA) classique. Les cellules hépatiques produisent l'angiotensinogène. Les cellules juxta-glomérulaires des artérioles afférentes génèrent la pro-rénine. Pour hydrolyser l'angiotensinogène, la pro-rénine doit subir ou non une activation protéolytique qui clive ou délège, respectivement, un segment obstruant le site actif de la rénine. La rénine activée hydrolyse l'angiotensinogène en angiotensine I (Ang I). Ensuite, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), qui est davantage exprimée par les cellules endothéliales des poumons, clive l'Ang I en l'Ang II. De plus, des voies indépendantes de la rénine et de l'ECA produisent l'Ang II. Finalement, après la génération de l'Ang II, de multiples effets physiologiques sont engendrés par une stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (Adapté de Carey et Siragy, 2007 et de McFarlane et coll., 2003).

### 1.1.1 L'angiotensinogène

À la suite de l'analyse de sa séquence contenant un domaine de quatorze acides aminés, l'angiotensinogène a été classé dans la famille des inhibiteurs de sérines protéases et il s'avère être le seul précurseur des peptides du SRA (Doolittle, 1983). L'angiotensinogène est majoritairement synthétisé dans le foie et la présence de ses ARNm dans les hépatocytes est observée de manière panlobulaire (Morgan et coll., 1996). La transcription du gène de l'angiotensinogène dans le foie serait enclenchée par deux processus activateurs : le premier implique la liaison de glucocorticoïdes à des récepteurs cytosoliques d'hépatocytes provoquant une activation du promoteur de l'angiotensinogène menant à son expression et le deuxième est directement lié à l'inflammation et plus particulièrement aux cytokines interleukine 1 et du *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) (Brasier et Li, 1996). Un polymorphisme connu du gène de l'angiotensinogène engendrerait une augmentation de l'expression de ce gène menant à une activité accrue du SRA, ce qui se répercute par une prévalence de l'hypertension chez certaines populations (Brasier et Li, 1996). Pour générer l'angiotensine I (10 acides aminés), la rénine hydrolyse l'angiotensinogène en N-terminal et la présence de son motif His-Pro-Phe à la position 6 à 8, respectivement, est primordiale pour cette scission et agirait à titre d'ancrage enzymatique (Nakagawa et coll., 2007). De plus, des enzymes additionnelles peuvent former de l'angiotensine I à partir de l'angiotensinogène : la cathépsine, la tonine, le plasminogène tissulaire, la kallikréine faisant partie du SKK, etc. (Guang et coll., 2012).

### 1.1.2 La rénine

La rénine (EC 3.4.23.15) est une aspartyl protéase, facteur enzymatique limitant en amont de la production de l'hormone circulante angiotensine II et est exprimée dans de nombreux tissus mais principalement dans les reins (Nguyen et Muller, 2010). Cette enzyme est d'abord sécrétée sous forme de pro-enzyme, la prorénine, par les cellules juxtaglomérulaires des artérioles afférentes des reins et lors de son activation protéolytique, elle subit un retranchement de 43 de

ses acides aminés N-terminaux libérant la rénine active (Kobori et coll., 2007). De plus, une activation non-protéolytique réversible de la pro-rénine a été obtenue *in vitro* par acidification ou par exposition à de froides températures : ceci provoque un changement de conformation activateur du précurseur enzymatique (Hsueh et Baxter, 1991). Par ailleurs, la différence entre les deux types d'activations réside dans la scission irréversible (protéolytique) ou dans le repliement réversible du prosegment (non-protéolytique) dévoilant le site enzymatique (Jan Danser et coll., 2007). Lorsqu'elle est activée, la rénine provoque une conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I (8 acides aminés). La pro-rénine ne semblait pas avoir d'effets biologiques et la rénine était perçue comme étant simplement une enzyme mais récemment, un récepteur pouvant lier ces deux protéines a été découvert et a permis d'étendre le rôle de ces deux protéines (Nguyen, 2011). Effectivement, ce récepteur mobilise la voie de signalisation des *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine et la voie non-canonique Wnt/*Planar cell polarity*, ce qui permet de lui attribuer un rôle au niveau embryonnaire, du dommage et de la réparation cellulaire, du cancer et de la fibrose lors de diabète et d'hypertension (Nguyen, 2011).

### 1.1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (L'ECA)

L'ECA (peptidyl-dipeptidase A, EC 3.4.15.1), une métallopeptidase à zinc, est responsable d'une étape protéolytique clé dans le SRA : la conversion de l'angiotensine I (Ang I : 1-10) en angiotensine II (Ang II : 1-8) (Baudin, 2002). Effectivement, l'ECA agit généralement comme une exopeptidase et hydrolyse deux peptides du C-terminal libre de ses deux substrats préférentiels; l'Ang I et la BK (Guang et coll., 2012). Trois formes actives de l'ECA sont maintenant reconnues, la première étant l'ECA somatique, qui est présente dans de nombreux tissus, l'ECA germinale retrouvée exclusivement dans les testicules, l'ECA2 (EC 3.4.17) qui est le produit d'un autre gène. L'ECA2, exprimée de manière ubiquitaire, et son homologue inactif, la collectrine, sont présents dans les reins (Turner et Hooper, 2002). L'ECA2, récemment introduite comme membre actif dans la cascade du SRA, clive l'Ang I en Ang-(1-9) et l'Ang II en Ang-(1-7); deux protéolyses menant à la formation du fragment Ang-(1-7) auquel le récepteur MAS a nouvellement été attribué (Clarke et Turner, 2012, Santos et coll., 2003).

De plus, l'ECA2 est une monoxycarboxypeptidase et l'ECA germinale et somatique, en revanche, sont des di-peptidyl-carboxypeptidases (Guang et coll., 2012). De surcroît, l'ECA2 et l'ECA germinale détiennent chacune un site catalytique tandis que l'ECA somatique dispose de deux domaines catalytiques indépendant mais chaque isoforme de l'ECA recèle deux séquences consensus de liaison au zinc dont celle-ci : His-Glu-X-X-Glu (Turner et Hooper., 2002). Par conséquent, les deux sites catalytiques de l'ECA somatique, le domaine-C et le domaine-N, présentent une prédilection variable pour plusieurs substrats; le domaine-C est attribué au SRA par hydrolyse préférentiel de l'Ang I tandis que le domain-N hydrolyse les peptides Ac-SDKP et l'Ang-(1-7), la protéine  $\beta$ -amyloïde, etc. (Coates., 2003).

#### **1.1.4 L'angiotensine II**

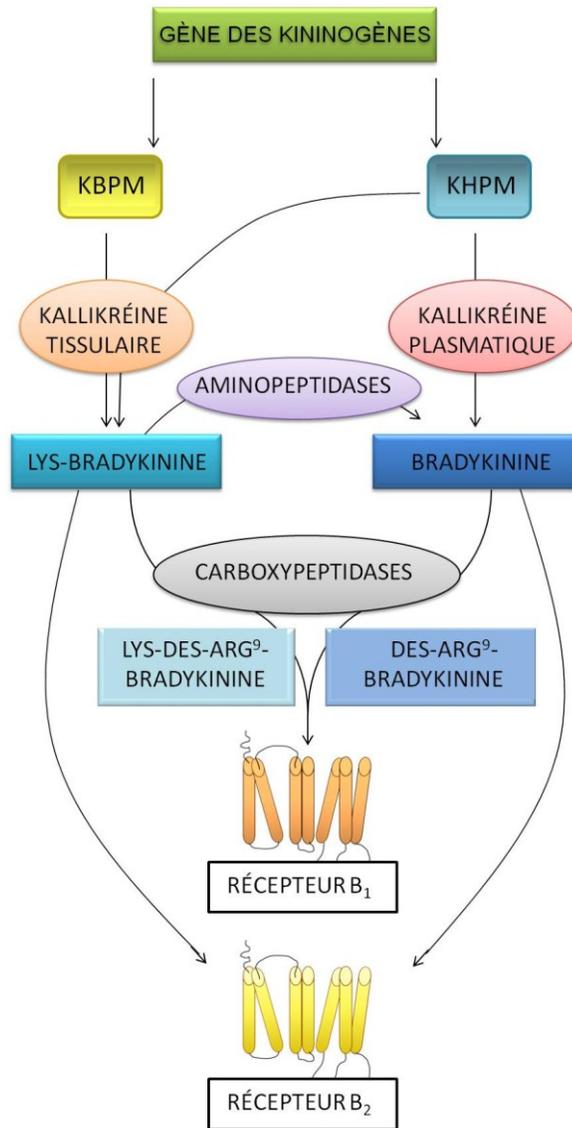
La voie primaire générant l'angiotensine II (1-8) est sans équivoque celle de l'ECA mais si on se réfère aux différents SRA tissulaires, d'autres enzymes prennent le relais, notamment dans le cœur où la chymase agit à titre d'enzyme principale de conversion de l'Ang I en Ang II (Uehara et coll., 2012). L'angiotensine II est le principal agent bioactif du SRA et médit une pléiade d'effets à travers la stimulation de deux différents récepteurs à sept domaines transmembranaires de l'angiotensine; les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (Mehta et Griendling, 2007). D'ailleurs, la plupart des effets physiologiques de l'Ang I sont attribuables à son action sur le récepteur AT<sub>1</sub> tandis que le récepteur AT<sub>2</sub> intervient davantage comme antagoniste physiologique du récepteur AT<sub>1</sub> (Griendling et coll., 1996). Les effets physiologiques que l'Ang II provoque, par l'entremise d'une stimulation du récepteur AT<sub>1</sub>, comprennent la vasoconstriction, la rétention du sodium et de l'eau, une boucle de rétro-action négative agissant sur la rénine, une hypertrophie des cardiomyocytes et des cellules de muscles lisses vasculaires, etc. (Zaman et coll., 2002). Une stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> par l'angiotensine II, quant à elle, engendre une inhibition de la croissance cellulaire, de la prolifération cellulaire, une réparation des tissus, de la vasodilatation, de l'apoptose, etc. (Zaman et coll., 2002).

## **1.2 Le système kallikréine-kinine(SKK)**

Le SKK régule plusieurs fonctions vasculaires (pression sanguine, coagulation, relaxation du muscle lisse et augmentation de la perméabilité vasculaire), cellulaires (prolifération cellulaire, angiogénèse, inflammation, activation de neurones sensoriels, etc.) et l'homéostasie des électrolytes via la formation de la bradykinine et de peptides liés (figure 2).

### **1.2.1 Les kininogènes**

Les deux précurseurs des kinines, le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) et le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM), résultent de l'épissage alternatif d'un seul gène localisé sur le chromosome 3q26 et détiennent donc, presque entièrement la même séquence d'acides aminés, à l'exception d'une partie de la chaîne C-terminale (Marceau et coll., 1998). Le KHPM est une  $\alpha$ -globuline (88 à 120 kDa) et le KBPM est une  $\beta$ -globuline (50 à 68 kDa) qui sont clivées par la kallikréine plasmatique (KP) et la kallikréine tissulaire (KT), respectivement (Moreau et coll., 2005). Leurs disparités structurales engendrent une différence fonctionnelle de leur chaîne légère, car le KBPM ne possède pas les sites d'activation de contact et de liaison à la prékallikréine (PKK) et du facteur XI de la coagulation (Moreau et coll., 2005). Lorsque le KHPM est hydrolysé, deux séquences peptidiques sont générées : la BK et la KHPMa (Hillmeister et Persson, 2012). Ce produit de clivage (KHPMa) ainsi que sa molécule parente (KHPM) peuvent lier trois différentes protéines de liaison présentes sur l'endothélium (la forme soluble du récepteur de l'activateur urokinase du plasminogène (uPAR), gC1qR et la cytokératine1) avec une affinité semblable excepté pour la protéine adaptatrice uPAR qui lie plus sélectivement (d'un facteur 50) le KHPM hydrolysé par les kallikréines (Pixley et coll., 2011).



**Figure 2.** Résumé schématique du système kallikréine-kinine. L'unique gène des kininogènes subit un épissage alternatif pour générer le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) et le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM). Le KBPM est hydrolysé par la kallikréine tissulaire pour former la Lys-bradykinine (Lys-BK) qui agit via le récepteur B<sub>2</sub> des kinines ou est hydrolysé par une carboxypeptidase pour produire la Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine, qui est le ligand préférentiel du récepteur B<sub>1</sub>. D'autre part, le KHPM mène à la formation de la Lys-BK et la bradykinine (BK) par l'action respective, des kallikréines tissulaires et plasmatiques. De plus, la BK peut être générée par un clivage de la Lys-bradykinine par une aminopeptidase. À l'instar de la Lys-BK, la BK agit via le récepteur B<sub>2</sub> et est aussi clivée par une carboxypeptidase pour produire la des-Arg<sup>9</sup>-BK qui agit via le récepteur B<sub>1</sub> (Adapté de Campbell, 2001).(Schmaier et McCrae, 2007). Deux zymogènes, la prékallikréine et la prokallikréine engendrent, respectivement, la kallikréine plasmatique (KP; EC 3.4.21.34) et la kallikréine tissulaire (KT; EC 3.4.21.35), qui sont les deux sérines protéases principales libérant les peptides actifs du SKK (Regoli et coll., 2012). Ces derniers agissent sur deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG): le B<sub>1</sub> et le B<sub>2</sub> des kinines (Marceau et Bachvarov, 1998).

### 1.2.2 Les kallikréines

Les kallikréines plasmatiques et tissulaires sont les deux enzymes les plus puissantes qui catalysent la libération des kinines à partir des kininogènes mais elles sont physicochimiquement, immunologiquement et fonctionnellement différentes puisqu'elles ne partagent que 38% d'homologie de séquence (Goettig et coll., 2010). La KP (60 kDa) est essentiellement exprimée en tant que précurseur inactif (PKK), est sécrétée au niveau du foie et libère la BK intégrée dans la séquence du KHPM (Moreau et coll., 2005). La KT est exprimée comme proenzyme dans de nombreux tissus et leurs sécrétions exocrines; les reins, le pancréas et les glandes salivaires détiennent les plus hauts niveaux d'expression pour libérer la Lys-BK à partir de KHPM et KBPM (Feener, 2010). La KT a la capacité de cliver les deux kininogènes car ils partagent dans leur structure primaire la séquence d'acides aminés de la kallidine (Lys-BK) et ensuite des carboxypeptidases se chargent de libérer la BK incluse dans les deux kininogènes tandis que la KP clive le KHPM, par sa liaison à la PKK, entre la lysine et l'arginine en C-terminal, ce qui a pour effet de libérer la BK, qui est la kinine de référence (Lalmanach et coll., 2010). En plus de la KT, 14 autres gènes codant pour une protéase apparentée à la kallikréine plasmatique existent chez l'humain et ils sont tous regroupés sur le même locus (q13.2-q13.4) du chromosome 19 (Goettig et coll., 2010). Cependant, seule la KT libère efficacement les kinines, les substrats des autres formes étant pour la plupart inconnus ou mal connus (Moreau et coll., 2005).

### 1.2.3 Les kinines

Les kinines sont des agents vasoactifs synthétisés *de novo* et présents dans la microcirculation, ils agissent principalement sur les cellules de muscle lisse et endothéliales. Les deux kinines natives sont la BK et la kallidine (Lys-BK). Ces dernières sont puissantes et efficaces, toutefois certains de leurs métabolites sont également actifs (Moreau et coll., 2005). Deux différentes

cascades protéolytiques mènent à la formation de la BK, une se déroulant dans le plasma et l'autre dans les tissus, d'où le nom de leur kallikréine respective (Phipps et coll., 2012). Le système de formation des kinines plasmatiques active la voie de la coagulation intrinsèque. Le facteur XII (FXII ou facteur Hageman) est la protéine initiatrice des cascades protéolytiques de la coagulation, de la fibrinolyse, du complément et est un membre de la triade de protéines comprenant la PKK et le KHPM impliquées dans la voie de formation des kinines plasmatiques (Citarella et coll., 1996). L'activation de l'activité sérine protéase du FXII peut être le résultat de plusieurs interactions plasmatiques telles que des conditions infectieuses et inflammatoires, des blessures au niveau tissulaire ou celles initiées sur un nombre foisonnant de surfaces artificielles et de substances physiologiques (Moreau et coll., 2005). Les surfaces chargées négativement au contact du plasma lient le zymogène FXII et provoquent un changement conformationnel de FXII résultant en FXII activé (FXIIa) (Schmaier et McCrae, 2007). Le FXIIa engendre la libération de la KP à partir de la PKK, cette dernière étant de 80 à 90% associée au KHPM (Proud et Kaplan, 1988). La KP produit alors une boucle de rétroaction positive et active FXII beaucoup plus rapidement que la réaction de son autoactivation (Kaplan et Ghebrehiwet, 2010). La KP libérée clive le KHPM. Également, il a été démontré que le KHPM est clivé par une enzyme libérée par le neutrophile humain, la protéinase 3 (PR3), et ce, d'une manière équivalente chez des patients atteints de vascularite et en santé (Kahn et coll., 2009). La Lys-BK, quant à elle est le produit de la protéolyse limitée des deux kininogènes par la KT aux liens peptidiques Met<sup>379</sup>-Lys<sup>380</sup> and Arg<sup>389</sup>-Ser<sup>390</sup> (Fogaca et coll., 2004). Les kinines produites peuvent engendrer de multiples réponses cellulaires mais la production d'agents relaxants est ce qui caractérise leur rôle au niveau du SKK (Regoli et coll., 2012). Effectivement, en conditions inflammatoires, les kinines agissent sur les récepteurs B<sub>2</sub> d'une part en provoquant une vasodilatation artériolaire médiée par le relâchement de l'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandines (PGI<sub>2</sub>) entraînant une augmentation du débit sanguin et d'autre part en augmentant la perméabilité vasculaire provoquant une extravasation plasmatique des vénules post-capillaires (Hall, 1997). Les kinines, malgré la dualité de leur type de récepteur, produisent généralement les mêmes actions physiologiques et pathologiques principalement au niveau du système vasculaire et rénal (Regoli et coll., 2012). De plus, les kinines mènent au relâchement périphérique de tachykinines proinflammatoires en actionnant la voie de la douleur et de l'inflammation neurogénique par leurs actions sur les terminaisons des nerfs sensitifs (Hall, 1997). Également, les kinines semblent impliquées dans les maladies

inflammatoires chroniques de l'intestin car le  $RB_2$  et le  $RB_1$ , qui lui est surexprimé dans les entérocytes de ces patients, induisent une sécrétion active de chlorure (Cl) et d'eau provoquant de la diarrhée (Marceau et Regoli, 2008).

#### 1.2.4 Le métabolisme des kinines

Lorsqu'un peptide du SKK est généré, sa demi-vie plasmatique et la durée de son action biologique sont restreintes en raison de l'action de multiples clivages orchestrés par diverses familles d'enzymes (Bhoola et coll., 1992). Si on considère la pharmacologie du  $RB_2$ , qui est le plus largement exprimé, on sait que son agoniste préférentiel, la BK, s'avère être la kinine type du SKK. La BK est inactivée lorsque n'importe lequel des acides aminés dont elle est composée lui est retranché. Un nombre considérable de peptidases, appelées kininases *in vitro*, peut effectuer cette transformation (figure 3) (Skidgel, 1992).

##### 1.2.4.1 L'ECA

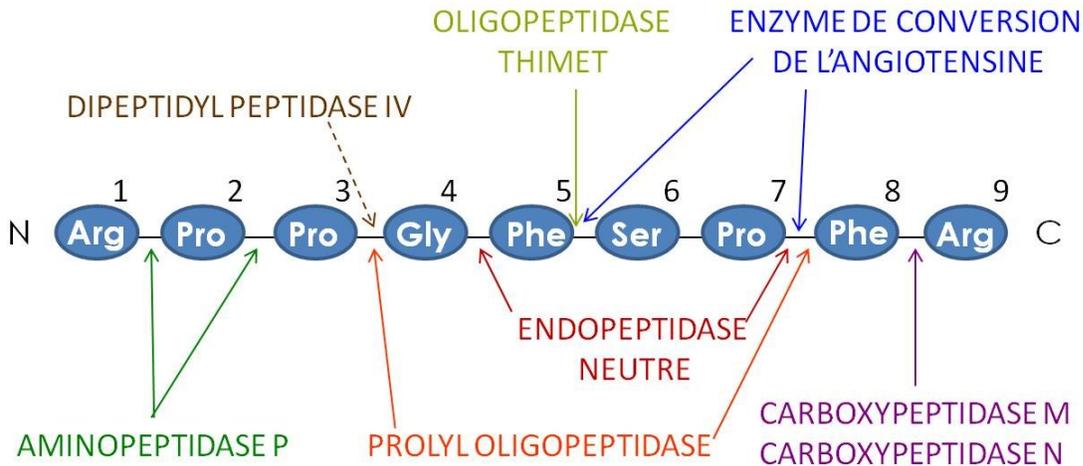
L'enzyme de conversion de l'angiotensine joue un rôle fondamental dans le SKK mais aussi dans le SRA tel que décrit précédemment. Effectivement, si l'on compare les constantes de cinétiques d'hydrolyse de la BK d'une multitude de kininases avec celle de l'ECA, on peut déterminer que l'ECA inactivera spécifiquement la BK et que son action sera prépondérante étant donné sa présence dans de nombreux tissus, dans l'endothélium des vaisseaux sanguins et l'existence d'une forme soluble dans le plasma (Erdös et Skidgel, 1997). L'ECA inactive la BK par l'hydrolyse de ses liens peptidiques entre l'acide aminé 7 et 8 qui génère la  $BK_{[1-7]}$ , entre l'acide aminé 5 et 6 qui génère la  $BK_{[1-5]}$  en plus de libérer un tripeptide de la des-Arg<sup>9</sup>-BK pour générer, d'une seconde manière, la  $BK_{[1-5]}$  (figure 3) (Kuoppala et coll., 2000). Toutes ces protéolyses engendrent une inactivation physiologique (Bönner, 1990).

#### 1.2.4.2 Les carboxypeptidases N et M

La carboxypeptidase N (CPN, EC 3.4.17.3), appelée autrefois kininase I, est responsable de la dégradation de l'arginine en C-terminal des kinines (Erdös et Sloane, 1962). Cette enzyme soluble, exprimée dans le foie et sécrétée dans le plasma sanguin, est un tétramère composé de deux grosses sous-unités et de deux petites sous-unités où se situent les sites catalytiques; elle clive les lysines ou les arginines présentes en C-terminal d'une multitude de protéines et de peptides (Matthews et coll., 2004). D'autre part, la carboxypeptidase M (CPM, E.C. 3.4.17.12) est un monomère constitué d'une seule chaîne d'acides aminés rattaché à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui clive les mêmes acides aminés que la CPN (Deiteren et coll., 2009). Ces deux carboxypeptidases transforment la BK et la Lys-BK en agonistes du  $RB_1$  (figure 2)

#### 1.2.4.3 L'endopeptidase neutre

L'endopeptidase neutre ou néprilysine (NEP, EC 3.4.24.11) est une métalloendopeptidase membranaire, présente dans plusieurs tissus mais davantage dans les reins, qui clive préférentiellement les acides aminés hydrophobes de la partie N-terminale des peptides et en ce qui concerne la BK, la NEP génère deux types de fragments : la  $BK_{[1-7]}$  et la  $BK_{[1-4]}$  (figure 3) (Moreau et coll., 2005). Les autres fonctions de la NEP sont variées mais très nombreuses dans le cerveau : douleur, anxiété, rythmes circadiens, plasticité synaptique, intégrité de la barrière hémato-encéphalique, fatigue, mémoire, fonctions motrices, etc. et concernent sans doute des neuropeptides (Nalivaeva et coll., 2012). De plus, de récentes études démontrent que la régulation à la baisse de la NEP semble impliquée dans la progression du cancer de la prostate et des reins, dans le développement du cancer des poumons, dans la leucémie et la maladie d'Alzheimer (Turner et coll., 2001). Tous les effets de la NEP résultent de la dégradation de divers substrats.



**Figure 3.** Représentation schématique des enzymes principales dégradant la bradykinine. Les flèches représentent le clivage d'un lien peptidique de la bradykinine et celle en pointillé désigne un clivage post-inactivation. L'aminopeptidase P clive les liens peptidiques Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> et Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>. La dipeptidyl peptidase IV clive le lien Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup> après que l'aminopeptidase P ait clivé le lien Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>. Aussi, la prolyl oligopeptidase clive le lien peptidique Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup> et Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>. Les deux enzymes qui catabolisent principalement la bradykinine, l'endopeptidase neutre et l'enzyme de conversion de l'angiotensine, clivent successivement deux liens peptidiques chacun : Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>, Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> et Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup> et Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>, respectivement. L'oligopeptidase thimet clive le lien peptidique Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>. De plus, les deux carboxypeptidases, M et N, clivent l'arginine en C-terminal pour générer les deux agonistes des-Arg<sup>9</sup> (lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK et des-Arg<sup>9</sup>-BK) du récepteur B<sub>1</sub> (Adapté de Campbell, 2003).

#### 1.2.4.4 L'aminopeptidase P et l'aminopeptidase N

L'aminopeptidase P (APP, EC 3.4.11.9) est une métallopeptidase composée de quatre monomères entourant un centre métallique catalytique qui clive un lien peptidique précédant une proline quel que soit l'acide aminé final de la partie N-terminal d'un peptide (Graham et coll., 2005). En ce qui concerne la bradykinine, l'APP clive le lien de Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> et de Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup> générant la BK<sub>[2-9]</sub> et la BK<sub>[3-9]</sub> (figure 3) (Cunningham et O'Connor, 1997). L'APP est retrouvée dans les reins, les poumons, les intestins, le cerveau et le plasma; la majorité de l'APP dans le sang est localisée à l'intérieur des plaquettes lui conférant un rôle probable de dégradation de peptides circulants impliqués dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et pulmonaires (Kitamura et coll., 1999, Cunningham et O'Connor, 1997). Les patients développant un angioedème induit par la prise d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA) détiendraient un haplotype ATG qui a pour conséquence une réduction de l'activité de

l'APP membranaire; une augmentation de BK circulante serait ainsi en cause (Cilia La Corte et coll., 2011). Par ailleurs, l'aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) est une métallopeptidase abondante au niveau des reins et du système nerveux central qui hydrolyse la Lys-BK en BK et la Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK en des-Arg<sup>9</sup>-BK (Danziger, 2008). Cette dégradation, quoi qu'ayant un impact métabolique mineur, influence davantage le RB<sub>1</sub> par la dégradation de son agoniste préférentiel tandis que les conséquences au niveau du RB<sub>2</sub> sont négligeables car le peptide et son produit de dégradation démontrent une affinité semblable (Farmer et Burch, 1992). Dans une autre étude, un antagoniste obtenu par substitution d'un résidu lysine à son extrémité N-terminale par une D-arginine, démontre que cette conversion permet de conserver la nature antagoniste mais devient, en plus, un inhibiteur de l'APN (Gera et coll., 2006). De plus, un antagoniste du RB<sub>2</sub>, l'icatibant, peut inhiber l'APN (Bawolak et coll., 2006).

#### *1.2.4.5 La prolyl oligopeptidase et la dipeptidyl peptidase IV*

La prolyl oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26) est une enzyme cytosolique réalisant le clivage d'une proline intrapeptidique du côté C-terminal ou participant à la maturation d'une panoplie d'oligopeptides de moins de trente acides aminés : les hormones peptidiques et les neuropeptides (Matsuda et coll., 2013). Dans le cas de la bradykinine, la POP hydrolyse le lien peptidique entre la phénylalanine à la position 8 et la proline à la position 7 et du résidu Pro<sup>3</sup> et Gly<sup>4</sup> (figure 3) (Campbell, 2003). Cette enzyme est ubiquitaire et est impliquée dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques : différenciation cellulaire, inflammation, transport intracellulaire, le cycle des phosphoinositides, mémoire, fonctions cognitives, maladie de Parkinson, sans doute par la modulation de neuropeptides (Szeltner et coll., 2012). Le niveau d'activité plasmatique ou sérique de POP semble être associé à certains désordres psychiatriques. Ainsi, les patients dépressifs démontrent un faible taux de POP tandis que les patients atteints de schizophrénie et de troubles maniaques démontrent un niveau supérieur aux patients normaux (Peltonen et Männistö, 2011). Toutefois, étant donné qu'elle présente une plus haute activité dans le cerveau, la POP est une cible toute indiquée pour la création d'inhibiteurs spécifiques pour pallier à l'amnésie, aux lésions du cerveau, à des désordres neurologiques, à la perte de mémoire lors du vieillissement et pour la recherche de fonctions neuroprotectrices (Szeltner et coll., 2012). D'autre part, la dipeptidyl peptidase IV (DIPP IV,

EC 3.4.14.5) est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface d'une multitude de type cellulaire et est impliquée dans de nombreux processus pathologiques et physiologiques hétérogènes tels que la régulation de la glycémie, la pathogénèse du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les fonctions immunitaires, la métastase de diverses tumeurs malignes, l'adhésion cellulaire, la mobilisation des cellules souches de la moelle osseuse, etc (Gorrell, 2005, Byrd et coll., 2008). À la différence de toutes les autres enzymes décrites ici, la DIPP IV n'est pas une kininase, dans le sens où la BK est déjà clivée par l'aminopeptidase P lorsque la DIPP IV clive le lien peptidique de Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup> (Brown et coll., 2009).

#### 1.2.4.6 L'oligopeptidase thimet

L'oligopeptidase thimet (EP24.15, EC 3.4.24.15) est une métalloendopeptidase thiol-dépendante qui catabolise des peptides contenant de 5 à 18 acides aminés par clivage du lien peptidique suivant, au minimum, les trois premiers acides aminés à partir du C-terminal et qui est localisée dans les tissus produisant des hormones peptidiques et des neuropeptides (Morrison et Pierotti, 2003). L'EP24.15 clive la BK presque en son centre en ne laissant que la BK<sub>[1-5]</sub> et la BK<sub>[6-9]</sub> (figure 3) (Knight et coll., 1995). L'EP24.15 est retrouvée de manière ubiquitaire mais les plus hauts niveaux d'activité recensés se situent dans les testicules, le cerveau et dans les deux lobes de l'hypophyse (Shrimpton et coll., 2002). De plus, cette enzyme jouerait un rôle dans l'hydrolyse de séquences peptidiques antigéniques, qui contiendraient entre 6 et 17 acides aminés, générées à partir de protéines dégradées dans le protéasome (Saric et coll., 2004).

### 1.2.5 Les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines

Deux récepteurs médient les effets cellulaires des kinines, les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. Les RB<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> font partie de la superfamille des RCPGs et plus particulièrement de la famille apparentée au récepteur de la rhodopsine qui est subdivisée en 19 sous-familles (famille A3); donc, on peut postuler que leur structure est suffisamment semblable à celle de la rhodopsine pour pouvoir

prédire leurs conformations spatio-temporelles (Feierler et coll., 2011). Chez l'homme les deux RCPGs sont séparés par 12 kb sur le chromosome 14 et sont organisés en un locus compact de 60 kb (Cayla et coll, 2002). Par contre, ils ne présentent qu'une assez faible homologie de séquence (36 %) qui explique de multiples disparités associées aux deux sous-types (Hall, 1997). Ainsi le modèle «knock-out» du gène du RB<sub>2</sub> chez la souris exprime encore les réponses associées aux RB<sub>1</sub>. Ainsi, même étant très près sur un même locus, la régulation et le profil d'épissage des deux gènes ne semblent pas interdépendants. Les deux récepteurs de la BK diffèrent de manière notoire et ainsi ils peuvent être distingués par sept critères dont trois pharmacologiques : leur affinité pour les antagonistes, l'ordre de puissance des agonistes et leur manque de désensibilisation croisée. Ils se distinguent également par leur patron d'expression, la délétion ciblée de leurs gènes, leurs séquences nucléotidiques et leur composition en acides aminés (Marceau et coll., 1997). Les RB<sub>1</sub> ont été généralement associés aux « côtés néfastes » du SKK contrairement aux RB<sub>2</sub> qui sont perçus comme ceux produisant des effets bénéfiques surtout pour le système cardiovasculaire; toutefois, malgré leurs divergences indubitables, les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> produisent fréquemment plusieurs actions physiologiques et pathologiques qui sont identiques (Regoli et coll., 2012).

#### *1.2.5.1 Le récepteur B<sub>1</sub>*

Ce récepteur a une sensibilité marquée pour les métabolites des kinines n'ayant plus l'arginine en C-terminale et une affinité accrue pour les kinines possédant une lysine en N-terminale (Marceau, 1995). Effectivement, la seule kinine naturelle ayant une affinité subnanomolaire pour le RB<sub>1</sub> humain est la Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (Marceau, 1997). Le RB<sub>1</sub> est exprimé à de très faibles niveaux dans les tissus humains ou animaux sains mais est fortement exprimé lors de situations inflammatoires : dommages tissulaires ou injection de lipopolysaccharide bactérien (LPS), ce qui fait du RB<sub>1</sub> un récepteur inductible (Leeb-Lundberg et coll., 2005). Il est maintenant reconnu que le RB<sub>1</sub> est un important médiateur dans l'inflammation; en cas de septicémie, conditions immunopathologiques ou autres types de lésions tissulaires, il y a libération de molécules signalétiques induisant la synthèse de ce récepteur qu'on peut suivre notamment par la concentration d'ARN messager (ARMm) (Marceau et coll., 1998). Effectivement, lors de ces conditions, le récepteur est synthétisé dans le réticulum

endoplasmique et transloqué vers l'appareil de Golgi car la contraction médiée par la des-Arg<sup>9</sup>-BK dans l'aorte de lapin isolée est prévenue par l'addition de la bréfeldine A qui est un inhibiteur sélectif de cette translocation (Audet et coll., 2004). Également, la réponse aux différents agonistes et antagonistes pour les RB<sub>1</sub> dans de nombreux essais biologiques augmente de manière dépendante du temps et de la synthèse protéique, ce qui renforce la notion d'augmentation de la transcription du récepteur lors d'une lésion. (Marceau, 1997). La régulation à la hausse de l'expression du RB<sub>1</sub>, dans les cellules de muscles lisses vasculaires, serait dépendante à la fois d'une transcription accrue et de la stabilisation de son ARNm, la translocation nucléaire du *Nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) et la protéine kinase C (PKC) joueraient un rôle central dans ces processus (Moreau et coll., 2007). Également, il a été démontré dans les cellules vasculaires humaines que l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le TNF- $\alpha$  influencent de manière synergique l'expression RB<sub>1</sub> par la mobilisation de la voie de signalisation JAK-STAT et de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B, respectivement (Koumbadinga et coll., 2010). De plus, il n'est généralement pas exprimé chez des sujets normaux, néanmoins il existe certaines exceptions liées aux différents tissus ou espèces animales (Marceau et Regoli, 2004). Le RB<sub>1</sub> est tout indiqué pour exercer un rôle stratégique des pathologies inflammatoires (diabète, asthme, arthrite rhumatoïde et la sclérose multiple) et par son expression dans de multiples types cellulaires, son mécanisme signalétique persistant et le fait qu'il produit les effets pro-inflammatoires suivants: l'œdème, la douleur et l'extravasation de leucocyte dans le sang (Couture et coll., 2001).

#### 1.2.5.2 Le récepteur B<sub>2</sub>

Le RB<sub>2</sub> est retrouvé constitutivement dans les cellules endothéliales et des études de RT-PCR ont démontré qu'il était exprimé dans une panoplie de tissus allant des tissus des organes vitaux à ceux des appareils génitaux (Mahabeer et Bhoola, 2000). Également, les RB<sub>2</sub> sont présents dans les cellules tumorales de cerveau et non dans les cellules endothéliales normales ou tumorales des capillaires sanguins au niveau du cerveau : lors d'un cancer intra-cranien, la BK augmente la perméabilité de la barrière hémato-tumorale (Liu et coll., 2001). Par ailleurs, le RB<sub>2</sub> est localisé dans la couche superficielle de la moëlle épinière, dans les minces fibres non myélinisées et dans les petites cellules neuronales des ganglions sensitifs et cette présence du

RB<sub>2</sub>, dans le système nerveux central, médie la douleur viscérale et cutanée principalement. Cependant, il semble être impliqué dans d'autres types de douleur (Steranka et coll., 1988). Effectivement, le RB<sub>2</sub> est impliqué dans tous les signes cardinaux de l'inflammation aiguë, incluant la vasoconstriction/vasodilatation, la perméabilité vasculaire augmentée, la dilatation artérielle et la douleur par l'activation des nocicepteurs mais ce récepteur joue un rôle limité dans les composantes cellulaires de la réponse inflammatoire comprenant le recrutement des leucocytes à partir de la microcirculation (McLean et coll., 2000). Étant donné leur importance, le RB<sub>2</sub> et de nombreux RCPGs doivent subir un recyclage; ils sont engagés dans un cycle de désensibilisation induite par un agoniste qui comprend des phosphorylations, l'endocytose et un recyclage cellulaire du récepteur tel qu'observé dans des cellules en culture (Marceau et coll., 2002).

