

Université de Sherbrooke

**Rôle des déterminants moléculaires impliqués dans la signalisation du
récepteur urotensine II**

Par

Nicolas Perzo

Département de Pharmacologie

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Pharmacologie**

Mai, 2013

Membres du jury d'évaluation

Pr Leduc Richard, Département de Pharmacologie

Pr Denault Jean Bernard, Département de Pharmacologie

Pr Geraldés Pedro Miguel, Département de Médecine



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00348-5

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00348-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Résumé

Rôle des déterminants moléculaires impliqués dans la signalisation du récepteur urotensine II

Par

Nicolas Perzo

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Pharmacologie

L'Urotensine II (UII) est un peptide cyclique de 11 acides aminés initialement isolé à partir de l'urophyse de gobie. Cette hormone est impliquée dans l'homéostasie cardiovasculaire et exerce la majorité de ses effets par l'intermédiaire du récepteur de l'urotensine (UT). Le récepteur UT est couplé préférentiellement à la protéine G hétérotrimérique $G_{\alpha q}$ et les propriétés fonctionnelles de ce récepteur ont principalement été étudiées pour sa capacité à induire la production d'inositol phosphate ainsi que la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire. Il a été rapporté que UT peut également coupler à d'autres protéines G hétérotrimériques $G_{\alpha i/o}$ et qu'il peut activer plusieurs voies indépendantes de la protéine G, tels que la voie des MAP Kinase et de la beta-arrestine. Notre hypothèse stipule que différents ligands d'UT peuvent induire ou stabiliser différentes conformations du récepteur, chacune conduisant à une signalisation spécifique, ce concept est connu sous le nom de sélectivité fonctionnelle ou signalisation biaisée. Nous avons sélectionné 6 analogues de UII qui diffèrent dans leur structure chimique et nous avons évalué leur capacité à activer plusieurs voies de signalisation : $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha 13}$, ERK, NF κ B et le recrutement de la β -arrestine. Par ailleurs, la technologie de transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET) fut utilisée pour évaluer l'activation spécifique des protéines $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha 13}$ ainsi que le recrutement de la β -arrestine-2. Nous avons montré que la substitution de la lysine en huitième position de UII affecte la propriété du peptide à activer certaines voies de signalisation. De plus, l'analogue Nle8-UII agit comme agoniste complet sur la voie $G_{\alpha q}$ mais active faiblement le recrutement de la β -arrestine-2 ainsi que la voie NF κ B. Cette étude a permis d'identifier des ligands sélectifs pour certaines voies de signalisation d'UT et pourrait permettre la conception de ligands sélectifs pour UT dans diverses pathologies associées à ce récepteur.

Mots clés : UII, UT, Lysine, BRET, $G_{\alpha 13}$

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé..... | iii |
| Liste des illustrations | vi |
| Liste des tableaux..... | vii |
| Liste des abréviations..... | viii |
| 1. Introduction | 1 |
| 1.1. Les Récepteurs couplés aux protéines G | 1 |
| 1.1.1. Classification des GPCR..... | 1 |
| 1.1.2. Activation des GPCR | 4 |
| 1.1.3. Désensibilisation des GPCR | 6 |
| 1.1.4. Signalisation des β -arrestines | 7 |
| 1.2. Le système Urotensine II..... | 9 |
| 1.2.1. Urotensine II (UII)..... | 9 |
| 1.2.1.1. Origine | 9 |
| 1.2.1.2. L'Urotensine II- <i>Related Peptide</i> | 11 |
| 1.2.2. Le récepteur de l'urotensine II (UT)..... | 11 |
| 1.2.3. Signalisation du UT..... | 14 |
| 1.2.3.1. Activation du récepteur | 14 |
| 1.2.3.2. La voie calcique | 14 |
| 1.2.3.3. L'activation des MAPK | 15 |
| 1.2.3.4. La voie Rho A | 16 |
| 1.2.3.5. UII est un facteur chémoattractant | 16 |
| 1.2.3.6. Rôle de UII dans les pathologies..... | 18 |
| 1.3. Analogues synthétiques de l'UII | 19 |
| 1.4. Le concept de signalisation biaisée | 20 |
| 2. Objectifs du projet..... | 22 |
| 3. Matériels et méthodes | 23 |
| 3.1. Culture cellulaire | 23 |
| 3.2. Affinité des ligands..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Etude de la voie MAPK Erk1/2 | 24 |
| 3.4. Etude de la voie NFκB..... | 25 |
| 3.5. Etude de la voie des inositols phosphates. | 26 |
| 3.6. Recrutement des sous-unités Alpha (α) | 28 |
| 4. Résultats..... | 30 |
| 4.1. Affinités des ligands étudiés | 30 |
| 4.2. Activation de la voie calcique | 32 |
| 4.3. Activation de la voie G alpha i | 34 |
| 4.4. Activation de la voie G alpha 13..... | 34 |
| 4.5. Activation du recrutement de la Béta Arrestine-2..... | 35 |
| 4.6. Activation de la voie des MAPs Kinases ERK1/2 | 35 |
| 4.7. Activation de la voie NFκB | 36 |
| 5. Discussion | 42 |
| 6. Conclusion..... | 53 |
| Remerciements | 56 |
| 7. Bibliographie | 57 |

Liste des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation schématique des trois familles de GPCR..... | 3 |
| Figure 2 : Représentation schématique de l'activation d'un GPCR..... | 5 |
| Figure 3 : Désensibilisation et signalisation induit par les β -arrestines..... | 8 |
| Figure 4 : Système neurosécréteur des poissons téléostéens | 10 |
| Figure 5 : Représentation schématique du récepteur humain de l'urotensine II..... | 13 |
| Figure 6 : Mécanismes d'actions trophiques induites par l'urotensine II dans différents types cellulaires..... | 17 |
| Figure 7 : Principe de sélectivité fonctionnelle..... | 21 |
| Figure 8 : Représentation schématique du principe de la technologie Alpha Screen..... | 27 |
| Figure 9 : Représentation schématique du principe de la technologie IP-One Htrf®..... | 27 |
| Figure 10 : Principe du transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET)..... | 29 |
| Figure 11 : Affinités des analogues de l'UII sur le récepteur de l'Urotensine II..... | 31 |
| Figure 12 : Activation de la voie $G\alpha_q$ par les différents ligands..... | 33 |
| Figure 13 : Courbes dose réponse de l'accumulation d'inositol phosphate dans les cellules 293QBi exprimant de manière stable le récepteur UT..... | 33 |
| Figure 14 : Activation de la voie $G\alpha_i$ par les différents ligands..... | 37 |
| Figure 15 : Activation de la voie $G\alpha_{13}$ par les différents ligands. | 37 |
| Figure 16 : Recrutement de la β -arrestine-2 par les différents ligands..... | 38 |
| Figure 17 : Cinétique de phosphorylation de ERK1/2 en présence ou non d'inhibiteurs de la PKC et de l'EGFR..... | 39 |
| Figure 18 : Capacité des ligands à induire la phosphorylation de $NF\kappa B$ | 41 |
| Figure 19 : Comparaison de la chaîne latérale de la Lysine, l'Ornithine et la Norleucine...45 | 45 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Comparaison des structures primaire de UII..... | 10 |
| Tableau 2: Tableau présentant les ligands testés dans cette étude..... | 31 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------|---|
| BRET | <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfert</i> |
| DAG | Diacylglycérol |
| EGF | Facteur de croissance épidermique |
| ERK1/2 | <i>Extra cellular Regulated Kinases 1 et 2</i> |
| GDP | Guanine diphosphate |
| GPCR | Récepteur couplé à une protéine G |
| GTP | Guanine triphosphate |
| GRK | Kinase régulée par les GPCR |
| IL-6 | Interleukine 6 |
| IP1 | Inositol monophosphate |
| IP3 | Inositol 1, 4, 5-triphosphate |
| IP3R | Récepteur de l'inositol triphosphate |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MLCK | <i>Myosin light-chain kinase</i> |
| MMP-9 | <i>Matrix metalloproteinase 9</i> |
| NFκB | <i>Nuclear factor kappa B</i> |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| Nle | Norleucine |
| Orn | Ornithine |
| Pen | Penicillamine |
| PI3K | Phosphatidylinositide 3-kinase |
| PIP2 | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| PKC | Protéine kinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| RLuc | Luciférase de renilla |

| | |
|-------------------------------|--|
| UII | Urotensine II |
| URP | <i>Urotensine Related Peptided</i> |
| UT | Récepteur de l'Urotensine II |
| RhoA | <i>Ras homolog gene family, member A</i> |
| SST | Somatostatine |
| TAM | Tumeurs associés aux macrophages |
| TNFα | <i>Tumor necrosis factor α</i> |

1. Introduction

1.1. Les Récepteurs couplés aux protéines G

Toute cellule doit avoir le moyen de capter un stimulus de son environnement et de transmettre ce signal en une réponse appropriée. Les cellules possèdent à leur surface des macromolécules protéiques appelées récepteurs. Ces récepteurs sont capables de reconnaître spécifiquement et de lier des entités chimiques, appelées ligands. Suite à la liaison du ligand sur ce récepteur, un changement de conformation de ce dernier survient, induisant une réponse intracellulaire adéquate.

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont des protéines membranaires qui forment la quatrième plus grande superfamille du génome humain, représentant plus de 800 gènes identifiés à l'heure actuelle (Lander et al., 2001). Nombre de ces récepteurs jouent un rôle physiologique important dans la cellule, et plusieurs pathologies sont aujourd'hui associées à une dérégulation de ces récepteurs (Seifert and Wenzel-Seifert, 2002). Par exemple les tumeurs gastriques via le récepteur de la cholecystokinine ou encore la cécité via le récepteur de la rhodopsine.

1.1.1. Classification des GPCR

Il existe trois classes de GPCR, A, B et C. Chacune d'entre elles est caractérisée par des éléments structuraux qui définissent sa classe (Figure 1).