### **1.3 Interactions entre le SKK et le SRA**

Les deux systèmes sont étroitement reliés autant pour la régulation de fonctions physiologiques primordiales que pour les protéines et peptides qui les composent. Le fait que les récepteurs B<sub>2</sub> et AT<sub>1</sub> puissent former des hétérodimères stables demeure controversé. Si ces derniers formaient des hétérodimères, ils pourraient potentialiser les voies signalétiques normalement engendrées par AT<sub>1</sub> et la formation de ce complexe provoquerait une augmentation de l'expression du RB<sub>2</sub>, suggérant que l'Ang I agit comme activateur de la transcription du RB<sub>2</sub> (Shen et El-Dahr, 2006). D'ailleurs, les deux peptides, BK et Ang-(1-7), provoquent la vasodilatation de l'endothélium via le RB<sub>2</sub> et le récepteur AT<sub>1</sub>, respectivement. De plus, l'Ang II et la BK enclenchent l'activation de la fibrinolyse et la formation de la BK (Dielis et coll., 2005). Ainsi, l'Ang-(1-7) contrebalance les effets médiés par l'axe ECA-Ang II-récepteur AT<sub>1</sub> à l'instar de la BK et ce via sa production par l'ECA2 à partir de l'Ang I ou l'Ang II (Iwai et Horiuchi, 2009). Également l'Ang-(1-7) potentialise la BK par inhibition de l'ECA ou par des mécanismes dépendants du récepteur AT<sub>2</sub> (Tom et coll., 2003). Pour ce qui est du métabolisme du SKK et du SRA, il est à noter qu'un nombre impressionnant d'enzymes ont pour substrat les peptides reliés à la bradykinine en plus des peptides apparentés à l'angiotensine. Par exemple, une des enzymes du SKK, la KP, a pour substrat la pro-rénine qui est une proenzyme

du SRA et en l'hydrolysant, la rénine devient opérationnelle (Shariat-Madar et coll., 2002). Le métabolisme des peptides vasoactifs de ces deux systèmes est capital et c'est précisément une enzyme qui permet la connexion la plus tangible entre le SKK et le SRA : l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui inhibe la vasoconstriction induite par la BK en catalysant son inactivation et en promouvant la vasoconstriction induite par l'activation de l'Ang I en Ang II (Campbell, 2003). En plus de cliver la BK, la POP et la NEP dégradent l'Ang I pour générer le fragment actif Ang-(1-7) (Welches, 1993). Une troisième enzyme, l'oligopeptidase thimet, génère les mêmes résultats; elle catabolise la BK en fragment inactif et l'Ang I en Ang-(1-7) active, l'impliquant dans l'homéostasie cardiovasculaire en induisant de la vasoconstriction (Shrimpton et coll., 2002). L'APN serait impliquée dans la dégradation des agonistes du récepteur B<sub>1</sub> dans le SKK mais jouerait un rôle plus discret dans le SRA : elle transformerait le peptide Ang-(2-8) en Ang-(3-8) (Campbell, 2003).

#### **1.4 La famille des récepteurs couplés aux protéines G**

Pour convenablement fonctionner, chaque cellule du corps humain doit être en mesure de communiquer de façon adéquate en intégrant tous les types de stimuli extracellulaires sous forme d'informations pour produire une réponse intracellulaire adaptée. Cette transposition de signaux est en partie médiée par les RCPGs qui engendrent la signalisation cytoplasmique et nucléaire de par leurs interactions avec des protéines intracellulaires. Lors de la résolution du patron de diffraction du cristal du récepteur bovin de la rhodopsine, la disposition structurale dans l'espace et les points de contact moléculaires d'un modèle général tridimensionnel de RCPG furent décrits et cette approche a été étendue depuis à de nombreux RCPGs (Palczewski et coll., 2000). Les RCPGs sont regroupés dans 5 familles qui peuvent être déterminées par le système de classification GRAFS : Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/taste2 et Sécrétine (Schiöth et Fredriksson, 2005). Les RCPGs de la famille apparentée à la rhodopsine ont une structure tertiaire commune qui se détaille par sept domaines transmembranaires (TMs) hélicoïdaux, trois boucles intracellulaires (BIs) et extracellulaires (BEs) ainsi qu'une queue carboxy terminale (C-terminale) intracellulaire et amino terminale (N-terminale) extracellulaire (Kristiansen, 2004). De plus, entre la première et

la deuxième BE se trouve deux cystéines (Cys), formant un pont disulfure, nécessaire au repliement du récepteur et un autre acide aminé Cys retrouvé dans la queue C-terminale qui sert de site de palmitoylation permettant la formation d'une éventuelle quatrième BI par intercalation du lipide à la membrane (Luttrell, 2008). Également, la structure des RCPGs est contrainte par divers acides aminés, conservés au cours de l'évolution, qui assurent une multitude de fonctions, telles que la stabilisation de la structure, la reconnaissance de ligands, l'établissement de sites de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, farnésylation, palmitoylation, sumoylation, isoprénylation, ubiquitination, acylation, etc.) (Chini et Parenti, 2009).

#### **1.4.1 Activation et signalisation des RCPGs**

Les RCPGs sont maintenant perçus comme étant des protéines oscillant entre une conformation active et inactive (la dernière étant favorisée) et pouvant afficher différents stades d'activation, leur procurant plusieurs intensités de transmission de signal, qui dépendent entre autres de la structure chimique du ligand (Granier et Kobilka, 2012). Les ligands génèrent des changements de conformation au sein des RCPGs qui mènent à la stabilisation de la conformation active selon trois différentes voies connues : la voie TM5/TM3 faisant intervenir une proline et un acide aminé hydrophobe, la voie TM6 impliquant une rotation de ce domaine autour d'une proline par l'action d'un acide aminé tyrosine et tryptophane et la voie TM7/TM2 impliquant le réarrangement d'un réseau intra-domaine de liens hydrogène par interactions avec des molécules d'eau (Deupi et coll., 2012). Les ligands provoquent ces activations par interactions avec de multiples sites de liaison qui peuvent être classés en 2 groupes : les sites de liaison orthostériques (site de liaison du ligand endogène qui entraîne une stabilisation de la conformation du récepteur) et les sites de liaison allosteriques (site de liaison distinct du site de liaison orthostérique et entraîne un changement de conformation qui modifie ce dernier) (Chun et coll., 2012). La diversité des ligands existants se traduit aussi dans l'orientation qu'ils adoptent aux sites de liaison des différents RCPGs; diverses orientations possibles des ligands ont été modélisées et les sites de liaison varient considérablement d'un type de récepteur à l'autre et respectent la nature des ligands qui leurs sont attribués (petites

structures hormonales jusqu'à de volumineux repliements peptidiques) (Audet et Bouvier, 2012). Une multitude de récepteurs sont localisés à la surface membranaire sous forme de complexes oligomériques; il a été démontré qu'une importante fraction de ces récepteurs subsiste en tant que complexes lors de leur internalisation induite par un agoniste et que cette configuration affecterait leur trafic intracellulaire (Cao et coll., 2005). Effectivement, la capacité de dimérisation des récepteurs leur octroie de nouvelles propriétés : un répertoire de ligands augmenté, une spécificité et une affinité accrue pour les ligands, une possibilité de transphosphorylation et de déplacement des sous-unités pour accroître l'éventualité d'une activation, etc. (Lohse, 2010). Néanmoins, ces oligomères peuvent avoir des répercussions néfastes au sein de l'organisme et la découverte de leur implication dans la pathogénèse de certaines maladies (la pré-éclampsie, la maladie de Parkinson, la schizophrénie et l'hypogonadisme hypergonadotrope) n'en n'est qu'à ses balbutiements (Dalrymple et coll., 2008). Ainsi, lorsqu'un ligand atteint un site de liaison, le récepteur agit à titre de « *guanine nucleotide exchange factor* » (GEF) et catalyse le transfert de la guanidine diphosphatase (GDP) pour une guanidine triphosphatase (GTP) sur la sous-unité alpha ( $G_\alpha$ ) de la protéine G hétérotrimérique. Celle-ci étant composée de trois sous-unités (alpha, gamma et bêta) et subit une dissociation de la  $G_\alpha$  nouvellement modifiée (Zhang et Xie, 2012). Selon de récentes études de *fluorescence resonance electron transfert* (FRET), le modèle favorisé présentement suggère que le complexe hétérotrimérique serait pré-couplé au récepteur et n'entrerait pas en contact avec le récepteur seulement lors de son activation (Oldham et Hamm, 2008). Lors de cette dissociation, une des quatre classe de sous-unités alpha ( $G_{q/11}$ ,  $G_{12}$ ,  $G_s$  et  $G_i$ ) recrute les voies canoniques de signalisation en régulant un des effecteurs qui lui est associé; activation de la phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), stimulation de la RhoGEF, activation ou inhibition de l'adénylate cyclase, respectivement (Parmentier, 2012). De manière générale,  $G_q$  active la PLC $\beta$  qui hydrolyse son substrat préférentiel, le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI(4,5)P2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3) ce qui provoque une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Berridge, 1993). Concernant l'activation de RhoGEF, la GTPase monomérique RhoA est activée à son tour et active la protéine ROCK pour induire une contraction cellulaire et une augmentation de la transcription génique SRF-dépendante (Siehler, 2009). De plus, lorsque l'adénylate cyclase est activée, il y a génération d'AMP cyclique (AMPc) ce qui provoque l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle la *cyclic AMP response element binding protein* (CREB) qui migre au noyau, lie l'ADN et induit la transcription génique

(Blumenthal, 2012). Également, les RCPGs peuvent parfois s'associer à différentes sous-unités  $\alpha$  des protéines G et ces dernières peuvent activer de multiples effecteurs en plus de ceux qui seraient typiquement activés par une seule (exemple : le *parathyroid hormone receptor 1* (PTH1) de la parathormone peut s'associer à  $G_s$  et  $G_i$ ) (Dorsam et Gutkind, 2007). De plus, les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , qui sont physiologiquement indissociables ( $G_{\beta\gamma}$ ), peuvent aussi médier des signaux par l'entremise d'une liaison avec une vingtaine d'effecteurs tels que la PLC $\beta$ , la tubuline, la calmoduline, des canaux calciques, etc. (Ritter et Hall, 2009 et Kristiansen, 2004). En plus de la régulation des effecteurs traditionnels établis, les sous-unités de la protéine G peuvent emprunter des voies non canoniques, ce qui reflète leur importance d'une manière indiscutable. Cela se traduit, entre autres, par l'attribution de nouveaux rôles dans la division cellulaire, dans les interactions avec le cytosquelette et les protéines d'adhésions cellulaires et dans la régulation subcellulaire, considérant leur localisation dans plusieurs organelles (Hewavitharana et Wedegaertner, 2012). Également, par la mesure de l'activité des effecteurs activés par différents ligands, la notion d'agoniste biaisé a émergé et fait appel à l'activation d'une ou de quelques voies de signalisation parmi toutes celles que l'agoniste naturel active normalement ou même des voies dont l'activation n'a jamais été répertoriée (Galés, 2012). En effet, certains ligands biaisés reconnaissant un RCPG ont activé des voies dépendantes de la  $\beta$ -arrestine sans que la protéine G hétérotrimérique ne soit impliquée (Millar et Newton, 2010). De plus, des patrons de phosphorylations spécifiques orchestrés par différentes protéines kinases provoqueraient une variation des voies signalétiques qu'un même récepteur peut déclencher et expliqueraient l'effet signalétique dépendant du tissu observé pour une multitude de RCPGs (Tobin et coll., 2008). Cependant, en plus des multiples voies signalétiques activées, une activation et une expression atypique de plusieurs RCPGs seraient à l'origine de transcriptions géniques qui provoqueraient une stimulation de la croissance et de l'invasion de tumeurs et les métastases (Lappano et Maggiolini, 2012). De fait, les RCPGs s'avèrent jouer un rôle central dans le développement de métastases; on retrouve les effets de pro-survie, prolifération et promigratoires médiés par les récepteurs de chimiokines CXCR4 augmentés dans les cellules tumorales surexprimant ce récepteur (Dorsam et Gutkind, 2007). Effectivement, une multitude de RCPGs sont surexprimés dans les cellules squameuses de carcinomes du cou et de la tête et dans plusieurs tumeurs primaires ou métastatiques (Lappano et Maggiolini, 2011). Par ailleurs, les récepteurs des chimiokines procèdent normalement au guidage physiologique des

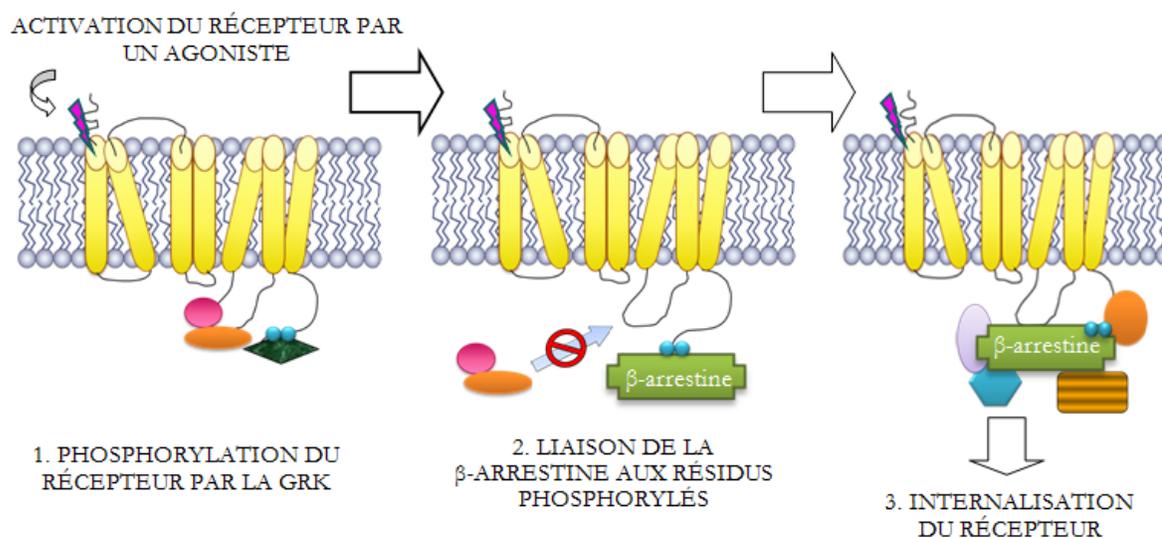
leucocytes mais ce processus est « piraté » lors de la progression de différentes étapes clés menant à la migration des cellules cancéreuses (Kakinuma et Hwang, 2006).

#### 1.4.2 Désensibilisation et endocytose des RCPGs

Après que les RCPGs aient effectué la transmission de leur message, la cellule est en mesure de réguler la suppression de la signalisation selon 3 modes : la désensibilisation des récepteurs qui permet une phase réfractaire lors d'une stimulation continue, le recrutement de la machinerie endosomale qui opère une captation des récepteurs à la surface pour en abaisser le nombre ou par la régulation à la baisse provoquant une diminution du niveau total de récepteurs de la cellule (Kim et Benovic, 2002). En ce qui concerne la régulation à la baisse des RCPGs, des processus tels que la biosynthèse, l'expression génique et la protéolyse lysosomale ou non lysosomale des récepteurs sont responsables de la régulation de la diminution du nombre de récepteurs (Tsao et von Zastrow, 2001). Le mécanisme général de désensibilisation des RCPGs fait intervenir successivement deux processus; le premier impliquant une kinase des RCPGs, la *G-protein coupled receptor kinase* (GRK), qui initie la phosphorylation des acides aminés Ser/Thr présents dans la queue C-terminale ainsi que sur les boucles intracellulaires. Le deuxième mécanisme fait intervenir la  $\beta$ -arrestine ( $\beta$ -arr) qui reconnaît les acides aminés phosphorylés et contraint stériquement le récepteur empêchant un couplage avec la protéine G, entraînant une désensibilisation fonctionnelle (figure 4) (Shukla et coll., 2011). Les  $\beta$ -arrestines sont des protéines jouant un rôle capital dans la désensibilisation et il en existe quatre membres actifs dont l'arrestine-1 visuelle (bâtonnet) et l'arrestine-4 (cônes) qui sont presque exclusivement exprimés dans la rétine et s'associent à leur photorécepteur, la rhodopsine (Luttrell et Lefkowitz, 2002). Quant aux deux autres  $\beta$ -arrestines ( $\beta$ -arrestine<sub>1</sub> = arrestine-2 et  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub> = arrestine-3), elles sont ubiquitaires et interagissent avec un nombre immense de protéines variées (337 à ce jour); enzymes métaboliques, canaux ioniques, chaperons, protéines du cytosquelette, facteurs de transcription, ribonucléoprotéines, etc. (Xiao et coll., 2007). D'après certaines études portant sur l'endocytose des RCPGs, un nouveau paradigme émerge : la  $\beta$ -arrestine donne lieu à un deuxième mode de régulation, à la suite de la désensibilisation, comportant l'endocytose de certains RCPGs par recrutement de protéines d'échafaudage

favorisant la formation de puits recouverts d'un manteau de clathrine (PRMC) (McDonald et Lefkowitz, 2001). À cet égard, le mécanisme d'internalisation via les PRMCs est le plus connu et plusieurs RCPGs l'empruntent. Néanmoins, même si la désensibilisation et l'endocytose semblent être des processus inextricables, ils sont indépendants et leurs activités ne permettent pas de prédire le sort du récepteur (van Koppen et Jakobs, 2004). Effectivement, plusieurs exemples appuient le fait qu'ils ont une identité distincte; des ligands allostériques peuvent influencer la désensibilisation sans affecter l'endocytose et les ligands endogènes liant le site orthostérique semblent être efficaces dans la sélectivité des effets du trafic des RCPGs en ayant la capacité de promouvoir un certain processus aux dépens d'un autre (Whistler, 2009). Il semblerait que certains RCPGs soient phosphorylés mais aussi ubiquitinés, ce qui déterminerait leur sort intracellulaire d'une manière dépendante du temps et du patron d'ubiquitination (Jean-Alphonse et Hanyaloglu, 2011). À cet égard, les arrestines peuvent aussi être ubiquitinées et cela engendre leur recrutement à la membrane plasmique et hypothétiquement une succession de liaisons moléculaires conduisant à l'endocytose de récepteurs phosphorylés; les ligases E3, tiers acteurs de l'ubiquitination, reconnaissent les cargos phosphorylés (Shenoy et Lefkowitz, 2003a). En plus de ces fonctions de désensibilisation et d'internalisation des RCPGs, la  $\beta$ -arrestine est récemment reconnue comme pouvant agir à titre de protéine adaptatrice et transmettrice de signaux notamment dans la voie des *extracellular signal regulated kinases* (ERKs) (Heitzler et coll., 2012). Effectivement, la liaison de la  $\beta$ -arrestine au récepteur activé et phosphorylé par une GRK expose son domaine C-terminal et entraîne la liaison à ce domaine de molécules adaptatrices et accessoires (AP2 étant essentielle et la plus abondante aux PRMCs) pouvant reconnaître la machinerie des PRMCs et ainsi stabiliser cet assemblage pour une future scission du PRMC par l'activité GTPase d'une dynamine (figure 4) (Delom et Fessart, 2011). Pour ce qui est de la  $\beta$ -arrestine, il semble qu'elle ne conduit pas à la formation des PRMCs mais qu'elle achemine le complexe du récepteur vers des PRMCs pré-formés à la surface cellulaire (Pierce et coll., 2002). En ce qui concerne l'association des récepteurs à la  $\beta$ -arrestine, ils peuvent être associés, préférentiellement à la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>, mais non internalisés ensemble (RCPGs de classe A) ou internalisés associés, soit à la  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub> ou à la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>, et mener à la formation d'endosomes (RCPGs de classe B) (Shenoy et Lefkowitz, 2003b). Subséquemment, lorsque tous les acteurs sont réunis et que les RCPGs sont concentrés dans les puits, la transformation du PRMC en vésicule endocytotique est enclenchée et elle est divisée en cinq stages distincts déterminés par observations

biologiques; 1) la nucléation à la membrane plasmique, 2) la sélection du cargo par association avec la protéine AP2, 3) l'assemblage du manteau de clathrine par polymérisation des triskélions de clathrine, 4) la scission vésiculaire par l'action de la dynamine et 5) le démantèlement/recyclage des composantes du manteau de clathrine menant à la formation d'une vésicule endocytotique contenant les molécules cargos (McMahon et Boucrot, 2011). La formation complète, dès la capture du cargo, des vésicules recouvertes d'un manteau de clathrines et leur internalisation se produit dans un délai de 20 secs à 90 secs tout en étant saturable et non compétitive vis-à-vis les différents RCPGs permettant une hétérogénéité des cargos (Wolfe et Trejo, 2007). Il est à noter que la dynamine est une grosse GTPase qui est indispensable pour la scission de la vésicule au niveau de la membrane plasmique; des fibroblastes présentant un double KO de la dynamine 1 et 2 révèlent une élongation du cou tubulaire de la vésicule par addition de protéines (protéines contenant un domaine Bin–Amphiphysine–Rvs (BAR) : l'endophiline, la *sorting nexin-9* (SNX9), l'amphiphysine et la tuba) sans toutefois présenter de scission vésiculaire (Ferguson et De Camilli, 2012). De plus, des RCPGs empruntant la voie endocytotique dynamine-dépendante seraient sujets à une complétion de leur activation à l'intérieur des vésicules résultantes ou entraîneraient l'activation de voies signalétiques lors de leur trafic intravésiculaire (Platta et Stenmark, 2011). À titre d'exemple, des RCPGs peuvent inhiber ou stimuler la production d'AMPC après leur internalisation et ce flot de seconds messagers diverge de celui généré à la membrane plasmique du fait que ce signal serait plus persistant et permettrait l'activation de voies de signalisation différentes (Jalink et Moolenaar, 2010). En définitive, les études sur le mécanisme d'endocytose dépendant des molécules de clathrines sont prédominantes, mais les RCPGs peuvent être endocytosés par d'autres mécanismes; par association avec les cavéoles, qui sont des invaginations de la membrane plasmique riches en cavéoline-1, ou par autres vésicules non recouvertes de clathrine (Drake et coll., 2006).



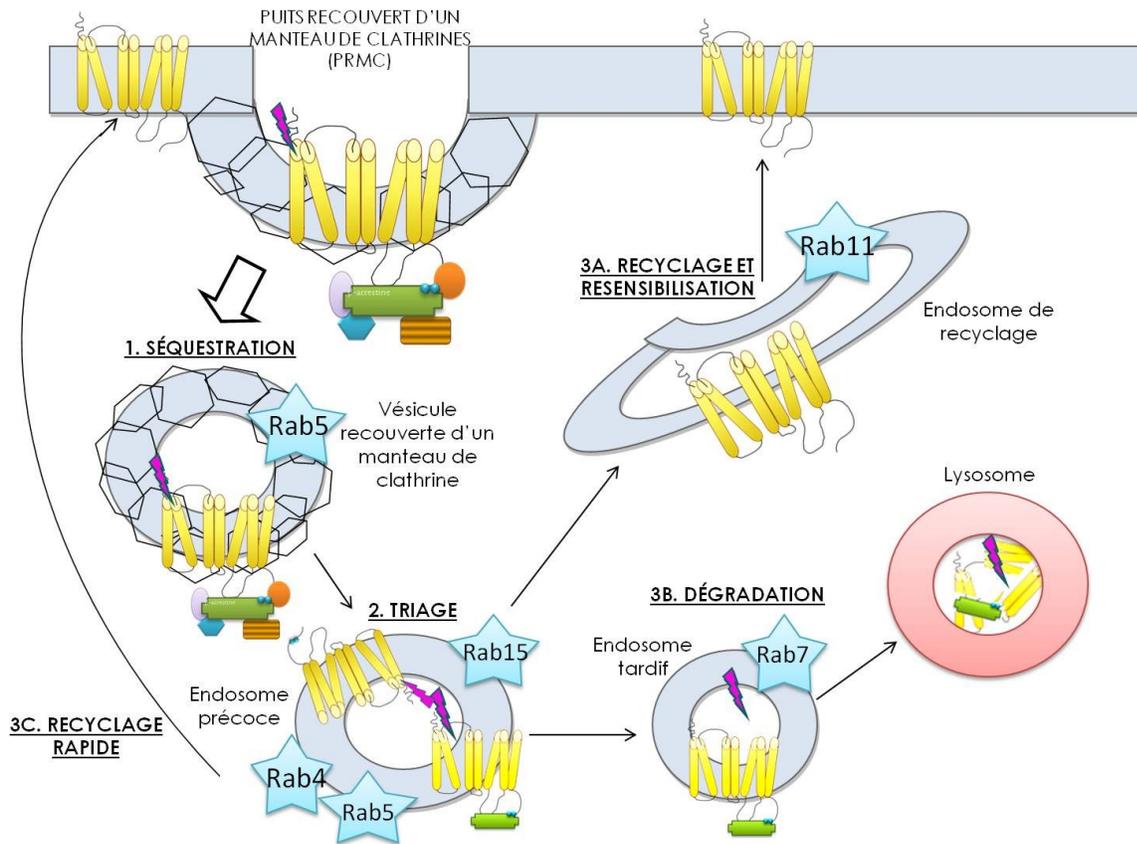
**Figure 4.** Représentation des processus de désensibilisation et de l'endocytose médiés par le complexe associé à la  $\beta$ -arrestine. 1- Lorsque le récepteur est activé par un agoniste, la GRK phosphoryle la queue C-terminale. 2- La  $\beta$ -arrestine reconnaît les acides aminés phosphorylés et empêche le récepteur de signaler à nouveau même si un agoniste entre en contact avec son site d'activation. 3- Lorsque la  $\beta$ -arrestine, une protéine adaptatrice multifonctionnelle, est en place, plusieurs protéines viennent s'y associer (AP2, clathrine, Mdm3, Nedd4, etc.) et la formation de ce complexe enclenche le processus d'endocytose par reconnaissance de puits recouverts d'un manteau de clathrine. (Adapté de Shukla et coll., 2012).

### 1.4.3 Dégradation et recyclage des RCPGs

Lorsque le RCPG est séquestré dans une vésicule recouverte d'un manteau de clathrine, nouvellement scindée de la membrane plasmique, il peut emprunter deux voies : recyclage ou dégradation (figure 5) (Luttrel, 2008). La voie de recyclage implique un retour rapide à la surface cellulaire ce qui induit une resensibilisation des récepteurs et une remise à neuf de sa capacité à transmettre les signaux tandis que la voie de dégradation permet une interruption de l'activité signalétique du récepteur par un transit vers les lysosomes (Jean-Alphonse et Hanyaloglu, 2011). En plus de ces deux voies, une troisième option, de recyclage ou de dégradation, peut être imposée aux récepteurs mais à un rythme beaucoup plus lent (Marchese et coll., 2008). Pour ce qui est de la régulation à la baisse des récepteurs par dégradation, les lysosomes en sont les protagonistes étant donné qu'une cinquantaine d'enzymes disposées à hydrolyser les cargos y sont amassées et que ces dernières arborent une activité intra-

lysosomale maximale au pH acide optimal de 4.5-5.0 (Repnik et coll., 2012). Ainsi, plusieurs autres molécules sont impliquées dans cette dégradation, dirigent les cargos ubiquitinés ou non vers les lysosomes tel que le complexe de triage endosomal requis pour le transport (ESCRT) et induisent l'arrêt permanent du signal (Moser et coll., 2010). Il a été démontré qu'un nombre croissant de RCPGs nécessiterait une ubiquitination de leurs acides aminés lysines pour être dirigé vers les lysosomes mais que cette ubiquitination, distincte de celle menant au protéasome, ne serait pas responsable de l'endocytose initiale (Hanyaloglu et von Zastrow, 2008). Si les RCPGs sont ubiquitinés lorsqu'ils sont dirigés vers une dégradation, des peptidases ubiquitines-spécifiques (USPs) doivent absolument retirer leurs molécules d'ubiquitines pour qu'ils puissent pénétrer les lysosomes (Cottrel, 2013). Étant donné que les RCPGs provenant de la voie endocytotique ne sont pas les seuls cargos se dirigeant vers les lysosomes, une distinction de ces cargos doit être effectuée et il existe une famille de molécules pouvant réguler ce trafic vésiculaire : les petites GTPases Rabs (Ng et coll., 2012). Effectivement, si les récepteurs ne sont pas destinés à la dégradation, ils empruntent des voies post-endocytotiques permettant leur recyclage dans lesquelles les Rabs coordonnent successivement le trafic de compartiments intracellulaires distincts (Segev, 2011). En effet, les Rabs sont des petites GTPases apparentées à Ras et sont responsables de la régulation de ces voies post-endocytotiques. On en dénombre plus d'une soixantaine encodées dans le génome et elles sont impliquées dans l'endocytose, le trafic endosomal, la fusion des endosomes et l'exocytose (Seachrist et Ferguson, 2003). Étant donné qu'elles sont des GTPases, les Rabs doivent être activées par des protéines accessoires, les GEFs, à l'instar de la protéine G trimérique, et lorsqu'elles sont liées au GTP, elles recrutent un cortège d'effecteurs qui leur est propre et qui permettront de réguler les voies de transport vésiculaires (Mizuno-Yamasaki et coll., 2012). Malgré une quantité considérable de protéines Rabs, seulement quelques-unes sont les figures emblématiques du trafic endocytotaire des RCPGs : Rab5 qui médie la fusion de la vésicule endocytotique pour former l'endosome précoce, Rab7 qui permet le transport de l'endosome tardif au lysosome, Rab15 qui dirige le trafic de l'endosome précoce à l'endosome de recyclage pour rejoindre les Rab4 et Rab11 qui régulent le recyclage rapide et lent, respectivement (figure 5) (Hutagalung et Novick, 2011). Ainsi, la première petite GTPase impliquée est Rab5 qui est exprimée à la membrane, aux PRMCs et aux endosomes précoces, occupe une fonction de formation des vésicules car elle est directement corrélée à la régulation de la demi-vie des PRMCs *in vivo* (Bucci et coll., 1992). De plus, Rab5 régule le démantèlement

des vésicules recouvertes de clathrines par interactions avec l' $\mu$ 2 kinase et le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) (Hutagalung et Novick, 2011). Rab5 assure le transport des nouvelles vésicules aux endosomes précoces en amarrant et déplaçant les vésicules le long des microtubules, lui conférant les tâches de régulation non seulement du transport membranaire, mais aussi de la motilité et de la distribution intracellulaire des endosomes précoces (Zerial et McBride, 2001). Également, en plus de Rab5, l'*early endosomal autoantigen 1* (EEA1) semble être présent au niveau des endosomes précoces uniquement et serait impliqué dans la fusion de ces derniers par interactions, en tant qu'effecteur de Rab5 (Clague, 1998). Dans l'endosome précoce le pH luminal est acide (pH  $\sim$  6.5) de telle sorte que, généralement, le ligand se dissocie de son récepteur et toutes les protéines présentes sont ensuite triées pour être recyclées, dégradées, transcytosées à la surface opposée ou transportées de manière rétrograde au réseau trans-golgien (Welling et Weisz, 2010). Ainsi, l'endosome précoce, régenté par Rab5, agit à titre de station qui destine les RCPGs aux différentes voies possibles. Les vésicules qui bourgeonnent de l'endosome précoce pour être dirigées vers différents compartiments endosomaux seraient acheminées à leur destination par le complexe dynéine-dynactine par déplacement sur une route constituée de microtubules (Jovic et coll., 2010). Rab4, qui est identifiée aux endosomes précoces et aux endosomes de recyclage (pH  $\sim$  6.5), serait impliquée dans une redistribution rapide des RCPGs directement à la membrane plasmique à partir de l'endosome précoce et probablement dans le trafic des endosomes précoces vers les endosomes de recyclage (Sönnichsen et coll., 2000). Si les RCPGs sont destinés à un recyclage lent, ils sont transportés aux endosomes de recyclage où Rab11 effectuerait principalement un recyclage du contenu de ces endosomes vers la surface membranaire (Maxfield et McGraw, 2004). Par contre, si les RCPGs doivent être détruits, ils doivent se rendre aux lysosomes; la petite GTPase Rab7 gouverne ces processus et elle est responsable du trafic de l'endosome précoce vers l'endosome tardif (pH  $\sim$  5.0-6.0) et finalement au lysosome. Rab7 est donc reconnue pour être l'instigatrice principale de la dégradation des cargos (Luttrell, 2008). Effectivement, la



**Figure 5.** Représentation des voies de dégradation ou de recyclage lors de l'internalisation médiée par les molécules de clathrine. 1) Lors de la scission de la vésicule par la dynamine, le récepteur, le ligand et des protéines de la machinerie endosomale sont séquestrés. 2) Les protéines de la machinerie se dissocient et redeviennent fonctionnelles. Rab5 ainsi que d'autres protéines procèdent au démantèlement du manteau de clathrine de la vésicule. Le RCPCG, son ligand et la  $\beta$ -arrestine sont dirigés par l'action de Rab5 vers un endosome précoce où l'étape du tri du RCPCG amorce ce qui dirigera le complexe vers la membrane ou le lysosome. 3A) Le complexe présent dans l'endosome précoce est dirigé, à l'aide de Rab15 vers un endosome de recyclage, est déphosphorylé et retourne à la membrane par transport médié par Rab11. Rab11 est aussi présent dans le réseau trans-Golgien. 3B) Le complexe dans l'endosome précoce fusionne avec un endosome tardif et ce dernier est habituellement transféré et dégradé au lysosome. La maturation de ces endosomes est accompagnée par un échange de Rab5 en Rab7. 3C) Le recyclage rapide de certains RCPCGs est orchestré par Rab4, lequel est présent aux endosomes précoces mais aussi aux endosomes de recyclage (Adapté de Luttrell, 2008 et de Hutagalung et Novick, 2011).

localisation partagée de Rab7 aux compartiments lysosomaux, en plus de celle aux endosomes tardifs, confirme son rôle dans le trafic de l'endosome tardif vers les lysosomes en interagissant avec la « *Rab-interacting lysosomal protein* » permettant de recruter un complexe moteur microtubulaire dynéine-dynactine (Méresse et coll., 1995, Hutagalung et Novick, 2011). Ensuite, le lysosome dégrade les cargos transporté par l'endosome tardif (aussi appelé « *multivesicular body* » ; MVB) lors de leur fusion dans la région juxta-nucléaire étant donné que ces organelles sont concentrés au voisinage du centre organisateur des microtubules (Luzio et coll., 2007).

#### 1.4.4 Le récepteur B<sub>2</sub> des kinines

Le RB<sub>2</sub> des kinines est un récepteur à sept domaines transmembranaires, décrit précédemment, qui est exprimé constitutivement sur plusieurs types cellulaires et est reconnu pour médier la majorité des effets physiologiques des kinines.

##### 1.4.4.1 Activation et signalisation du récepteur B<sub>2</sub>

Le RB<sub>2</sub> est un récepteur qui a la possibilité d'adopter une conformation active de manière spontanée, sans avoir recours à la liaison d'un ligand et la stabilisation de la conformation inactive serait générée par une interaction intramoléculaire entre les acides aminés Asn<sup>113</sup> (TM3) et Trp<sup>256</sup> (TM6) (Leed-Lundberg et coll., 2005). En plus des différentes conformations qu'ils adoptent, de nombreux GPCRs sont retrouvées sous forme d'hétéro- ou d'homodimères à la membrane plasmique et ceci serait en partie dû à des interactions entre les domaines transmembranaires, la queue C-terminale et la possibilité de former des ponts disulfures; les dimères de RB<sub>2</sub> seraient stabilisés par N-glycosylation, par ajout de molécules d'acide sialique et par création de ponts disulfures (Michineau et coll., 2006). Une association du RB<sub>2</sub> avec le récepteur AT<sub>1</sub> de l'Ang II demeure controversée mais elle induirait une réduction de la puissance de la BK; cette association potentialise les effets signalétiques de l'Ang II médiés par le récepteur et la séquestration après l'activation de ce dernier tout en

atténuant celle induite par la BK (AbdAlla et coll., 2000). En effet, les récepteurs sont co-exprimés dans des tissus susceptibles de dépendre du bon fonctionnement du SRA; les reins, les muscles lisses, les plaquettes et les vaisseaux péritonéaux (Breitwieser, 2004). Une pléthore de ligands, agonistes et antagonistes, ont été développés dans le but d'approfondir les mécanismes cellulaires contrôlés par le RB<sub>2</sub>, mais d'un point de vue clinique, seul l'icatibant est en usage clinique et est présentement disponible pour traiter l'angio-œdème héréditaire (Marceau, 2012). Plusieurs études allient l'exploitation d'agonistes et d'antagonistes développés en laboratoire à titre comparatif versus les effets induits par l'agoniste natif, la BK, sur le RB<sub>2</sub>; des études de mutagenèse ont permis d'élucider les acides aminés impliqués dans la reconnaissance du ligand et l'activation du récepteur (Meini et coll., 2002). Ainsi, il a été observé que certaines mutations dans les domaines transmembranaires distants (TM2 :W86A et TM6 : F259A) ont totalement entravé la reconnaissance et la liaison de la BK et d'un agoniste non peptidique synthétique aux récepteurs mutés, ce qui concorde avec les trois voies principales de stabilisation des RCPGs (Bellucci et coll., 2003). Toutefois, certaines mutations n'ont affecté que l'effet de l'agoniste synthétique sans influencer la liaison de la BK pour les RB<sub>2</sub> mutés et cela a permis d'établir que le RB<sub>2</sub> possède au moins un site qui diffère de son site orthostérique (Bellucci et coll., 2003). D'ailleurs, la même mutation (TM2 :W86A) abaisse l'affinité de trois antagonistes ainsi que quelques autres mutations dans les TM3 et TM7, renforçant l'implication de ces TMs dans la stabilisation du récepteur B<sub>2</sub> (Meini et coll., 2002). Également, une étude révèle que si l'arginine en position 9 (C-terminale) de la séquence de la bradykinine native est retranchée, son affinité pour le RB<sub>2</sub> de rat est réduite d'un facteur 27,000 comparativement à la même opération effectuée sur l'antagoniste HOE 140, pour qui l'affinité n'est réduite que d'un facteur 7 (Jarnagin et coll., 1996). Effectivement, l'arginine en C-terminal de la BK est l'acide aminé qui pénètre en premier dans la rosette formée par les TMs du RB<sub>2</sub> et c'est cette arginine qui permet une affinité marquée de la BK pour le RB<sub>2</sub> et moindre pour le RB<sub>1</sub>, ce dernier favorisant les ligands dépourvus de cette arginine (exemple : des-Arg<sup>9</sup>-BK) (Leeb-Lundberg et coll., 2005). Lorsque la BK se lie au RB<sub>2</sub>, il y a couplage intracellulaire avec la protéine G trimérique dont les sous-unités alphas peuvent être, généralement, G<sub>αq/11</sub> ou G<sub>αi/o</sub> (Maurer et coll., 2011). Il existe aussi certains modèles où les voies signalétiques contrôlées par les protéines G<sub>αq</sub> et G<sub>αs</sub> co-existent et où ces voies sont trans-régulées de manière négative (Fang et coll., 2005). La sous-unité G<sub>αq/11</sub> active la PLCβ générant ainsi du DAG et de l'IP3 à partir du PI(4,5)P2. L'IP3 se lie à son récepteur provoquant l'activation de canaux calciques

induisant un relâchement d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol à partir de réserves intracellulaires, notamment dans le réticulum endoplasmique (Mikoshiya, 2007). Dans les cellules endothéliales, cette hausse de  $\text{Ca}^{2+}$  active la calcineurine qui désinhibe l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) par déphosphorylation de sa Tyr<sup>497</sup> (Harris et coll., 2001). De plus, le calcium engendré d'une manière dépendante d'un agoniste active la PLA2 qui entraîne la transformation de plusieurs lipides telle que la phosphatidylcholine (PC) en acide arachidonique, qui est ensuite métabolisée par la cyclooxygénase (COX) et la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) synthase pour mener à la formation de la PGI<sub>2</sub> (Howl et Payne, 2003). Par la suite, cette PGI<sub>2</sub> active son récepteur (IP) pour augmenter la concentration d'AMPC disponible dans le muscle lisse. Ces deux seconds messagers provoquent la relaxation des muscles lisses via la hausse de calcium occasionnée par la BK. En plus des effets médiés par la sous-unité alpha, la sous-unité G<sub>βγ</sub> active la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui à son tour active une protéine sérine/thréonine kinase (Akt) provoquant la phosphorylation de la Ser<sup>1177</sup>, site d'activation majeur d'eNOS (Kuhr et coll., 2010). De sorte qu'eNOS est à la fois désinhibée par G<sub>α</sub> et activée par G<sub>βγ</sub>. Il a été démontré que dans plusieurs tissus, l'action des kinines, du NO et des prostaglandines ne provoquent pas une augmentation du nombre de RB<sub>2</sub> et qu'un antagonisme persistant et systémique du RB<sub>2</sub> par l'icatibant n'induit pas un mécanisme compensatoire de régulation à la hausse du récepteur B<sub>1</sub> (Marceau et coll., 1999). Également, la notion d'agoniste biaisé du RB<sub>2</sub> a été étudiée par exploitation d'agonistes résistants au métabolisme (B-9972 : agoniste peptidique et le composé 47a : agoniste partiel non-peptidique) lesquels démontrent une activation persistante de c-Fos et de ERK1/2 qui peuvent être dû à une cinétique prolongée d'endocytose (Bawolak et coll., 2009). Entre autres, les RB<sub>2</sub> de la bradykinine seraient impliqués dans le développement du cancer de la prostate, dans la migration du chondrosarcome et dans la stimulation de l'invasion et la croissance de multiples carcinomes notamment celui des cellules squameuses de la tête et du cou (CCSTC) (Lappano et Maggiolini, 2011). le RB<sub>2</sub> et les EGFRs sont généralement surexprimés dans les cellules cancéreuses et leur ligand inflammatoire, dans ce cas la BK et la PGE<sub>2</sub>, respectivement, contribuent à la stimulation de voies autocrines telle que la voie *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) de manière dépendante ou indépendante de l'EGFR (Thomas et coll., 2006). Effectivement, dans les CCSTC, la bradykinine induit une transactivation du *epidermal growth factor receptor* (EGFR), activant la voie MAPK induisant une augmentation de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) lui conférant une activité inflammatoire (Zhang et coll., 2008). D'ailleurs, dans les

cellules humaines du cancer de la prostate, la BK active la voie PKC $\delta$ /c-Src menant à une augmentation de la chimiomigration et de l'expression des *matrix metalloproteinases 9* (MMP-9); l'activité protéolytique des MMP corrèle avec les processus d'invasion et de métastases observées dans plusieurs cancers (Yu et coll., 2013). En outre, la BK potentialise la prolifération cellulaire, augmente les niveaux de c-Myc et de l'activité de ERK1/2 dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 (Figuroa et coll., 2012). La BK, via l'activation de son récepteur, induit la prolifération cellulaire dans un nombre croissant de cancers. Également, il a été démontré qu'une perte de fonction du RB<sub>2</sub> dans le rein en développement entraîne une stabilisation de la protéine tumorale 53 (p53) et conséquemment, l'induction d'un état pré-apoptotique par stimulation de l'expression de gènes pré-apoptotiques (Bax, PUMA, Bad, caspases, etc.) et une dérégulation intracellulaire des voies de survie par régulation négative des voies MAPK/ERK et PI3K-Akt qui sont reconnues pour promouvoir la survie et la prolifération (Fan et coll., 2006).

#### 1.4.4.2 Désensibilisation et endocytose du récepteur B<sub>2</sub>

Étant donné que le RB<sub>2</sub> détient une activité indépendante de la liaison d'un ligand, il semblerait qu'il serait aussi sujet à une désensibilisation basale autonome (Leeb-Lundberg, 2012). La phosphorylation des acides aminés sérine (Ser) et thréonine (Thr) de la queue C-terminale par les GRKs et la PKC joue un rôle indéniable dans l'endocytose, le trafic, le recyclage du RB<sub>2</sub> et de son couplage aux protéines G (Leeb-Lundberg et coll., 2005). Effectivement, dans les cellules HEK293, la co-expression du RB<sub>2</sub> et d'une GRK révèle que seule la GRK4 $\alpha$  parmi les GRK non associées à la rhodopsine (GRK2 à GRK6) provoquait une augmentation des phosphorylations de la queue C-terminale et ce, aux acides aminés Ser<sup>339</sup> et Ser<sup>346</sup>/Ser<sup>348</sup> (Blaukat et coll., 2001). En plus des GRK, le RB<sub>2</sub> est phosphorylé par la PKC sur le résidu Ser<sup>346</sup> ce qui entraînerait sa désensibilisation lors d'addition de faibles doses de BK et cette phosphorylation semble aussi être agoniste-indépendante provoquant ainsi la désensibilisation hétérologue (Blaukat et coll., 2001). L'internalisation du RB<sub>2</sub> s'opère, généralement, via la phosphorylation de acides aminés spécifiques dans une séquence centrale de la queue C-terminale. Ces acides aminés sérine et thréonine (Ser<sup>339</sup>, Ser<sup>346</sup>, Ser<sup>348</sup>, Thr<sup>342</sup>, Thr<sup>345</sup>) définissent

une phosphorylation/internalisation optimale du RB<sub>2</sub> puisque lorsque ces acides aminés sont mutés, une diminution de l'internalisation peut être observée et ce, jusqu'à 80% (Pizard et coll., 1999). Par contre, la séquestration via les vésicules enrobées de clathrine n'est pas complètement supprimée indiquant une implication de mécanismes auxiliaires. Ainsi, il a été démontré que les phosphorylations de la queue C-terminale seraient nécessaires au recrutement de la  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub> mais pas à celui de la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>; lorsque la région C-terminale du RB<sub>2</sub> est tronquée, l'internalisation du récepteur se produit par association à la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub> (Feierler et coll., 2011). D'ailleurs, il s'avère que ce serait l'hélice 8 qui jouerait un rôle crucial dans l'endocytose de récepteur car lorsqu'une mutation ponctuelle de la proline de l'hélice 8 est effectuée, aucune endocytose n'est observée et ce, même si les  $\beta$ -arrestines sont surexprimées (Feierler et coll., 2011). Ainsi, l'hélice 8 intracellulaire agirait comme régulateur allostérique permettant au RB<sub>2</sub> de stabiliser une conformation autorisant une subséquente liaison avec la protéine G, les  $\beta$ -arrestines et les GRKs (Fausner et coll., 2005). En effet, le récepteur B<sub>2</sub> peut s'associer à la  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub> ou à la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>, est recyclé d'une manière dépendante du trafic endocytotique et une stimulation par un agoniste induit une régulation à la baisse (Bawolak et coll., 2009). La désensibilisation ainsi que l'endocytose du RB<sub>2</sub> suivent les paradigmes établis pour les RCPGs qui préconisent le rôle que jouent les  $\beta$ -arrestines; après la phosphorylation du RB<sub>2</sub>, les  $\beta$ -arrestines s'associent et permettent l'endocytose (Bawolak et coll., 2011). Une étude exploitant la méthode de fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) est en mesure d'estimer le temps d'association du complexe RB<sub>2</sub>- $\beta$ -arrestine<sub>2</sub> et en est venu à la conclusion que ce dernier était d'environ deux minutes (Gousseva et coll., 2008). De plus, cette étude a validé une version de la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub> tronquée, ayant supposément plus d'affinité pour le RB<sub>2</sub>, et celle-ci forme un complexe avec le RB<sub>2</sub> qui reste associé presque trois fois plus longtemps au récepteur que la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub> non-tronquée (Gousseva et coll., 2008). La distribution subcellulaire de la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub> et de la  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub> est influencée par leur séquence en C-terminal et la liaison de ces dernières au RB<sub>2</sub> influence grandement la désensibilisation, la séquestration et le recyclage du récepteur (Oakley et coll., 2000). L'endocytose du RB<sub>2</sub> a longtemps été perçue indépendante des molécules de clathrine et médiée par une séquestration des récepteurs au niveau des cavéoles mais une récente étude exploitant un système de bioluminescence resonance energy transfer (BRET) (Hamdam et coll., 2007) a catégorisé l'internalisation des RB<sub>2</sub> dépendante des molécules de clathrine et des  $\beta$ -arrestines. Toutefois, il existe une possibilité qu'une population de RB<sub>2</sub> soit retrouvée aux cavéoles et/ou radeaux

lipidiques et que cette dernière y soit transloquée transitoirement sans être séquestrée (Lamb et coll., 2002). Il se pourrait que l'endocytose du RB<sub>2</sub> soit dépendante du type cellulaire car certaines protéines impliquées dans les voies signalétiques du RB<sub>2</sub> ainsi que le récepteur même sont associés aux cavéoles dans les cellules endothéliales (Frank et coll., 2003). De plus, des études exploitant des signaux optiques, générés par la lignée cellulaire cancéreuse A431, ont révélé que la rupture des domaines enrichis en cholestérol supprimait environ 50% de l'endocytose des RB<sub>2</sub> (Fang et coll., 2005). Ce modèle démontre que les RB<sub>2</sub> n'empruntent pas une voie endocytotique exclusivement et que plusieurs voies peuvent coexister pour désensibiliser les récepteurs et recruter des voies signalétiques intracellulaires post-endocytotiques. Également, les RB<sub>2</sub> peuvent endocytoser de volumineux complexes ligand-anticorps sans présenter des signes autophagiques tel que confirmé par exploitation de nanomatériaux enrobés d'anticorps (Bawolak et coll., 2011).

#### *1.4.4.3 Dégradation et recyclage du récepteur B<sub>2</sub>*

Le sort du RB<sub>2</sub>, lorsqu'il est internalisé, s'avère être dicté par certains acides aminés présents sur sa queue C-terminale; une substitution de la queue du RB<sub>2</sub> par celle du RB<sub>1</sub> atténue la proportion de récepteurs recyclés et dirige le RB<sub>2</sub> vers la dégradation lysosomale (Enquist et coll., 2007). Effectivement, la queue C-terminale du RB<sub>2</sub> activé est la cible de phosphorylations, effectuées par les GRKs, permettant de recruter une  $\beta$ -arrestine qui agit à titre de protéine d'échaffaudage, facilitant l'association de plusieurs autres molécules impliquées dans le recyclage (Kim et Benovic, 2002). À cet égard, lorsque la queue du RB<sub>2</sub> est mutée pour augmenter l'affinité de sa liaison à la  $\beta$ -arrestine, les complexes résultants demeurent au niveau des endosomes et le recyclage est ainsi interrompu (Simaan et coll., 2005). Une observation similaire est obtenue lors de la stimulation du RB<sub>2</sub> par un agoniste résistant au métabolisme qui empêche un recyclage classique (redistribution des RB<sub>2</sub> à la membrane plasmique observée après trois heures de stimulation) révélant qu'une dissociation de l'agoniste permet le recyclage du récepteur : des enzymes endosomales doivent être responsables de la dégradation du ligand (Bawolak et coll., 2012). De plus, il a été démontré que 30 minutes après la stimulation du RB<sub>2</sub> par un agoniste fluorescent, le complexe récepteur-ligand est localisé aux endosomes précoces

(colocalisation du complexe et de Rab5) : le RB<sub>2</sub> est dirigé vers la station régissant le trafic endocytotique (Gera et coll., 2011a). De plus, la stimulation du RB<sub>2</sub>, par un ligand modifié en N-terminal par ajout d'une molécule fluorescente permet d'observer que le ligand parcourt le trajet endosomal (Rab5 et Rab7) jusqu'au lysosome pour y être dégradé (Gera et coll., 2011a).

#### **1.4.5 Récepteurs de l'histamine**

Pour médier ses effets pléiotropiques, l'histamine doit entrer en contact avec un ou plusieurs des quatre RCPGs de l'histamine (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> et H<sub>4</sub>) présents sur des types tout aussi variés de cellules : nerveuses, dendritiques, endothéliales, muscle lisse vasculaire, neutrophiles, macrophages, hépatocytes, etc (Jutel et coll., 2009). Par contre, il y a une prévalence d'incidence d'activation des récepteurs H<sub>1</sub> (RH<sub>1</sub>) et H<sub>2</sub> de l'histamine et donc les symptômes allergiques qui apparaissent chez l'humain sont majoritairement dus à ces 2 récepteurs, mais d'une manière prépondérante au RH<sub>1</sub>

##### *1.4.5.1 Le Récepteur H<sub>1</sub> de l'histamine*

Le RH<sub>1</sub> est un RCPG de la famille apparentée à la rhodopsine qui peut induire, entre autres, la vasodilatation, la perméabilisation vasculaire, la bronchoconstriction, la contraction de muscles lisses, de la vasodilatation à l'instar du RB<sub>2</sub> de la BK (Akdis et Simons, 2006). De plus, le RH<sub>1</sub> est associé à la sous-unité G<sub>αq/11</sub> activatrice de la phospholipase C, à l'instar du RB<sub>2</sub> des kinines (Simons et Simons, 2011)

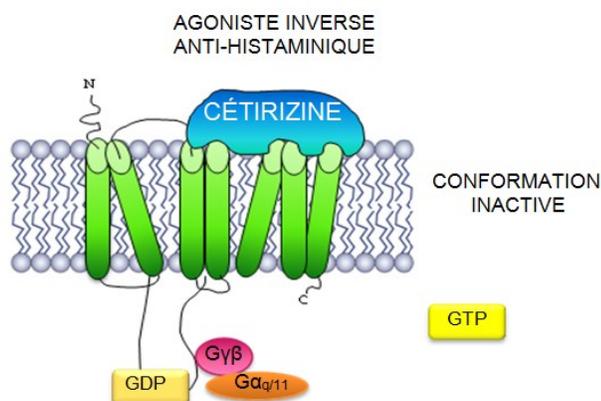
##### *1.4.4.2 Antagonisme du RH<sub>1</sub>*

Les quatre types de récepteurs de l'histamine détiennent une activité constitutive et peuvent alors provoquer des effets physiologiques sans que son agoniste n'ait pu intervenir dans la cascade signalétique (Simons, 2004). Donc cette activité intrinsèque des récepteurs suggère que

la forme active et inactive des récepteurs soit en équilibre et que l'équilibre tendrait vers la conformation inactive pour la majorité des récepteurs d'une population mais que certains récepteurs seraient activés de manière spontanée. Par contre, depuis peu, l'appellation des antagonistes de l'histamine (antihistaminiques) est changée pour agonistes inverses car ils se lient spécifiquement à la conformation inactive et suppriment l'activité intrinsèque des récepteurs par un déplacement de l'équilibre de la population totale des récepteurs vers une conformation inactive (Simons et Simons, 2011, de Ligt et coll., 2000). La première génération d'antihistaminiques pour le  $RH_1$  est non spécifique aux récepteurs de l'histamine (bloque d'autres types de récepteurs) et ces molécules peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et provoquer de la somnolence, une perte des fonctions cognitives et affecter les performances psychomotrices (Leurs et coll., 2002). Pour remédier à cette situation, une seconde génération d'antihistaminiques fut introduite pour usage clinique vers 1980 et ces molécules détiennent une forte affinité aux  $RH_1$ , ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique et ont peu d'effets secondaires (Simons, 2004).

#### *1.4.4.3 Agoniste inverse du $RH_1$ : la cétirizine*

La cétirizine est un agoniste inverse qui fait partie de la deuxième génération d'antihistaminique et est un métabolite principal (45%) de l'hydroxyzine duquel un groupement alcool est oxydé en groupement carboxylique pour générer la cétirizine (Nojavan et Fakhari, 2011). La cétirizine est un mélange racémique de deux énantiomères, la levocétirizine et la dextrocétirizine et son efficacité thérapeutique a été démontrée pour les rhinites allergiques saisonnières et pérenniales, l'urticaire, la dermatite atopique, la toux et l'asthme allergique et les réactions locales aux piqûres de moustiques (Curran et coll., 2004). Les effets antihistaminiques de la cétirizine seraient attribuables à l'énantiomère R (lévocétirizine) et au groupement carboxylique spécifique de ce métabolite qui lui procure un taux de dissociation très lent (Gilliard et coll., 2002). De ce fait, cette lente dissociation peut être exploitée dans une stratégie de pro-drogue étant donné que, dans un système biologique, les cinétiques d'hydrolyse des médicaments par les composantes enzymatiques sont des facteurs limitants complexes. Ainsi, chaque fraction libérée lie son récepteur et y reste associé jusqu'à ce que toutes les réactions d'hydrolyse soient complétées.



**Figure 6.** Représentation de l'action moléculaire de la cétirizine (agoniste inverse) sur le récepteur H<sub>1</sub> de l'histamine. La cétirizine permet l'immobilisation des récepteurs dans la conformation inactive et empêche toute activité intrinsèque suite à un déplacement de l'équilibre vers la conformation inactive. (Adapté de Simons et Simons, 2011).

## 1.5 Objectifs des travaux

Nos travaux visaient à approfondir notre connaissance sur l'étendue de la capacité d'endocytose d'un complexe formé d'un ligand et du RB<sub>2</sub> et d'explorer la faculté des enzymes appartenant au SKK, notamment L'ECA, de cliver divers substrats.

Le premier volet de l'étude consistait à exploiter des peptides pourvus d'un espaceur permettant le couplage d'une séquence bifonctionnelle ou d'un cargo. Deux ligands du RB<sub>2</sub>, l'agoniste B-9972 et l'antagoniste B-9430, furent couplés à une molécule fluorescente (FITC) dans le but d'obtenir des outils d'imagerie cellulaire dotés d'une bonne affinité pour le RB<sub>2</sub>. Ces deux ligands fluorescents furent caractérisés et ont été employés à titre de témoins dans les autres expériences. Également, des peptides détenant un épitope myc ont été employés pour tester l'hypothèse qu'un anticorps peut lier un ligand et être coendocytosé. Ces deux ligands bifonctionnels ont été caractérisés et la complémentarité moléculaire épitope-anticorps a été étudiée. De plus, des peptides cargos, chacun conjugué à une molécule aux propriétés

distinctes, ont été caractérisés. Par exemple, le peptide cargo comprenant l'AlexaFluor 350 a servi de modèle de localisation intracellulaire post-endocytose. Ainsi, des études basées sur les mécanismes d'endocytose connus permettront d'effectuer des colocalisations avec des protéines impliquées dans l'endocytose, notamment les  $\beta$ -arrestines et EEA1 (effecteur de Rab5). Tous ces peptides pénètrent dans les cellules cibles via une endocytose récepteur-spécifique et sont subséquemment colocalisés avec les protéines endosomales.

Le deuxième volet était plutôt axé sur l'enrichissement de nos connaissances du métabolisme d'un peptide naturel et d'un agoniste artificiel au sein de systèmes biologiques. Ainsi, une étude détaillée du peptide cargo détenant la cétirizine à son extrémité N-terminale a été effectuée. De ce fait, sa possible bivalence pour le  $RB_2$  et le  $RH_1$  de l'histamine a été évaluée. Ainsi, la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK permet de vérifier si une libération de la cétirizine seule ou des fragments de la cétirizine pouvaient agir via les récepteurs de l'histamine et antagoniser les effets engendrés par l'histamine. On émet l'hypothèse que CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK agisse à titre de pro-drogue nécessitant l'action d'hydrolyse d'une enzyme présente dans le système étudié pour révéler son activité antihistaminique latente. Également, avec la découverte d'un peptide libéré par une enzyme du neutrophile, la protéinase 3, certaines questions concernant la relation qu'il entretiendrait avec le SKK ont émergées. Ainsi, l'ECA hydrolyse la BK et pourrait, de la même manière, hydrolyser les liens peptidiques de la Met-Lys-BK-Ser-Ser et produire un peptide d'affinité supérieure pour le  $RB_2$ . Nous tenterons d'élucider l'implication du métabolisme de l'ECA dans l'activation métabolique des deux peptides (CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK et Met-Lys-BK-Ser-Ser). L'exploitation de systèmes biologiques sera essentielle, dans ce volet, pour illustrer la capacité des enzymes tissulaires, présentes au niveau vasculaire, à effectuer les réactions d'hydrolyses peptidiques qui permettent de potentialiser les effets contractiles des ces deux peptides.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Synthèse peptidique

Tous les peptides présentant une extension en N-terminal ainsi que Met-Lys-BK-Ser-Ser ont été produits par synthèse en phase solide, purifiés et caractérisés à l'aide des méthodes générales décrites précédemment (Gera et coll. 1996) par notre collaborateur, le Dr Lajos Gera (Université du Colorado, Denver). Ainsi, des groupements chimiques protecteurs (Boc, Fmoc, Toc, Tos), activateur (HOBt) ou cyclisateur (BOP) ont permis l'assemblage de plusieurs peptides selon des méthodes de synthèse chimiques nouvelles ou bien établies.

#### 2.1.1 Peptides fluorescents

Les peptides B-9972 (D-Arg<sup>0</sup>, [Hyp<sup>3</sup>, Igl<sup>5</sup>, Oic<sup>7</sup>, Igl<sup>8</sup>]-BK) et son isomère B-9430 (D-Arg<sup>0</sup>, [Hyp<sup>3</sup>, Igl<sup>5</sup>, D-Igl<sup>7</sup>, Oic<sup>8</sup>]-BK), un agoniste et un antagoniste du RB<sub>2</sub>, respectivement, ont précédemment été rapportés; B-9972 est un agoniste résistant au métabolisme et B-9430 est un antagoniste puissant (Bawolak et coll., 2007). La méthode d'obtention de nouveaux peptides fluorescents consistait en l'utilisation des sels d'acides trifluoroacétiques de B-9972 et B-9430 qui furent mis présence de fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC) et de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA) dans un solvant diméthylformamide (DMF) (Fulop et coll., 2007). Cette méthode d'acylation des peptides en N-terminal par FITC (isomère I, Molecular Probes, Inc.) a permis d'obtenir des peptides couplés au N $\alpha$ -fluorescéine-thiocarbamoyle (FTC); FTC-B-9972 et FTC-B-9430 (Gera et coll., 2012a).

### 2.1.2. Peptides détenant un épitope myc

L'ajout d'un épitope myc, qui est une séquence pouvant être reconnue par des anticorps monoclonaux commerciaux, a été rapporté pour le RB<sub>2</sub> (Bawolak et coll., 2011) et le RB<sub>1</sub> (Morissette et coll., 2004). L'épitope myc a été utilisée pour concevoir des peptides pouvant être détectés par ajout d'un anticorps anti-myc fluorescent. Les peptides qui ont été conjugués à cet épitope sont la BK et l'agoniste B-9972. Étant donné que l'épitope myc est assez volumineux (composé de dix acides aminés), un espaceur, basé sur la maximakinine, a été introduit pour permettre une certaine latitude pour la liaison de l'anticorps. Ainsi, les acides aminés K, G et P ont servi de séquence charnière et les peptides résultants, myc-KGP-B-9972 et myc-KGP-BK, ont été synthétisés à l'aide d'une résine préchargée (Boc-Arg(Tos)-O-résine) par stratégie Boc standard.

### 2.1.3 Peptides cargos

La bradykinine et un espaceur  $\epsilon$ -aminocaproyl ( $\epsilon$ -ACA), dont le propre groupement N-terminal fut protégé par Fmoc, furent couplés à une molécule d'intérêt ce qui nous a permis d'obtenir les peptides qui présentent une extension en N-terminal et ce, par une méthode exploitant BOP/HOBt/DIEA sur phase solide (Gera et coll., 2012a). Les peptides conjugués qui ont été générés sont la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK et l'acide carboxylique du ferrocène (FeC) couplé avec  $\epsilon$ -ACA-BK (FeC- $\epsilon$ -ACA-BK). Le troisième peptide conjugué, qui est constitué de l'AlexaFluor-350 couplé à  $\epsilon$ -ACA-BK (AF350- $\epsilon$ -ACA-BK), a dû être synthétisé différemment par une nouvelle méthode faisant intervenir un ester carboxylique succinimide d'AF-350 (N-hydroxysuccinimide-AF350) et le  $\epsilon$ -ACA-BK en présence de HOBt/DIEA (Cepeniene et coll., 2011).

#### **2.1.4 Met-Lys-BK-Ser-Ser**

Ce tridécapeptide, aussi appelé PR3-kinine, est issu d'un clivage du KHPM du SKK par la protéinase 3 du neutrophile (Khan et coll., 2009). Cette enzyme se retrouve au niveau de la membrane plasmique du neutrophile humain et est généralement libérée lors de la dégranulation des granules azurophiles, spécifiques et sécrétoires. La protéinase 3 est activée lors de sa translocation dans un environnement neutre (Gabillet et coll., 2012). Met-Lys-BK-Ser-Ser (M-K-BK-S-S) a été obtenu à partir de la stratégie Fmoc sur résine Merrifield selon la procédure de synthèse en phase solide standard (Gera et coll., 2008a).

### **2.2 Culture cellulaire et transfections**

Les cellules CHO (cellules d'ovaires d'hamster chinois) ont été cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplémenté avec du FBS (10 %), de la L-glutamine (2 mM) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine 1%). Les cellules HEK 293a, sous-clones des cellules HEK 293, obtenues de Sigma-Aldrich, furent cultivées dans le même milieu que les cellules CHO. Les cellules HEK 293 exprimant stablement la protéine de fusion RB<sub>2</sub>-GFP, produites à partir de cellules HEK 293 obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA), quant à elles, ont été cultivées dans du milieu  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -Minimum Essential Medium) supplémenté avec du FBS (10 %), avec la L-glutamine (2 mM), les antibiotiques (pénicilline et streptomycine 1%) et de la généticine (500  $\mu$ g/ml) pour sélectionner les cellules exprimant le transfectant grâce à une insertion du gène de résistance à la néomycine. Les cellules CHO et HEK 293a ont été transfectées par utilisation du réactif de transfection ExGen 500 (MBI Fermentas Inc.; 7 équivalents d'ExGen 500 pour 1 équivalent d'ADN) Subséquemment, le réactif de transfection Turbofect (Thermo Scientific Inc.) a été utilisé à cause de la discontinuation de la production d'ExGen 500. Les deux produits ont été utilisés lorsque les cellules atteignaient 70% de confluence, pour une durée variant entre 12 et 48 heures et selon les procédures décrites par le manufacturier. Deux vecteurs codant pour le

RB<sub>2</sub> précédemment décrits furent particulièrement employés; le vecteur myc-RB<sub>2</sub> (Bawolak et coll., 2011) et le vecteur codant pour le RB<sub>2</sub> de type sauvage du lapin (Bachvarov et coll., 1995). Le vecteur peACE codant pour l'ECA ainsi que les deux vecteurs codant pour des mutants de l'ECA (peACE-N1-active et peACE-C1-active), dont un des deux sites catalytiques est inactivé par substitution de deux acides aminés histidines par un acide aminé lysine (Wei et coll., 1992), sont des dons du Professeur Pierre Corvol (INSERM, Paris, France). Le vecteur codant pour la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>-GFP (Bernier et coll., 2007) est un don du Docteur Michel Bouvier (Université de Montréal, QC, Canada) alors que celui codant pour la  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub>-Cherry Fluorescent Protein (cherryFP) (Bawolak et coll., 2009) est un don du Docteur Jean-Martin Beaulieu (Université Laval, QC, Canada). Le vecteur codant pour EEA1-FYVE-GFP est un don du Docteur Tamas Balla (NICHD, NIH, Bethesda, MD, USA). Le vecteur codant pour le RH<sub>1</sub> (clone HRH0100000 inséré dans le vecteur pcDNA3.1) a été obtenu au centre de ressource cDNA de l'Université du Missouri-Rolla (Rolla, MO).

### **2.3 Microscopie à fluorescence**

Toutes les cellules destinées à la microscopie ont été cultivées dans des pétris de 35 mm. Ces cellules ont été stimulées par addition de substances directement dans les pétris ou par ajout de substances pré-mélangées au milieu de culture des pétris avant la stimulation et ce, pour une durée variant de 15 minutes à 3 heures et ensuite incubées à 37°C (atmosphère saturée en eau avec 5% CO<sub>2</sub>). Si les cellules exprimaient stablement le RB<sub>2</sub>-GFP ou transitoirement une protéine fluorescente, les lavages avant l'observation n'étaient pas effectués. Par contre, si un composé fluorescent agissait à titre de stimulant, 3 lavages étaient généralement accomplis. Par la suite, le milieu dans lequel les cellules baignaient était enlevé pour pouvoir apposer une lamelle au fond des pétris. De la sorte, la distribution cellulaire a été observée au microscope sous un objectif normal de 40X ou à l'huile de 100X sur des cellules vivantes exprimant stablement ou transitoirement des protéines cibles. Pour les peptides cargos, des cellules HEK 293 RB<sub>2</sub>-GFP ont été utilisées pour déterminer si la localisation intracellulaire de ce récepteur correspond aux effets obtenus par stimulation d'un véritable agoniste du RB2. En plus de ces

peptides, un excès de l'antagoniste du  $RB_2$ , le LF16-0687 (5  $\mu$ M) (don de Laboratoires Fournier, Daix, France), était additionné à certains pétris pour s'assurer de la spécificité des effets des peptides. Pour le peptide AF350- $\epsilon$ -ACA-BK, une colocalisation des cellules HEK 293  $RB_2$ -GFP était possible grâce aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission distinctes de la portion AF350 du peptide. De plus, des cellules exprimant myc- $RB_2$  cotransfectées avec la  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>-GFP ou la EEA1-FYVE-GFP ont été utilisées pour une stimulation du  $RB_2$  par AF350- $\epsilon$ -ACA-BK (essais de co-localisation). Pour les expériences concernant FTC-B-9972 (5  $\mu$ M), CF- $\epsilon$ -ACA-BK (5  $\mu$ M) et FTC-B-9430 (100 nM) des cellules exprimant myc- $RB_2$  ou non ont été utilisées. Toutes les expériences exploitant un anticorps fluorescent faisaient référence à l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope myc couplé à l'AlexaFluor-488 (clone 4A6, dilution 1:500; Millipore). Des cellules HEK 293a ont été transfectées soit avec myc- $RB_2$  ou le  $RB_2$  sauvage de lapin (parfois cotransfectées avec  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub>-cherryFP) et stimulées avec la BK (100 nM) ou un des peptides présentant un épitope myc (myc-KGP-BK ou myc-KGP-B-9972 5  $\mu$ M) en présence ou non de l'anticorps fluorescent. À titre de témoins, quelques pétris furent stimulés avec FTC-B-9430 (100 nM) ou FTC-B-9972 (5  $\mu$ M). D'autres expériences, utilisant les cellules HEK 293  $RB_2$ -GFP, furent conduites pour confirmer le sort des récepteurs lors d'une stimulation de 3 h par rapport au temps habituel de 30 min par ajout de la BK ou de myc-KGP-B-9972 (1 ou 10  $\mu$ M).

## **2.4 Essais de contractilité**

La réalisation de mesures de contractilité fait appel à des procédures approuvées par deux comités d'éthique locaux (expérimentations humaines et animales). Ainsi, des lapins mâles (New Zealand White, 1,5-2 kg) furent utilisés pour l'obtention de bandelettes de 3 cm de veine jugulaire (Houle et coll., 2000). En second lieu, des cordons ombilicaux provenant d'accouchements par césarienne élective ont été disséqués pour en extraire la veine ombilicale humaine et qui fut ensuite coupée en anneaux de 2-3 mm. Dans des bains à organes isolés de 5 ml, contenant une solution de Krebs (117,5 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM  $KH_2PO_4$ , 1,18 mM  $MgSO_4$ , 2,5 mM  $CaCl_2$ , 25 mM  $NaHCO_3$  et 5,5 mM D-glucose) oxygénée (95 %  $O_2$ ; 5%  $CO_2$ ) et chauffée (37°C), les tissus mentionnés ci-haut furent accrochés au fond et suspendus par un fil sous une tension de 0,5 g pour les bandelettes de veine de lapin et de 2 g pour les

anneaux d'aorte de lapin et de veine ombilicale humaine. Cette tension basale est nécessaire pour l'enregistrement des variations de contraction des tissus par un transducteur de force isométrique (modèle 52-9545; Harvard Apparatus, South Natick, MA) relié à un enregistreur. Ainsi, des courbes concentration-effet furent construites pour mesurer la puissance de nouveaux ligands des  $RB_2$  quantifiée selon l' $EC_{50}$  (concentration effective pour atteindre la moitié de l'effet maximal) des agonistes testés pour chaque type de récepteur. Les contractions ont été exprimées en pourcentage de contraction maximale induite par l'agoniste de référence (BK) enregistrées dans les tissus utilisés.

#### **2.4.1 Mesure de l'activité antagoniste des ligands**

Les valeurs d' $EC_{50}$  sont celles calculées pour les agonistes lors des essais de contractilité tandis que l'échelle  $pA_2$  mesure la puissance des antagonistes. Lors d'un ajout d'un antagoniste compétitif dans un essai de contractilité, la courbe concentration-effet obtenue pour un certain agoniste sera déplacée vers la droite. De ce fait, seulement les antagonistes compétitifs peuvent détenir une valeur de  $pA_2$ . Le  $pA_2$  est obtenu par un calcul de rapport des doses qui est transformé en log de ce rapport - 1 et est mis en fonction du log de la concentration d'un ligand qui servira de valeur témoin : régression de Schild (Gies et Landry., 2007). Les valeurs de  $pA_2$  ont été calculées avec un programme informatique (PCS/Pharm; Bawolak et Marceau, 2007). Ainsi, pour mesurer la puissance antagoniste de FTC-B-9430 dans les essais de contractilité, une addition de concentrations différentes (0, 250 nM, 1  $\mu$ M et 5  $\mu$ M) de ce dernier, 30 minutes avant la BK, fut effectuée pour produire une courbe concentration-effet de l'agoniste BK.

#### **2.4.2 Études de ligands agonistes du $RB_2$ présentant une extension en N-terminal**

En ce qui concerne les nouveaux peptides présentant un épitope myc (myc-KGP-BK et myc-KGP-B-9972), qui s'avèrent être deux produits d'extension d'agonistes connus du  $RB_2$  (BK et B-9972), la veine ombilicale humaine a été employée à titre d'essai biologique fonctionnel du

RB<sub>2</sub>. Les tissus furent pré-équilibrés 3 h et les courbes concentration-effet furent construites telles que décrites précédemment (Bawolak et coll., 2007). Les deux peptides références ainsi que les peptides détenant un épitope myc furent, un ou l'autre, ajoutés aux bains. Pour mesurer les effets de LF16-0687 (10 ou 100 nM) sur le peptide myc-KGP-BK, il était ajouté 30 minutes avant la construction de la courbe concentration-effet cumulative de l'agoniste. De plus, pour attester l'effet inhibiteur du LF16-0687 sur le peptide myc-KGP-B-9972, dans des bains contenant l'agoniste en concentration unique (7,4 µM) cet inhibiteur (LF16-0687 100 nM) ou de la saline furent préalablement additionnés. Finalement, lorsque les contractions atteignaient des valeurs submaximales, un excès de BK (9,4 µM) fut ajouté pour obtenir des effets contractiles maximaux. Pour les ligands détenant un groupement fluorescent FTC (FTC-B-9972 et FTC-B-9430), qui sont des dérivés de l'agoniste B-9972 et de l'antagoniste B-9430, les études de contractilité de la veine ombilicale humaine suivirent la nature des composés étudiés. Pour FTC-B-9972, nous avons fait une comparaison des effets contractiles de ce peptide avec ceux de la BK, représentés par les courbes construites lors d'un ajout cumulatif de l'un ou l'autre de ces peptides à la suite d'une équilibration des tissus d'une durée de 3 h. Également, une comparaison de leur temps de relaxation fut effectuée, suite à une stimulation maximale, et obtenue par un lavage dès l'obtention du plafond de l'effet contractile. Les peptides détenant une portion étiquetée comme cargo (AF350-ε-ACA-BK, FeC-ε-ACA-BK et CTZ-ε-ACA-BK) furent introduits, dans les bains à organes isolés, après un temps d'équilibration de 3 h des anneaux de veine ombilicale humaine et des courbes concentration-effet cumulatives aux 3 peptides ainsi qu'à la BK furent construites.