La classe A, aussi appelée *Rhodopsin-like*, est la plus grande famille des GPCR. Cette classe de récepteur fixe de nombreux types de ligands, incluant également les petites molécules comme les amines biogènes ou les peptides. L'homologie de séquence des récepteurs de cette classe repose essentiellement sur des résidus clefs qui au cours de l'évolution ont été conservés, notamment au niveau des régions transmembranaires. Les

récepteurs de cette classe possèdent un domaine extracellulaire où se situe le domaine N-terminal, cette région étant impliquée dans la liaison du ligand au récepteur. Le domaine transmembranaire est quant à lui composé d'un réseau de sept hélices α . Ces hélices permettent le changement de conformation du récepteur suite à la liaison du ligand dans la partie extracellulaire ou membranaire du récepteur. Enfin, au niveau de la partie intracellulaire, la queue cytoplasmique contient des résidus et motifs importants pour la régulation des interactions directes protéines-protéines ou indirectes, par l'intermédiaire d'effecteurs intracellulaires. De plus, les modifications post traductionnelles (comme par exemple la phosphorylation ou l'ubiquitinylation) de la queue cytoplasmique sont susceptibles de moduler à la fois l'état d'activation du récepteur, le couplage aux protéines G hétérotrimériques tout en participant à la régulation de l'internalisation et désensibilisation du récepteur.

La classe B appelée *Secretin-like*, regroupe 20 récepteurs pour certains types d'hormones et de neuropeptides (Fredriksson et al., 2003). La liaison du ligand à ces récepteurs implique à la fois les boucles N-terminales et extracellulaires. Ces récepteurs sont caractérisés par la présence d'un domaine N-terminal d'environ 100 résidus contenant plusieurs ponts disulfures conservés entre les récepteurs de cette famille. Bien que le pont disulfure reliant la première boucle extracellulaire et le haut du TMD3 soit présent chez cette classe, il y a absence des motifs conservés retrouvés chez la classe A. Parmi les récepteurs de la classe B, on retrouve les récepteurs de la calcitonine, de la parathormone (PTH), du glucagon, du peptide intestinal vasoactif (VIP).

La classe C est également appelée métabotrope ou *glutamate-like*. Parmi les récepteur de cette classe, on retrouve les récepteurs métabotropiques du glutamate, le récepteur de l'acide γ -aminobutyrique (récepteur GABA_B), le récepteur « senseur de calcium » (CaSR) ainsi que les récepteurs aux phéromones et certains du goût amer (Kniazeff et al., 2011). La reconnaissance du ligand est obtenue grâce à leur très grand domaine extracellulaire. Il est organisé en deux lobes distincts séparés par une cavité où se lie le ligand selon la manière de la *venus fly trap* (Yang, 1996).

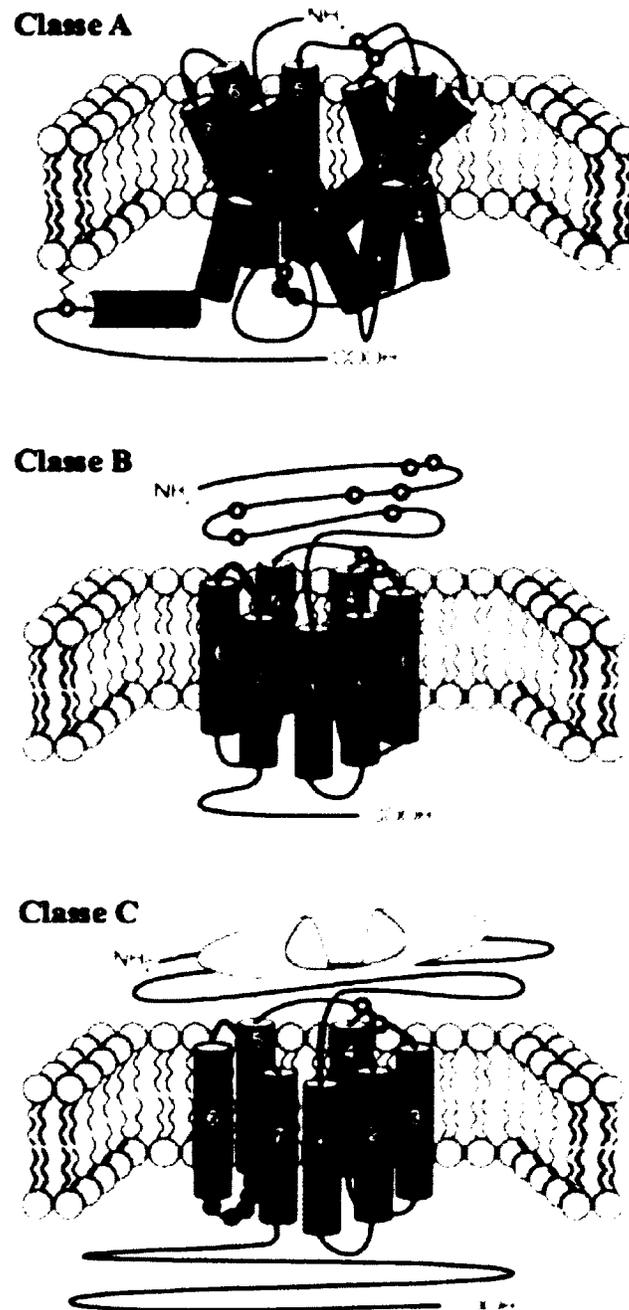


Figure 1 : Représentation schématique des trois familles de GPCR. Les GPCR sont divisés en trois classes majeures et une représentation de chacun d'entre eux est montrée. Les GPCR de chaque classe ont certains résidus et motifs conservés représentés en rouge.

1.1.2. Activation des GPCR

Les GPCR ont ainsi été nommés pour leur capacité à s'associer avec des protéines G hétérotrimériques ($G\alpha\beta\gamma$). Chez l'Homme, il existe 23 sous-unités α , 6 sous unités β et 11 sous unités γ (Oldham and Hamm, 2008). Les protéines G hétérotrimériques sont divisées en quatre classes basées sur l'homologie de la séquence primaire de la sous unité α : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$. La liaison d'un ligand extracellulaire dans la pochette de liaison du récepteur va entraîner l'initiation de la transduction d'un signal par l'intermédiaire d'un changement de conformation du récepteur (Figure 2). Ce changement induira, entre autre, le recrutement de certaines protéines G hétéromériques (Gether, 2000). Puis, suite à l'échange de nucléotide (la guanosine diphosphate [GDP] va être remplacée par la guanosine triphosphate [GTP]), l'association étroite entre les sous-unités et le récepteur va se rompre. Les deux groupes de sous-unités, $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, seront alors libres d'interagir et de moduler l'activation d'une ou de plusieurs cascades de signalisation comme l'activation de l'adénylate cyclase, de la phospholipase, des Mitogen activated protein kinase (MAPK) ou encore les canaux calciques ou potassiques. La transduction du signal sera ensuite régulée par les modifications opérées sur le récepteur, comme par exemple, sa phosphorylation par des kinases spécifiques ou non spécifiques du récepteur qui moduleront son interaction avec certaines protéines intracellulaires et ainsi induire son internalisation ainsi que sa désensibilisation (Kohout and Lefkowitz, 2003; Lander et al., 2001; Tsao et al., 2001).

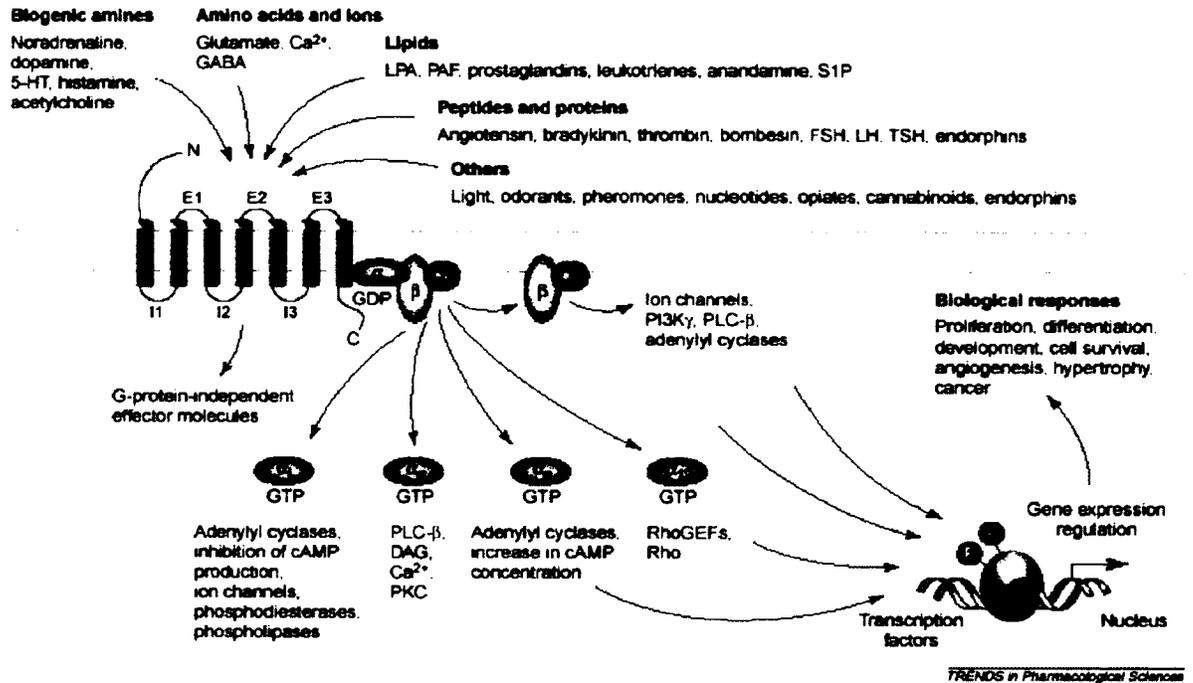


Figure 2 : Représentation schématique de l'activation d'un GPCR. Dans la conformation inactive, la sous-unité α de la protéine G se lie au GDP et est liée à un complexe $\beta\gamma$. Lors de l'activation du récepteur par son ligand, il y a échange du GDP pour le GTP. Dans la forme active, la sous-unité $G\alpha$ ainsi que le complexe $\beta\gamma$ peuvent induire une signalisation via des molécules effectrices en aval.

1.1.3. Désensibilisation des GPCR

La désensibilisation des GPCR se déroule dans les secondes qui suivent l'activation du récepteur par son agoniste. La signalisation via les protéines G se termine donc par un enchaînement de deux étapes, les GPCR kinases (GRK) vont phosphoryler le récepteur actif créant un site de liaison pour les arrestines. En effet, les GRK phosphorylent spécifiquement certains résidus serine et thréonine présents dans la portion carboxy-terminale et/ou dans les boucles intracellulaires des GPCR activés. Les récepteurs activés et phosphorylés vont devenir par la suite des sites d'ancrage de haute affinité pour les arrestines (Gurevich et al., 2012; Seifert and Wenzel-Seifert, 2002).