#### **2.4.3 Études de la Met-Lys-BK-Ser-Ser**

Pour approfondir les effets contractiles de la M-K-BK-S-S sur des systèmes biologiques susceptibles d'être concernés par l'action de ce peptide dérivé d'une nouvelle voie de formation, nous avons utilisé les veines isolées de lapin et de cordon ombilical humain, qui sont représentatives des effets médiés par le RB<sub>2</sub>. Les segments de veines ombilicales humaines ont été pré-équilibrés pour une durée de 3 h avant la construction des courbes concentration-

effet. Ensuite, un ou l'autre des peptides (M-K-BK-S-S ou BK) fut ajouté de manière cumulative et ce en présence de DMSO, de l'antagoniste LF16-0687 ou de l'inhibiteur de l'ECA, préalablement ajoutés 30 minutes avant les peptides à l'étude. Dans les expériences concernant les veines jugulaires de lapin, une confirmation de la susceptibilité de M-K-BK-S-S à l'hydrolyse par les ECA endogènes a été faite par l'emploi optionnel de l'inhibiteur de l'ECA (énalaprilat 100 nM). À des fins de comparaison, des courbes concentration-effet ont été produites, de manière identique, pour l'agoniste naturel préférentiel du  $RB_2$ , la BK.

#### **2.4.4 Études du ligand latent du récepteur $H_1$ libéré à partir de CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK**

Pour effectuer des essais de contractilité sur un système biologique exprimant naturellement les deux récepteurs ( $RB_2$  et  $RH_1$ ), nous avons opté pour l'emploi d'anneaux de veine ombilicale humaine qui peuvent aussi générer d'importantes réponses contractiles (Marceau et coll., 1994). Les anneaux furent pré-équilibrés dans les bains à organes isolés par lavages successifs avec le tampon de Krebs et ce, pour une durée de 2,5 h. Deux protocoles ont été suivis; le premier visant à s'assurer que la cétirizine seule pouvait inhiber les effets contractiles de l'histamine sans nuire à ceux exercés par la BK et le deuxième pour attester la capacité du peptide CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK à inhiber les effets contractiles médiés par l'histamine. Les courbes concentration-effet du premier protocole pour l'histamine, avec ou sans cétirizine (25 nM), furent construites 4 h suivant le montage des tissus dans les bains et celles de la BK, en suivant le même mode opératoire, 3 h suivant le montage. Dans les expériences du deuxième protocole, tous les tissus furent traités avec le LF16-0687 (1  $\mu$ M) pour effectuer un blocage permanent du  $RB_2$  dans l'éventualité où certains effets qui en dépendent pourraient interférer dans les enregistrements des effets contractiles médiés par l'histamine. Ensuite, 3 h après le montage des tissus dans les bains, la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK (0,59  $\mu$ M) fut introduite et 1 h après ce peptide, l'histamine était ajoutée de manière cumulative pour effectuer la construction des courbes concentration-effet. Le deuxième protocole comportait aussi un traitement optionnel à l'omapatrilate, un inhibiteur mixte de l'ECA et de la NEP, afin de déterminer si l'effet antihistaminique conjugué de la cétirizine dépend de la dégradation de la partie peptidique de ce peptide.

## 2.5 Essais de liaison

Pour estimer l'affinité des différents ligands pour un récepteur donné, nous avons effectué des essais de liaison sur des cellules adhérentes intactes, cultivées dans des plaques de 24 puits et incubées ou non avec des compétiteurs en présence d'un radioligand correspondant au récepteur en question. Effectivement, l'emploi d'un agoniste naturel (BK), d'un antagoniste (pyrilamine) et d'un inhibiteur (énalaprilate), modifiés par substitutions d'atomes d'hydrogène par des atomes de tritium, a permis d'estimer la population résiduelle des récepteurs en présence de compétiteurs ou encore de mesurer l'affinité de ces radioligands pour un certain type de récepteurs. Pour le RB<sub>2</sub>, la [<sup>3</sup>H]BK (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA; 60-90 Ci/ mmol) a été employée, pour l'ECA, l'[\*<sup>3</sup>H]énalaprilate (produite par le Dr Victor Sidorov, à partir de l'énalaprilate pure obtenue chez Kemprotec Ltd; 20-30 Ci/ mmol) et pour le RH<sub>1</sub>, la [<sup>3</sup>H]pyrilamine (American Radiolabeled Chemicals, Inc. St. Louis, MO; 20 Ci/ mmol). Une méthode générale est suivie avec quelques modifications de manipulations qui dépendent du type cellulaire, des compétiteurs et du récepteur cible. La procédure pour le RB<sub>2</sub> a été décrite précédemment (Bawolak et coll., 2007) et de l'ECA (Koumbadinga et coll., 2010). La procédure pour le RB<sub>2</sub> a été appliquée telle quelle pour le RH<sub>1</sub>. Les cellules étaient premièrement rincées avec 1 ml de tampon de liaison approprié (préchauffé à 37°C pour l'ECA), rincées une deuxième fois avec 0,5 ml : ce volume restait dans le puits et servait de milieu réactionnel. Ensuite, les compétiteurs étaient ajoutés, suivi d'une quantité de radioligand qui était constante dans tous les puits; [<sup>3</sup>H]BK (3 nM), l'[\*<sup>3</sup>H]énalaprilate (2 nM) et la [<sup>3</sup>H]pyrilamine (2 nM). Dans d'autres cas, nous voulions établir des courbes de saturation des récepteurs; alors une concentration croissante de radioligand était ajoutée à différents puits; [<sup>3</sup>H]BK (0,5-7 nM) et [<sup>3</sup>H]pyrilamine (0,25-4 nM). De plus, dans toutes les expériences de liaison, des puits appariés étaient employés pour mesurer la liaison non spécifique par ajout d'un excès de la version non tritiée du radioligand utilisé. Après une incubation de 90 min sur glace pour le RB<sub>2</sub> et le RH<sub>1</sub> et une incubation de 60 min à 37°C pour l'ECA, les puits étaient promptement rincés trois fois avec du PBS IX pH 7.4 glacé. Après les rinçages, les puits

étaient laissés à sec pour dissoudre les cellules par addition de 1 ml de NaOH 0,1 M et les suspensions résultantes étaient transférées dans 7 ml de liquide de scintillation (EcoLite(+), Fisher Scientific Inc.) dans lequel la radioactivité émise, par les radioligands liés aux récepteurs, était comptée pendant 2 min. L'affinité des ligands est traduite en  $IC_{50}$  (concentration d'un ligand non-radiomarqué qui inhibe la moitié de la liaison du radioligand) par dépouillement des courbes concentration-effet obtenues (Gies et Landry., 2007). Les essais de compétition de  $RB_2$  ont été réalisés sur des cellules HEK 293 exprimant stablement la protéine de fusion  $RB_2$ -GFP dans un tampon maintenu à 4°C (PBS 1 X, 0,02% azoture de sodium, 0,1 % BSA supplémenté avec 1 mM PMSF, 1  $\mu$ M captopril). Les essais de compétition de l'ECA ont été faits sur des cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec un vecteur d'ADN codant pour l'ECA de séquence humaine dans un tampon de liaison préchauffé (M199, pH 7.4, supplémenté avec 0.02 % azoture de sodium, 0.1 % BSA). D'autres essais de compétition ou de saturation reposaient sur l'utilisation de cellules CHO transfectées transitoirement avec myc- $RB_2$  ou  $RH_1$  dans le même tampon que les essais du  $RB_2$ . En plus des essais de compétition, une variation de ce protocole a été élaborée pour vérifier une possible libération de la cétirizine par dégradation de la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK dans les pétris lorsque mis en contact avec des cellules HEK 293  $RB_2$ -GFP ou HEK 293a transfectées avec l'ECA. Dans ces cas, le milieu conditionné de ces stimulations sur pétris, à 37°C, a été produit dans un tampon de liaison modifié (PBS 1 X, 0,1 % BSA), récolté et congelé. Les stimulations sur pétris de cellules HEK 293  $RB_2$ -GFP ont été réalisées avec la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK (1  $\mu$ M) en présence ou non de l'inhibiteur du  $RB_2$ , le LF16-0687 (1  $\mu$ M). Celles effectuées sur cellules HEK 293a ECA ont été incubées avec la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK (1  $\mu$ M) en présence d'omapatrilat (1  $\mu$ M) ou non (Bristol-MyersSquibb, Princeton, NJ) qui est un inhibiteur double : ECA ( $IC_{50}$  = 5 nM) et NEP ( $IC_{50}$  = 9 nM) (Blais et coll., 2002). Ensuite, les milieux conditionnés étaient utilisés comme compétiteurs de la [ $^3$ H]pyrilamine sur des cellules CHO transfectées transitoirement avec  $RH_1$ .

## **2.6 Fractionnement cellulaire**

L'isolement des membranes fut opérée sur des cellules HEK 293a non transfectées ou transfectées avec un ou l'autre des mutants de l'ACE (peACE-N1-active ou peACE-C1-active)

pour supporter les essais enzymatiques. Ces cellules étaient cultivées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup>, jusqu'à confluence, pour être décollées et homogénéisées à l'aide d'un piston verre-verre, sur glace, dans 250 µl de tampon sucrose (250 mM sucrose, 20 mM tampon tricine, 1 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptine, 2 mg/ml pepstatine, 10 mg/ml d'inhibiteur de trypsine de soja, pH 7.5). L'homogénat résultant était soniqué 30 secondes, était centrifugé une première fois (600 g, 10 min) et le surnageant issu de cette centrifugation l'était une deuxième fois (15000 g, 5 min). Cette fois, le culot de la deuxième centrifugation fut centrifugé une dernière fois (150 000 g, 3 h). Après les 3 h de la dernière centrifugation, le culot contenait les membranes cytoplasmiques. Le dosage des protéines totales pour les essais enzymatiques se fit par utilisation de l'essai BCA Protein Assay (Pierce) et la quantité de protéines utilisée était de 5 µg.

## **2.7 Essai enzymatique**

Les extraits membranaires normalisés étaient ajoutés, juste avant la lecture, dans une cuvette de 1 ml contenant le substrat FRET de l'ECA, Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH (Bachem, Torrance, CA; 10 µM), chez lequel la fluorescence est latente et est révélée lors de son hydrolyse par l'ECA, dissout dans un tampon Tris-HCl 0,1 M supplémenté de NaCl 0,05 M, ZnCl<sub>2</sub> 10 µM, pH 7.0). Avant l'addition des membranes dans la cuvette, la BK, la M-K-BK-S-S, en concentrations croissantes ou l'énalaprilat (100 nM) furent ajoutés pour agir à titre de compétiteurs au substrat fluorogénique de l'ECA. Les cuvettes ont été déposées dans un spectrophotomètre Aminco Bowman Series 2 luminescence, maintenues à 37°C, constamment agitées à l'aide d'un agitateur magnétique et ce, pour être excitées à 320 nm. La lecture de la fluorescence émise par les échantillons s'est effectuée à 420 nm pour une durée de 600 s. Les valeurs entre 200 s à 600 s ont été utilisées pour faire les calculs des pentes  $\Delta\text{fluorescence}/\Delta\text{temps}$ .

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 Peptides détenant une extension en N-terminal

La création de nouveaux outils moléculaires permet l'approfondissement des connaissances de plusieurs processus cellulaires et dans cette optique, différents peptides ont été produits dans le but d'examiner l'endocytose et la relation ligand-récepteur (tableau 1). Ainsi, des ligands fluorescents, des peptides dotés d'un cargo fonctionnel et un espaceur  $\epsilon$ -aminocaproyl, des peptides détenant un épitope myc et un espaceur basé sur la maximakinine (figure 7) et un peptide produit par le neutrophile humain furent caractérisés et étudiés dans des systèmes biologiques et des lignées cellulaires où, à tout le moins, le RB<sub>2</sub> figure.

Peptide	position <sup>a</sup>															
	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1+	2+	
<b>Agonistes du récepteur B<sub>2</sub> / ligands de l'ECA</b>																
<i>Premier peptide parent: BK</i>					Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-COOH			
CF- $\epsilon$ ACA-BK			CF	$\epsilon$ -ACA	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-COOH			
AF350- $\epsilon$ ACA-BK			CF	$\epsilon$ -ACA	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-COOH			
CTZ- $\epsilon$ ACA-BK			CTZ	$\epsilon$ -ACA	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-COOH			
FeC- $\epsilon$ ACA-BK			FeC	$\epsilon$ -ACA	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-COOH			
maximakinin	...	Lys	Gly	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-COOH			
Met-Lys-BK-Ser-Ser			Met	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-COOH	Ser	Ser	
<i>Second peptide parent: B-9972</i>																
				D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	Oic	Igl	Arg-COOH			
FTC-B-9972			FTC	D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	Oic	Igl	Arg-COOH			
<b>Antagonistes du récepteur B<sub>2</sub></b>																
<i>Peptide parent: B-9430</i>																
				D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	D-Igl	Oic	Arg-COOH			
FTC-B-9430			FTC	D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	D-Igl	Oic	Arg-COOH			

**Tableau 1.** Séquences alignées des substitutions effectuées et des acides aminés des peptides détenant une extension en N-terminal comparés aux peptides parents

<sup>a</sup>Abréviations : AF350 : AlexaFluor-350; CF : 5(6)-carboxyfluorescéine; CpG :  $\alpha$ -cyclopentylglycine; CTZ : cétirizine;  $\epsilon$ -ACA :  $\epsilon$ -aminocaproyl; FeC : ferrocényl; FTC : fluorescéine-5-thiocarbamoyl; Hyp : trans-4-hydroxyproline; Igl :  $\alpha$ -(2-indanyl)glycine; Oic : acide (3as, 7as)-octahydroindole-2-carboxylique

<sup>b</sup>La séquence complète de la maximakinine (19 acides aminés) H-Asp-Leu-Pro-Lys-Ile-Asn-Arg-Lys-Gly-Pro-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH

<p>Espaceur</p>	
DLPKINR <b>KGP</b> RPPGFSPFR	Maximakinine (19 acides aminés)
EQKLISEEDL	Épitope myc (10 acides aminés)
EQKLISEEDL <b>KGP</b> RPPGFSPFR	Myc-KGP-BK (22 acides aminés)
EQKLISEEDL <b>KGP</b> rRP <i>Hyp</i> G/g/S <i>Dic</i> /g/R	Myc-KGP-B-9972 (23 acides aminés)

**Figure 7.** Relation des séquences des agonistes détenant un épitope myc avec la maximakinine. Les lettres bleues représentent les acides aminés de l'espaceur. Les lettres rouges représentent les acides aminés de la bradykinine.

### 3.2 Étude des nouvelles versions fluorescentes des peptides B-9430 et B-9972

#### 3.2.1 Caractérisation pharmacologique des ligands fluorescents FTC du RB<sub>2</sub>

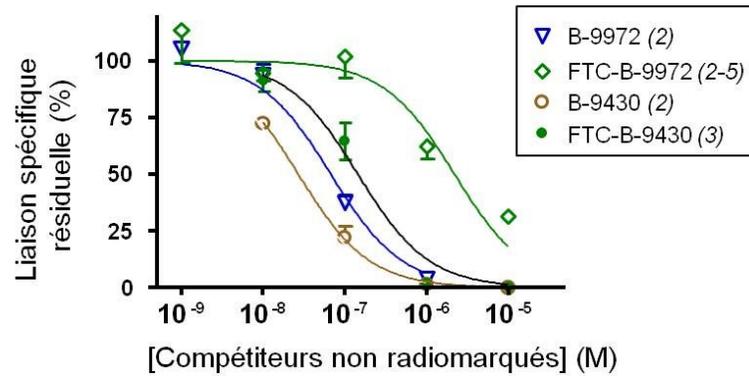
L'affinité de FTC-B-9972 (agoniste) et de FTC-B-9430 (antagoniste) pour le RB<sub>2</sub>, en comparaison avec l'affinité de leur peptides parents (B-9972 et B-9430) pour le même récepteur, ont été testées conjointement dans une expérience de compétition de liaison avec le radioligand [<sup>3</sup>H]BK sur des cellules HEK 293 exprimant stablement la protéine RB<sub>2</sub>-GFP (figure 8). Ces cellules furent incubées, sur glace, avec les deux peptides fluorescents ainsi qu'avec leur peptide parent pour une durée de 90 min à 37 °C (figure 8). Les peptides fluorescents FTC-B-9430 et FTC-B-9972 ont chacun démontré une perte d'affinité lors des essais de liaison d'un facteur d'environ 8 fois et 50 fois pour le RB<sub>2</sub>-GFP, respectivement, comparativement à leur peptide parent respectifs; l'IC<sub>50</sub> de B-9972 : 40-68 nM, de FTC-B-9972: 2205 nM, de B-9430 : 16-22 nM et de FTC-B-9430 : 145 nM (figure 8). Pour compléter la caractérisation pharmacologique de ces deux peptides, des essais de contractilité basés sur la veine ombilicale humaine furent effectués étant donné que ce système a été validé pour caractériser des ligands du RB<sub>2</sub> (figure 9) (Marceau et coll., 2010). La courbe obtenue pour

FTC-B-9972 fut comparée à celle de la BK. La BK présente des  $EC_{50}$  variables selon les tissus mais les valeurs d' $EC_{50}$  moyennes obtenues dans les veines ombilicales humaines se situent entre 10 et 19 nM (Gera et coll., 2012a). Les  $EC_{50}$  obtenus dans ces essais traduisent une perte de puissance contractile d'un facteur 8 pour le FTC-B-9972 ( $EC_{50}$  : 108 nM) comparativement à l'agoniste préférentiel du  $RB_2$ , la BK ( $EC_{50}$  : 10-19 nM) (figure 9A). De plus, dans les bains où la plus haute concentration de ces deux agonistes a été ajoutée, lors de l'obtention d'une réponse contractile maximale, un lavage fut effectué pour déclencher une relaxation des tissus (figure 9B). Le temps de demi-relaxation (demi-vie :  $t_{1/2}$ ) des tissus incubés avec FTC-B-9972 est d'au moins deux fois plus long que pour ceux incubés avec la BK (figure 9B). Pour mesurer l'activité antagoniste du FTC-B-9430, une série de concentrations (0-5  $\mu$ M) fut ajoutée dans les bains 30 min avant l'ajout de concentrations croissantes de BK (figure 9C). Le peptide fluorescent a démontré une activité antagoniste légèrement plus faible que son peptide parent ( $pA_2$  de B-9430 : 7,70 >  $pA_2$  de FTC-B-9430 :  $6,96 \pm 0,8$ ) (figure 9C) et cela a été démontré par transformation des données obtenues à la figure 9C en régression de Schild et par calcul des  $pA_2$  par un logiciel informatique (Bawolak et coll., 2007) (figure 9D). La pente obtenue pour la régression de Schild [ $-0.80 \pm 0.20$  (moyenne  $\pm$  erreur-type)] est compatible avec un antagonisme compétitif.

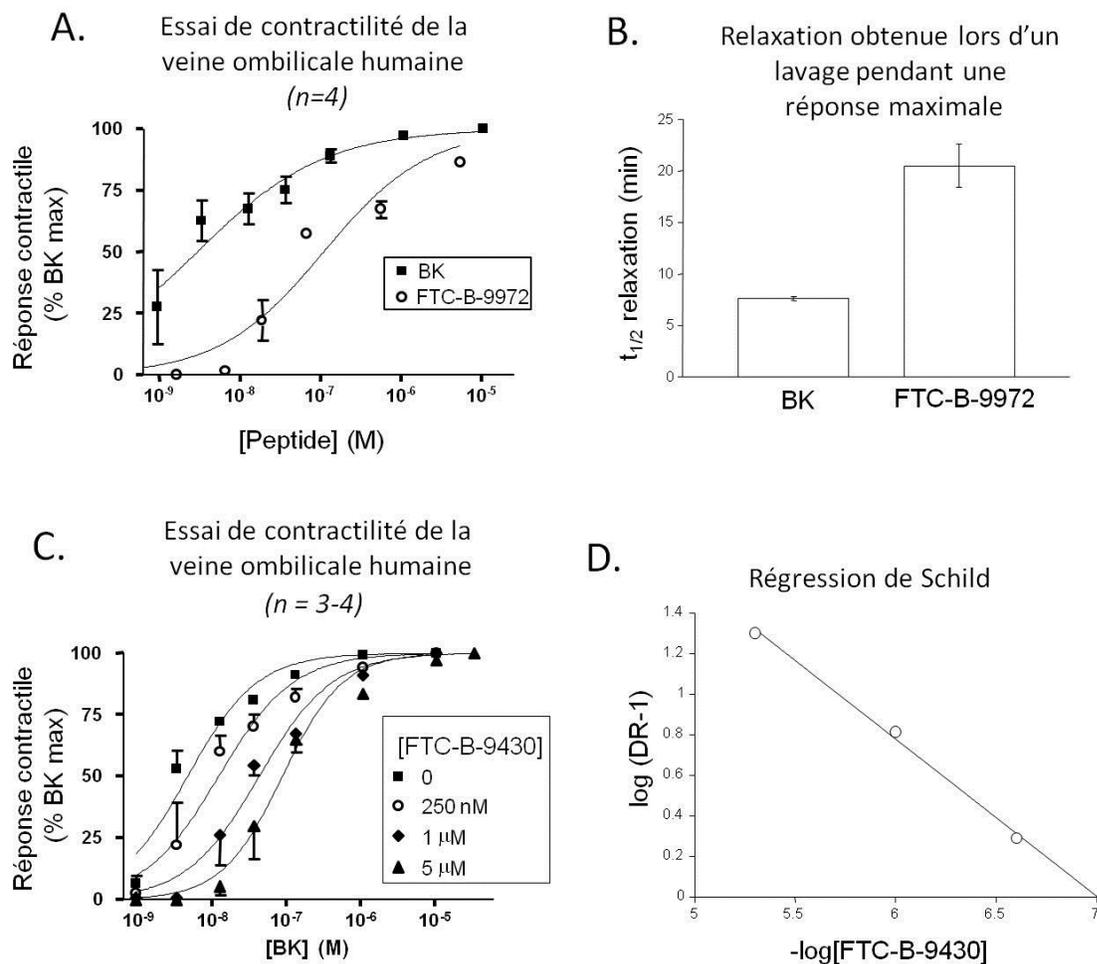
### 3.2.2 Distribution de la fluorescence des peptides

Des expériences en épifluorescence ont été effectuées pour visualiser la localisation subcellulaire des peptides fluorescents. Des cellules HEK 293a surexprimant les récepteurs  $B_2$  recombinants de type sauvage de lapin ou myc- $RB_2$  ont été stimulées par les deux peptides fluorescents (FTC-B-9972 : 5  $\mu$ M ou FTC-B-9430 : 100 nM) (figure 10A). De plus, des cellules HEK 293a non transfectées furent pareillement stimulées et servirent de témoins. L'antagoniste (FTC-B-9430) présente un marquage général de la membrane plasmique tandis que l'agoniste (FTC-B-9972) démontre une fluorescence intracellulaire discontinue de structures où la fluorescence est condensée. Dans la seconde expérience, des cellules HEK 293a transfectées avec le myc- $RB_2$  non stimulées servirent de témoins. Les cellules furent

Compétition de 3 nM de [<sup>3</sup>H]BK sur des  
cellules HEK 293 exprimant stablement RB<sub>2</sub>-GFP



**Figure 8.** Compétition de la liaison de 3 nM de [<sup>3</sup>H]BK sur des HEK293-RB<sub>2</sub>-GFP par les peptides B-9972, B-9430 et leur analogues fluorescents. La liaison spécifique résiduelle obtenue pour chaque ligand est exprimée en pourcentage de la moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne. Nombre de déterminations indiquées par les chiffres entre parenthèses.



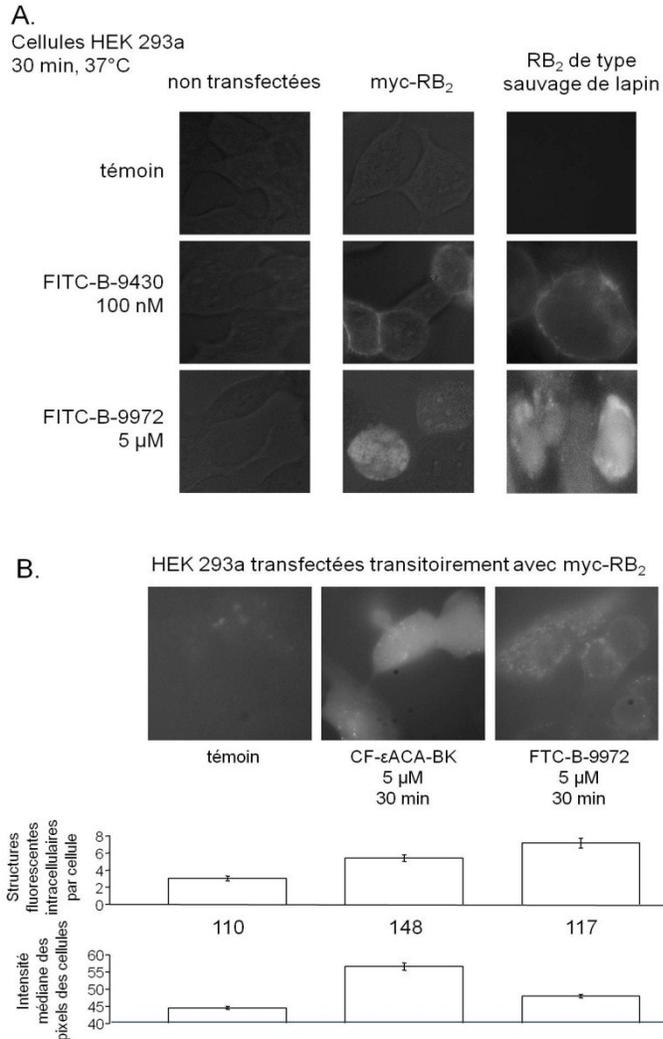
**Figure 9.** Essais de contractilité basés sur la veine ombilicale humaine de l'agoniste FTC-B-9972 et de l'antagoniste FTC-B-9430. (A) Courbes concentration-effet cumulatives de la BK et de FTC-B-9972 (B) Temps requis (min) pour une demi-relaxation de la réponse contractile de la veine ombilicale humaine stimulée par une concentration maximale de BK et de FTC-B-9972 suite à un changement de la solution de Krebs dans les bains. (C) Effet de l'ajout, 30 min avant la BK de différentes concentrations de FTC-B-9430 (0- 5 μM) sur la contraction de la veine ombilicale humaine induite par la BK (D) Régression de Schild pour FTC-B-9430; la pente obtenue à l'aide du programme PharmStat (Bawolak et coll., 2007) est de  $-0.80 \pm 0.20$  (moyenne  $\pm$  erreur-type). (A et C) Les valeurs des réponses contractiles composant les courbes sont exprimées en % de la moyenne  $\pm$  l'erreur-type d'un nombre de déterminations variant entre 3 et 4 pour les deux types d'essais de contractilité.

employées pour comparer la distribution et l'intensité de la fluorescence de FTC-B-9972 avec le peptide CF- $\epsilon$ -ACA-BK, ce dernier étant dégradé au niveau des endosomes (figure 10B). Pour ces trois conditions, de nombreuses cellules furent individuellement évaluées (témoin= 110, CF- $\epsilon$ -ACA-BK: 5  $\mu$ M, 30 min = 148 et FTC-B-9972: 5  $\mu$ M, 30 min = 117) pour compter les structures fluorescentes intracellulaires et l'intensité médiane des pixels des cellules (logiciel Photoshop 6.0; figure 10B). Comme prévu, le CF- $\epsilon$ -ACA-BK présentait, en plus des agrégats cytosoliques, une fluorescence diffuse uniforme et confirmait ce qui avait été démontré dans une étude antérieure (Gera et coll., 2011a). La différence d'intensité médiane de fluorescence que les deux peptides fluorescents ont induite est statistiquement significative lorsque comparée aux images témoins (figure 10B). Effectivement, le CF- $\epsilon$ -ACA-BK a émis une plus grande intensité médiane des pixels comptabilisés dans les cellules ( $50,4 \pm 1,2$ ) par rapport au FTC-B-9972 ( $45,4 \pm 0,5$ ) et aux cellules témoins ( $42,0 \pm 1,3$ ). Le FTC-B-9972 (agoniste résistant au métabolisme) a affiché un plus grand nombre de structures fluorescentes intracellulaires;  $8,8 \pm 1,8$  comparativement à  $5,5 \pm 0,6$  pour le CF- $\epsilon$ -ACA-BK et  $1,3 \pm 0,4$  pour les images témoins (valeur qui dépend de l'autofluorescence; figure 10B).

### **3.3 Étude de la liaison ligand-récepteur des agonistes détenant un épitope myc**

#### **3.3.1 Caractérisation pharmacologique de myc-KGP-BK et myc-KGP-B-9972**

Les courbes concentration-effet obtenues lors de l'essai de contractilité effectué à l'aide de veines ombilicales humaines révèlent que myc-KGP-BK détient une plus grande affinité pour le RB<sub>2</sub> que myc-KGP-B-9972 avec une affinité 20 fois moindre que celle de la BK pour contacter les tissus (figure 11A). Toutefois, l'agoniste résistant au métabolisme (B-9972), parent de myc-KGP-B-9972 est plus puissant que les deux peptides modifiés. Myc-KGP-B-9972, quant à lui, s'est avérée être largement moins puissant pour stimuler les effets contractiles médiés par le RB<sub>2</sub> avec une perte de puissance d'un facteur de 250, comparativement à la BK (figure 11A). De plus, l'emploi de l'antagoniste LF16-0687 (Houle et coll., 2000) a révélé que

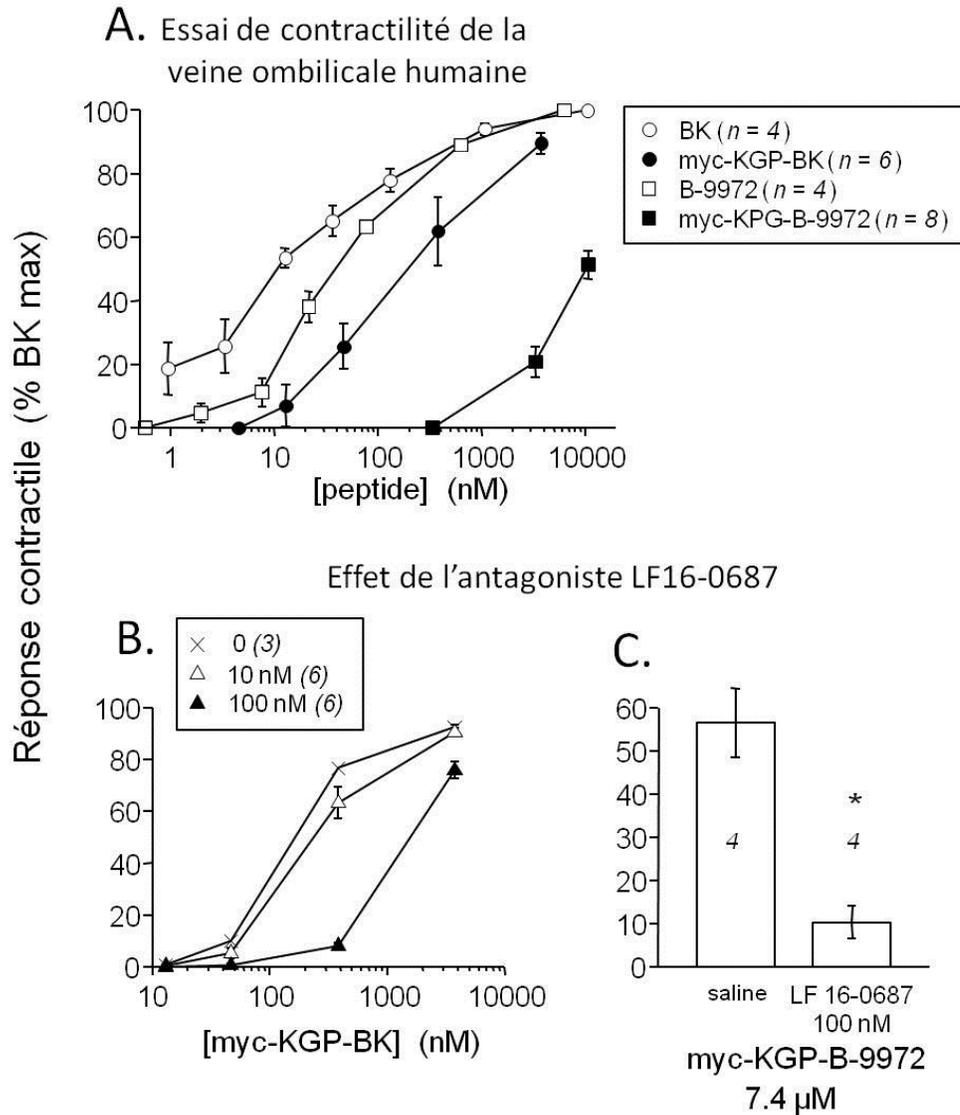


**Figure 10.** Distribution de la fluorescence des peptides FTC-B-9972 et FTC-B-9430 sur différents RB<sub>2</sub> recombinants. (A-B) Les cellules témoins ainsi que toutes les images de cellules non transfectées démontrent seulement de l'autofluorescence. Toutes les images représentent de l'épifluorescence verte. Représentatif de plusieurs cellules. Grossissement original: 400-1000 X (A) Le peptide FTC-B-9430 a démontré une fluorescence plutôt membranaire lorsque mis en présence, pour une durée de 30 min, des deux types de récepteurs. (B) Le CF-ε-ACA-BK et la FTC-B-9972 se distinguent par leur fluorescence et ce, aux mêmes concentrations : l'un engendre une fluorescence beaucoup plus cytosolique tandis que l'autre est localisée presque entièrement dans des structures endosomales. La première série d'histogrammes comptabilise le nombre de structures fluorescentes intracellulaires par cellule  $\pm$  erreur-type et la seconde série mesure l'intensité médiane des pixels de fluorescence verte dans les mêmes échantillons. Le nombre présenté entre les deux séries d'histogrammes correspond au nombre de cellules comptabilisées. Le test de Kruskal-Wallis indiquait que les trois valeurs des deux séries étaient hétérogènes ( $P < 0,0001$ ). Le test de comparaison multiple de Dunn ( $P < 0,01$ ) a permis de démontrer que toutes les paires de valeurs possibles différaient significativement une de l'autre.

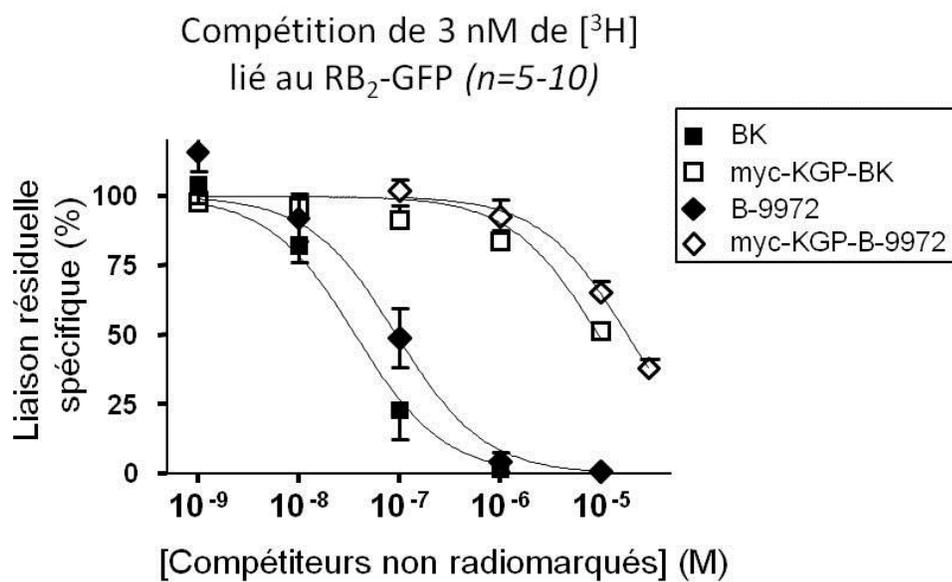
les deux peptides détenant un épitope myc sont effectivement antagonisés; myc-KGP-BK ajouté en concentrations croissantes en présence de 10 ou 100 nM de LF16-0687 (figure 11B) et 7,4  $\mu$ M de myc-KGP-B-9972 en présence de 100 nM de LF16-0687 ou de saline (figure 11C). Dans les trois essais, une concentration de 9,4  $\mu$ M de BK fut ajoutée lorsque les contractions semblaient submaximales pour atteindre un effet contractile maximal. Les essais de liaison ont globalement corroboré l'ordre d'affinité établi des peptides. Par contre, les deux peptides détenant un épitope myc ont démontré 196 à 259 fois moins d'affinité au RB<sub>2</sub> comparé à la BK lors des essais de liaison (figure 12), l'espèce pouvant expliquer la différence (la veine est humaine et le RB<sub>2</sub> recombinant, de lapin).

### **3.3.2 Évaluation de la complémentarité moléculaire des agonistes détenant un épitope myc**

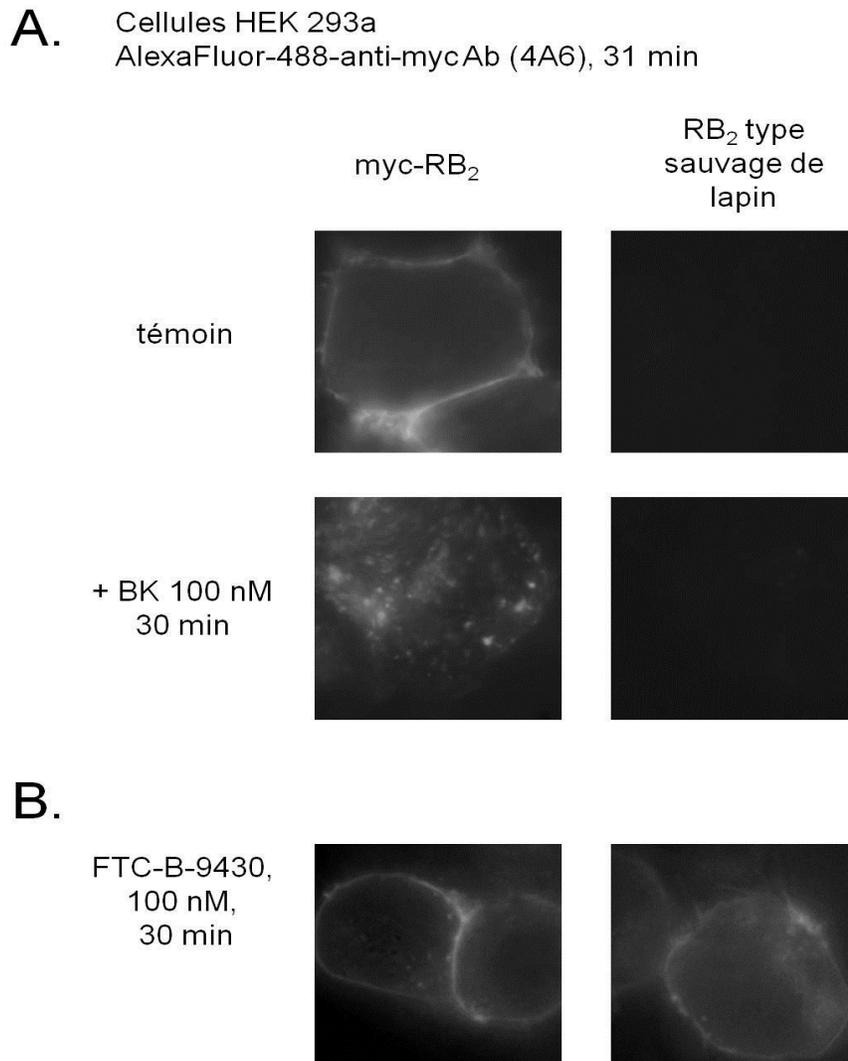
L'affinité et la spécificité de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope myc couplé à l'Alexa Fluor 488 (clone 4A6, dilution 1:500; Millipore) pour un épitope myc couplé à un récepteur a été observée (Bawolak et coll., 2007) si bien que l'anticorps a reconnu les séquences myc des récepteurs transfectés (myc-RB<sub>2</sub>) dans les cellules permeabilisées. Par contre, l'épitope myc, qui est d'environ 150 kilodaltons (kDa), est couplé avec la BK qui elle, doit s'imbriquer dans la rosette de son récepteur pour l'activer, d'où l'hypothèse qu'un espaceur dans la structure du ligand serait utile. Étant donné la grande perte d'affinité des peptides myc-KGP-BK et myc-KGP-BK-B-9972 qui a été observée dans les essais fonctionnels précédents, une visualisation de la capacité du RB<sub>2</sub> à être internalisé, lorsqu'il est complexé à ces peptides, s'est imposée. Ainsi, pour s'assurer de la validité de notre anticorps et de sa capacité à suivre le KB<sub>2</sub> lors de son internalisation, des études en épifluorescence ont été réalisées impliquant la réaction de l'anticorps anti-myc clone 4A6 conjugué à l'AlexaFluor-488 avec un épitope myc déjà étudié, myc-RB<sub>2</sub> (Bawolak et coll., 2007) (figure 13). Tous les pétris de ces expériences ont été rincés trois fois pour garantir la spécificité du signal immunofluorescent (figure 13). Des cellules transfectées transitoirement avec myc-RB<sub>2</sub> ou le RB<sub>2</sub> de lapin de type sauvage furent stimulées par le peptide antagoniste fluorescent FTC-B-9430 (100 nM) pour une durée de 30 minutes et ont prouvé l'expression des récepteurs de surface cellulaire (figure 13B). Dans certains pétris, l'anticorps monoclonal AF488-4A6 (dilution 1: 500) a été incubé seul et a réagi seulement avec



**Figure 11.** Essais de contractilité de la veine ombilicale humaine, un essai biologique pour mesurer la puissance des ligands du  $RB_2$  détenant une séquence myc. (A) Les effets contractiles de la bradykinine (BK), du B-9972 ainsi que leur peptide homologue. (B) Effet de l'antagoniste LF16-0687 (10 et 100 nM) sur l'effet contractile du peptide apparenté à la bradykinine. (C) La réponse contractile médiée par myc-KGP-B-9972 (7,4  $\mu$ M) telle que modifiée par l'antagoniste LF16-0687. \*  $p < 0.01$ , test t de Student. (B et C) Les effets de l'antagoniste LF16-0687, ajouté 30 minutes avant un des deux agonistes.



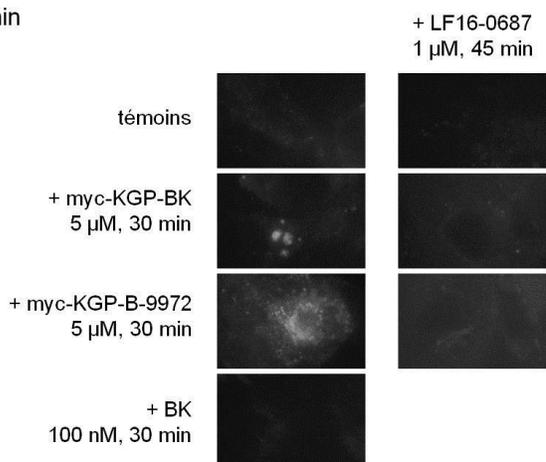
**Figure 12.** Essais de compétition du radioligand [<sup>3</sup>H]bradykinine au RB<sub>2</sub> conjugué à une protéine verte fluorescente par différents ligands non radiomarqués. La liaison spécifique résiduelle, de 3 nM de [<sup>3</sup>H]BK en présence des compétiteurs est exprimée en pourcentage de la moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne. Nombre de déterminations indiquées par *n*.



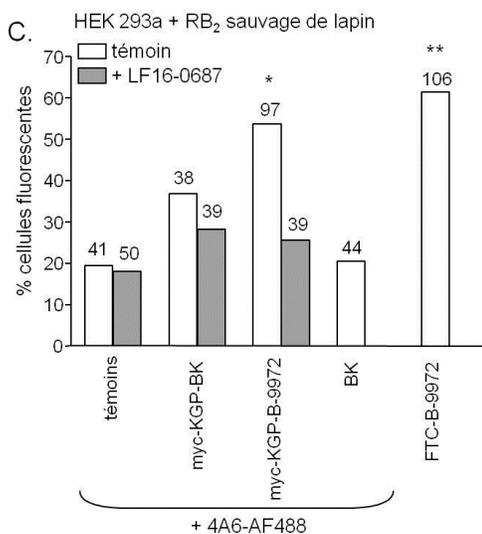
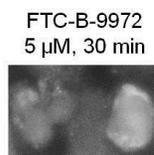
**Figure 13.** Liaison de l'anticorps monoclonal anti-myc conjugué avec le fluorophore AlexaFluor 488 à des cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec myc-RB<sub>2</sub> ou le RB<sub>2</sub> de type sauvage. Les cellules sont stimulées à 37°C, pour une durée de 31 min pour celles mises en présence de l'anticorps et de la BK et 30 min pour les autres. Les cellules stimulées par FTC-B-9430 présentent, pour les deux types de récepteurs, une fluorescence membranaire. Epifluorescence verte. Représentatif de plusieurs cellules. Grossissement original: 1000 X

myc-RB<sub>2</sub> au repos dans la membrane plasmique (figure 13A). De plus, les deux types de récepteurs ont été mis en présence de l'anticorps et soumis à une stimulation par la BK (100 nM) pour une durée de 30 minutes dans le but d'induire l'internalisation des récepteurs (figure 13A). Seules les cellules myc-RB<sub>2</sub> témoins ont présenté un marquage continu de la membrane plasmique indiquant que l'anticorps ne peut diffuser dans la cellule (figure 13A). De plus, lors de l'ajout de la BK, la fluorescence était transloquée au cytosol témoignant une agrégation des anticorps, ou non aux récepteurs, à l'intérieur de la cellule (figure 13A). Les cellules exprimant les deux types de récepteurs et stimulés par FTC-B-9430 présentèrent un marquage membranaire vert constant prouvant l'expression des deux récepteurs (figure 13B). Dans une autre expérience, des cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec le RB<sub>2</sub> de lapin de type sauvage ont été utilisées pour valider le modèle impliquant une liaison anticorps-ligand-récepteur (figure 14A). Les cellules furent incubées pendant 30 min avec un des peptides détenant un épitope myc (5 µM chacun) ou la BK (100 nM) pour tester la complémentarité de l'anticorps avec les nouveaux ligands (figure 14A). De plus, des co- traitements avec le LF-16-0687 (5 µM), ajouté 15 min avant les compétiteurs, furent effectués pour confirmer la spécificité des signaux obtenus (figure 14A). Les pétris témoins ainsi que ceux stimulés par la BK n'ont démontré aucun marquage immunofluorescent résultant de l'excitation du fluorophore de l'anticorps. FTC-B-9972 fut introduit dans certains pétris pour agir à titre de témoin fluorescent d'affinité connue et visuellement validée pour le RB<sub>2</sub> (figure 14B). Fait étonnant, les pétris soumis à une stimulation par myc-KGP-B-9972 révélèrent une endocytose de l'anticorps plus marquée que ceux stimulés par myc-KGP-BK. D'après les données statistiques, seul myc-KGP-B-9972 couplé à l'anticorps et les pétris témoins incubés avec FTC-B-9972 ont affiché une fréquence de marquage fluorescent intracellulaire dépassant celle de l'autofluorescence (figure 14C). La stimulation des cellules en présence de l'anticorps par la BK n'a entraîné aucune augmentation de fluorescence relativement à l'autofluorescence. En outre, l'inhibiteur LF16-0687 a supprimé toute fluorescence associée aux liaisons spécifiques entre les peptides et le RB<sub>2</sub> (barres grises de l'histogramme, figure 14C).

A. HEK 293a+ RB<sub>2</sub> sauvage de lapin + AlexaFluor-488-4A6, ~7 nM,  
30 min



B. HEK 293a +  
RB<sub>2</sub> sauvage de lapin



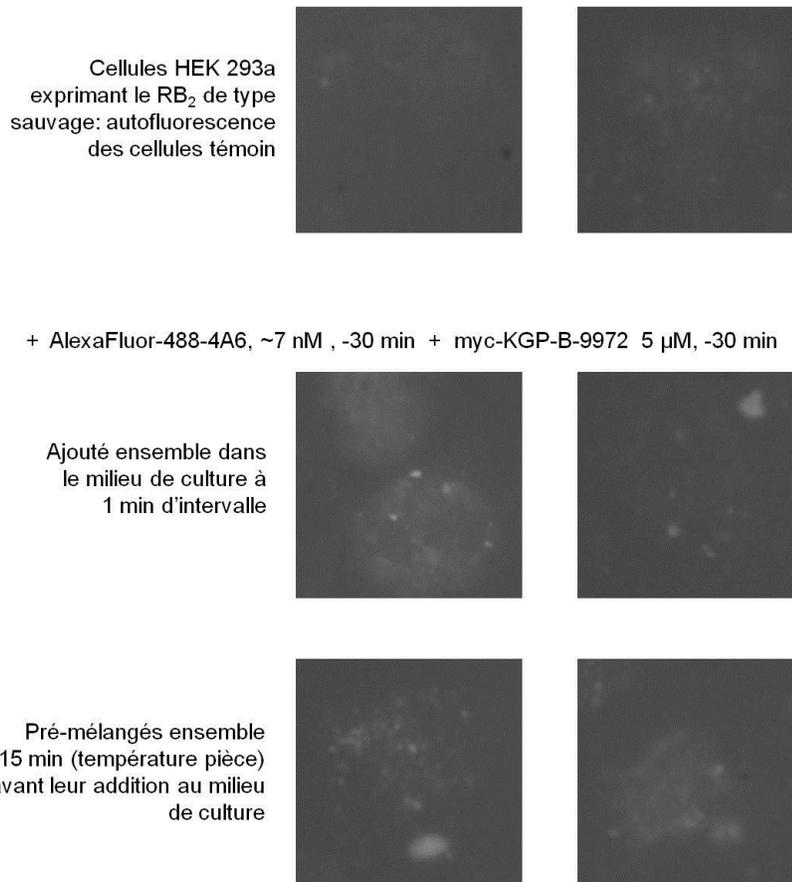
**Figure 14.** Endocytose de RB<sub>2</sub> de type sauvage de lapin exprimé par des cellules HEK 293a transfectées transitoirement médiée par une stimulation par différents agents pharmacologiques. (A) L'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 conjugué au fluorophore AlexaFluor 488 a été ajouté 1 min avant les agonistes indiqués. (B) Les pétris témoins furent stimulées par l'agoniste FTC-B-9972 (5 µM). (A-B) Les stimulations ont été effectuées lors d'une incubation à 37°C, pour une durée de 30 min pour les agonistes et de 15 min supplémentaires avant l'ajout de ces derniers pour le LF16-0687 (1 µM). La concentration finale de l'anticorps dans les pétris atteignait environ 7 nM. Toutes les images prises en épifluorescence à un grossissement original de 1000 X résultent de 2 jours d'observations et ont subi la même amplification du signal fluorescent. (C) Histogramme de la proportion de cellules qui présentent des structures intracellulaires fluorescentes, sans rendre compte de l'intensité, dans les expériences reportées en A et B. La fluorescence des cellules témoins résultait uniquement de l'autofluorescence. Le nombre des cellules comptabilisées est indiqué au-dessus de chaque barre de l'histogramme. \*  $p < 0.001$  et \*\*  $p < 10^{-4}$  obtenus lors d'un test de Khi-carré.

### 3.3.3. Effet d'une pré-incubation anticorps-agoniste

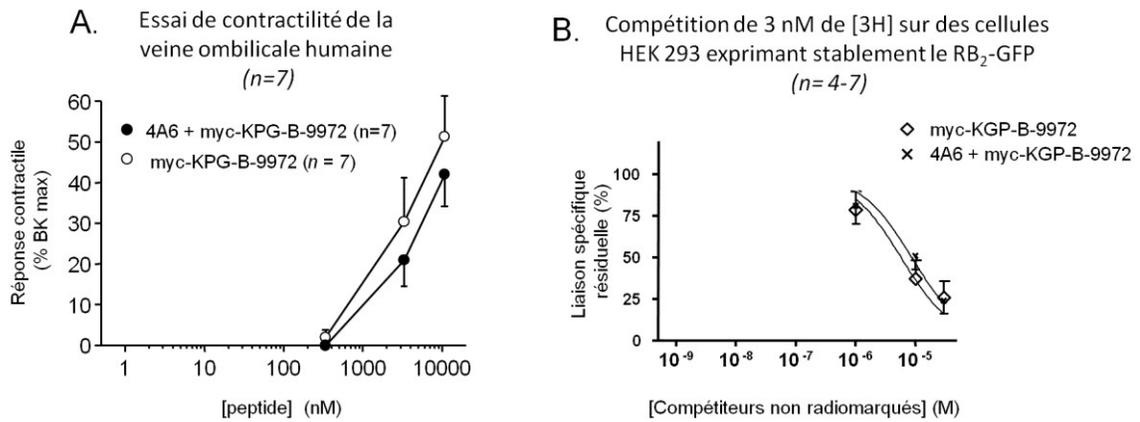
Lorsque le paratope d'un anticorps reconnaît un épitope, plusieurs caractéristiques moléculaires confèrent aux deux séquences une complémentarité de leurs charges et de la cohésion de leur conformation spatiale (Frank, 2002). Nos deux expériences antérieures (figure 13 et 14) faisaient intervenir une pré-addition de l'anticorps monoclonal anti-myc AF488 environ 1 min avant les agonistes lorsque les pétris étaient observés en épifluorescence. Par contre, étant donné la nécessité d'une étroite association de l'anticorps avec le peptide détenant l'épitope myc, une pré-incubation de ces deux molécules pourrait mener à une augmentation de la concentration de complexes anticorps-agoniste qui auraient pu pénétrer, par internalisation du RB<sub>2</sub>, dans la cellule. Pour tester cette idée, nous avons pré-incubé l'anticorps anti-myc 4A6 AF488 (dilution 1 :500) avec myc-KGP-B-9972 (5 µM) pendant 15 minutes à température pièce et avons additionné cette mixture à des cellules HEK 293a exprimant le RB<sub>2</sub> de lapin de type sauvage (figure 15). L'intensité des signaux produits par les structures intracellulaires fluorescentes obtenues a été indiscernable pour les deux différents protocoles. Ensuite, pour quantifier s'il y a une différence de puissance marquée entre l'agoniste lié ou non à l'anticorps, des essais de contractilité et de liaison ont été faits avec trois concentrations de myc-KGP-B-9972 (1, 10 et 30 µM) (figure 16). Les réponses contractiles et les valeurs de liaisons résiduelles spécifiques obtenues démontrent qu'une pré-incubation avec l'anticorps n'a aucun effet significatif sur le nombre de récepteurs stimulés (figure 16)

### 3.3.4 Désensibilisation modifiée du RB<sub>2</sub>-GFP

Lorsque des RB<sub>2</sub> des kinines sont stimulé par la BK, ils entrent dans une voie de recyclage qui permet aux récepteurs de revenir à la surface pour être à nouveau disponible pour réagir à un stimulus (Gera et coll., 2011a). Ce cycle de recyclage des RB<sub>2</sub> est achevé par la grande majorité des récepteurs trois heures après une telle stimulation (Bachvarov et coll., 2001). Lors d'études impliquant le B-9972, le peptide parent de l'agoniste myc-KGP-B-9972, l'observation des récepteurs après 3 heures de stimulation a révélé que des structures endosomales typiques

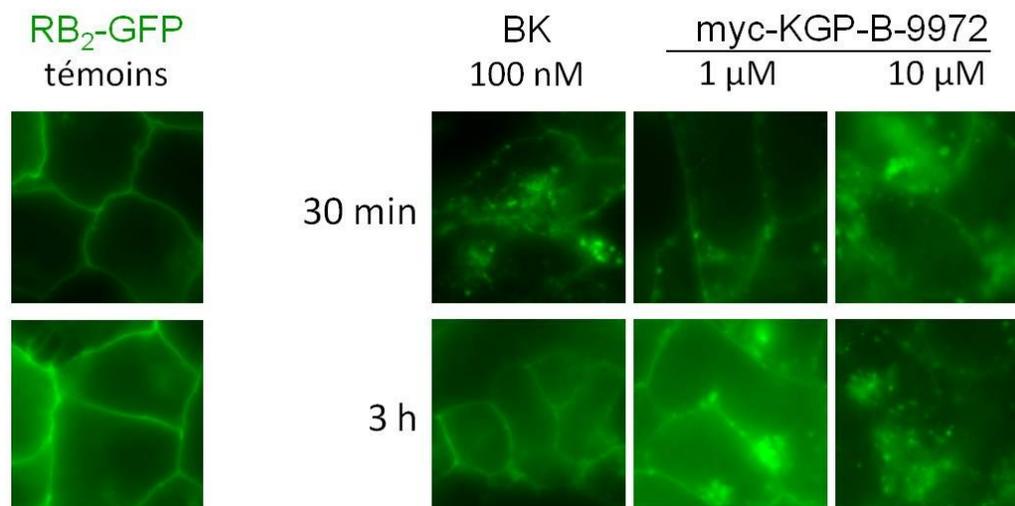


**Figure 15.** Influence d'une pré-incubation de 15 min de l'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 avec le peptide myc-KGP-B-9972 sur la présence de fluorescence intracellulaire. Toutes les images ont été prises en épifluorescence à un grossissement original de 1000 X et ont subi la même amplification du signal fluorescent. La fluorescence des cellules témoins résultait uniquement de l'autofluorescence. L'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 conjugué au fluorophore AF488 a été soit additionné 1 min dans les pétris avant l'ajout du peptide myc-KGP-B-9972 (5 μM), soit mis en présence du peptide 15 min avant leur incubation dans les pétris. La concentration finale d'anticorps dans les pétris atteignant environ 7 nM (dilution 1:500). Les trois conditions sont représentées par deux champs d'observation distincts.



**Figure 16.** Effets d'une pré-incubation de 15 min de l'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 avec le peptide myc-KGP-B-9972 sur deux systèmes impliquant le RB<sub>2</sub>. (A-B) Les deux expériences présentent des courbes construites avec trois concentrations de myc-KGP-B-9972 (1, 10 et 30  $\mu$ M). (A) Les courbes concentration-effet résultent de l'incubation du peptide seul ou co-incubé avec l'anticorps dans les baignoires à organes isolés. (B) Les courbes obtenues résultent de l'incubation du peptide seul ou co-incubé avec l'anticorps. (A-B) Les valeurs de liaison spécifique résiduelle ou de réponse contractile composant les courbes ont été exprimées en % de la moyenne  $\pm$  l'erreur-type d'un nombre de déterminations variant entre 4 et 7.

d'internalisation des récepteurs étaient toujours présentes et cela découle de la résistance au métabolisme de B-9972 (Bawolak et coll., 2007). Une vérification de cet aspect métabolique a été effectuée à l'aide des cellules RB<sub>2</sub>-GFP, permettant de suivre le sort intracellulaire du RB<sub>2</sub> jusqu'à la membrane plasmique lors de son recyclage (figure 17). Deux types de témoin ont été employés pour confirmer la persistance endosomale du myc-KGP-B-9972 à l'instar de son parent (B-9972); des cellules qui n'ont subi aucune stimulation et d'autres cellules qui ont été stimulées par la BK (100 nM) pour une durée de 30 min et de 3 h, ce qui correspondait au temps requis pour observer une internalisation massive du RB<sub>2</sub> et son recyclage presque total à la membrane plasmique, respectivement (figure 17). Une fluorescence membranaire lisse, comme celle observée avec les pétris témoins, a été obtenue après 3 h d'incubation avec la BK et ce, sans changement de milieu dès le début de l'incubation. Au temps 30 min, une perte de la continuité membranaire des RB<sub>2</sub>-GFP a été constatée, indiquant que la BK provoque une internalisation massive des récepteurs de la surface cellulaire aux endosomes. Lors de son endocytose, le RB<sub>2</sub> peut s'associer avec 2 types de  $\beta$ -arrestines (1 et 2) au niveau des endosomes (Hamdam et coll., 2007; Bawolak et coll., 2009). Étant donné la persistance des structures endosomales lors de la stimulation de cellules RB<sub>2</sub>-GFP avec la myc-KGP-B-9972, une évaluation de la présence d'une de ces deux arrestines confirmerait la présence du complexe anticorps-agoniste-récepteur. En effet, l'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 conjugué au fluorophore AF488 a été employé pour retracer l'agoniste associé au récepteur et la protéine recombinante  $\beta$ -arrestin<sub>1</sub>-cherryFP a été transfectée transitoirement dans des cellules HEK 293a pour attester que la triade de protéines est effectivement associée après 3 heures de stimulation (figure 18). Les cellules ont été incubées avec l'anticorps (dilution 1:500) 1 min avant l'ajout de myc-KGP-B-9972 (5  $\mu$ M) (figure 18). Effectivement, une colocalisation des signaux rouges et verts a été observée confirmant qu'une persistance endosomale du complexe agoniste-récepteur-arrestine s'est produite par stimulation des cellules avec la myc-KGP-B-9972 à l'instar de son peptide parent (B-9972) (Bawolak et coll., 2007).



**Figure 17.** Endocytose et recyclage du RB<sub>2</sub>-GFP stimulé par la BK ou myc-KGP-B9972. Les temps d'incubation correspondent à une endocytose massive (30 min) ou un recyclage presque complet (3 h) des récepteurs B<sub>2</sub> couplés à une protéine fluorescente exprimés de manière stable par des HEK 293. La BK induit un cycle normal tandis qu'une persistance endosomale est observée pour myc-KGP-BK au temps 3 h. Résultats typiques et représentatifs de 2-3 jours d'observation en épifluorescence et de plusieurs champs microscopiques. Les cellules témoins démontrent une fluorescence membranaire lisse notable. Grossissement original: 1000 X

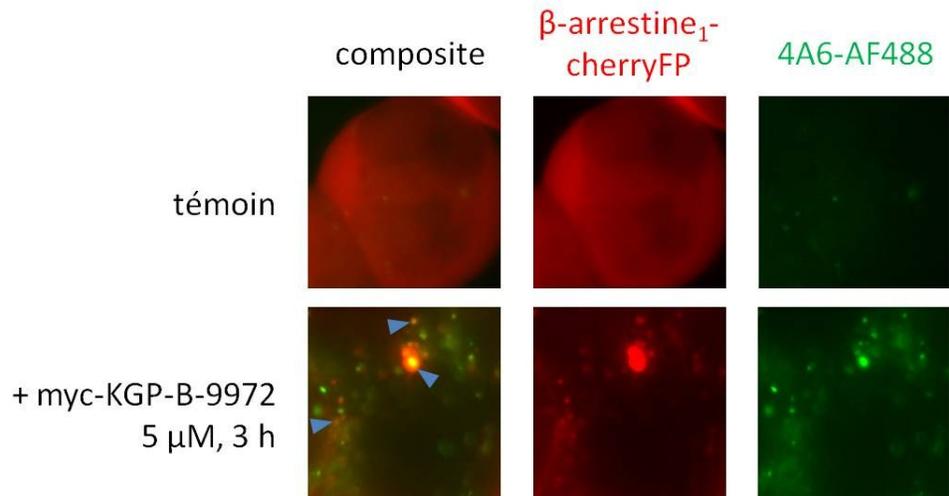
### **3.4 Étude de peptides analogues à la BK : addition de cargos fonctionnels**

Avec l'utilisation de l'espaceur  $\epsilon$ -ACA (Gera et coll., 2011a), un modèle de construction fonctionnelle a émergé permettant l'adjonction de molécules qui seraient pertinentes au niveau cellulaire si elles pouvaient être délivrées au cytosol. Le but des peptides cargos était d'évaluer si des molécules à la structure hétérogène, détenant chacune un groupement acide carboxylique, pouvaient être condensées ou conjuguées à la BK pour donner une nouvelle vocation à la liaison ligand-récepteur  $B_2$ . Les trois molécules sélectionnées ont toutes une fonction propre. Le ferrocène est une molécule qui compose plusieurs dérivés ayant des propriétés médicinales (Orneas, 2011), la cétirizine est un anti-histaminique du  $RH_1$  de deuxième génération (Chen, 2008) et l'AlexaFluor-350 est un fluorophore émettant dans le bleu (émission : 442 nm), ce qui diffère des longueurs d'ondes d'émission des deux fluorophores généralement utilisés dans notre laboratoire (AlexaFluor-488 : émission verte et AlexaFluor-594 : émission rouge).

#### **3.4.1 Étude pharmacologique des peptides cargos**

Pour évaluer les différences d'affinité et d'activité des trois peptides cargos AF350- $\epsilon$ -ACA-BK, FeC- $\epsilon$ -ACA-BK et CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK, des études de compétition de liaison et de contractilité ont été faites, respectivement (figure 19A et 19B). En ce qui concerne les essais de liaison, les trois peptides et la BK ont été incubés avec des cellules transfectées stablement avec le  $RB_2$ -GFP (figure 19A). Un ordre d'affinité des peptides pour le  $RB_2$ -GFP fut obtenu; BK >> CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK > FeC- $\epsilon$ -ACA-BK > AF350- $\epsilon$ -ACA-BK (figure 19A). Par contre, lors des essais de contractilité, un ordre différent s'est dessiné : BK >> AF350- $\epsilon$ -ACA-BK > FeC- $\epsilon$ -ACA-BK > CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK (figure 19B).

HEK 293a  
RB<sub>2</sub> de type sauvage de lapin  
+  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub>-cherryFP



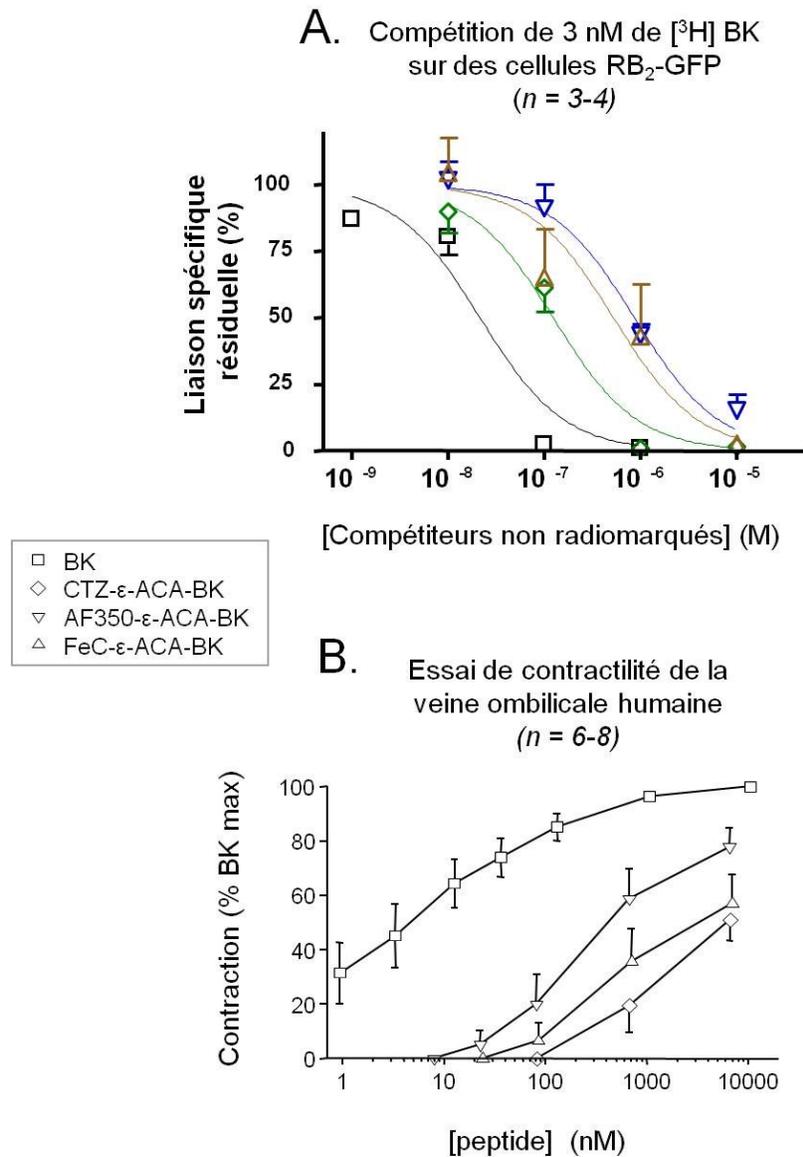
**Figure 18.** Représentation d'un complexe tétramoléculaire : anticorps (anti-myc-AF488), agoniste (myc-KGP-B-9972), récepteur (RB<sub>2</sub> de type sauvage de lapin) et une arrestine ( $\beta$ -arrestin<sub>1</sub>-cherryFP). Les images ont été prises 3 h après une stimulation des RB<sub>2</sub> par myc-KGP-B-9972 (5  $\mu$ M). Les cellules témoins démontrent une fluorescence rouge diffuse lisse pour l'expression de la protéine  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub>-cherryFP et une fluorescence granulaire verte pour les complexes anticorps-agoniste-RB<sub>2</sub>. L'image composite des cellules stimulées par la myc-KGP-BK indique une colocalisation des deux types de fluorescence (représentée par les flèches bleues). Grossissement original: 1000 X.

### 3.4.2 Confirmation de la nature agoniste des peptides cargos

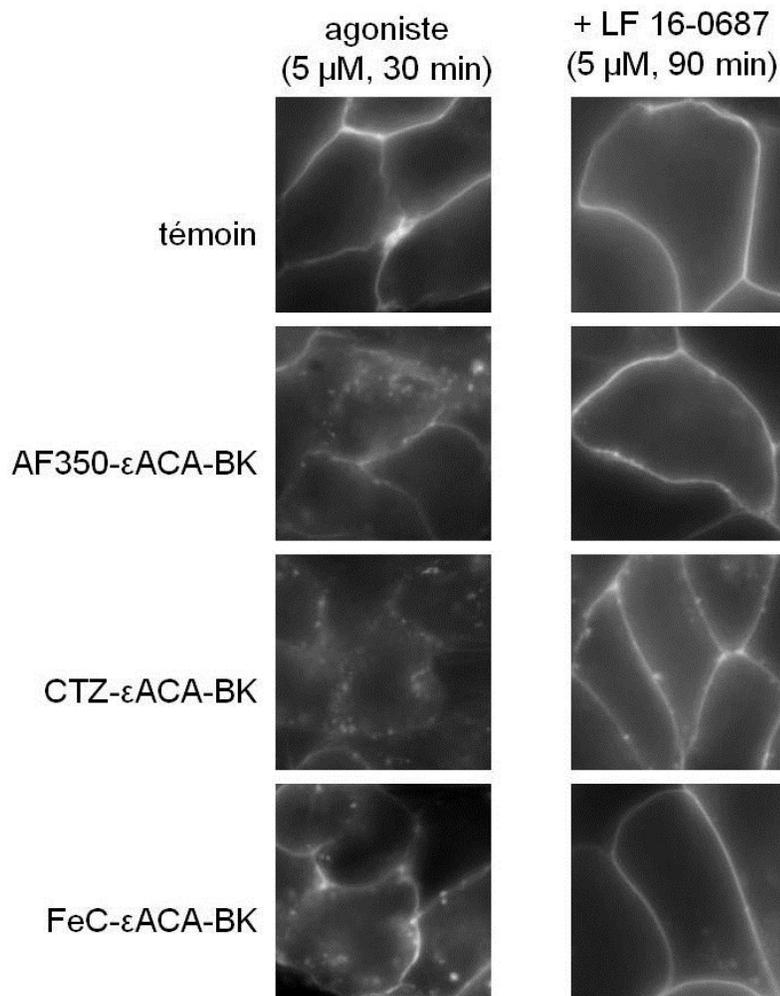
Les agonistes synthétiques sont des mimétiques des médiateurs physiologiques; ils peuvent engendrer les mêmes réponses cellulaires lorsqu'ils stimulent un récepteur et ils sont déplaçables par un excès de l'antagoniste de ce dernier (Gies et Landry., 2007). Pour s'assurer que les trois peptides cargos conservent leur statut d'agoniste du RB<sub>2</sub> (mêmes effets qu'une stimulation par la BK), des cellules HEK 293 exprimant de manière stable la protéine RB<sub>2</sub>-GFP ont été incubées pendant 30 min, à 37°C avec les trois nouveaux ligands (figure 20). Les trois peptides ont démontré le même type de translocation endosomale du RB<sub>2</sub>-GFP que celle qui a été observée lorsque ces cellules étaient stimulées par le ligand endogène préférentiel du RB<sub>2</sub>, la BK (figure 17). De plus, pour certifier que la fluorescence endosomale est bel et bien une conséquence de l'activation des récepteurs par les agonistes, une pré-addition de l'inhibiteur du RB<sub>2</sub>, le LF16-0687 (5 µM), d'une durée de 60 min avant l'ajout des trois peptides, a été réalisée (figure 20). La présence du LF16-0687 a permis d'obtenir un marquage lisse des cellules à l'instar de celle émise par les cellules témoins indiquant qu'une abolition de l'effet agoniste s'est produite (figure 20).

### 3.4.3 Exploitation en épifluorescence du peptide AF350-ε-ACA-BK

Étant donné l'émission d'une longueur d'onde détectable dans le bleu, le peptide possédant la portion AlexaFluor-350 a pu être utilisé pour effectuer des études de colocalisation avec des protéines qui étaient détectables dans le vert (GFP). Effectivement, à la manière des études faisant appel à l'anticorps couplé à l'AlexaFluor-488, le peptide a servi de référence illustrant la localisation du complexe récepteur-agoniste lors de l'endocytose et plus particulièrement de la contiguïté de ce complexe avec des protéines endosomales. Deux types de protéines ont été sélectionnées pour visualiser la localisation du complexe récepteur-agoniste dans les endosomes précoces, ce qui a permis de ne pas perdre l'association du récepteur avec le ligand. La β-arrestine<sub>2</sub>-GFP et l'Early Endosome Antigen1 (EEA1-FYVE-GFP) sont les deux protéines qui ont été employées comme marqueur d'endosomes précoces. Des cellules HEK 293a ont été co-transfectées avec l'un ou l'autre de ces marqueurs et le myc-RB<sub>2</sub> (figure 21).