Les GRK sont une famille de six sérine/thréonine protéine kinases caractérisées par leur capacité à phosphoryler et désensibiliser les récepteurs occupés. Les GRK sont classées en fonction de leur similarité fonctionnelle et de séquence. Il existe chez les vertébrés trois sous famille de GRK. La sous famille GRK1 comprend GRK1 (kinase de la rhodopsine) et GRK7 (cône kinase), la sous famille GRK2 comprend GRK2 et 3 et la sous famille GRK4 comprend GRK4, 5 et 6 (Oldham and Hamm, 2008; Premont et al., 1999). Toutes les GRK sont des protéines multi-domaines qui ont toutes en commun une partie N-terminale unique composée d'environ 25 résidus spécifique de la famille de GRK, suivi de la région régulatrice du signal de la protéine G (RGS) homology domain (RH), et d'un domaine Ser/Thr kinase. (Gether, 2000; Gurevich et al., 2012). D'autre part, le N-terminal de chaque sous famille contient l'élément structurel responsable de la reconnaissance de leur cible. GRK1 et 7 portent des courtes séquences de prénylation, GRK2 et 3 possèdent des domaines pleckstrin Homologie (PH) qui interagissent avec les sous unités $\beta\gamma$ des protéines G. GRK4 et 6 possèdent des sites de palmitoylation ainsi que des sites de liaison pour les éléments chargés positifs alors que GRK5 s'appuie uniquement sur des éléments de liaison positifs.

Par ailleurs, certains seconds messagers dépendant des protéines kinases, incluant l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dépendant de la protéine kinase A et C (PKA et PKC), phosphorylent également les sérine/thréonine présentes au niveau de la

queue C-terminale de nombreux GPCR. La phosphorylation de la queue C-terminale est suffisante pour altérer l'efficacité des récepteurs en absence de β -arrestines (Luttrell and Lefkowitz, 2002).

Les arrestines appartiennent à une famille composée de 4 membres. Les arrestines 1 et 4 sont exprimées uniquement dans les cônes et bâtonnets de la rétine, les β arrestines 1 et 2 aussi connues comme étant les arrestines 2 et 3 sont quant à elles exprimées de manière ubiquitaire et régulent la majorité des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Ma and Pei, 2007). Les arrestines ont d'abord été identifiées comme des régulateurs négatifs de la signalisation des GPCR. Cependant, de nouveaux rôles dans le trafic et la signalisation des récepteurs leur ont été attribués récemment (Reiter et al., 2012a).

La phosphorylation des résidus sérine ou thréonine de GPCR par les GRK va augmenter l'affinité de ces régions phosphorylées pour les arrestines qui vont se lier. Cela va provoquer le découplage par encombrement stérique de la protéine G du récepteur, entraînant ainsi la désensibilisation de la réponse.

Après cette étape de désensibilisation le récepteur va entrer dans un processus d'endocytose par l'intermédiaire du recrutement de partenaires dont la clathrine et le complexe adaptateur hétérotétramérique AP-2. Ce dernier se fixera via sa sous unité β 2-adaptine à la β -arrestine-2 (Whalen et al., 2011).

1.1.4. Signalisation des β -arrestines

Depuis une dizaine d'année, il a été établi que les β -arrestines peuvent être à l'origine de signalisation cellulaire indépendante des protéines G. En effet, elles agissent comme des plateformes multifonctionnelles qui interagissent avec de nombreux partenaires protéiques ainsi que des protéines kinases afin d'activer par phosphorylation de nombreuses cibles intracellulaires (Xiao et al., 2007). Parmi les effets reliés à la signalisation induites par les β -arrestines on retrouve l'activation des MAPK en

particulier de ERK1/2 (DeWire et al., 2008) ainsi que la formation de plaques d'adhésion focale dépendante de RhoA (Barnes, 2004). D'autres voies de signalisation sont également induites comme l'inhibition du facteur de transcription *nuclear factor kappa B* (NFκB) en ciblant l'expression génique de sa protéines stabilisatrice *inhibitor kappa B* (IκB) (Gao et al., 2004), ou encore l'activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui va induire la déphosphorylation de AKT ce qui mènera à l'activation de la glycogène synthase kinase 3 (Beaulieu et al., 2005; Reiter et al., 2012b) (Figure 3).

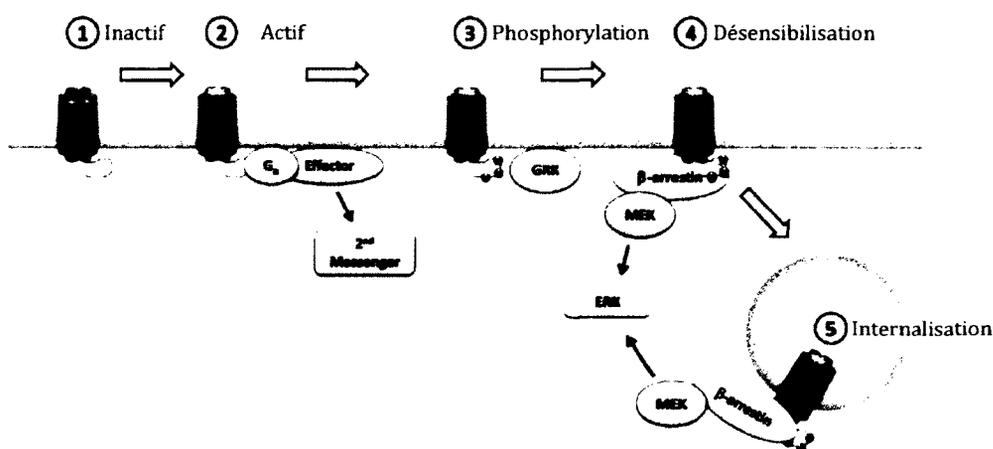


Figure 3 : Désensibilisation et signalisation induit par les β-arrestines. Les protéines G et les β-arrestines sont des déterminants clés de la pharmacologie des récepteurs. Le récepteur inactif (1) activé par un agoniste induit un couplage avec la protéine G et transduit le signal via un deuxième messager (2). Suite à cela, le récepteur occupé est phosphorylé par les kinases GRK (3), puis les β-arrestines sont recrutées pour la désensibilisation du récepteur en réduisant le couplage du récepteur avec la protéine G (4). Les β-Arrestines sont des protéines d'échafaudages pour deux enzymes de signalisation tels que la MEK, conduisant à la transduction d'un signal de manière indépendante de la protéine G et la machinerie d'endocytose pour promouvoir l'internalisation du récepteur dans les endosomes (5). Pour certains récepteurs tels que le récepteur de l'angiotensine II, la β-arrestine reste lié au récepteur et continue de stimuler la transduction du signal à partir de l'endosome. Dans l'endosome, le récepteur est soit recyclé à la surface de la cellule ou dégradé aux lysosomes. (Violin et al., 2013)

1.2. Le système Urotensine II

1.2.1. Urotensine II (UII)

1.2.1.1. Origine

L'urotensine II (UII) est un peptide cyclique qui fut isolé pour la première fois en 1969 par Bern et Lederis (Douglas and Ohlstein, 2000) de l'urophyse du gobie. L'urophyse de ce poisson peut s'apparenter chez les mammifères à l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 4). Des orthologues de l'UII ont ensuite été retrouvés chez d'autres poissons ainsi que chez les mammifères, incluant l'Homme. Chez ce dernier, la séquence de l'hormone présente onze acides aminés (Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val). La comparaison de la structure primaire de cette hormone révèle une très forte identité de séquence entre les espèces. En fait, du poisson jusqu'à l'Homme, l'évolution entre les espèces a favorisé la conservation des résidus 5 à 10, alors que la partie N-terminale présente des variations de séquences entre les espèces (Tableau 1). UII est le résultat du clivage d'un prépropeptide de 124 acides aminés. L'ARNm de ce précurseur a été identifié dans la moelle épinière, le bulbe rachidien, le cœur, les reins, les cellules endothéliales ainsi que dans les muscles lisses (Onan et al., 2004a). L'UII est produite suite au clivage du prepro UII par des proprotéines convertases PC1 et PC2 lors de la maturation dans les granule de sécrétion du réseau transgolgien (Bilodeau et al., 2011)

UII exerce de puissants effets hémodynamiques, agit sur les réponses inotropiques et chronotropiques (Krum and Kemp, 2007), module la réponse inflammatoire (Johns et al., 2004), joue un rôle dans l'induction de l'hypertrophie cardiaque et vasculaire (Papadopoulos et al., 2008), provoque d'importants effets angiogéniques (Guidolin et al., 2010a) et inhibe la libération d'insuline induite par le glucose (Silvestre et al., 2004). Ainsi, le système urotensinergique est lié à de nombreux états pathophysiologiques, dont l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, la pré-éclampsie, le diabète,

l'insuffisance rénale et les maladies du foie, les ulcères, ainsi que psychologique avec des troubles neurologiques (Ross et al., 2010).