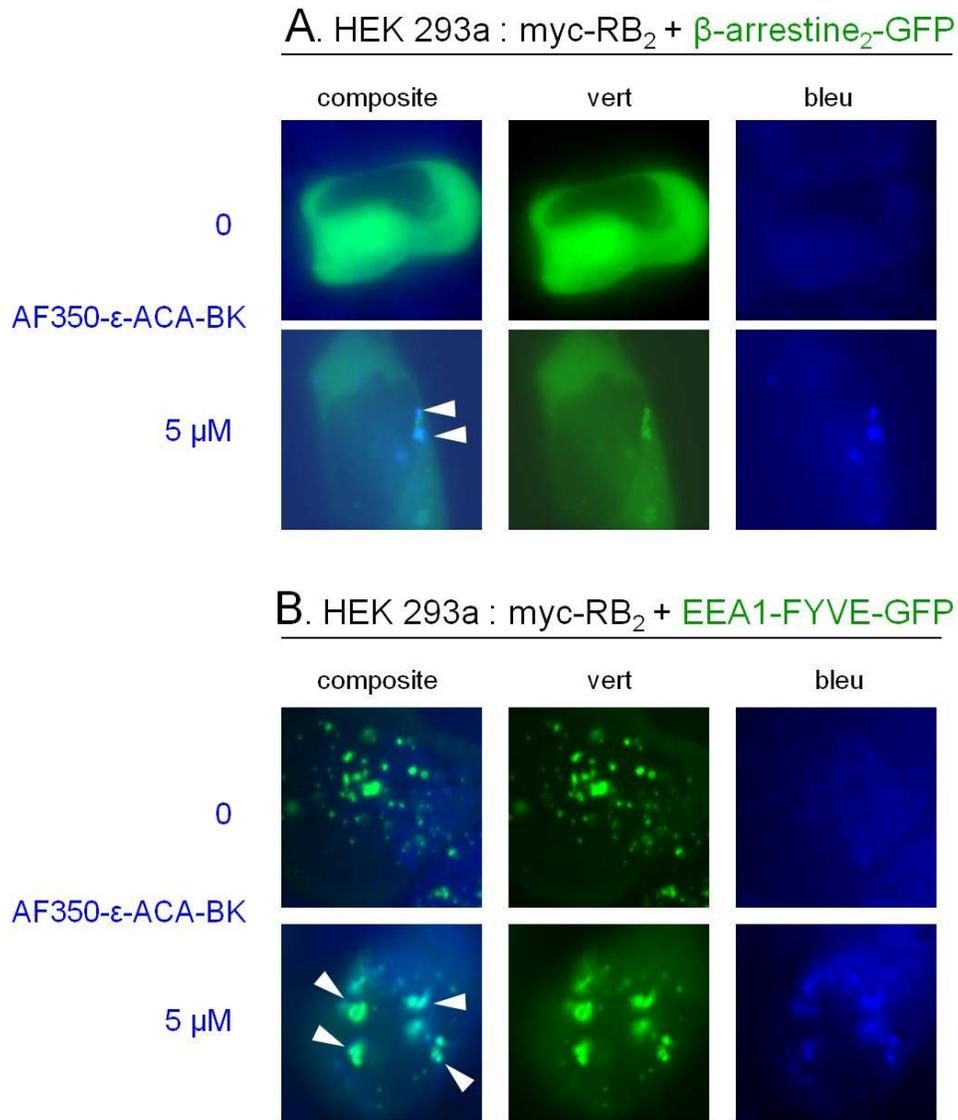


**Figure 19.** Effets des différentes extensions en N-terminal de la BK (AF350-ε-ACA-BK, FeC-ε-ACA-BK et CTZ-ε-ACA-BK) lors des essais de contractilité et de liaison. (A) Essais de compétition du radioligand [<sup>3</sup>H]bradykinine (3 nM) au RB<sub>2</sub> conjugué à une protéine verte fluorescente par différents ligands, analogues à la BK, non radiomarqués. La liaison spécifique résiduelle obtenue est exprimée en pourcentage de la moyenne ± erreur type de la moyenne. Nombre de déterminations indiquée par n. (B) Les courbes concentration-effet résultant de la stimulation par la bradykinine ou trois peptides cargo. (A-B) Les symboles des courbes des différents ligands utilisés lors des deux types d'essais sont représentés dans la légende située entre les deux graphiques. Pour chaque ligand, les valeurs ont été exprimées en pourcentage de la moyenne ± erreur type. Nombre de déterminations indiqué par les chiffres entre parenthèses.



**Figure 20.** Confirmation du statut d'agoniste pour les différents peptides cargos par stimulation de cellules exprimant stablement le RB<sub>2</sub>-GFP. Les pétris de cellules RB<sub>2</sub>-GFP stimulées par un peptide présentant une extension en N-terminal (5  $\mu$ M) ont été incubés à 37°C pour une durée de 30 min. D'autres pétris de cellules RB<sub>2</sub>-GFP ont été additionnés d'un inhibiteur du RB<sub>2</sub>, le LF16-0687 (5  $\mu$ M), 60 min avant l'addition des peptides. Tous les peptides ont été antagonisés par l'inhibiteur et cela s'est traduit par l'absence ou la réduction de l'endocytose du RB<sub>2</sub> fluorescent. Après chaque incubation, les pétris ont été lavés trois fois et observés en épifluorescence. Grossissement original: 1000 X

Par la suite, les cellules ont été stimulées pendant 30 min, à 37°C, avec le peptide AF350-e-ACA-BK (5 µM) ou non et rincées trois fois pour s'assurer que la fluorescence bleue observée résulterait d'une liaison spécifique avec les récepteurs adjoints à l'épitope myc (figure 21). Après le lavage des pétris, les fluorescences bleues et vertes ont été observées en épifluorescence. Pour les cellules HEK 293a transfectées transitoirement avec myc-RB<sub>2</sub> et la β-arrestine<sub>2</sub>-GFP, une colocalisation de la fluorescence verte de la β-arrestine<sub>2</sub>-GFP et de la fluorescence bleue du peptide fut remarquée dans de nombreuses structures condensées d'apparence endosomale (figure 21A). Le même aspect condensé de la fluorescence ainsi que de la présence de structures endosomales intégrant la protéine recombinante verte et le peptide bleu furent observés pour les cellules myc-RB<sub>2</sub>-EEA1-FYVE-GFP à la différence que les structures endosomales étaient plus abondantes et manifestes.



**Figure 21.** Présence simultanée d'une protéine impliquée dans le processus d'endocytose ( $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>-GFP ou EEA1-FYVE-GFP) et du peptide AF350- $\epsilon$ -ACA-BK dans des cellules HEK 293a co-transfectées. (A) La protéine recombinante  $\beta$ -arrestine<sub>2</sub>-GFP a été cotransfectée transitoirement avec myc-RB<sub>2</sub> dans des cellules HEK 293a. Les cellules ont été incubées à 37°C pour une durée de 30 minutes avec 5  $\mu$ M ou non d'AF350- $\epsilon$ -ACA-BK. (B) Le même protocole a été appliqué aux cellules hormis que la protéine surexprimée est la EEA1-FYVE-GFP. (A-B) Les cellules ont été lavées trois fois avant leur observation en épifluorescence et le grossissement original était de 1000 X.

### **3.5 Évaluation supplémentaire du peptide cargo CTZ-ε-ACA-BK comme ligand direct ou latent du RH<sub>1</sub>**

Le peptide cargo CTZ-ε-ACA-BK a été choisi pour effectuer des études supplémentaires parce que sa portion CTZ est une cible tangible du RH<sub>1</sub> qui pouvait être testée *in vitro* au niveau cellulaire (essais de liaison) et tissulaire (essais de contractilité).

#### **3.5.1 Caractérisation de la liaison de CTZ-ε-ACA-BK à deux récepteurs impliqués dans l'inflammation**

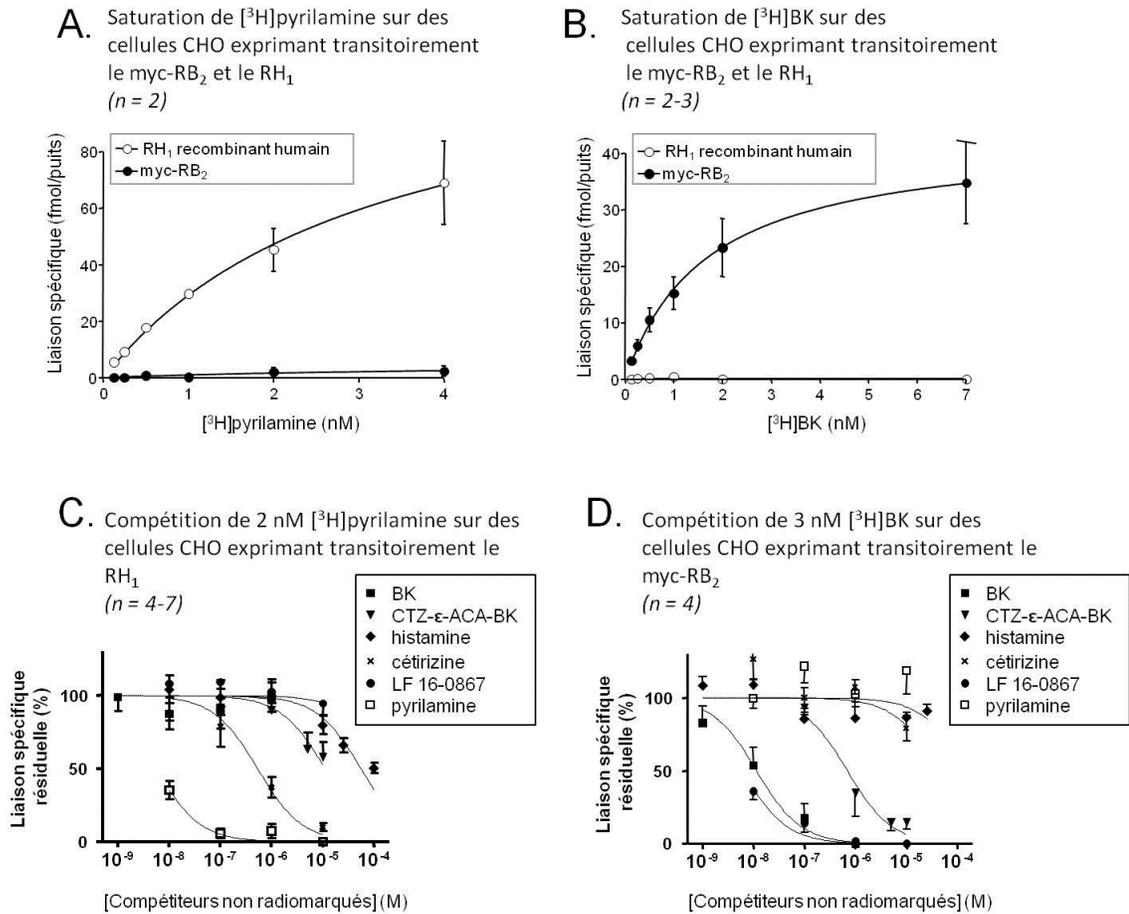
Le RH<sub>1</sub> et le RB<sub>2</sub> sont tous deux impliqués dans les manifestations vasculaires de l'inflammation et le peptide CTZ-ε-ACA-BK détient, à l'intérieur de sa séquence, une portion pouvant lier ces récepteurs; un antagoniste inverse du RH<sub>1</sub> (CTZ) et un agoniste sélectif du RB<sub>2</sub> (BK).

Effectivement, pour la reconnaissance du ligand par le RB<sub>2</sub>, le côté C-terminal du peptide plonge dans la rosette (ce qui correspond à la portion BK pour la CTZ-ε-ACA-BK). Pour ce qui est de la portion cétirizine, engagée dans un lien amide, elle pourrait ou non se lier au RH<sub>1</sub>. Dans une expérience préalable, des courbes de saturation furent construites pour chaque récepteur par addition du radioligand correspondant dans la moitié des puits et par ajout de la version non tritiée du radioligand dans l'autre moitié (la BK et la pyrilmamine, 1 μM) (figures 22A et 22B). Ensuite, les valeurs obtenues dans les puits ayant été incubés avec les ligands non tritiés (liaison non spécifique) étaient soustraites des valeurs obtenues pour les puits ayant été incubés avec les radioligands, ce qui nous a permis d'obtenir une courbe de saturation de la liaison spécifique. Ainsi, des concentrations croissantes de [<sup>3</sup>H]pyrilmamine et de [<sup>3</sup>H]BK ont été mises en présence des deux types de récepteurs exprimés transitoirement dans des cellules CHO. La liaison de la [<sup>3</sup>H]pyrilmamine aux récepteurs myc-RB<sub>2</sub> semblait négligeable et celle aux RH<sub>1</sub> semblait saturable avec un K<sub>d</sub> de 3,19 nM et un B<sub>max</sub> extrapolé d'une valeur de 123 fmol/puits (figure 22A). De même, la liaison de [<sup>3</sup>H]BK aux récepteurs RH<sub>1</sub> recombinants humains apparaît nulle tandis que la liaison aux myc-RB<sub>2</sub> était considérable avec un B<sub>max</sub> calculé

de 42,9 fmol/puits et de haute affinité avec un  $K_d$  de 1,67 nM (figure 22B). Dans une deuxième expérience, une série de ligands furent mis en compétition avec les radioligands assortis aux récepteurs ciblés (figures 22 C et 20D). Ainsi, deux agonistes du  $RB_2$ , la BK et la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK, un agoniste du  $RH_1$ , l'histamine, un antagoniste du  $RB_2$ , le LF16-0687 et deux antihistaminiques, la cétirizine et la pyriline servirent de compétiteurs pour les essais de liaison aux deux récepteurs (figures 22C et 22D). Pour le  $RH_1$ , les deux antihistaminiques ont démontré une importante affinité avec des  $IC_{50}$  de 5.5 et 532 nM pour la pyriline et la cétirizine, respectivement (figure 20C). Les ligands du  $RB_2$  furent inefficaces pour déplacer la liaison de la [ $^3H$ ]pyriline aux récepteurs (figure 22C). Fait important, l'histamine, un agoniste naturel du  $RH_1$  a démontré une faible affinité pour ce récepteur avec un  $IC_{50}$  de 55,5  $\mu$ M tandis que la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK a davantage affiché d'affinité pour le  $RH_1$  que l'histamine avec un  $IC_{50}$  de 11,0  $\mu$ M (figure 22C), ce qui est quand même une affinité moindre que celle de la CTZ libre. Pour ce qui est de la liaison au récepteur myc- $B_2$ , les deux antihistaminiques n'ont pas présenté d'affinité notable contrairement aux ligands du  $RB_2$ , la BK et le LF16-0687, qui ont démontré de très hautes affinités avec des  $IC_{50}$  de 6.1 et de 11.5 nM, respectivement (figure 22D). La CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK démontre une moins grande affinité pour le  $RH_1$  que pour le myc- $RB_2$  avec un  $IC_{50}$  passant de 11,0  $\mu$ M à 690 nM : la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK a davantage déplacé la liaison de la [ $^3H$ ]BK aux myc- $RB_2$  que celle de la [ $^3H$ ]pyriline aux  $RH_1$  (figure 22D).

### 3.5.2 Essais de liaison testant une activation métabolique de la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK

Un protocole alternatif d'essai de compétition fut effectué pour déceler si la libération de la forme libre de la cétirizine ou de fragments par des peptidases, pouvait avoir lieu dans le milieu d'incubation de cellules transfectées stablement ou transitoirement avec  $RB_2$ -GFP et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), respectivement. Des cellules HEK 293  $RB_2$ -GFP furent incubées à 37°C, pour une durée de 30 minutes, avec 1 $\mu$ M de CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK ou non (figure 23A). Ensuite, le milieu dans lequel les cellules ont été incubées fut récolté pour être congelé et appliqué à des cellules CHO exprimant de manière transitoire le récepteur recombinant  $RH_1$  pour mesurer la présence d'un effet de compétition généré par, si il y a lieu, des fragments de la cétirizine ou la cétirizine complète (figure 23A). Ces milieux conditionnés



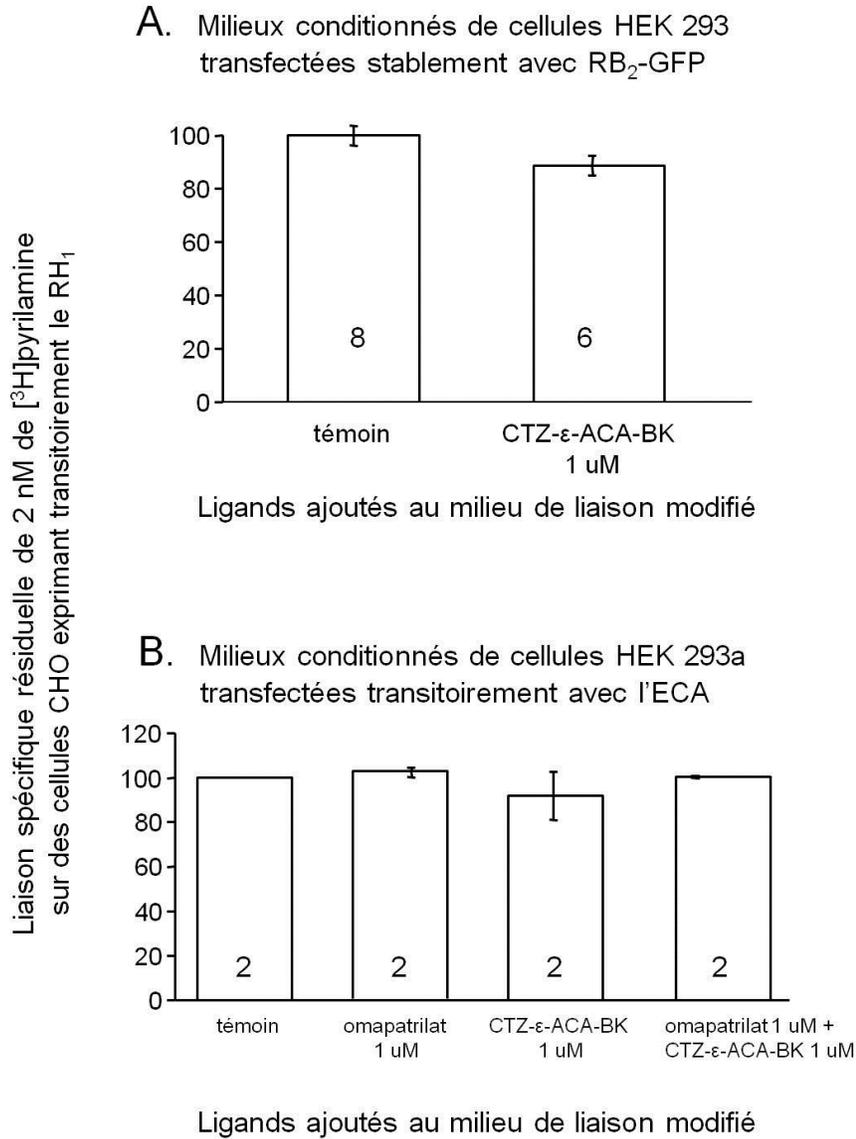
**Figure 22.** Caractérisation du RH<sub>1</sub> ou du myc-RB<sub>2</sub> exprimé transitoirement par des cellules CHO. (A et B) Courbes de saturation obtenues par ajout de concentrations croissantes de l'un ou l'autre des radioligands [ $^3\text{H}$ ]pyrilamine, ou [ $^3\text{H}$ ]BK) sur des cellules CHO exprimant le récepteur H<sub>1</sub> ou le myc-RB<sub>2</sub>. (C et D) Essais de compétition de la liaison de la [ $^3\text{H}$ ]pyrilamine aux RH<sub>1</sub> ou de la [ $^3\text{H}$ ]BK aux myc-RB<sub>2</sub> par divers ligands non radiomarqués de l'un ou l'autre des récepteurs cibles. Les résultats sont exprimés par une moyenne  $\pm$  l'erreur-type du nombre de déterminations ( $n$ ) tel qu'indiqué.

nous ont servi de témoins car on postulait que l'ECA exprimée par les cellules HEK 293a-ECA dégraderait le peptide. Nos cellules HEK 293 RB<sub>2</sub>-GFP étaient employées pour tester si une dégradation endosomale se produisait telle qu'observée pour la CF-ε-ACA-BK (figure 10B). Pour tester l'hypothèse de la dégradation de la CTZ-ε-ACA-BK par l'ECA, des pétris de cellules HEK 293a ECA ont été incubés, dans un tampon de liaison modifié (PBS 1 X, 0,1 % BSA), pour une durée de 30 min, à 37°C, avec ou sans la CTZ-ε-ACA-BK (1 μM) et en présence ou non d'omapatrilat (1 μM), qui est un inhibiteur double de l'ECA et de l'endopeptidase neutre (NEP) (figure 23B). Ainsi, des essais de compétition de la liaison de 2 nM de [<sup>3</sup>H]pyrilamine furent effectués, sur des cellules CHO exprimant le RH<sub>1</sub>, avec les milieux conditionnés de cellules RB<sub>2</sub>-GFP qui testaient l'inactivation endosomale de la CTZ-ε-ACA-BK et avec des milieux conditionnés de cellules HEK 293a ECA (figures 23A et 23B). Dans les essais de compétition réalisés, aucun milieu conditionné n'a pu efficacement déplacer la liaison de la [<sup>3</sup>H]pyrilamine et donc n'a semblé contenir de la cétirizine libre ou des fragments de la CTZ-ε-ACA-BK actifs dans cette mesure (figures 23A et 23B).

### 3.5.3 Essais de contractilité

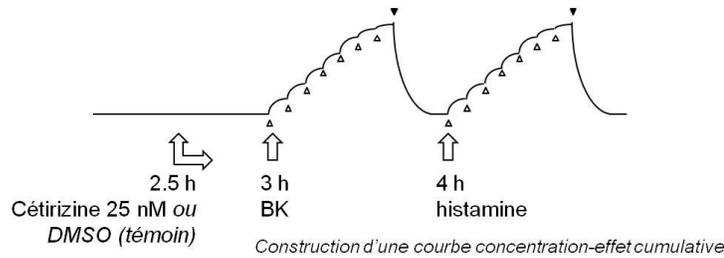
Pour conduire des essais pouvant témoigner les effets contractiles de la bradykinine et de ceux de l'histamine sur leur récepteur respectif, le RB<sub>2</sub> et le RH<sub>1</sub>, la veine ombilicale humaine a été sélectionnée car il a été démontré qu'elle peut produire des réponses contractiles médiées par ces deux récepteurs (Marceau et coll., 2010). Deux protocoles (1 et 2) furent suivis pour rendre compte de l'antagonisme induit par la cétirizine et de celle du peptide détenant la cétirizine, la CTZ-ε-ACA-BK. Ainsi pour le protocole 1, les veines ombilicales humaines dans les bains à organes isolés furent pré-équilibrées dans le tampon Krebs pour une durée de 2,5 h, ensuite, la cétirizine (25 nM) ou le DMSO furent introduits 30 min avant la construction des courbes concentration-effet aux temps 3 h pour la bradykinine et 4 h pour l'histamine (figure 24A). Ce protocole fut réalisé pour vérifier si un effet antagoniste de la cétirizine était remarqué pour l'un ou l'autre des agonistes. Dans ces conditions, les effets contractiles observés pour une stimulation par la bradykinine ne démontrent aucun antagonisme par la cétirizine (figure 24B). Toutefois, lorsque les veines ont été stimulées par l'histamine, nous avons observé que la

cétirizine antagonise bel et bien la contraction induite par l'histamine confirmant la présence des récepteurs  $H_1$  et de la spécificité de la kétirizine pour ce dernier (figure 24C). Pour ce qui est du protocole 2, après une équilibre des tissus dans les bains de 2,5 h, un antagoniste du  $RB_2$ , le LF16-0687 (1  $\mu\text{M}$ ) fut introduit 30 min avant la construction des courbes concentration-effet et ce, en présence ou non de l'omapatrilat (1  $\mu\text{M}$ ), qui est un inhibiteur de l'ECA et de la NEP (figure 25A). Le LF16-0687 sert à inhiber les effets contractiles directs et l'endocytose de la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK de façon à isoler l'effet des peptidases exprimées à la surface cellulaire. Après ce 30 minutes de double ou triple antagonisme, au temps 3 h, la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK 0,59  $\mu\text{M}$  ou de la saline furent additionnées à ces bains (figure 25A). Finalement, au temps 4 h, l'histamine fut introduite pour générer les effets contractiles et observer si les courbes seraient antagonisées par de la kétirizine libérée par des peptidases présentes dans la veine ombilicale humaine (figure 25A). L'ajout de CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK à 0,59  $\mu\text{M}$  a démontré un déplacement de la courbe concentration-effet témoin de l'histamine vers la droite signifiant qu'elle exerce un effet antagoniste sur la contraction médiée par l'histamine (figure 25B). Cependant, l'ajout de l'omapatrilat 1  $\mu\text{M}$ , en plus du LF16-0687, ne modifie pas l'effet antagoniste produit par la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK, ce qui révèle que l'ECA ou la NEP ne participent pas à la libération de kétirizine libre (figure 25B).

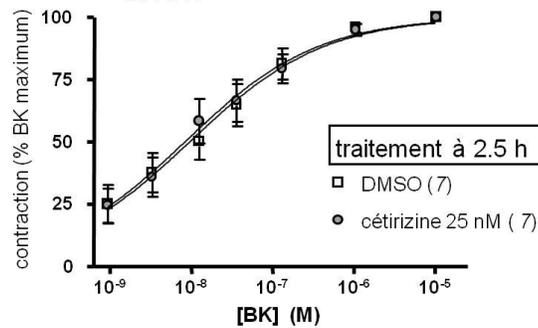


**Figure 23.** Histogrammes représentant les effets d'une pré-incubation de CTZ-ε-ACA-BK avec des cellules HEK 293 RB<sub>2</sub>-GFP ou HEK 293a ECA lors d'essais de compétition de la liaison de 2 nM de [<sup>3</sup>H]pyrilamine aux RH<sub>1</sub> exprimés par des cellules CHO. (A) Essais de compétition réalisés avec les milieux conditionnés (témoin et CTZ-ε-ACA-BK) de cellules HEK 293 RB<sub>2</sub>-GFP utilisés comme compétiteurs de 2 nM de [<sup>3</sup>H]pyrilamine aux RH<sub>1</sub> exprimés par des cellules CHO. (B) Essais de compétition réalisés avec les milieux conditionnés (témoin, omapatrilat seul, CTZ-ε-ACA-BK seule et CTZ-ε-ACA-BK mis en présence d'omapatrilat) de cellules HEK 293a ECA utilisés comme compétiteurs de 2 nM de [<sup>3</sup>H]pyrilamine aux RH<sub>1</sub> exprimés par des cellules CHO. Les résultats sont la moyenne ± l'erreur-type du nombre de déterminations indiquées par les chiffres dans les histogrammes.

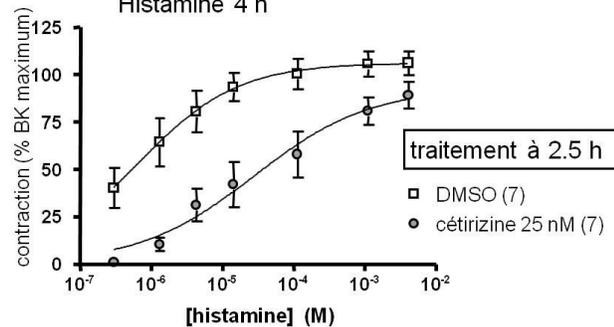
A. Protocole 1.  
Veine ombilicale humaine



B. Essai de contractilité de la  
veine ombilicale humaine  
BK 3 h

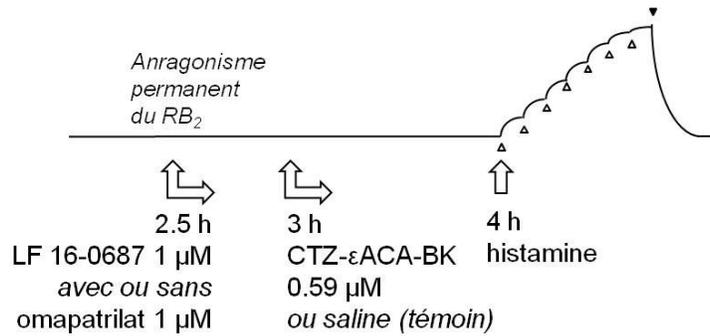


C. Essai de contractilité de la  
veine ombilicale humaine  
Histamine 4 h

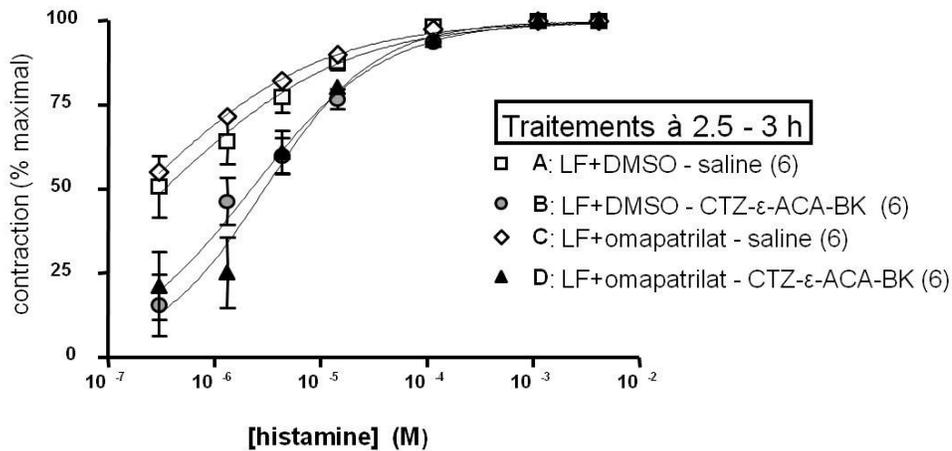


**Figure 24.** Vérification de l'inhibition spécifique de la cétirizine sur la contraction induite par l'histamine par la réalisation du protocole 1 sur la veine ombilicale humaine. (A) Le protocole 1 fait intervenir la cétirizine (25 nM) ou le DMSO (témoin) 30 min, au temps 2,5 h, avant la construction des courbes concentration-effet par addition de la BK, au temps 3 h ou de l'histamine, au temps 4 h. (B) Courbes de contractions obtenues pour la BK. (C) Courbes de contractions obtenues pour l'histamine. (B et C) Les valeurs de réponses contractiles composant les courbes ont été exprimées en % de la moyenne  $\pm$  l'erreur-type d'un nombre de d'expériences indiqué entre parenthèses.

**A. Protocole 2.**  
Veine ombilicale humaine



**B. Essai de contractilité de la veine ombilicale humaine**  
Histamine 4 h

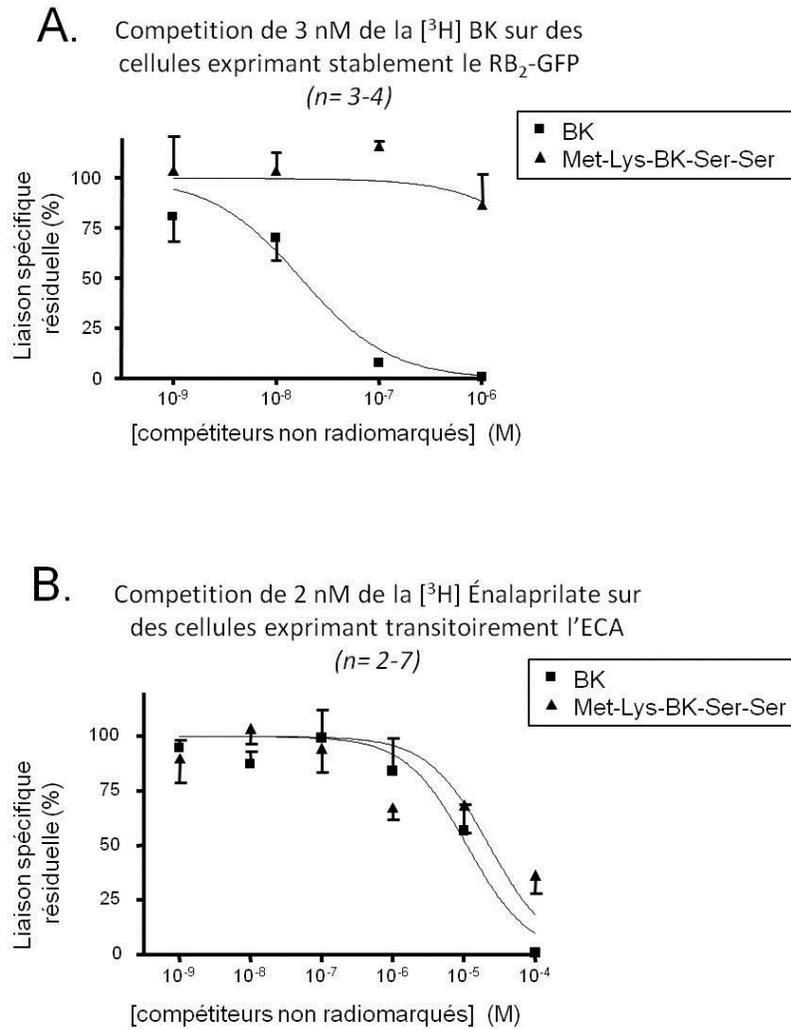


**Figure 25.** Antagonisme de l'histamine par CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK dans la veine ombilicale humaine et dépendance possible de cet antagonisme de peptidases endogènes. (A) Le protocole 2 fait intervenir l'antagoniste LF16-0687 (1  $\mu$ M) en présence ou non d'omapatrilat (1  $\mu$ M) 30 min, au temps 2,5 h, avant l'addition de la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK ou de saline (témoin), au temps 3 h et ensuite, la construction des courbes concentration-effet est effectuée par ajout d'histamine au temps 4h. (B) Courbes de contractions obtenues pour l'histamine. Les valeurs de réponses contractiles composant les courbes ont été exprimées en % de la moyenne  $\pm$  l'erreur-type d'un nombre de d'expériences distinctes entre parenthèses.

## **3.6 Caractérisation de Met-Lys-BK-Ser-Ser**

### **3.6.1 Mesure de l'affinité de Met-Lys-BK-Ser-Ser pour deux cibles pharmacologiques principales présentes dans les vaisseaux sanguins**

L'équilibre dynamique ligand-récepteur fait intervenir des états liés et non liés. Donc, pour mesurer la concentration de complexes récepteur-ligand liés présents dans nos expériences, des études d'affinité de ces complexes ont été effectuées par emploi de ligands radiomarqués. Effectivement, deux cibles biologiques ont été sélectionnées; le récepteur B<sub>2</sub> des kinines et l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ainsi, les radioligands sont la [<sup>3</sup>H]BK et la [<sup>3</sup>H]énalaprilate, respectivement. Le ligand non radiomarqué correspondant au radioligand utilisé dans chaque essai a servi de compétiteur de la Met-Lys-BK-Ser-Ser (figure 26). Dans les deux essais de compétition, des concentrations croissantes des versions non tritiées des radioligands et de la M-K-BK-S-S ont été ajoutées aux cellules conjointement à une concentration fixe du radioligand telle que décrite à la figure 26. Des cellules HEK 293 exprimant stablement le RB<sub>2</sub>-GFP furent employées pour évaluer l'affinité de M-K-BK-S-S pour le RB<sub>2</sub> (figure 26B). Les courbes de compétition obtenues pour le RB<sub>2</sub> nous indiquent que la M-K-BK-S-S n'a que peu d'affinité pour le récepteur B<sub>2</sub> des kinines (figure 26A). Effectivement, d'après les IC<sub>50</sub>, M-K-BK-S-S aurait une affinité micromolaire pour le RB<sub>2</sub>, comparativement à la bradykinine non tritiée (BK naturelle) pour laquelle les valeurs d'affinité se situent dans les nanomolaires (tableau 2). Finalement, l'affinité de M-K-BK-S-S fut mesurée pour l'ECA par transfection de cellules HEK 293a avec le vecteur codant pour la protéine recombinante de l'ECA (figure 26B). D'après les courbes de compétition obtenues, M-K-BK-S-S a démontré une affinité pour l'ECA qui s'apparentait à celle de la BK; les IC<sub>50</sub> révèlent que les deux peptides diffèrent d'un facteur de 2 (BK : 11 μM et M-K-BK-S-S : 22,4 μM) (tableau 2). Néanmoins, la courbe pour ce dernier peptide était anormalement horizontale, s'éloignant du modèle à un site enzymatique.