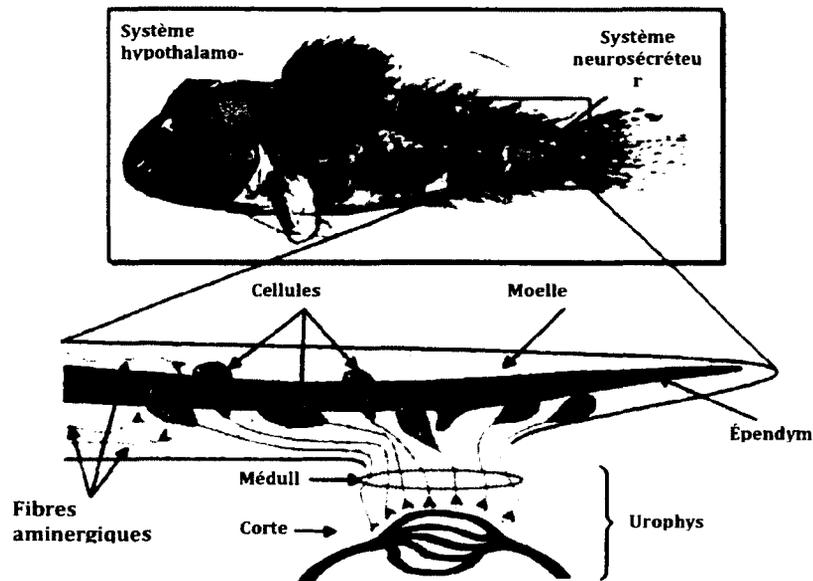


Figure 4 : Système neurosécréteur des poissons téléostéens. Représentation schématique de l'organisation du système neurosécréteur caudal et ses connexions vasculaires dans l'épiphyse des poissons téléostéens. (Vaudry et al., 2010)

| Espèces | Séquence |
|------------------------|---|
| Larproie | H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Fugu | H-Thr-Gly-Asn-Asn-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Raie | H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Chien de mer | H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Esturgeon | H-Gly-Ser-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Esturgeon spatule | H-Gly-Ser-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Gobie | H-Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Poisson zèbre α | H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Poisson zèbre β | H-Gly-Ser-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Sangsue A | H-Gly-Ser-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Sangsue B | H-Gly-Ser-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Carpe α | H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Carpe $\beta 1$ | H-Gly-Gly-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Carpe $\beta 2$ | H-Gly-Ser-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Carpe γ | H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH |
| Flet | H-Ala-Gly-Thr-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Truite | H-Gly-Gly-Asn-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Bar | H-Ala-Gly-Asn-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Grenouille | H-Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Poulet | H-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Diamant mandarin | H-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Souris | <Gln-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH |
| Rat | <Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH |
| Porc A | H-Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Porc B | H-Gly-Pro-Pro-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Bovin | H-Gly-Pro-Ser-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Singe | H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Chimpanzé | H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |
| Humain | H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH |

Tableau 1 : Comparaison des structures primaire de UII (Vaudry et al., 2010)

1.2.1.2. L'Urotensine II-Related Peptide

En 2003, un anticorps dirigé contre la séquence cyclique de l'UII fut utilisé dans un lysat de cerveau de rat (Sugo et al., 2003). Les complexes immuns ont ensuite été purifiés et séquencés et un nouveau composé nommé Urotensine II-Related Peptide (URP) fut découvert. Ce dernier est composé de huit acides aminés dont sept en commun avec l'UII humaine possédant notamment la même partie cyclique.

Cette séquence cyclique composée des acides aminés 5 à 11 de l'urotensine II humaine et de l'URP, possède des acides aminés communs avec la somatostatine humaine, hormone sécrétée par les cellules de l'hypothalamus mais également par les cellules delta de l'estomac, de l'intestin et du pancréas. Par ailleurs, l'UII et l'URP sont capables d'activer le récepteur de la somatostatine 2 et 5 en plus d'activer UT (Malagon et al., 2008)

1.2.2. Le récepteur de l'urotensine II (UT)

UT fut découvert chez le rat lors d'une expérience qui visait à trouver de nouveaux gènes codant pour des peptides qui seraient susceptibles de se fixer sur des récepteurs (Mori et al., 1999). Lors d'une précédente étude, une librairie d'ADN a été étudiée et un récepteur couplé à une protéine protéine G fut découverte et nommé GPR14 (Marchese et al., 1995). GPR14 montre 27% d'identité de séquence avec le récepteur à la somatostatine SSTR4 et plus particulièrement 41% d'identité dans la partie de la séquence de son domaine transmembranaire. GPR14 de rat fut utilisé comme sonde pour voir si on la retrouvait chez l'Homme et une séquence de 389 acides aminés fut découverte avec 75% d'identité chez l'humain. Un nouveau GPCR était identifié chez

l'Homme. Il a enfin été déterminé que ce récepteur activait la mobilisation calcique suite à la stimulation par l'urotensine II de Gobie ainsi que par celle d'origine humaine. GPR14 a ainsi été renommé récepteur de l'urotensine II (UT) (Ross et al., 2010). Il possède les caractéristiques structurales des GPCR de classe A à savoir, deux potentiels sites de glycosylation sur le domaine N-terminal ainsi que deux résidus cystéine dans les première et seconde boucles extracellulaires ce qui permet d'avoir un pont disulfure entre celles-ci (Figure 5). UT est retrouvé au niveau du cerveau, de la moelle épinière, du myocarde ventriculaire, des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules endothéliales vasculaires, du cortex rénal, de la glande surrénale, de l'hypophyse et de la thyroïde.

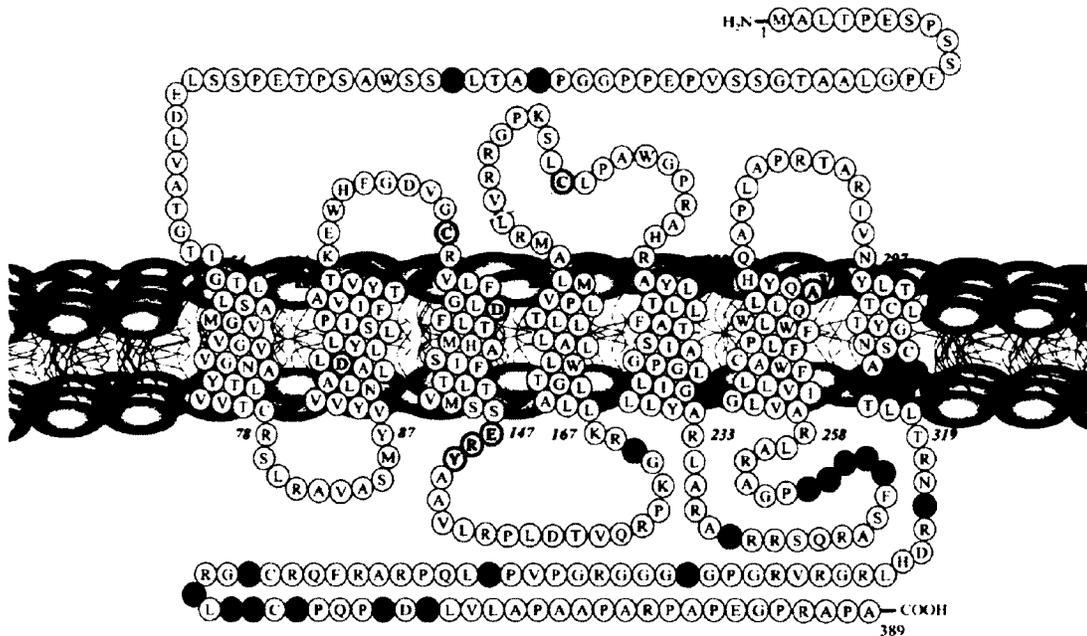


Figure 5 : représentation schématique du récepteur humain de l'urotensine II. Le récepteur UT possède sept domaines transmembranaires reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Les résidus colorés en jaunes sont les résidus les mieux conservés dans chacun des domaines transmembranaires. Les résidus colorés en rouge sont les résidus impliqués dans l'internalisation, les résidus colorés en vert sont les sites de phosphorylation, en violet la séquence signal de localisation nucléaire et en bleu les sites de glycosylation (Fournier, 2012).

1.2.3. Signalisation du UT

1.2.3.1. Activation du récepteur

Le récepteur de l'urotensine II est un GPCR qui est couplé majoritairement avec la sous-unité $G\alpha_q$. Une fois activé par son ligand, UT va changer de conformation et ainsi permettre le recrutement de la sous-unité $G\alpha_q$ couplée au GDP. Puis le récepteur activé agit par la suite de facteur d'échange de guanine nucléotide (Guanine nucleotide exchange factor ou GEF) et promeut le remplacement du GDP par le guanosine tri phosphate (GTP). Ceci déstabilise le complexe et permet le relâchement de la sous unité α -GTP et du dimère $\beta\gamma$. Chacun d'entre eux agit comme messenger et active différents effecteurs intracellulaires (Figure 6).

1.2.3.2. La voie calcique

La sous-unité $G\alpha_q$ va activer la phospholipase C β , qui conduira par la suite au clivage du Phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) en Inositol triphosphate (IP3) et diacyl glycerol (DAG). L'IP3 va ensuite s'associer à son récepteur (IP3R) présent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique pour induire la sortie d'ions calciques dans le cytosol de la cellule. Dans les muscles lisses, la sortie de calcium du réticulum endoplasmique permise par l'UII, va permettre en retour un afflux de calcium extracellulaire par l'ouverture des canaux calciques. Dans le cytoplasme, les ions calcium vont se fixer sur la calmoduline, une protéine naturellement présente dans le milieu intracellulaire, ce qui va provoquer un changement de conformation de cette dernière et ainsi permettre l'activation de la *myosin light-chain kinase* (MLCK) par phosphorylation.

Cela conduira à une contraction des muscles lisses via la phosphorylation des têtes de myosine par la MLCK (Iglewski and Grant, 2010).

1.2.3.3. L'activation des MAPK

La voie MAPK est activée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires, particulièrement par les facteurs de croissance et de différenciation. Cette activation est déclenchée majoritairement par les récepteurs à activité tyrosine kinase, mais aussi par des GPCR, et fait intervenir un grand nombre d'étapes entre la membrane plasmique et le noyau. Chez les mammifères, il existe cinq familles de MAPK : *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1 and ERK2), *Jun N-terminal kinases* (JNK1, JNK2 and JNK3); la kinase p38 avec ses différents isoformes (p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ), ERK3/ERK4 et ERK5 (Chang and Karin, 2001; Davis, 2000; Johnson, 2002). Les principes fondamentaux qui régissent l'activation de cette voie ont été établis au cours des années 1990 et sont relativement bien compris (Meloche and Pouyssegur, 2007).

La liaison du ligand à son récepteur de surface cellulaire induit l'activation de la petite GTPase Ras via la PKC qui est elle-même activée par le DAG. Ras va entrer en interaction avec la protéine sérine/thréonine kinase Raf qui phosphoryle à son tour les MAP kinase kinases, MEK1/2. Cette cascade de phosphorylation se poursuit par l'activation des protéines d'intérêt ERK1/2 sur leurs résidus sérine et thréonine. Ainsi, ERK1/2 entre dans le noyau cellulaire et ajoute des groupements phosphate aux résidus sérine et thréonine du facteur de transcription Fos; le facteur de transcription Jun étant préalablement phosphorylé par la protéine kinase JNK (une autre protéine de la famille des MAP kinases). Ces deux facteurs de transcription forment alors un hétérodimère nommé complexe transcriptionnel AP-1 (*activating protein-1*) qui agit sur le gène c-Fos, un gène de réponse précoce nécessaire pour passer de l'état G₀ à G₁ du cycle cellulaire (Pearson et al.; Wortzel and Seger, 2012). Les MAPK jouent donc un rôle important dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire (Liu et al., 2009; Onan et al.,

2004b). La cascade des MAPK peut également être activée en parallèle via la transactivation du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*). Cette activation tardive de l'EGFR permet une réactivation des MAPK (Sauzeau et al., 2001; Tsoukas et al., 2011).

1.2.3.4. La voie Rho A

Il existe une autre voie de signalisation permettant la vasoconstriction des muscles lisses médiée par l'urotensine II. Il s'agit de la petite GTPase Rho A. Cette protéine est activée par la PKC qui elle-même est activée par le DAG issu du PIP2. En effet la protéine RhoA va activer la Rho kinase qui induira une vasoconstriction des muscles lisses par phosphorylation de la myosine. L'activation du complexe Rho-A/Rho-kinase par l'urotensine-II, permet donc la contraction, la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que la prolifération des muscles lisses vasculaires (Sauzeau et al., 2001).

Ainsi au travers de la voie calcique et de la voie Rho A, l'urotensine II est considéré par certains comme le vasoconstricteur le plus puissant. La liaison d'UII sur UT mène à une vasoconstriction plus forte que celle induite par l'endothéline-1, la sérotonine et la norépinéphrine dans les cellules de muscles cardiaque humain (Watanabe et al., 2006).

1.2.3.5. UII est un facteur chémoattractant

En plus d'être un puissant vasoconstricteur, l'urotensine II agit également comme facteur chémoattractant dans le système immunitaire lors de l'inflammation. Dans les cellules sanguines périphériques monocellulaires (PBMC) il a été démontré que UT était exprimé dans la majorité des monocytes ainsi qu'une grande partie des cellules NK (*natural killer*). Par ailleurs, l'urotensine II agit comme un facteur chémoattractant pour les cellules du système inflammatoire humain et de rat (Segain et al., 2007). De plus cette

chémoattraction est dépendante de l'activation de la Rho-Kinase car l'inhibition de cette dernière bloque tout facteur chémoattractif du UT.

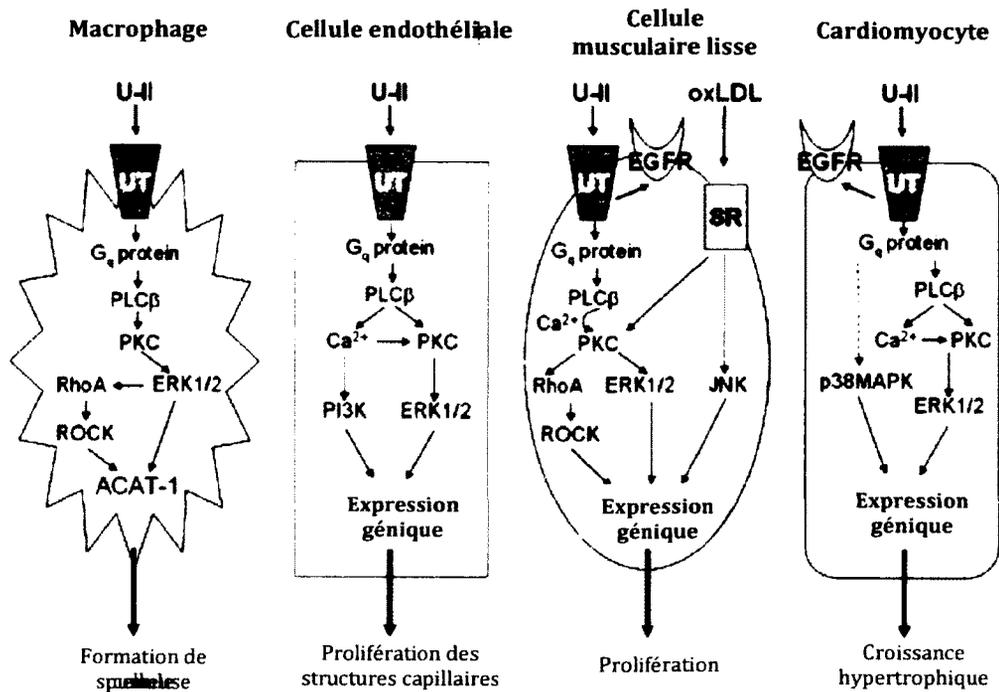


Figure 6 : Mécanismes d'actions trophiques induites par l'urotensine II dans les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les cardiomyocytes. PLC, phospholipase-C; PKC, protein kinase C; ROCK, Rho kinase; ACAT-1, acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; JNK, Jun N-terminal kinase; p38-MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; SR, scavenger receptor class A; EGFR, epidermal growth factor receptor.
Figure adaptée de (Guidolin et al., 2010a)

1.2.3.6. Rôle de UII dans les pathologies

L'UII est impliquée dans de nombreuses pathologies et parmi elles, la pathologie cardiovasculaire est sans doute la plus importante puisque UII est aujourd'hui le plus puissant vasoconstricteur connu. Parmi les pathologies les plus répandues, la dysfonction endothéliale peut entraîner des vasoconstrictions ou des vasodilatations inadéquates qui induit par la suite des ischémies myocardiques et de l'hypertension (Zhang et al., 2002). On retrouve dans ces cas d'hypertension, une augmentation de 3,4 fois l'expression de UII ainsi que de UT (Suguro et al., 2007). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de UII et UT semble être également associée aussi à l'athérosclérose coronarienne (Maguire et al., 2004). L'athérosclérose est caractérisée par le remaniement de l'intima des gros vaisseaux. Dans cette pathologie, l'ARNm de UII est surexprimée dans les leucocytes et plus particulièrement dans les lymphocytes présents au niveau des lésions provoquées par cette maladie (Bousette et al., 2004). Récemment, il a été montré chez un modèle murin d'athérosclérose que UT était surexprimé et qu'un antagoniste, le SB657510 (GlaxoSmithKline) diminuait la formation des plaques d'athérosclérose (You et al., 2012).

UII est aussi impliqué dans le diabète. En effet, il joue un rôle dans la sécrétion de l'insuline et donc dans la pathogénèse du diabète de type II. UII et UT sont tous les deux présents dans le pancréas et UII inhibe de façon significative la sécrétion d'insuline en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose en influençant directement les cellules β du pancréas (Clozel, 2005)

Enfin, l'angiogenèse est un processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux préexistants. De nombreux facteurs sont impliqués dans cette synthèse *de novo* comme le VEGF, le FGF-2, le TGF-beta et le PDGF. Récemment l'UII a été montré comme étant un facteur pro-angiogénique à travers l'activation de la voie des MAPK, de la PI3K ainsi que de p38 (Guidolin et al., 2010a; 2010b). Ces différentes voies de signalisation activées par l'UII sont donc des cibles importantes pour le

traitement de l'angiogenèse dans des conditions pathologiques comme le cancer ou l'inflammation (Diebold et al., 2012).

1.3. Analogues synthétiques de l'UII

Depuis la découverte de l'UII et de son récepteur, de nombreuses études de structure activité ont été menées. Des modifications comme des amidations ou des délétions de résidus de la partie N-terminale de l'UII n'ont montré que des modifications mineures sur l'affinité du ligand pour son récepteur (Leprince et al., 2008). En revanche, l'UII (4-11) possède de meilleures capacités de liaison par rapport au peptide entier et la modification de la structure cyclique par le remplacement des cystéines en position 5 et 10 par des alanines ou des sérines entraîne une perte d'affinité pour le récepteur. Par ailleurs, les modifications des résidus 6, 7, 8 et 9 montrent que la partie cyclisée est importante pour la liaison du récepteur et l'induction de la réponse calcique (Brkovic, 2003; Flohr et al., 2002). D'autres études ont permis l'identification du premier agoniste non peptidique du UT, AC-7954 (Croston et al., 2002) ou encore de montrer par photo-affinité que la phénylalanine située en 6^{ème} position se fixait sur les résidus Met-184/185 de la 4^{ème} partie transmembranaire récepteur de rat (Boucard et al., 2003). De nombreux analogues peptidiques ont été synthétisés et il est intéressant de constater que certains ligands sont des agonistes complets sur les récepteurs UT humains mais agonistes partiels ou antagonistes sur ceux du rat (Camarda et al., 2002a). L'Urantide [Pen5, DTrp7, Orn8] hUII (4-11) est décrite dans la littérature comme un antagoniste. En effet, l'urantide bloque les contractions d'anneaux aortiques de rat sans affecter la réponse induite par la noradrénaline ou l'endothéline-1 (Patacchini et al., 2003). Bien que cet effet ait été montré sur un système *in vivo*, il a été démontré par la suite sur un modèle *in vitro* que l'urantide pouvait avoir des propriétés agonistes sur le récepteur humain ou antagonistes sur le récepteur de rat dans l'activation de la voie calcique (Camarda et al., 2004). A l'heure actuelle, l'étape de développement la plus avancée atteint par un antagoniste du UT a été effectuée avec le Palosuran (ACT-058362) et conduit par Actelion

Pharmaceutical. Mais cet essai clinique a été arrêté en mai 2005 à cause du manque de résultats probants chez les patients atteints de diabète néphropathique (Maryanoff and Kinney, 2010). Depuis, aucun autre composé n'est entré en phase clinique.

1.4. Le concept de signalisation biaisée

Au cours de ces dernières années, il a été montré que les GPCR pouvaient signaler à travers plusieurs voies de signalisation parallèles simultanément. Cette multi-activation est possible par le biais des différentes familles de protéines G hétérotrimériques présentes en aval du récepteur (Rajagopal et al., 2011). Plus tard, il a été découvert que certains ligands pouvaient avoir des efficacités différentes sur les voies de signalisation activées par leur récepteur. C'est ce qu'on appelle la sélectivité fonctionnelle ou le principe de signalisation biaisée (figure 7). Il est maintenant reconnu que les β -arrestines, qui contribuent à la desensibilisation des GPCR, peuvent agir comme protéines d'échafaudages et influencer l'activation de certaines voies de signalisation comme l'activation de la voie des MAPK ou encore la transactivation de l'EGFR. Un exemple de signalisation biaisé a été démontré pour le récepteur de l'angiotensine II (Wei et al., 2003). Ils ont montré que le ligand Sar¹Ile⁴Ile⁸ AngII (SII) n'activait pas la voie des inositols phosphates contrairement à l'angiotensine II mais que ce ligand induisait l'activation de la voie des MAPK de manière dépendante de la β arrestine-2. En effet, ils ont montré grâce à l'utilisation de siRNA contre la β -arrestine-2 que le SII ne permet pas d'activer la voie des MAPK contrairement à l'angiotensine II. De ce fait, les ligands biaisés seront classés, soit dépendants de la protéine G, soit dépendants de la β -arrestine. Il existe aujourd'hui une douzaine de ligands qui ont été identifiés comme des ligands biaisés sur le recrutement des protéines G et/ou de la β arrestine (Ahn et al., 2004; Violin et al., 2010; Wei et al., 2003).