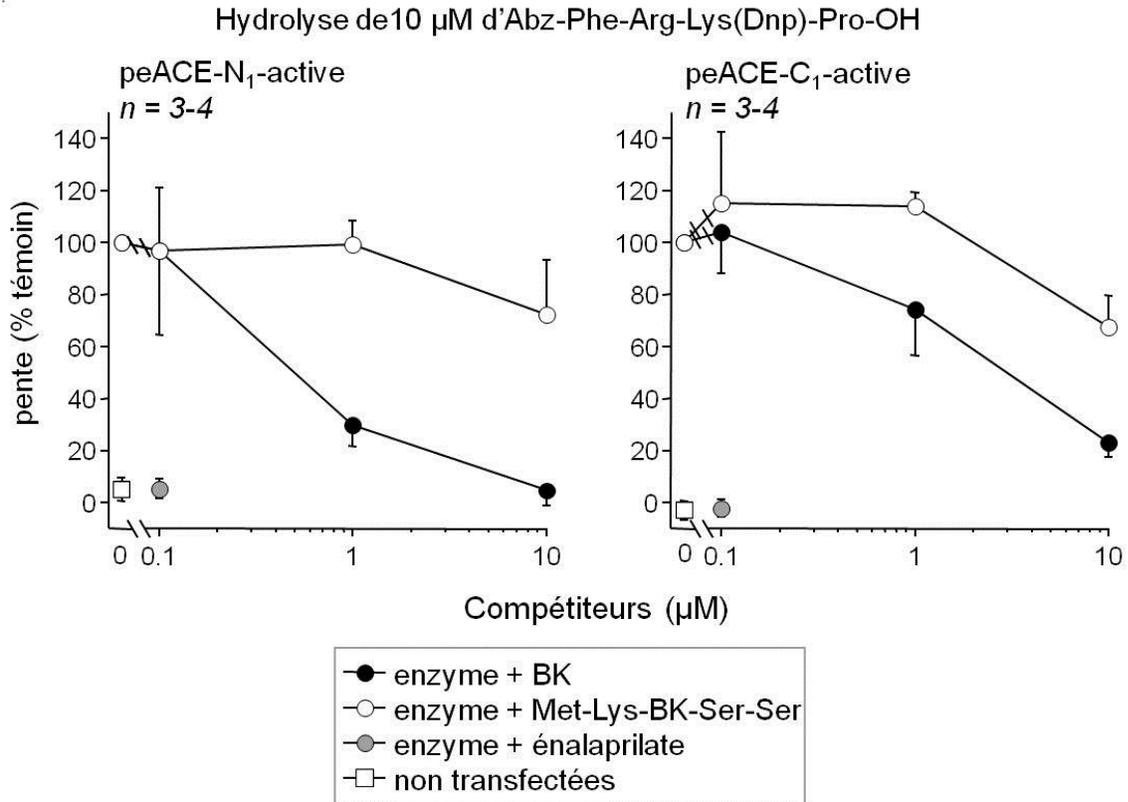
**Figure 26.** Essais de compétition de la Met-Lys-BK-Ser-Ser et de la bradykinine effectués sur des cellules HEK 293 transfectées stablement avec le RB<sub>2</sub>-GFP ou transitoirement avec l'ECA. Des concentrations croissantes ont été co-incubées avec le radioligand pour une durée de 90 minutes pour les essais du RB<sub>2</sub> et 60 min pour ceux de l'ECA. La liaison spécifique résiduelle obtenue pour chaque ligand est exprimée en pourcentage de la moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne. Nombre de déterminations indiquées par les chiffres entre parenthèses.

### **3.6.2 Mesure de l'activité des deux sites actifs de l'ECA par essai enzymatique**

Pour éclairer l'irrégularité des points de la courbe de compétition obtenue lors des essais de liaison de Met-Lys-BK-Ser-Ser sur l'ECA, une étude approfondie de l'affinité de ce peptide pour les deux différents sites catalytiques de cette enzyme fut réalisée. Pour ce faire, l'exploitation de deux vecteurs codants pour une ECA qui n'a qu'un de ses deux sites catalytiques présent (peACE-N1-active et peACE-C1-active) a été employée pour déterminer quel site lierait préférentiellement la M-K-BK-S-S. Ainsi, chacun des vecteurs a été transfecté transitoirement dans des cellules HEK 293a et les membranes de ces cellules, en plus de celles de cellules HEK 293a non transfectées, ont été isolées pour être en mesure de procéder à une compétition des récepteurs membranaires avec le substrat fluorogénique Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH (10  $\mu$ M). Les enzymes membranaires de cellules HEK 293a non transfectées n'ont pas révélé la fluorescence latente du substrat. L'addition d'énalaprilate (10  $\mu$ M) en présence des membranes 30 minutes avant celle du substrat a confirmé la spécificité du substrat fluorogénique (figure 27). Toutefois, les membranes des cellules HEK 293a transfectées avec les deux mutants ont réussi à produire une fluorescence par clivage du substrat. En ce qui a trait à la compétition du peptide M-K-BK-S-S avec le substrat, on a observé qu'il n'existe pas une grande différence d'affinité, à des concentrations de 10  $\mu$ M, pour l'un ou l'autre des sites catalytiques de l'ECA (figure 27). De plus, nous avons observé que la BK compétitionne davantage que M-K-BK-S-S pour les deux sites catalytiques mais que la BK présente une affinité plus marquée pour le site N1 actif (figure 27). De cette manière, on a remarqué que la différence d'affinité entre les compétiteurs (M-K-BK-S-S et BK) est plus grande pour le site N1 actif tel que démontré à la figure 27.

### **3.6.3 Essais de contractilité basés sur deux systèmes biologiques : la veine ombilicale humaine et la veine jugulaire de lapin**

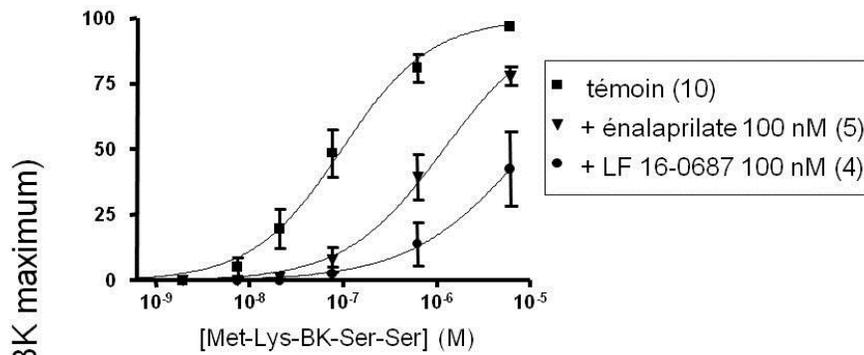
Les essais fonctionnels biologiques, bien documentés, que nous avons utilisés lors de nos études sur Met-Lys-BK-Ser-Ser sont la veine ombilicale humaine et la veine jugulaire de lapin. Dans les essais effectués à l'aide la veine ombilicale humaine, on a observé que M-K-BK-S-S est 30 fois moins puissante que la BK et le LF16-0687 a déplacé les courbes de contraction des



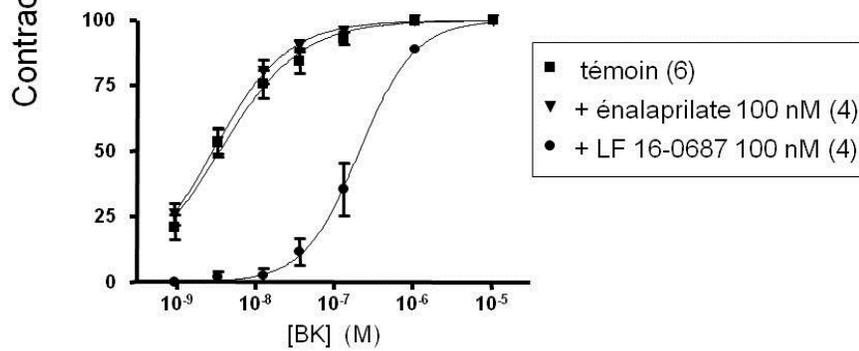
**Figure 27.** Compétition de l'hydrolyse de Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH par la BK et la Met-Lys-BK-Ser-Ser dans des essais enzymatiques basés sur les deux mutants de l'ECA. L'énalaprilate, un inhibiteur de l'ECA, empêche l'hydrolyse du substrat fluorogénique. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  erreur type du nombre de déterminations indiqué par *n*.

deux peptides vers la droite d'environ 65 à 90 fois indiquant que M-K-BK-S-S médie ses actions contractiles dans la veine ombilicale humaine via le  $RB_2$  à l'instar de la BK (figure 28). Également, on a remarqué que les courbes contractiles produites par M-K-BK-S-S sont déplacées d'un facteur 12 lorsque ce dernier est incubée avec un inhibiteur de l'ECA, l'énalaprilate (100 nM) et ce, sans affecter les effets médiés par la BK (figure 28). Quant aux essais effectués sur la veine jugulaire de lapin, qui présentent un système détenant un plus grand rapport endothélium/muscle lisse, on a remarqué que la BK et M-K-BK-S-S démontrent une puissance de contraction quasi équivalente médiée par les récepteurs  $B_2$  endogènes ( $EC_{50}$  de 16.3 nM et 10.5 nM, respectivement) (figure 29). Néanmoins, lors de l'addition d'énalaprilate (100 nM), on observe une réduction des effets contractiles de M-K-BK-S-S sur le  $RB_2$  d'un facteur 13 tandis que les effets induits par la BK sur le  $RB_2$  sont potentialisés (figure 29). En effet, la BK a été 5,3 fois plus puissante en termes contractiles lors de la pré-addition d'énalaprilate (tableau 2).

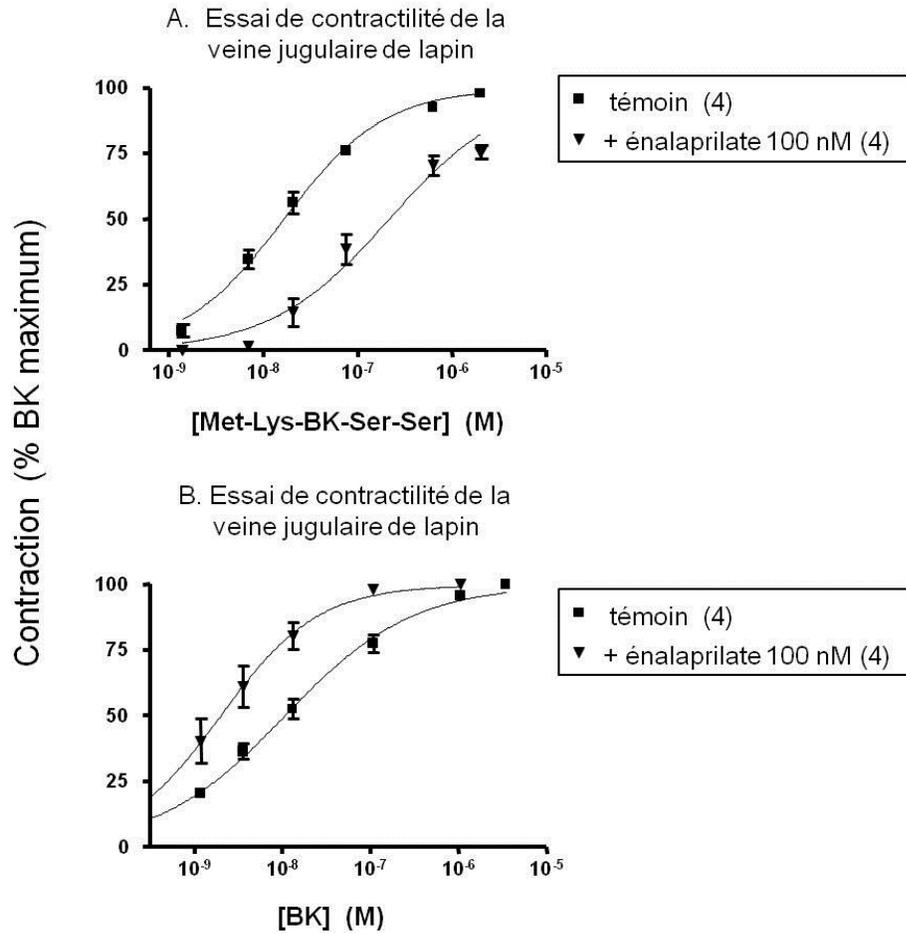
**A.** Essai de contractilité de la veine ombilicale humaine



**B.** Essai de contractilité de la veine ombilicale humaine



**Figure 28.** Essais de contractilité de la veine ombilicale humaine, un essai biologique pour mesurer la puissance de contraction de Met-Lys-BK-Ser-Ser. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type du nombre de déterminations entre parenthèses.



**Figure 29.** Essais de contractilité de la veine jugulaire de lapin, un essai biologique pour mesurer la puissance de contraction de Met-Lys-BK-Ser-Ser. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 déterminations.

Tableau 2. Valeurs d'affinité ( $IC_{50}$ ) et de puissance contractile ( $EC_{50}$ ) de la Met-Lys-BK-Ser-Ser et de la BK pour différentes cibles moléculaires et biologiques.

Protéine		M-K-BK-S-S	BK	M-K-BK-S-S + LF16-687	BK + LF16-0687	M-K-BK-S-S + énalaprilate	BK + énalaprilate
		$IC_{50}$	$IC_{50}$				
RB <sub>2</sub> -GFP	$IC_{50}$	7.6 $\mu$ M	17.5 nM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ECA	$IC_{50}$	22.4 $\mu$ M	11.0 $\mu$ M	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tissu							
Veine ombilicale humaine	$EC_{50}$	95.9 nM	3.46 nM	9.18 $\mu$ M	208 nM	1.17 $\mu$ M	2.84 nM
Veine jugulaire de lapin	$EC_{50}$	16.3 nM	10.5 nM	N.D.	N.D.	211.9 nM	1.97 nM



## 4. DISCUSSION

### 4.1 Caractérisation des peptides détenant une extension en N-terminal

Lors d'études portant sur la maximakinine, qui est un peptide de 19 acides aminés sécrété dans le venin d'un crapaud chinois et détenant la séquence complète de la bradykinine en N-terminal, une résistance naturelle à l'inactivation endosomale a été observée (Bawolak et coll., 2012). De plus, la possibilité d'une extension de la séquence naturelle de la BK en N-terminal a été confirmée par l'affinité substantielle de la maximakinine pour le RB<sub>2</sub> (Bawolak et coll., 2012). Dans une autre étude antérieure, les peptides B-9972 et B-9430 ont été caractérisés en profondeur (Bawolak et coll., 2007). Quoique de courtes séquences peptidiques soient grandement affectées par une modification structurale Nous avons condensé ces peptides avec la molécule fluorescente FITC. Ainsi, ces deux ligands fluorescents ont été synthétisés dans l'espoir que FITC soit une molécule candidate qui n'altérerait pas leurs activités biologiques (tableau 1). Ensuite, la production des peptides bifonctionnels détenant un épitope myc a été réalisée en tenant compte de la séquence de la maximakinine par inclusion de trois de ses acides aminés agissant à titre de charnière (figure 5). Ces peptides participent à la liaison récepteur-ligand à l'instar des récepteurs modifiés avec le même épitope (Bawolak et coll., 2007). De plus, d'autres études alliant fluorescence et ligands (Gera et coll., 2011a) ont servi de précédents quant au choix d'une séquence compétente pour introduire entre les deux domaines (espaceur), qui permettrait la synthèse de peptides contenant une molécule cargo fonctionnelle (AF350, CTZ et FeC) (Tableau 1). Les trois peptides qui ont été produits détiennent chacun un cargo qui diffère en termes de possibilité fonctionnelle. Le seul peptide naturel (Met-Lys-BK-Ser-Ser) a été découvert lors d'une étude impliquant une réaction de catabolisme d'une des composantes du SKK par une enzyme du neutrophile humain (PR3) (Kahn et coll., 2009). La Met-Lys-BK-Ser-Ser et le peptide détenant la cétirizine ont été étudiés dans l'hypothèse d'une activation pharmacologique secondaire à leur hydrolyse enzymatique (tableau 1).

#### 4.1.1 Paire agoniste/antagoniste de ligands fluorescents FTC

Entre les deux ligands fluorescents, le FTC-B-9972 est celui qui démontre la plus grande perte d'affinité (d'un facteur  $\sim 50$ ) par rapport à son peptide parent et le FTC-B-9430 affiche une perte moins importante par rapport au B-9430 (d'un facteur  $\sim 8$ ). Néanmoins, les essais de contractilité nous révèlent une différence moins notable (d'un facteur 8) entre le FTC-B-9972 par rapport au B-9972. La particularité de B-9972 est de pouvoir résister au métabolisme et la cinétique de relaxation des veines ombilicales isolées suite au lavage des tissus dans les bains a démontré que cette qualité a été conservée après l'ajout du fluorophore fluorescéine-5-isothiocyanate à la B-9972. Ainsi, un agoniste associé à un fluorophore présentant la possibilité d'être endocytosé est fonctionnelle. Effectivement, lors de la comparaison de l'intensité de fluorescence cellulaire produite par FTC-B-9972 et CF- $\epsilon$ -ACA-BK, nous avons constaté que ce dernier présente une plus forte intensité de marquage cellulaire qui est due à la distribution du fluorophore dans le cytosol. Cette distribution de la fluorescence diffuse uniforme pour le peptide CF- $\epsilon$ -ACA-BK appuie la dégradation du peptide et la libération subséquente de CF seul ou toujours couplé à l'espaceur. De plus, lors de l'analyse du nombre de structures intracellulaires marquées, le FTC-B-9972 a affiché un nombre supérieur de ces structures étant donné qu'il est résistant au métabolisme et le fluorophore n'a pas tendance à diffuser dans la cellule. La transformation de l'antagoniste B-9430 en molécule fluorescente a déjà été effectuée (B-10380 : Bawolak et coll., 2008) mais nous voulions trancher quant à l'amélioration d'affinité et d'intensité de fluorescence que procurerait l'extension de ce peptide en N-terminal avec un autre fluorophore (FITC). Le peptide résultant, FTC-B-9430, ne diffère pas en termes de puissance antagoniste, mais démontre une plus faible intensité de marquage cellulaire quant à ce qui a été déjà observé en microscopie pour B-10380. Effectivement, une concentration deux fois plus élevée (100 nM) que celle employée lors des études avec B-10380 (50 nM) est nécessaire pour atteindre un marquage cellulaire moyen avec FTC-B-9430. La différence majeure existant entre les deux antagonistes fluorescents est la présence de l'espaceur  $\epsilon$ -aminocaproyl qui permet, peut-être, de minimiser les interactions défavorables du fluorophore avec les acides aminés du récepteur et de permettre une meilleure liaison de l'antagoniste. Effectivement c'est à la lumière de cette étude et de celle portant sur la CF- $\epsilon$ -ACA-BK (Gera et

coll., 2011a) que nous avons privilégié l'espaceur  $\epsilon$ -aminocaproyl dans la conception des peptides cargos.

#### 4.1.2 Peptides bifonctionnels liant un récepteur et un anticorps

Des études exploitant l'épitope myc adjoint à de volumineuses protéines ont été menées et elles portaient sur un transporteur de glucose (GLUT4myc : Asahi et coll., 1999), le récepteur  $AT_2$  (Myc- $AT_2$  : Jiang et coll., 2012) et le récepteur  $B_2$  (myc- $B_2R$  : Bawolak et coll., 2007). Également, il existe des études où les ligands profitent de l'association avec un épitope dans la détection immune et tel est le cas pour le ligand de Notch (Delta-1ext-myc : Varnum-Finney et coll., 2000). Dans notre cas, les ligands possèdent une séquence charnière dont les trois acides aminés ont été tirés de la séquence de la maximakinine, un peptide naturellement prolongé en N-terminal. Ainsi, les peptides résultants permettent d'obtenir une complémentarité moléculaire (épitope-anticorps commercial) assez forte pour que cette liaison perdure au sein de la cellule tel qu'observé en épifluorescence. Par contre, la fluorescence obtenue lors de la stimulation du  $RB_2$  pour les deux agonistes modifiés résulte uniquement du fluorophore de l'anticorps et ne concorde pas avec la puissance contractile qu'ils médient. Ainsi, les effets de contractilité observés (modèle biologique) démontrent que myc-KGP-BK est un agoniste plus puissant que myc-KGP-B-9972 pour induire la contraction dans les veines ombilicales humaines. De ce fait, dans les essais de contractilité, myc-KGP-BK affiche une perte d'effets contractiles d'un facteur 20 tandis que myc-KGP-B-9972 d'un facteur de 250. Ces résultats concordent avec les pertes d'affinité observées lors des essais de liaison pour les deux peptides (d'un facteur 196-250). Cette grande disparité de valeurs constatée pour myc-KGP-BK entre les deux essais peut être attribuable au fait que la portion bradykinine dans le peptide myc-KGP-BK gagnerait une certaine résistance face aux enzymes présentes au niveau des tissus par protection stérique conférée par les acides aminés additionnels à la séquence parent. Une autre explication serait la différence d'espèces ( $RB_2$  humain et  $RB_2$  de lapin pour la construction recombinante). Quant à myc-KGP-B-9972, les acides aminés supplémentaires n'engendreraient aucun changement entre les valeurs obtenues lors des essais de contractilité et de liaison. De plus, les essais de contractilité renforcent l'idée que les deux peptides détenant un épitope myc

conservent leur statut d'agonistes spécifiques car lors de l'ajout de l'antagoniste du  $RB_2$  (LF16-0687), les deux peptides sont antagonisés. Fait très important, lors de la stimulation des cellules par la bradykinine en présence de l'anticorps monoclonal anti-myc (clone 4A6) conjugué au fluorophore AF488, aucune fluorescence dépassant celle de l'auto fluorescence n'est observée. De ce fait, on peut sans aucun doute déduire que la fluorescence émise par les complexes immuns résulte d'une internalisation des peptides porteurs de l'épitope myc par les récepteurs  $B_2$ . Néanmoins, les essais de liaison démontrent que les deux peptides détiennent une affinité similaire pour le  $RB_2$  lors de compétition avec la bradykinine tritiée (modèle cellulaire), contribuant à valider la distribution et l'intensité de fluorescence de myc-KGP-B-9972 observée en microscopie (modèle cellulaire). Le marquage fluorescent plus intense obtenu en épifluorescence, lors de la stimulation des  $RB_2$  par myc-KGP-B-9972 en présence de l'anticorps, résulterait de la rigidité stérique conférée au peptide par la portion B-9972. Effectivement, cette rigidité permettrait une meilleure stabilité de la liaison de l'anticorps avec le peptide détenant l'épitope myc. Également, nous avons vérifié si une pré-incubation des ligands avec l'anticorps monoclonal anti-myc clone 4A6 conjugué au fluorophore AF488 pouvait potentialiser la fluorescence observée lors de l'incubation du complexe préformé avec les récepteurs  $B_2$ . Malgré la possibilité que cette pré-incubation soit favorable à une augmentation de la formation de complexes immuns, l'intensité de la fluorescence observée est constante dans tous les cas, suggérant que la formation de ce complexe est quasi instantanée dans le milieu de culture lors de la stimulation. De plus, lorsque l'anticorps est présent lors de la stimulation du  $RB_2$ , celui-ci ne modifie pas l'affinité que possède myc-KGP-B-9972 pour le  $RB_2$ , tel qu'observé lors des essais de liaison et des essais contractiles. Étant donné que le peptide myc-KGP-B-9972 présente une séquence commune à celle de l'agoniste résistant au métabolisme, nous avons voulu valider que ce nouveau peptide bifonctionnel posséderait la même propriété. Effectivement, la présence de structures intracellulaires qui se démarquent par une fluorescence condensée suggère la présence d'endosomes qui persistent après 3 h de stimulation du  $RB_2$  par cet agoniste. En plus de la fluorescence de la membrane de  $RB_2$ -GFP délocalisée au cytosol sous forme d'endosomes, myc-KGP-B-9972 colocalise avec la  $\beta$ -arrestine<sub>1</sub>. Ceci démontre qu'après 3 heures, le ligand persiste au niveau des endosomes et n'est pas encore dirigé vers une dégradation.

### 4.1.3 Peptides cargos : molécules cycliques

Lors de la caractérisation des différents peptides cargos, l'ordre d'affinité pour le RB<sub>2</sub> diffère de celui découvert lors des essais de contractilité. Dans les essais de liaison, la CTZ-ε-ACA-BK prend la tête après la BK, mais dans les essais de contractilité elle est dernière en termes de puissance contractilité en comparaison avec la BK. Cette disparité peut, encore une fois, être expliquée par la différence d'espèce entre les essais pharmacologiques. En plus, de la destitution de la CTZ-ε-ACA-BK de l'ordre pré-établi obtenu lors d'un comparatif de contraction produite, ce peptide détient plus d'affinité pour le RB<sub>2</sub> que pour le RH<sub>1</sub>. Pour évaluer si la portion BK préserve sa nature agoniste lors de l'ajout de ces molécules cycliques, une incubation des peptides cargos avec un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> a permis d'affirmer qu'ils sont bel et bien des agonistes. Effectivement, l'incubation de ces peptides avec des cellules exprimant le RB<sub>2</sub> fluorescents permet d'observer des structures intracellulaires où la fluorescence est condensée (structures endosomales). De plus, cette distribution intracellulaire condensée est totalement supprimée, laissant place à une distribution membranaire uniforme de la fluorescence, confirmant que les peptides provoquent l'endocytose du RB<sub>2</sub> de par leur liaison à ce dernier. Dans le but de consolider la présence des peptides cargos au niveau de la triade ligand-récepteur-β-arrestine lors de l'endocytose ligand dépendante, et ultérieurement dans les endosomes, le peptide cargo AF350-ε-ACA-BK s'est révélé utile en raison de son spectre d'émission caractéristique. Ainsi, AF350-ε-ACA-BK colocalise avec la β-arrestine<sub>2</sub> et EEA1-FYVE. Par contre, l'AF350-ε-ACA-BK s'est montré moins efficace que les autres peptides conjugués à des fluorophores lors des études en épifluorescence étant donné que l'autofluorescence des cellules est maximale dans le bleu et que l'intensité d'émission des fluorophores bleus n'est généralement pas grande. Avec le peptide détenant le ferrocène, nous avons démontré que notre design permet d'adjoindre des molécules assez originales, de forme « sandwich » qui engendre des dérivés pour lesquels des applications médicales sont attribués.

## 4.2 Exploitation de systèmes biologiques et cellulaires pour libérer un peptide actif

Les prodrogues sont des médicaments qui doivent subir une transformation *in vivo* pour libérer leur molécule active (Rautio et coll., 2008). Le peptide CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK contient deux domaines pharmacologiquement actifs agissant sur deux récepteurs différents et peut être considéré comme une pro-drogue car une biotransformation induirait, hypothétiquement, la libération de fragments plus actifs que la molécule parente. Nous avons basé sa structure sur celle de la CF- $\epsilon$ -ACA-BK (Gera et coll., 2011a) car ce dernier a démontré une délocalisation cytosolique de sa fluorescence lors de son internalisation par liaison au RB<sub>2</sub>. Ainsi, si la portion CF est présente à travers le cytosol nous voulions voir si le médicament (CTZ) serait déployé, à l'instar du CF, dans l'espace intracellulaire et jusqu'à la surface cellulaire où se trouve RH<sub>1</sub>.

De nombreux intermédiaires métaboliques et métabolites endogènes activent, en conditions physiologiques ou pathologiques, les RCPGs (Tonack et coll., 2013). C'est alors que la compréhension de la capacité de ces métabolites à engendrer des réponses cellulaires devient importante si une dérégulation du métabolisme venait à se produire. Ainsi, le peptide Met-Lys-BK-Ser-Ser est un produit du métabolisme du neutrophile humain mais il s'avère être subséquentement hydrolysé par l'ECA pour être activé. Cette activation est paradoxale car dans un même environnement la BK et la M-K-BK-S-S pourraient être présentes et hydrolysées par l'ECA ce qui induirait, respectivement, une inactivation et une activation de la signalisation du même récepteur.

### 4.2.1 Évaluation de la libération de cétirizine de manière enzymatique

Dans le but d'évaluer si la lignée cellulaire utilisée (cellules CHO) conviendrait à l'exploitation de la transfection des vecteurs myc-RB<sub>2</sub> et RH<sub>1</sub> et pour mesurer l'affinité de différents ligands nous avons procédé à des essais de liaison (saturation). Effectivement, les cellules CHO permettent d'obtenir des courbes de saturation adéquates de la liaison de [<sup>3</sup>H]BK et [<sup>3</sup>H]pyrilamine pour poursuivre avec des essais de compétition impliquant divers ligands. De ce

fait, un ordre d'affinité des ligands s'est dessiné pour chaque récepteur. Les antihistaminiques sont ceux détenant le plus d'affinité pour le RH<sub>1</sub> recombinant humain tandis que pour myc-RB<sub>2</sub>, tel que prévu, ce sont la bradykinine et l'antagoniste LF16-0687. Avec ces ligands, nous avons pu constater que pour le RH<sub>1</sub>, notre peptide (CTZ-ε-ACA-BK) détient plus d'affinité que son agoniste endogène (histamine). Par contre, dans l'autre essai de compétition, la CTZ-ε-ACA-BK démontre une plus grande affinité pour le RB<sub>2</sub>. Somme toute la CTZ-ε-ACA-BK démontre qu'il est possible de produire un ligand qui possède une dualité intrinsèque déterminée par l'identité de ses portions N- et C-terminales. Ensuite, nous avons évalué si une libération de l'antihistaminique (CTZ) pouvait se produire par mise en contact du peptide avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine, d'enzymes endosomales ou intracellulaires. Lors de la production du milieu conditionné et de son incubation avec les cellules HEK 293a transfectées avec l'ECA, nous n'avons pas remarqué une quelconque libération de la cétirizine libre ou d'un fragment actif. Au cours de nos travaux nous avons opté pour l'ECA et il se pourrait qu'une autre enzyme du SKK puisse hydrolyser la CTZ-ε-ACA-BK. Par contre, compte tenu des études antérieures, une acidification du milieu dans lequel la CTZ-ε-ACA-BK se trouve ou le métabolisme des enzymes endosomales auraient pu permettre la libération de la CTZ tel qu'observé pour la CF-ε-ACA-BK (Gera et coll., 2011a). Toutefois, le fait que les fragments de cétirizine ou la cétirizine libre doivent rétro-diffuser de l'environnement endosomal ou cytosolique au milieu extracellulaire constitue une limitation de cette approche. Ensuite, pour tester si une libération de la portion cétirizine ou de fragments actifs par les ectoenzymes des tissus de veines ombilicales humaines pouvait se produire nous avons effectué des essais de contractilité. Premièrement, pour s'assurer que les produits de dégradation pourraient intervenir dans les effets contractiles médiés par l'histamine sur le RH<sub>1</sub> et la bradykinine sur le RB<sub>2</sub>, nous avons construit nos courbes en présence de cétirizine pour s'assurer que seules les courbes produites par l'histamine seraient affectées. Ainsi, la veine ombilicale humaine s'avère être un bon modèle pour tester la libération de fragments actifs de la cétirizine ou de la cétirizine libre car seulement les courbes de l'histamine ont démontrées un antagonisme par un prétraitement à la cétirizine. Par la suite, l'introduction d'un antagoniste du RB<sub>2</sub> (LF16-0687) et d'un inhibiteur double de l'ECA et de la NEP (omapatrilat), avant la construction des courbes concentration-effet médiées par l'histamine permet d'isoler un effet antagoniste du peptide conjugué sur la contraction induite par l'histamine. Ainsi, ces courbes ont révélé que la CTZ-ε-ACA-BK induit un antagonisme des effets contractiles médiés par

l'histamine et que l'omapatrilat ne modifie pas cet antagonisme. La CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK n'est pas fragmentée en un ligand de haute affinité du RH<sub>1</sub> suite à la dégradation enzymatique opérée par les ectoenzymes présentes sur les veines ombilicales humaines. La <sup>14</sup>C-cétirizine, lorsqu'administrée à des patients en bonne santé ne semble être que minimalement métabolisée et le seul métabolite retrouvé chez ces patients est un produit de dé-alkylation de la chaîne latérale de la cétirizine (Wood et coll., 1987). Cette chaîne, dans le peptide CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK, est engagée dans un lien amide avec la portion espaceur ce qui limite davantage la possibilité d'un clivage libérant la portion entière de la cétirizine. Alors, seulement un produit de clivage détenant au moins une portion de l'espaceur serait envisageable.

#### **4.2.2 Nouveau substrat endogène de l'ECA : Met-Lys-BK-Ser-Ser**

M-K-BK-S-S est un peptide qui est produit d'une manière kallikréine indépendante par le biais de l'action de la protéinase 3 du neutrophile humain (Kahn et coll., 2009). La PR3 est retrouvée dans les granules de neutrophile ainsi que sur sa surface membranaire (Kahn et coll., 2009). Une connaissance approfondie des interactions de M-K-BK-S-S avec le SKK s'avère très importante pour comprendre les effets que pourraient engendrer certaines pathologies impliquant une concentration accrue de neutrophile dans le sang et les tissus. M-K-BK-S-S ne détient qu'une affinité micromolaire pour le RB<sub>2</sub>, ce qui est nettement moins que la BK (nanomolaire). Néanmoins, son affinité pour l'ECA est comparable à celle de la BK. Ainsi, l'analyse de l'étude comparative que nous avons faite entre l'affinité que détient la M-K-BK-S-S et la BK pour les deux sites catalytiques de l'ECA démontre que la BK détient une différente affinité pour les deux sites catalytiques. De plus, on peut affirmer que la différence d'affinité entre les deux peptides est plus grande pour le site catalytique en N-terminal de l'ECA et que le M-K-BK-S-S, à une haute concentration, semble avoir une affinité équivalente pour les deux sites. Dans l'étude menée par Khan et coll, aucune référence à l'action des ectoenzymes des vaisseaux sanguins sur le peptide produit par la PR3 n'est mentionnée. Ainsi, nous avons mis en valeur des systèmes biologiques (contractilité des veines ombilicales humaines et veines jugulaires de lapin) pour démontrer l'implication de l'ECA dans l'activation de la M-K-BK-S-S. Les courbes obtenues à l'aide de la veine ombilicale humaine révèlent que l'action antagoniste

de LF16-0687, sur la contraction induite par la BK et la Met-Lys-BK-Ser-Ser, est remarquable. Également, suite à la pré-incubation des tissus avec un inhibiteur de l'ECA, l'énalaprilate, nous pouvons confirmer l'action activatrice des enzymes présentes au niveau des tissus dans les baignoires car nous observons une perte de puissance de contraction seulement pour M-K-BK-S-S. Pour confirmer, cette perte de puissance, nous avons décidé d'employer un deuxième modèle des effets contractiles médiés par la BK, la veine jugulaire de lapin. Effectivement, l'effet inhibiteur de l'énalaprilate démontre de manière manifeste ce qui se passe lorsque l'on met les peptides en présence d'une population abondante d'ECA (rapport endothélium/muscle lisse plus grand dans ce tissu vasculaire très mince). La courbe de la contractilité médiée par la BK, en présence d'énalaprilate, est déplacée vers la gauche ce qui signifie une grande potentialisation. Toutefois, le contraire se produit pour la M-K-BK-S-S, la courbe est déplacée vers la droite et on observe une grande perte de puissance. Cet essai biologique démontre les effets contradictoires et paradoxaux de l'ECA sur les deux peptides : inactivation de BK et activation métabolique de M-K-BK-S-S. Il est à noter que Met-Lys-BK, qui est le produit probable de la réaction, est un agoniste de haute affinité pour le  $RB_2$  (Gera et coll., 2011b).



## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le premier volet de nos travaux a permis d'améliorer notre connaissance sur de nouveaux outils d'imagerie cellulaire et de tester des hypothèses concernant la complémentarité moléculaire épitope-anticorps. Les deux peptides fluorescents (FTC-B-9972 et FTC-B-9430) confirment la possibilité de conjuguer une molécule fluorescente à un ligand endogène et à un agoniste résistant au métabolisme. Également, deux des ligands (BK et B-9972) ont été exploités pour permettre de confirmer qu'une liaison d'un anticorps avec un ligand détenant l'épitope correspondant peut être détectée après son endocytose. De plus, il est important de noter que l'endocytose de cet anticorps est spécifique et peut être contrôlée de manière pharmacologique. Les peptides cargos témoignent bien la possibilité de conjugaison d'un cargo avec un ligand ciblant un récepteur connu, la BK et le RB<sub>2</sub> en l'occurrence. Ainsi, des cargos aux propriétés variées (une molécule organométallique médicinale, un anti-histaminique et un fluorophore commercial) ont tous démontré leur qualité d'agonistes et ont été endocytosés. L'endocytose de tous les peptides produits et étudiés nécessite une liaison avec le RB<sub>2</sub> et donc, ces outils sont dirigés vers le récepteur cible et pourraient libérer leur cargos d'une manière déterminée par les populations de récepteurs selon les tissus (sélectivité et spécificité).

Le concept de conjugaison d'un épitope avec un ligand permet de valider la possibilité que des anticorps à cargos cytotoxiques puissent être exploités pour induire une cytotoxicité et subséquemment, l'apoptose ou la nécrose de cellules qui détiennent spécifiquement le récepteur en question (application possible en oncologie). De plus, le choix de cargos originaux pourraient induire différentes voies signalétiques et conférer aux ligands de nouvelles propriétés lorsqu'ils se retrouvent dans les endosomes et le milieu intracellulaire. Également, le design de peptides bivalents pourrait être étudié plus en détail et permettre la conjugaison de peptides préférentiellement hydrolysés par des enzymes qui se retrouvent à proximité de récepteurs cibles. De nombreux récepteurs sont surexprimés en conditions pathologiques, notamment les cancers. D'ailleurs, une étude récente a permis de montrer que le relâchement de cargo, par exploitation d'un vecteur médicamenteux de type micelle polymérique, était

possible sous l'influence du pH acide des endosomes de cellules tumorales (Ding et coll., 2009). Une stratégie visant l'endocytose de médicaments anti-cancéreux pourrait être bénéfique en délimitant l'action de ces médicaments. Ceci est possible dans la mesure où le vecteur médicamenteux détient des liens labiles ce qui provoque le relâchement du cargo au niveau endosomal (bas pH) mais est stable au pH physiologique.

Le deuxième volet de notre étude a permis de mettre en lumière la possibilité d'obtenir un ligand détenant deux domaines pouvant chacun lier leur récepteur. Par contre, à cause de sa capacité initiale assez forte à lier le  $RH_1$ , la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK ne constitue pas un bon modèle de pro-drogue car l'activation métabolique ne permettra pas un gain d'affinité très grand. Effectivement, le ou les produits d'hydrolyse du peptide CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK n'affichent pas une affinité supérieure au peptide non hydrolysé. De plus, les enzymes endogènes et recombinantes dans nos systèmes cellulaires et celles présentes sur les veines ombilicales humaines n'arrivent pas à hydrolyser, d'une quelconque manière, la CTZ- $\epsilon$ -ACA-BK pour libérer la cétirizine libre ou des fragments susceptibles d'avoir un effet antagoniste. Ainsi, le fait que la cétirizine n'est que faiblement métabolisée dans le corps humain soit une limitation, on aurait pu remarquer des effets dus à la CTZ liée à l'espaceur. Néanmoins, nos études concernant la Met-Lys-BK-Ser-Ser nous ont permis de dévoiler une activation opérant dans les mêmes systèmes (SKK et SRA) que la BK. Ainsi, la M-K-BK-S-S détient une affinité presque nulle pour le  $RB_2$  mais une affinité proche de la BK pour l'ECA. Effectivement, d'une manière paradoxale, la M-K-BK-S-S est clivée par l'ECA à l'instar de la BK, qui est inactivée, et les peptides résultants de cette réaction (exemple: Met-Lys-BK) provoquent une activation du  $RB_2$ . L'approfondissement du métabolisme de la M-K-BK-S-S serait utile dans certaines situations cliniques étant donné que l'ECA est majoritairement retrouvée au niveau des cellules endothéliales. Ainsi, une stimulation du  $RB_2$  pourrait être compartimentée par une administration parentérale de la M-K-BK-S-S (exemple : vasodilatation sans stimulation de l'épithélium gastro-intestinal ou des afférences neurologiques qui possèdent le  $RB_2$ ). De plus, si des patients se retrouvent dans une situation d'hyperleucocytose, la dégranulation des neutrophiles sanguins pourrait induire, aux sites où l'ECA est présente, les mêmes effets que ceux observés pour la BK.

Conséquemment, il serait intéressant de pousser l'exploitation de ligand d'affinité bivalente,

dans la mesure où le site cible devrait être atteint et la portion fonctionnelle libérée. Des études non publiées portant sur un ligand détenant une portion histamine (L-Ala-Histamine), activable par une autre enzyme du système kallikréine-kinine (APN) sont en cours. Il est à noter que la création de ligands activables par le métabolisme suscite un intérêt particulier dans la résolution de problèmes concernant l'amélioration de la livraison ciblée du médicament, de la solubilité aqueuse, de la perméabilité et de la lipophilicité, etc. De plus, à la manière de M-K-BK-S-S, les populations d'enzymes susceptibles d'hydrolyser les ligands devront être ciblées selon les tissus et les récepteurs à activer (proximité nécessaire).



## BIBLIOGRAPHIE

AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**:94-8.

Akdis CA, Simons FE (2006) Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol* **533**: 69-76.

Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, Juliano L, Carmona AK (2005) A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res* **38**:861-8.

Asahi Y, Hayashi H, Wang L, Ebina Y (1999) Fluoromicroscopic detection of myc-tagged GLUT4 on the cell surface. Co-localization of the translocated GLUT4 with rearranged actin by insulin treatment in CHO cells and L6 myotubes. *J Med Invest* **46**:192-9.

Audet M, Bouvier M (2012) Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell* **151**:14-23.

Audet R, Petitclerc E, Drapeau G, Rioux F et Marceau F (1994) Further analysis of the upregulation of bradykinin B1 receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. *Eur J Pharmacol* **271**:551-5.

Bachvarov DR, Houle S, Bachvarova M, Bouthillier J, Adam A, Marceau F (2001) Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* **297**:19-26.

Bachvarov DR, Saint-Jacques E, Larrivée JF, Levesque L, Rioux F, Drapeau G, Marceau F (1995) Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **275**:1623-1630.

Bakker RA, Wieland K, Timmerman H, Leurs R (2000) Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* **387**:R5-7.

Baudin B (2002) New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med* **40**:256-65.

Bawolak MT, Fortin S, Bouthillier J, Adam A, Gera L, C-Gaudreault R, Marceau F (2009) Effects of inactivation-resistant agonists on the signalling, desensitization and down-regulation of bradykinin B(2) receptors. *Br J Pharmacol* **158**:1375-86.

Bawolak MT, Fortin JP, Vogel LK, Adam A, Marceau F (2006) The bradykinin B2 receptor antagonist icatibant (Hoe 140) blocks aminopeptidase N at micromolar concentrations: off-target alterations of signaling mediated by the bradykinin B1 and angiotensin receptors. *Eur J Pharmacol* **551**:108-11.

Bawolak MT, Gera L, Bouthillier J, Stewart JM, Adam A, Marceau F (2008) A fluorescent version of the bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist B-9430: pharmacological characterization and use in live cell imaging. *Peptides* **29**:1626-30.

Bawolak MT, Gera L, Morissette G, Stewart JM, Marceau F (2007) B-9972 (D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Igl<sup>5</sup>,Oic<sup>7</sup>,Igl<sup>8</sup>]-bradykinin) is an inactivation-resistant agonist of the bradykinin B<sub>2</sub> receptor derived from the peptide antagonist B-9430 (D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Igl<sup>5</sup>,D-Igl<sup>7</sup>,Oic<sup>8</sup>]-bradykinin): pharmacologic profile and effective induction of receptor degradation. *J Pharmacol Exp Ther* **323**:534-46.

Bawolak MT, Lodge R, Morissette G, Marceau F (2011) Bradykinin B<sub>2</sub> receptor-mediated transport into intact cells: anti-receptor antibody-based cargoes. *Eur J Pharmacol* **668**:107-14.

Bawolak MT, Roy C, Gera L, Marceau F (2012) Prolonged signalling and trafficking of the bradykinin B<sub>2</sub> receptor stimulated with the amphibian peptide maximakinin: insight into the endosomal inactivation of kinins. *Pharmacol Res* **65**:247-53.

Bellucci F, Meini S, Cucchi P, Catalani C, Reichert W, Zappitelli S, Rotondaro L, Quartara L, Giolitti A, Maggi CA (2003) A different molecular interaction of bradykinin and the synthetic agonist FR190997 with the human B<sub>2</sub> receptor: evidence from mutational analysis. *Br J Pharmacol* **140**:500-6.

Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**:3153-25.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* **44**:1-80.

Blais C Jr, Lapointe N, Rouleau JL, Clément R, Bachvarov DR, Adam A (2002) Effects of captopril and omapatrilat on early post-myocardial infarction survival and cardiac hemodynamics in rats: interaction with cardiac cytokine expression. *Can J Physiol Pharmacol* **80**:48-58.

Blaukat A, Pizard A, Breit A, Wernstedt C, Alhenc-Gelas F, Muller-Esterl W, Dikic I (2001) Determination of bradykinin B<sub>2</sub> receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J Biol Chem* **276**:40431-40440.

Blumenthal SA (2012) Earl Sutherland (1915-1975) and the discovery of cyclic AMP. *Perspect Biol Med* **55**:236-49.

Bönner G (1990) Kinin-related effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Clin Physiol Biochem* **8**:6-15.

Brasier AR, Li J (1996) Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension* **27**:465-75.

Briet M, Schiffrin EL (2010) Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol* **6**:261-73.

Breitwieser GE (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res* **94**:17-27.

Brown NJ, Byiers S, Carr D, Maldonado M, Warner BA (2009) Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor use associated with increased risk of ACE inhibitor-associated angioedema. *Hypertension* **54**:516-23.

Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**:715-28.

Byrd JB, Touzin K, Sile S, Gainer JV, Yu C, Nadeau J, Adam A, Brown NJ (2008) Dipeptidyl peptidase IV in angiotensin-converting enzyme inhibitor associated angioedema. *Hypertension* **51**:141-7.

Campbell DJ (2001) The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**:1060-5.

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

Cao TT, Brelot A, von Zastrow M (2005) The composition of the beta-2 adrenergic receptor oligomer affects its membrane trafficking after ligand-induced endocytosis. *Mol Pharmacol* **67**:288-97.

Carey RM, Siragy HM (2003) Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* **24**:261-71.

Cayla C, Merino FV, Cabrini AD, Silva J-A, Pesquero BJ et Bader M (2002) Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. *Int Imm* **2**:1721-1727.

Cepeniene D, Irvin R, Hodges RS, Gera L (2011) Selective labeling of lysine containing biological active peptides at the N-terminus with Alexa Fluor. In: Lebl M, editor. Peptides: Building Bridges (Proceedings of the 22nd American Peptide Symposium), San Diego, CA: American Peptide Society, Prompt Scientific Publisher, p. 76-77.

Chen C (2008) Physicochemical, pharmacological and pharmacokinetic properties of the zwitterionic antihistamines cetirizine and levocetirizine. *Curr Med Chem* **15**:2173-91.

Chini B, Parenti M (2009) G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J Mol Endocrinol* **42**:371-9.

Chun L, Zhang WH, Liu JF (2012) Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacol Sin* **33**:312-23.

- Cilia La Corte AL, Carter AM, Rice GI, Duan QL, Rouleau GA, Adam A, Grant PJ, Hooper NM (2011) A functional XPNPEP2 promoter haplotype leads to reduced plasma aminopeptidase P and increased risk of ACE inhibitor-induced angioedema. *Hum Mutat* **32**:1326-31.
- Citarella F, Misiti S, Felici A, Farsetti TA, Pontecorvi A, Fantoni A (1996) Estrogen induction and contact phase activation of human factor XII. *Steroids* **61**:270-276.
- Clague MJ (1998) Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J* **336**:271-82.
- Clarke NE, Turner AJ (2012) Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade. *Int J Hypertens* **2012**:307315.
- Coates D (2003) The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* **35**:769-73.
- Curran MP, Scott LJ, Perry CM (2004) Cetirizine: a review of its use in allergic disorders. *Drugs* **64**:523-61.
- Cottrell G (2013) Roles of proteolysis in regulation of GPCR function. *Br J Pharmacol* **168**:576-90.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429**:161-76.
- Cunningham DF, O'Connor B (1997) Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1343**:160-86.
- Dalrymple MB, Pflieger KD, Eidne KA (2008) G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol Ther* **118**:359-71.
- Danziger RS (2008) Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev* **13**:293-8.
- Deiteren K, Hendriks D, Scharpé S, Lambeir AM (2009) Carboxypeptidase M: Multiple alliances and unknown partners. *Clin Chim Acta* **399**:24-39.
- deLigt RA, Kourounakis AP, IJzerman AP (2000) Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol* **130**:1-12.
- Delom F, Fessart D (2011) Role of Phosphorylation in the Control of Clathrin-Mediated Internalization of GPCR. *Int J Cell Biol* **2011**:246954.
- Deupi X, Standfuss J, Schertler G (2012) Conserved activation pathways in G-protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* **40**:383-8.

- Dielis AW, Smid M, Spronk HM, Hamulyak K, Kroon AA, ten Cate H, de Leeuw PW (2005) The prothrombotic paradox of hypertension: role of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. *Hypertension* **46**:1236-42.
- Doolittle RF (1983) Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science* **222**:417-9.
- Dorsam RT, Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**:79-94.
- Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* **99**:570-82.
- Enquist J, Skröder C, Whistler JL, Leeb-Lundberg LM (2007) Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol Pharmacol* **71**:494-507.
- Erdős EG, Skidgel RA (1997) The kinin system Chap 7 Metabolism of Bradykinin by Peptidases in Health and Disease. Academic Press: 111-141.
- Erdős EG, Sloane EM (1962) An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem Pharmacol* **11**:562–585.
- Fan H, Stefkova J, El-Dahr SS (2006) Susceptibility to metanephric apoptosis in bradykinin B2 receptor null mice via the p53-Bax pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**:F670-82.
- Fang Y, Li GG, Peng J (2005) Optical biosensor provides insights for bradykinin B(2) receptor signaling in A431 cells. *FEBS Lett* **579**:6365-74.
- Farmer SG, Burch RM (1992) Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**:511-36.
- Faussner A, Bauer A, Kalatskaya I, Schüssler S, Seidl C, Proud D, Jochum M (2005) The role of helix 8 and of the cytosolic C-termini in the internalization and signal transduction of B(1) and B(2) bradykinin receptors. *FEBS J* **272**:129-40.
- Feener EP (2010) Plasma Kallikrein and Diabetic Macular Edema *Curr Diab Rep* **10**:270–275.
- Feierler J, Wirth M, Welte B, Schüssler S, Jochum M, Faussner A (2011) Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B (2) receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem* **286**:43282-93.
- Ferguson SM, De Camilli P (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:75-88.
- Figuroa CD, Ehrenfeld P, Bhoola KD (2012) Kinin receptors as targets for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **16**:299-312.

Fogaca SE, Melo RL, Pimenta DC, Hosoi K, Juliano L, Juliano MA (2004) Differences in substrate and inhibitor sequence specificity of human, mouse and rat tissue kallikreins. *Biochem J* **380**:775-781.

Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP (2003) Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:1161-8.

Frank SA (2002) Immunology and Evolution of Infectious Disease. Chap.4 Specificity and Cross-Reactivity. Princeton University Press:33-56.

Fulop L, Penke B, Zarandi M (2007) Synthesis and fluorescent labeling of beta-amyloid peptides. *J Pept Sci* **7**:397-401.

Fyhrquist F, Saijonmaa O (2008) Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* **264**:224-36.

Gabillet J, Millet A, Pederzoli-Ribeil M, Tacnet-Delorme P, Guillevin L, Mouthon L, Frchet P, Witko-Sarsat V (2012) Proteinase 3, the autoantigen in granulomatosis with polyangiitis, associates with calreticulin on apoptotic neutrophils, impairs macrophage phagocytosis, and promotes inflammation. *J Immunol* **185**:2574-83.

Galés C (2012) G-protein-coupled receptors plasticity and signalling. *Med Sci (Paris)* **28**:883-5.

Gelfand EW (2002) Role of histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists. *Am J Med* **16**:113.

Gera L, Stewart JM, Fortin JP, Morissette G, Marceau F (2008) Structural modification of the highly potent peptide bradykinin B1 receptor antagonist B9958. *Int Immunopharmacol* **8**:289-92.

Gera L, Bawolak MT, Roy C, Lodge R, Marceau F (2011a) Design of fluorescent bradykinin analogs: application to imaging of B2 receptor-mediated agonist endocytosis and trafficking and angiotensin-converting enzyme. *J Pharmacol Exp Ther* **337**:33-41.

Gera L, Fortin JP, Adam A, Stewart JM, Marceau F (2006) Discovery of a dual-function peptide that combines aminopeptidase N inhibition and kinin B1 receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* **317**:300-8.

Gera L, Roy C, Bawolak MT, Charest-Morin X, Marceau F (2012a) 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**:433-46.

Gera L, Roy C, Bawolak MT, Bouthillier J, Adam A, Marceau F (2011b) 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**:528-34.

- Gera L, Roy C, Marceau F (2012b) Bifunctional epitope-agonist ligands of the bradykinin B2 receptor. *Biol Chem* [Epub ahead of print]
- Gies JP, Landry Y (2007) Médicaments. Pharmacométrie. Wolters Kluwer SA :113-137.
- Gilliard M, Van der Perren C, Moguilevsky N, Massingham R, Chatelain P (2002 )Binding characteristics of cetirizine and levocetirizine to human H<sub>1</sub> histamine receptors: contribution of Lys<sup>191</sup> and Thr<sup>194</sup>. *Mol Pharmacol* **61**:391-399.
- Goettig P, Magdolen V, Brandstetter H (2010) Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* **92**:1546-67.
- Gorrell MD (2005) Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)* **108**:277-92.
- Gousseva V, Simaan M, Laporte SA, Swain PS (2008) Inferring the lifetime of endosomal protein complexes by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* **94**:679-87.
- Graham SC, Bond CS, Freeman HC, Guss JM (2005) Structural and functional implications of metal ion selection in aminopeptidase P, a metalloprotease with a dinuclear metal center. *Biochemistry* **44**:13820-36.
- Granier S, Kobilka B (2012) A new era of GPCR structural and chemical. *BiologyNat Chem Biol* **18**:670-3.
- Griendling KK, Lassègue B, Alexander RW (1996) Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**:281-306.
- Guang C, Phillips RD, Jiang B, Milani F (2012) Three key proteases--angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin--within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch Cardiovasc Dis* **105**:373-85.
- Hall JM (1997) Bradykinin Receptors. *Gen Pharmac Vol* **28**, No 1:1-6.
- Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA, Bouvier M (2007) Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* **282**:29089-100.
- Hanyaloglu AC, von Zastrow M (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:537-68.
- Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen ZP, Kemp BE, Venema RC (2001) Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* **276**:16587-91.
- Heitzler D, Durand G, Gallay N, Rizk A, Ahn S, Kim J, Violin JD, Dupuy L, Gauthier C, Piketty V, Crépieux P, Poupon A, Clément F, Fages F, Lefkowitz RJ, Reiter E (2012)

Competing G protein-coupled receptor kinases balance G protein and  $\beta$ -arrestin signaling. *Mol Syst Biol* **26**:590.

Hewavitharana T, Wedegaertner PB (2012) Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* **24**:25-34.

Hillmeister P, Persson PB (2012) The Kallikrein-Kinin system. *Acta Physiol (Oxf)* **206**:215-9.

Houle S, Larrivée JF, Bachvarova M, Bouthillier J, Bachvarov DR, Marceau F (2000) Antagonist-induced intracellular sequestration of rabbit bradykinin B2 receptor. *Hypertension* **35**:1319-1325.

Howl J, Payne SJ (2003) Bradykinin receptors as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* **7**:277-85.

Hsueh WA, Baxter JD (1991) Human prorenin. *Hypertension* **17**:469-477.

Hutagalung AH, Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* **91**:119-49.

Iwai M, Horiuchi M (2009) Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* **32**:533-6.

Jalink K, Moolenaar WH (2010) G protein-coupled receptors: the inside story. *Bioessays* **32**:13-6.

Jan Danser AH, Batenburg WW, van Esch JH (2007) Prorenin and the (pro)renin receptor--an update. *Nephrol Dial Transplant* **22**:1288-92.

Jarnagin K, Bhakta S, Zuppan P, Yee C, Ho T, Phan T, Tahilramani R, Pease JH, Miller A, Freedman R (1996) Mutations in the B2 bradykinin receptor reveal a different pattern of contacts for peptidic agonists and peptidic antagonists. *J Biol Chem* **271**:28277-86.

Jean-Alphonse F, Hanyaloglu AC (2011) Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Mol Cell Endocrinol* **331**:205-14.

Jiang L, Teng GM, Chan EY, Au SW, Wise H, Lee SS, Cheung WT (2012) Impact of cell type and epitope tagging on heterologous expression of G protein-coupled receptor: a systematic study on angiotensin type II receptor. *PLoS One* **7**:e47016.

Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* **25**:99-112.

Jutel M, Akdis M, Akdis CA. (2009) Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* **39**:1786-1800.

Kahn R, Hellmark T, Leeb-Lundberg LM, Akbari N, Todiras M, Olofsson T, Wieslander J, Christensson A, Westman K, Bader M, Müller-Esterl W, Karpman D (2009) Neutrophil-derived proteinase 3 induces kallikrein-independent release of a novel vasoactive kinin. *J Immunol* **15**:7906-15.

- Kakinuma T, Hwang ST (2006) Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* **79**:639-51.
- Kaplan AP, Ghebrehiwet B (2010) The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* **47**:2161–2169.
- KimYM, Benovic JL (2002) Differential roles of arrestin2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in Gprotein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* **23**:30760-8.
- Kitamura S, Carbini LA, Simmons WH, Scicli AG (1999) Effects of aminopeptidase P inhibition on kinin-mediated vasodepressor responses. *Am J Physiol* **276**:H1664-71.
- Knight CG, Dando PM, Barrett AJ (1995) Thimet oligopeptidase specificity: evidence of preferential cleavage near the C-terminus and product inhibition from kinetic analysis of peptide hydrolysis. *Biochem J* **308**:145-50.
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007) The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* **59**:251-87.
- Koumbadinga GA, Bawolak MT, Marceau E, Adam A, Gera L, Marceau F (2010) A ligand-based approach to investigate the expression and function of angiotensin converting enzyme in intact human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* **31**:1546-54.
- Koumbadinga GA, 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**:117-25.
- Kristiansen K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* **103**:21-80.
- Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO (2000) Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**:1069-74.
- Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA (2010) Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* **44**:145-54.
- Lalmanach G, Naudin C, Lecaille F, Fritz H (2010) Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochim* **92**:1568-1579.
- Lamb ME, Zhang C, Shea T, Kyle DJ, Leeb-Lundberg LM (2002) Human B1 and B2 bradykinin receptors and their agonists target caveolae-related lipid rafts to different degrees in HEK293 cells. *Biochemistry* **41**:14340-7.

Lappano R, Maggiolini M (2011) G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **10**:47-60.

Lappano R, Maggiolini M (2012) GPCRs and cancer. *Acta Pharmacol Sin* **33**:351-62.

Leeb-Lundberg LMF (2012) Kinin. Chap.3 Kinin receptor signaling and regulation. De Gruyter:33-50.

Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57**:27-77.

Leurs R, Church MK, Taglialatela M (2002) H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy* **32**:489-98.

Lieberman P (2011) The basics of histamine biology. *Ann Allergy Asthma Immunol* **106** :S2-5.

Liu Y, Hashizume K, Chen Z, Samoto K, Ningaraj N, Asotra K, Black KL (2001) Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. *Neurol Research* **23**:379-387.

Lohse MJ (2010) Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr Opin Pharmacol* **10**:53-8.

Luttrell LM (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* **39**:239-64.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**:455-65.

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:622-32.

Mahabeer R, Bhoola KD (2000) Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol Ther* **88**:77-89.

Marceau F (1995) Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* **30**:1-26.

Marceau F (1997) The kinin system. Chap.8 Kinin B1 receptor induction and inflammation. Academic Press:143-156.

Marceau F (2012) Kinin. Chap.5 Drugs in the kallikrein-kinin system. De Gruyter:69-84

Marceau F, Adam A, Houle S, Bouthillier J, Bachvarova M et Bachvarov DR (2011) Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. *Biol Chem* **382**:131-3.

Marceau F, Bachvarov DR (1998) Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**:385-401.

Marceau F, deBlois D, Petitclerc E, Levesque L, Drapeau G, Audet R, Godin D, Larrivée JF, Houle S, Sabourin T, Fortin JP, Morissette G, Gera L, Bawolak MT, Koumbadinga GA,

- Bouthillier J (2010) Vascular smooth muscle contractility assays for inflammatory and immunological mediators. *Int Immunopharmacol* **10**:1344-1353.
- Marceau F, Fortin JP, Morissette G, Dziadulewicz EK (2003) A non-peptide antagonist unusually selective for the human form of the bradykinin B2 receptor. *Int Immunopharmacol* **3**:1529-36.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* **50**:357-86.
- Marceau F, Larrivée JF, Bouthillier J, Bachvarova M, Houle S, Bachvarov DR (1999) the rabbit. *Am J Physiol* **277**:R1568-78.
- Marceau F, Larrivée J-F, Saint-Jacques E et Bachvarov DR. (1997) The kinin B1 receptor : an inducible G protein coupled receptor. *Can J. Physiol. Pharmacol* **75**:725-730.
- Marceau F, Levesque L, Drapeau G, Rioux F, Salvino JM, Wolfe HR, Seoane PR, Sawutz DG (1994) Effects of peptide and nonpeptide antagonists of bradykinin B2 receptors on the vasoconstrictor action of bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* **269**:1136-43.
- Marceau F, Regoli D (2004) Bradykinin receptor ligands : therapeutic perspectives. *Nature reviews* **3**:845-852.
- Marceau F, Regoli D (2008) Therapeutic options in inflammatory bowel disease: experimental evidence of a beneficial effect of kinin B1 receptor blockade. *Br J Pharmacol* **154**:1163-5.
- Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A (2002) Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol* **2**:1729-1739.
- Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:601-29.
- Matsuda T, Sakaguchi M, Tanaka S, Yoshimoto T, Takaoka M (2013) Prolyl oligopeptidase is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-binding protein that regulates genotoxic stress-induced cell death. *Int J Biochem Cell Biol* **S1357-2725**:00019-8.
- Matthews KW, Mueller-Ortiz SL, Wetsel RA (2004) Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol* **40**:785-93.
- Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, Howarth P, Kaplan A, Kojda G, Leeb-Lundberg F, Lötvall J, Magerl M (2011) New topics in bradykinin research. *Allergy* **66**:1397-406.
- Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:121-32.
- McDonald, P.H. and Lefkowitz, R.J (2001) beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal* **13**:683-689.

McFarlane SI, Kumar A, Sowers JR (2003) Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* **91**:30-37.

McLean, P.G., Perretti, M., Ahluwalia, A (2000) Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc. Res.* **48**, 194–210.

McMahon HT, Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**:517-33.

Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**:C82-97.

Meini S, Cucchi P, Zappitelli S, Rotondaro L, Quartara L, Giolitti A, Maggi CA (2002) Preliminary mutational analysis of the human kinin B2 receptor for nonpeptide antagonist ligands recognition. *Can J Physiol Pharmacol* **80**:303-9.

Méresse S, Gorvel JP, Chavrier P (1995) The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci* **108**:3349-58.

Michineau S, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM (2006) Human bradykinin B2 receptor sialylation and N-glycosylation participate with disulfide bonding in surface receptor dimerization. *Biochemistry* **45**:2699-707.

Mikoshiha K (2007) IP3 receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* **102**:1426-46.

Millar RP, Newton CL (2010) The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol* **24**:261-74.

Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F, Novick P (2012) GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* **81**:637-59.

Moreau ME, Bawolak MT, Morissette G, Adam A, Marceau F (2007) Role of nuclear factor-kappaB and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **71**:949-56.

Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. (2005) The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* **99**:6-38.

Morgan L, Broughton Pipkin F, Kalsheker N (1996) Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol* **28**:1211-22.

Morissette G, Fortin JP, Otis S, Bouthillier J, Marceau F (2004) A novel nonpeptide antagonist of the kinin B1 receptor: effects at the rabbit receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:1121-30.

Morrison LS, Pierotti AR (2003) Thimet oligopeptidase expression is differentially regulated in neuroendocrine and spermatid cell lines by transcription factor binding to SRY (sex-

determining region Y), CAAT and CREB (cAMP-response-element-binding protein) promoter consensus sequences. *Biochem J* **376**:189-97.

Moser E, Kargl J, Whistler JL, Waldhoer M, Tschische P (2010) G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology* **86**:22-9.

Nakagawa T, Akaki J, Satou R, Takaya M, Iwata H, Katsurada A, Nishiuchi K, Ohmura Y, Suzuki F, Nakamura Y (2007) The His-Pro-Phe motif of angiotensinogen is a crucial determinant of the substrate specificity of renin. *Biol Chem* **388**:237-46.

Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ (2012) The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *Int J Alzheimers Dis* **2012**:383796.

Ng EL, Gan BQ, Ng F, Tang BL (2012) Rab GTPases regulating receptor trafficking at the late endosome-lysosome membranes. *Cell Biochem Funct* **30**:515-23.

Nguyen G (2011) Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci* **120**:169-78.

Nguyen G, Muller DN (2010) The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol* **21**:18-23.

Nojavan S, Fakhari AR (2011) Chiral separation and quantitation of cetirizine and hydroxyzine by maltodextrin-mediated CE in human plasma: effect of zwitterionic property of cetirizine on enantioseparation. *Electrophoresis* **32**:764-71.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275**:17201-10.

Offermanns S, Rosenthal W. 2008. Encyclopedia of Molecular Pharmacology, Volume 1, 2nd edition p. 675.

Oldham WM, Hamm HE. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:60-71.

Ornelas C (2011) Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New J. Chem* **35**:1973–1985.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, A. Behnke C, Motoshima H, A. Fox B, Le Trong I, C. Teller D, Okada T, E. Stenkamp R, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**:739-745.

Parmentier M (2012) Shedding light on G protein-coupled receptor signaling. *Nat Methods* **9**: 965-6.

Patrick GL, Depovere P (2002) Chimie pharmaceutique, adapté par Paul Depovere 2<sup>ème</sup> édition, Éditions de boeck.

Peltonen I, Männistö PT (2011) Effects of diverse psychopharmacological substances on the activity of brain prolyl oligopeptidase. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **108**:46-54.

Phipps JA, Jobling AI, Greferath U, Fletcher EL, Vessey KA (2012) Alternative pathways in the development of diabetic retinopathy: the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. *Clin Exp Optom* **95**:282-9.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:639-50.

Pixley RA, Espinola RG, Ghebrehiwet B, Joseph K, Kao A, Bdeir K, Cines DB, Colman RW (2011) Interaction of high-molecular-weight kininogen with endothelial cell binding proteins suPAR, gC1qR and cytokeratin 1 determined by surface plasmon resonance (BiaCore). *Thromb Haemost* **105**:1053-9.

Pizard A, Blaukat A, Muller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM (1999) Bradykinin-induced internalization of the human B<sub>2</sub> receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem* **274**:12738-12747.

Platta HW, Stenmark H (2011) Endocytosis and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **23**:393-403.

Proud D, Kaplan AP (1988) Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol* **6**:49-83.

Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, Savolainen J (2008) Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* **7**:255-70.

Regoli D, Plante GE, Gobeil F Jr (2012) Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* **135**:94-111.

Renné T (2011). The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. *Semin Immunopathol* **34**:31-41.

Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B (2012) Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta* **1824**:22-33.

Ritter SL, Hall RA (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:819–830.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:8258-63.

- Saric T, Graef CI, Goldberg AL (2004) Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem* **279**:46723-32.
- Schiöth H. B. and Fredriksson R (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* **142**:94-101.
- Schmaier AH, McCrae KR (2007) The plasma kallikrein–kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost* **5**:2323–9.
- Seachrist JL, Ferguson SS (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* **74**:225-35.
- Segev N (2011) Coordination of intracellular transport steps by GTPases. *Semin Cell Dev Biol* **22**:33-8.
- Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH (2002) Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. *Int Immunopharmacol* **2**:1841-9.
- Shen B, El-Dahr SS (2006) Cross-talk of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. *Biol Chem* **387**:145-50.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003a) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* **375**:503-15.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003b) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* **278**:14498-506.
- Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA (2002) Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. *Endocr Rev* **23**:647-64.
- Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ (2011) Emerging paradigms of  $\beta$ -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* **36**:457-69.
- Siehler S (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* **158**:41-9.
- Simaan M, Bédard-Goulet S, Fessart D, Gratton JP, Laporte SA (2005) Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. *Cell Signal* **17**:1074-83.
- Simons FE (2004) Advances in H1-antihistamines. *N Engl J Med* **351**:2203-17.
- Simons FE, Simons KJ (2011) Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol* **128**:1139-1150

Skidgel RA (1992) Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology. *J Cardiovasc Pharmacol* **20** Suppl 9:S4-9.

Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* **149**:901-14.

Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH (1988) Bradykinin as a pain mediator : receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:3245-3249

Szeltner Z, Juhász T, Szamosi I, Rea D, Fülöp V, Módos K, Juliano L, Polgár L (2012) The loops facing the active site of prolyl oligopeptidase are crucial components in substrate gating and specificity. *Biochim Biophys Acta* **1834**:98-111.

Thomas SM, Bhola NE, Zhang Q, Contrucci SC, Wentzel AL, Freilino ML, Gooding WE, Siegfried JM, Chan DC, Grandis JR (2006) Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **66**:11831-9.

Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC (2008) Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci* **29**:413-20.

Tom B, Dendorfer A, Danser AH (2003) Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? *Int J Biochem Cell Biol* **35**:792-801.

Tonack S, Tang C, Offermanns S (2013) Endogenous metabolites as ligands for G protein-coupled receptors modulating risk factors for metabolic and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**:H501-13.

Tsao PI, von Zastrow M (2001) Diversity and specificity in the regulated endocytic membrane trafficking of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **89**:139-47.

Turner AJ, Hooper NM (2002) The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **23**:177-83.

Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* **23**:261-9.

Uehara Y, Miura SI, Yahiro E, Saku K (2012) Non-ACE pathway-induced angiotensin II production. *Curr Pharm Des* [Epub ahead of print]

Underwood PC, Adler GK (2013) The Renin Angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans. *Curr Hypertens Rep* **15**:59-70.

van Koppen CJ, Jakobs KH (2004) Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **66**:365-7.

- Varnum-Finney B, Wu L, Yu M, Brashem-Stein C, Staats S, Flowers D, Griffin JD, Bernstein ID (2000) Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling. *J Cell Sci* **113**:4313-8.
- Wei L, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P (1992) The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J Biol Chem* **267**:13398-405.
- Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM (1993) A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci* **52**:1461-80.
- Welling PA, Weisz OA (2010) Sorting it out in endosomes: an emerging concept in renal epithelial cell transport regulation. *Physiology* **25**:280-92.
- Whistler JL (2009) Functional Selectivity of G Protein-Coupled Receptor Ligands. Chap. 4 Ligand-Selective Receptor Desensitization and Endocytosis. Humana Press:55-69.
- Wolfe BL, Trejo J (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8**:462-70.
- Wood SG, John BA, Chasseaud LF, Yeh J, Chung M (1987) The metabolism and pharmacokinetics of <sup>14</sup>C-cetirizine in humans. *Ann Allergy* **59**:31-4.
- Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR 3rd, Lefkowitz RJ (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:12011-6.
- Yan J, Mihaylov V, Xu X, Brzostowski JA, Li H, Liu L, Veenstra TD, Parent CA, Jin T (2012) A Gβγ effector, ElmoE, transduces GPCR signaling to the actin network during chemotaxis. *Dev Cell* **17**:92-103
- Yu HS, Lin TH, Tang CH (2013) Bradykinin enhances cell migration in human prostate cancer cells through B2 receptor/PKCδ/c-Src dependent signaling pathway. *Prostate* **73**:89-100.
- Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA (2002) Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* **1**:621-36.
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:107-17.
- Zhang W, Bhola N, Kalyankrishna S, Gooding W, Hunt J, Seethala R, Grandis JR, Siegfried JM (2008) Kinin b2 receptor mediates induction of cyclooxygenase-2 and is overexpressed in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Res* **6**:1946-56.
- Zhang R, Xie X (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* **33**:372-84.



# ANNEXE

## Documents revus et publiés

Gera L, Roy C, Marceau F (2013) Bifunctional epitope-agonist ligands of the bradykinin B2 receptor. *Biol Chem* **394**:379-83.

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**:433-46.

Bawolak MT, Roy C, Gera L, Marceau F (2011) Prolonged signalling and trafficking of the bradykinin B(2) receptor stimulated with the amphibian peptide maximakinin: Insight into the endosomal inactivation of kinins. *Pharmacol Res* **65**:247-53.

Roy C, Marceau E, Gera L, Marceau F (2011) An in vitro reconstitution system to address the mechanism of the vascular expression of the bradykinin B(1) receptor in response to angiotensin converting enzyme inhibition. *Vascul Pharmacol* **57**:15-23.

Gera L, Roy C, Bawolak MT, 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**:528-34.

Gera L, Bawolak MT, Roy C, Lodge R, Marceau F (2011) Design of fluorescent bradykinin analogs: application to imaging of B2 receptor-mediated agonist endocytosis and trafficking and angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol Exp Ther* **337**:33-41.

## Document soumis à la revue par les pairs

Roy C, Gagné V, J.G.Fernandes M, Marceau F (2013) High affinity capture and concentration of quinacrine in polymorphonuclear leukocytes via vacuolar ATPase-mediated ion trapping: comparison with other peripheral blood leukocytes and implications for the distribution of cationic drugs. *Toxicol and App Pharmacol*.

Gera L, Roy C, Marceau F (2013) Vasopeptidase-activated latent ligands of the histamine receptor-1. *Int Immunopharmacol*.

Charest-Morin X, Fortin S, Lodge R, Roy C, Gera L, C-Gaudreault R (2013) Inhibitory effects of cytoskeleton disrupting drugs and GDP-locked Rab mutants on bradykinin B2 receptor cycling. *Pharmacol Res* (accepté, en attente d'être publié).

Marceau F, Roy C, Bouthillier (2013) Assessment of cation trapping by cellular acidic compartments. *Methods Enzymol* (accepté, en attente d'être publié).

## Résumés

Roy C, Gagné V, J.Fernandes M, Bouthilier J, Marceau F. High affinity capture and retention of quinacrine in neutrophils via vacuolar ATPase-mediated ion trapping: Comparison with other peripheral blood leukocytes. Neutrophils in immunity, Québec, Canada, 10 au 12 juin 2012.

Gera L, Roy C, Bawolak M.-T, Charest-Morin X, Hodges R.S., Marceau F.N-terminal modifications of highly potent bradykinin agonists and antagonists for structure activity relationship and cell imaging studies. 32<sup>nd</sup> European Peptide Symposium, Athens, Greece, Sept. 2-7, 2012.

Roy C, Gera L, Bawolak MT, Bouthilier J, Adam A, Marceau F. Met;Lys-Bradykinin-Ser-Ser, un peptide libéré par la protéase PR3 du neutrophile à partir du kininogène plasmatique, est métaboliquement activé par l'ECA dans les tissus vasculaires. 53<sup>ème</sup> Réunion annuelle, Club de Recherches Cliniques du Québec, Sainte-Adèle, Canada, 22 au 24 septembre 2011.