De nombreuses techniques de quantification de l'effet biaisé d'un ligand ont été proposées (Galandrin and Bouvier, 2006a; 2006b; Rajagopal et al., 2011). Dernièrement,

Terry Kenakin and Arthur Christopoulos ont proposé qu'une approche mathématique soit utilisée afin de quantifier l'effet biaisé (Kenakin et al., 2012).

Agoniste biaisé

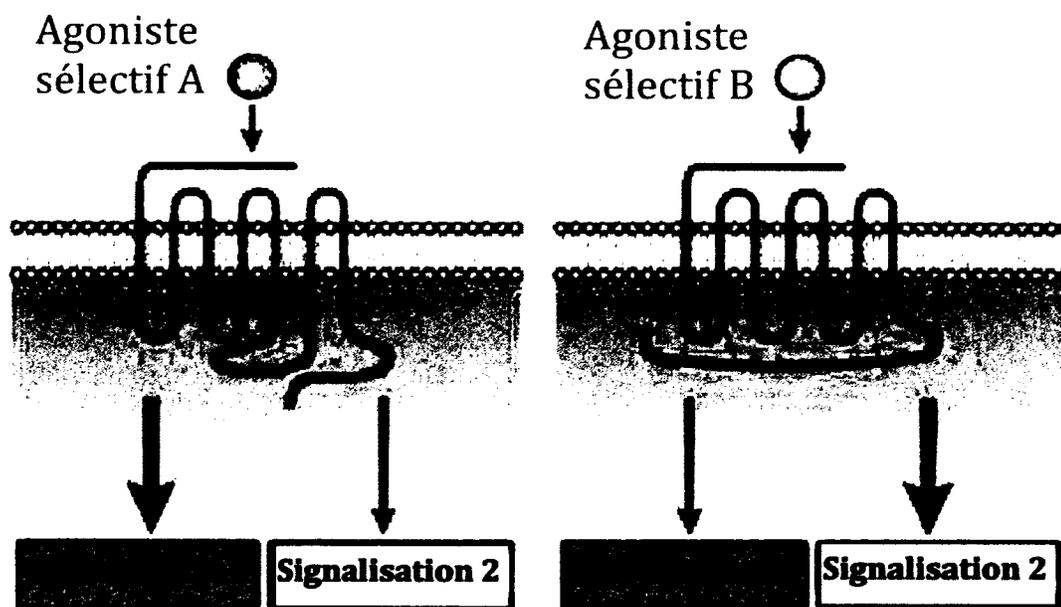


Figure 7: Principe de sélectivité fonctionnelle. La liaison du ligand dans la pochette de liaison va induire un changement de conformation du récepteur qui active préférentiellement une voie de signalisation (Kenakin et al., 2012).

2. Objectifs du projet

Les GPCR de classe A sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathophysiologiques et représentent donc des cibles importantes pour le traitement de nombreuses maladies. Le récepteur de l'urotensine II signale principalement via la sous unité $G\alpha_{q/11}$ et dernièrement, il a été montré que UT signale également via la sous unité $G\alpha_{i/o}$ (Jarry et al., 2010).

L'objectif de cette étude a été de déterminer si certains déterminants moléculaires peuvent stabiliser UT dans une conformation qui lui permettrait d'activer préférentiellement une voie de signalisation (concept de signalisation biaisée).

Pour cela, nous avons tout d'abord caractérisé les voies de signalisation connues avec les ligands endogènes (UII et URP) puis nous avons étudié avec ces mêmes ligands d'autres voies de signalisation qui ne sont pas encore connues pour le récepteur de l'Urotensine II. Enfin, toutes les voies de signalisation ont été caractérisées avec l'ensemble des ligands de cette étude.

3. Matériels et méthodes

L'albumine de sérum bovin (BSA) provient de Roche (Mannheim, Allemagne). La Bacitracine et la polyéthylèneimine (PEI) proviennent de Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Le DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Media), le FBS (Fetal Bovin Serum), pénicilline/streptomycine et la généticine (G418) proviennent de chez Wisent Bioproducts (St-Bruno, QC, Canada). Les ligands UII et UII (4-11) proviennent de Phoenix pharmaceuticals, Inc (Burlingame, CA, USA). URP, Orn5 URP et Orn8 UII proviennent de Tocris Bioscience. L'Urantide provient de Peptides international (Louisville, KY, USA). La Nle8-UII a été synthétisée dans notre laboratoire comme décrit précédemment (Holleran et al., 2007). La Coelenterazine 400a provient de chez Biosynth (Itasca, IL, USA). L'I-125 provient de chez Perkin Elmer (Woodbridge, ON, Canada).

3.1. Culture cellulaire

Des cellules QBI HEK 293 ont été transfectées ou non avec le récepteur humain du UT. Ces cellules ont ensuite été rendues stables par sélection des cellules qui avaient intégré le plasmide codant pour le récepteur UT humain avec de la généticine à 0,4mg/ml. Ces cellules ont été cultivées dans du DMEM complété avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂.

3.2. Affinité des ligands

La capacité de liaison des ligands a été évaluée par des courbes de dose déplacement. Cette technique consiste à utiliser de l'UII marquée à l'iode 125 (¹²⁵I) et de déplacer ce dernier avec une concentration croissante de ligand non marqué. Un IC₅₀ a été obtenu pour chacun d'entre eux selon la manière suivante : des HEK 293 hUT ont été

lavées au PBS, ont subi un cycle de congélation-décongélation puis ont été reprise par grattage dans du tampon de lavage [20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂]. Après centrifugation à 2 500 x g pendant 15 min à 4°C les membranes sont re-suspendues dans du tampon de binding [20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 0.1 % BSA, 0.01 % Bacitracine], 10 à 20 µg de protéines sont ensuite incubés pendant 1h avec 0.1 nM 125I-UII (500 Ci/mmol) en présence d'une concentration croissante du ligand d'intérêt dans un volume final de 200 µl. La radioactivité libre de celle qui s'est fixée sur le récepteur est éliminée par filtration à travers des filtres préalablement imprégnés pendant 1 heure dans du tampon de liaison. La radioactivité fixée sur les récepteurs est ensuite évaluée à l'aide d'un compteur à radiation gamma.

3.3. Etude de la voie MAPK Erk1/2

La technologie Alpha Screen SureFire phospho ERK1/2 (figure 8) développée par Perkin Elmer a été utilisée pour la détection de cette voie de signalisation.

Environ 50 000 cellules HEK 293 exprimant de manière stable le récepteur humain de l'urotensine II sont incubées dans une plaque 96 puits pendant 5h. Suite à cette période, les cellules sont privées de facteur de croissance pendant une période de 12 à 15 heures dans du milieu de culture DMEM non complété en FBS. Une cinétique d'activation des MAPK de 0 à 60 minutes est ensuite réalisée en stimulant les cellules à une concentration de 1µM avec chacun des ligands. Les cellules sont ensuite lysées pendant 10 minutes et congelées pendant au moins 4 heures. Post décongélation, 4 µl du lysat cellulaire est incubé en présence de 5µl d'un mélange de solution composé d'un tampon d'activation, d'un tampon de réaction ainsi que des billes donneuses et acceptrices d'énergie. Ce mélange contient des anti-phosphatases, des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée et non phosphorylée de ERK1/2 ainsi que des billes qui vont se coupler aux deux types d'anticorps. La lecture de la plaque s'effectue sur un EnSpire Alpha Plate Reader (Perkin Elmer) qui va exciter chaque puits de la plaque à 680 nm. Les billes donneuses qui se sont préalablement couplées aux anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt vont donc être excitées et un photo sensibilisateur, la phthalocyanine,

va convertir les molécules d'oxygène ambiant en molécules d'oxygène excitées et réactives. Cette molécule réactive possède une demi-vie de 4 μ sec et un rayon de diffusion en solution de 200 nm. Si une bille acceptrice couplée aux anticorps anti-forme phosphorylée se trouve dans le rayon d'action de la molécule d'oxygène excité, de l'énergie sera transférée aux thioxènes de la bille acceptrice qui émettra de la lumière entre 520-620 nm. En soustrayant la valeur donnée par chaque puits à la valeur du puits non stimulée nous permettra donc de quantifier la capacité de chacun des ligands à activer cette voie de signalisation.

3.4. Etude de la voie NF κ B

La technologie Alpha Screen développée par Perkin Elmer SureFire phospho NF κ B a été également utilisée pour la détection de l'activation de cette voie de signalisation.

Environ 50 000 cellules HEK 293 exprimant de manière stable le récepteur humain de l'urotensine II sont incubées dans une plaque 96 puits pendant 5h. Suite à cette période, les cellules sont privées de facteur de croissance pendant une période de 12 à 15 heures dans du milieu de culture DMEM non complété en FBS. Les cellules sont ensuite stimulées 15 minutes avec chacun des ligands à une concentration de 1 μ M, temps nécessaire pour induire l'activation maximale de la voie NF κ B puis lysées pendant 10 minutes et congelées pendant au moins 4 heures. Post décongélation 5 μ l de lysat cellulaire est incubé en présence d'un premier mélange de réaction composé d'un tampon d'activation contenant les anticorps dirigés contre les formes phosphorylées ou non de NF κ B ainsi que des billes acceptrices d'énergie pendant 2 heures. Suite à cette première période d'incubation 2 μ l d'un deuxième mélange contenant les billes donneuses d'énergie est ajouté. La plaque est ensuite incubée à l'abri de la lumière pendant au moins 2 heures. Comme pour la détection de la forme phosphorylée de ERK1/2, les plaques sont ensuite stimulées sur un lecteur de plaque EnSpire Alpha Plate Reader (Perkin Elmer). L'excitation à 680 nm provoquera l'excitation des billes acceptrices si

ces dernières sont situées dans leur rayon d'action et émettront à leur tour de la lumière entre 520 et 620 nm.

3.5. Etude de la voie des inositols phosphates.

Dans cette étude, l'activation de la voie des inositols phosphates a été évaluée en quantifiant les molécules d'IP1 produites suite à la stimulation (figure 9). En effet suite à l'activation du récepteur, des molécules d'IP3 sont produites et vont ensuite se fixer sur le récepteur IP3 présent sur la membrane du réticulum endoplasmique. Les molécules d'IP3 présentes dans le cytosol sont ensuite dégradées en IP2 puis IP1. Le test IPone de Cisbio permet grâce à la technologie Htrf (définir l'acronyme Htrf) de quantifier l'IP1 issu de la dégradation de l'IP3. Cette expérience utilise un anticorps monoclonal spécifique de IP1 qui est marqué avec le Lumi4TM-Tb. Cet anticorps reconnaît de manière indifférente l'IP1 produit par la cellule ainsi que l'IP1 exogène couplé à la sonde d2. Suite à la stimulation à 620 nm, une émission d'énergie fluorescente est générée par l'anticorps. Si une molécule d'IP1 exogène est présente au niveau du complexe immun cette énergie émise excitera la sonde d2 qui émettra à son tour à 665 nm. Le ratio de fluorescence (665 nm/620 nm) calculé est inversement proportionnel à la quantité d'IP1 produite. Un faible ratio montre une production importante d'IP1 par la cellule alors qu'un fort ratio indique une synthèse d'IP1 négligeable. Cette expérience se réalise sur des cellules HEK 293-hUT stables en suspension à une concentration de 17 500 cellules par puits. Suite à une stimulation de 30 minutes, ces cellules sont lysées en présence d'IP1 exogène (IP1d2) et d'anticorps anti IP1 (AbCrypt).

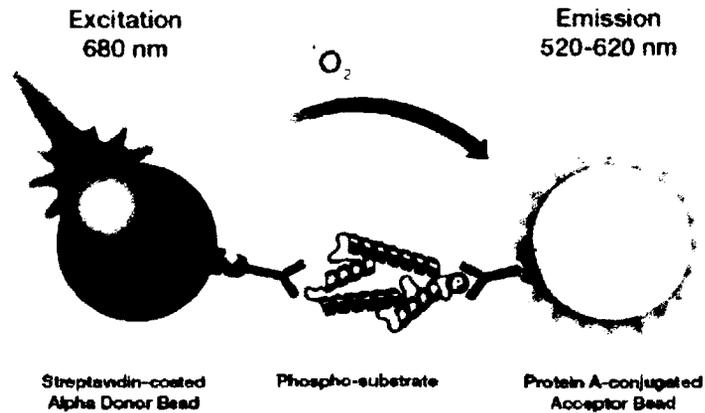


Figure 8 : Représentation schématique du principe de la technologie Alpha Screen®. Cette technologie est développée par Perkin Elmer pour étudier la forme phosphorylée d'une protéine (ERK1/2 ou NFκB).

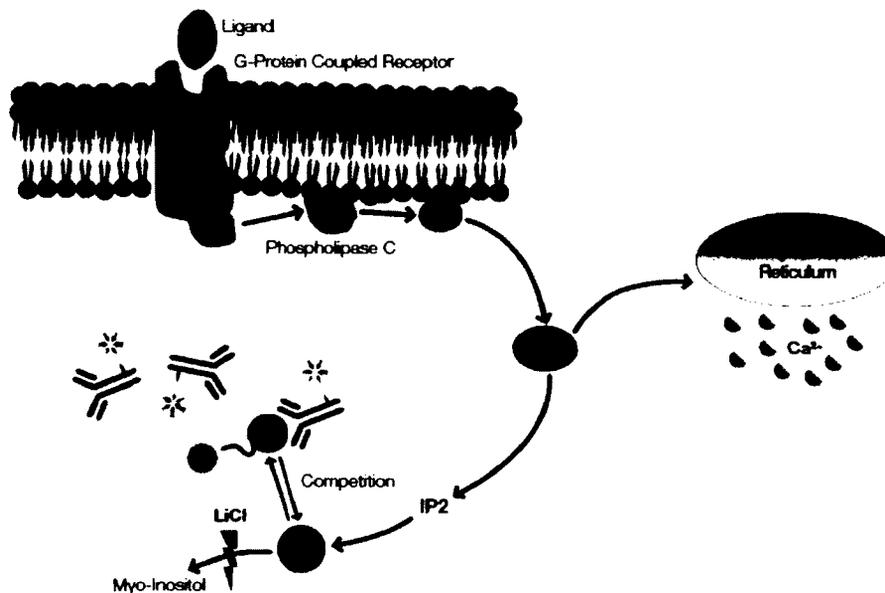


Figure 9 : représentation schématique du principe de la technologie IP-One Htrf®. Cette technologie est développée par Cisbio pour quantifier la production d'IP1 par une cellule.

3.6. Recrutement des sous-unités Alpha (α)

Des expériences de Bioluminescence Resonance Energy Transfert (BRET) ont été réalisées afin d'identifier de nouvelles voies de signalisation. Cette technique est fondée sur le transfert d'énergie entre un donneur bioluminescent et un accepteur fluorescent. Ce transfert d'énergie est dépendant de la distance entre ces deux molécules (10-100 Å) ainsi que de leur orientation (figure 10).

Le BRET2 utilise une luciférase (RlucII) isolée de la *Renilla reniformis* comme donneuse dont le substrat de cette dernière est la Deep Blue C également appelée coelenterazine 400A. En présence d'oxygène la RlucII catalyse la transformation de la coelenterazine en coelenteramide en émettant une légère émission lumineuse visible dans le bleu (395nm). Lorsqu'un possible accepteur est présent à proximité de cette source lumineuse, l'énergie bleue est captée par l'accepteur, dans ce cas, la GFP10. L'excitation de cette dernière entraîne l'émission d'une lumière verte à 510 nm. L'efficacité du transfert d'énergie du complexe RlucII à la GFP10 est déterminée par le rapport entre l'intensité d'émission de l'accepteur sur l'intensité d'émission du donneur. Ce ratio traduit ainsi la proximité entre la RlucII et la GFP10. Dans cette étude, des constructions de RlucII fusionnées avec la sous-unité $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ ou β Arrestin-2 ont été utilisées. Ces constructions ainsi que les constructions des sous unités γ couplées à la GFP10 et les sous unités β ont été gracieusement données par Michel Bouvier (Département de Biochimie, Université de Montréal, Qc, Canada).

Des QBI HEK 293 ont été transfectées au polyéthylèneimine (PEI) avec les plasmides codant pour chaque biosenseur $G\alpha$ ainsi que les sous unités γ couplées à la GFP10 et les sous unités β ainsi que le récepteur hUT. Chaque construction a été transfectée à une concentration différente. A 24h post transfection, les cellules sont lavées puis reprises dans une solution 1X de Hank's Balanced Salt (HBSS). 80 μ l de cellules sont incubées pendant 5 à 10 minutes dans une plaque 96 puits en présence de 10 μ l de ligand. Suite à la stimulation, 10 μ l de coelentérazine sont ajoutés dans chaque

puits de la plaque. La lecture de la luminescence s'effectue sur le Infinite M1000 de Tecan.

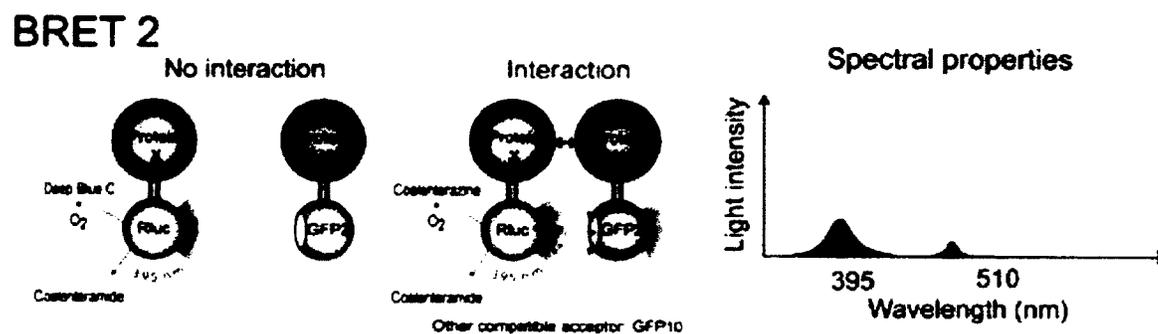


Figure 10 : Principe du transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET)

4. Résultats

4.1. Affinités des ligands étudiés

En plus de l'Urotensine II (UII) et l'Urotensine Related Peptide (URP) les deux ligands endogènes, cinq ligands ont été étudiés. L'urotensine II 4-11 est la plus petite partie du ligand qui est nécessaire pour activer le récepteur (Leprince et al., 2008). L'Urantide est un antagoniste pour la contraction d'anneau aortique de rat (Patacchini et al., 2003). De plus, nous avons essayé d'observer l'effet du remplacement de la lysine en position 8 de l'UII ou en position 5 de l'URP par une Ornithine. Enfin le dernier ligand étudié est la Nle8 UII dans lequel l'acide aminé lysine en position 8 de l'UII est remplacée par un résidu norleucine (Tableau 2).

Nous avons testé la capacité de nos ligands à se fixer sur le récepteur de l'urotensine II par une étude de liaison dose-déplacement. L'affinité a été déterminée en mettant en compétition chaque ligand avec de l'Urotensine II marquée à l'iode 125 (Figure 11).

UII, URP, UII (4-11) et l'urantide ont une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le récepteur, respectivement 3.2 nM, 1.1 nM, 1.9 nM et 6.7 nM). De plus, le remplacement de la lysine par une norleucine sur l'UII et l'URP respectivement en position 8 et 5 de ces derniers montre que cette position n'altère que très peu la liaison du ligand sur le récepteur avec un IC50 de 23 nM et 75 nM. Enfin, la Nle8 UII possède une affinité mille fois inférieure à celle de l'urotensine II.

| | |
|----------|--|
| UII | Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| URP | Ala -Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| UII 4-11 | Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val |
| Urantide | Asp- Pen -Phe- DTrp -Orn-Tyr-Cys-Val |
| Nle8 UII | Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp- Nle -Tyr-Cys-Val |
| Om5 URP | Ala Orn |
| Orn8 UII | Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp- Orn -Tyr-Cys-Val |

Tableau 2: Tableau présentant les ligands testés dans cette étude. Les acides aminés en gras représentent les résidus importants qui diffèrent de l'UII ou de l'URP. Sauf si mentionné autrement, le code de couleurs utilisées est le même pour tous les résultats de cette section.

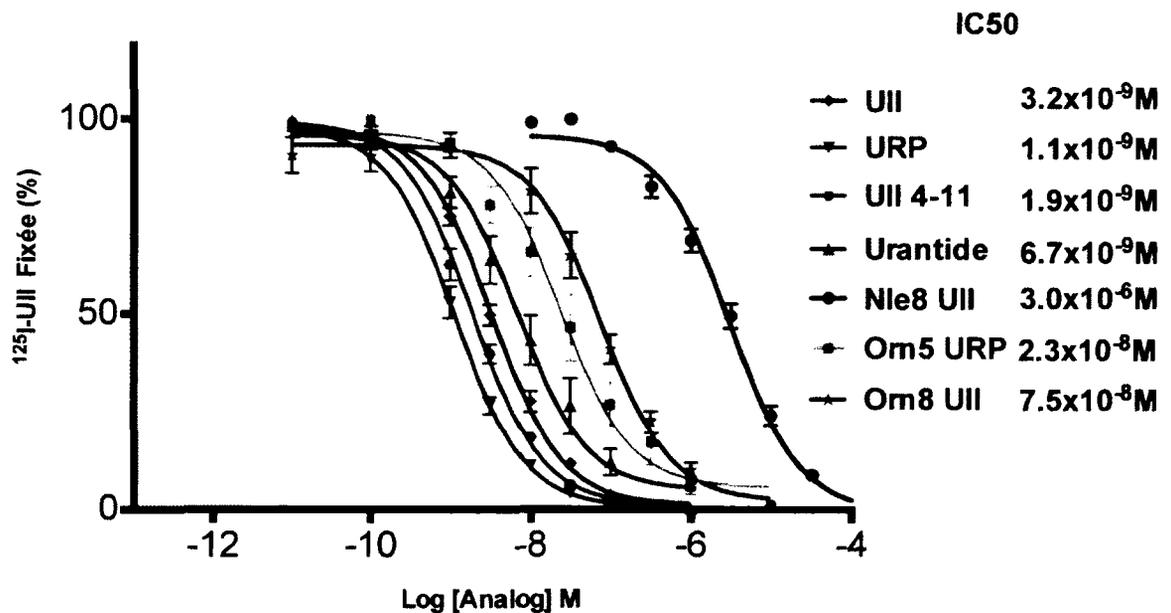


Figure 11 : Affinités des analogues de l'UII sur le récepteur de l'Urotensine II. Capacité des ligands non marqués à déplacer l'urotensine II marquée à ^{125}I .

4.2. Activation de la voie calcique

La signalisation du UT passe majoritairement via la sous unité G alpha q ($G\alpha_q$). Suite à cette activation, la phospholipase C clivera le PIP2 en DAG et IP3.

Afin de vérifier la capacité de chacun de nos ligands à activer cette sous-unité nous avons effectué des expériences de BRET entre les sous unité G alpha q RlucII, G-Gamma-1-GFP10. Des courbes dose réponse ont été obtenues montrant la capacité de chacun des ligands à induire un changement de conformation entre les différentes sous unités (figure 12).

Suite à leur liaison sur le récepteur, tous les ligands induisent un changement de conformation des sous unités $G\alpha_q$ et $G\gamma$, changement qui se reflète ici dans une diminution du ratio de BRET (Figure 12). La liaison de l'urantide ainsi que la Nle8 UII induisent une plus faible activation de la voie Gq (respectivement 54% et 71%) par rapport à celle induite par les ligands naturels du récepteur. L'urantide a été décrit dans la littérature comme étant un antagoniste sur le récepteur du rat mais qu'il était considéré comme un agoniste partiel sur le récepteur humain (Camarda et al., 2004).

Par la suite, les quantités d'inositol phosphate ont été mesurées (figure 13). L'inositol phosphate (IP1) est le produit de dégradation de l'inositol 1-3 bisphosphate (IP3) en inositol 1-2 bisphosphate (IP2) pour devenir de l'inositol phosphate (figure 13). Tous les ligands n'induisent pas la même accumulation d'IP3. UII, URP, UII (4-11) et Orn8 UII induisent une accumulation d'IP1 proche de celle induite par UII (92 % pour URP et 83% pour les autres). De plus, l'urantide agit dans cette expérience comme un agoniste partiel car il induit seulement une accumulation d'IP1 comparable à 65 % de celle induite par UII, tout comme l'Orn5 URP (74 %) et la Nle8 UII (77 %).

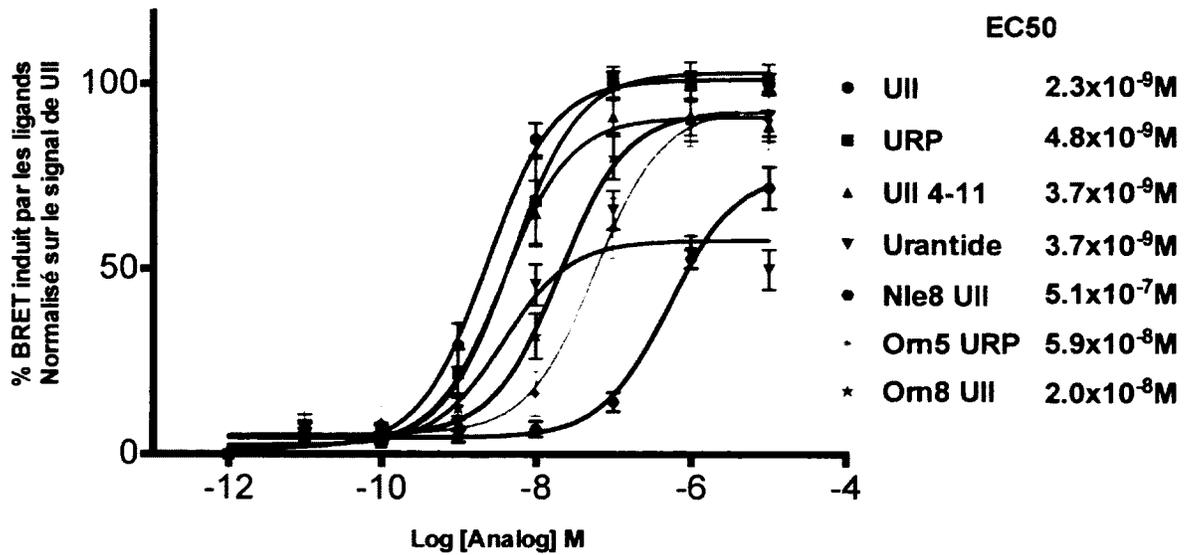


Figure 12 : Activation de la voie $G\alpha_q$ par les différents ligands. Changement du ratio de BRET mesuré sur des HEK 293 exprimant le biosenseur $G\alpha_q$ RLucII, GFP10 γ 1, β 1 et le récepteur hUT.

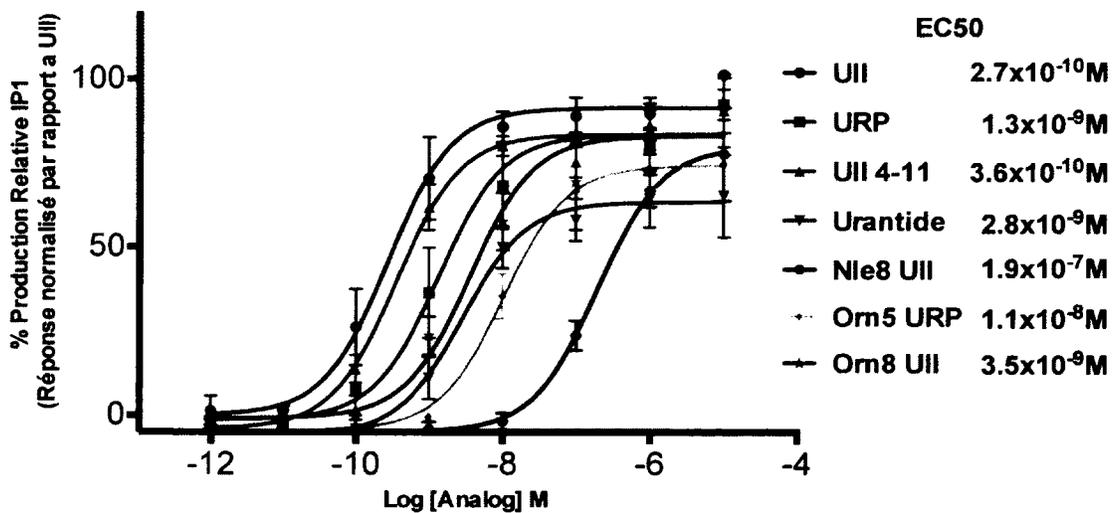


Figure 13 : Courbes dose réponse de l'accumulation d'inositol phosphate dans les cellules HEK 293 exprimant de manière stable le récepteur UT. Les données sont normalisées à 100% par rapport au signal obtenu avec l'urotensine II.

4.3. Activation de la voie G alpha i

Afin d'étudier la possibilité que le récepteur de l'Urotensine II active la voie Gi spécifiquement, nous avons testés à l'aide du biosenseur BRET $G\alpha_i$ RlucII si les deux ligands endogènes pouvaient activer cette sous unité. La littérature mentionne que UT active la protéine $G\alpha_{i/o}$ sans dissocier la protéine G α_i de α_o (Jarry et al., 2010). Par la suite, les autres ligands de l'étude ont été testés sur cette voie de signalisation. Par ailleurs, différents couples Beta, gamma-GFP10 ($\beta\gamma$ -GFP10) associés à $G\alpha_i$ RlucII ont été criblés afin d'obtenir le meilleur signal BRET, synonyme d'activation de cette voie (Figure 14).

Dans cette deuxième expérience qui utilise la technologie BRET avec le biosenseur $G\alpha_i$ RlucII, nous observons que tous les ligands excepté l'urantide et la Nle8 UII induisent la même diminution du ratio de BRET suite à l'ajout de concentration croissante de chaque ligand ($E_{max} > 90\%$). En revanche, la liaison de l'urantide ($E_{max} = 50\%$) et la Nle8 ($E_{max} < 50\%$) UII sur UT n'induit pas une activation aussi importante que suite à la liaison de UII ou URP alors que leur EC_{50} est similaire à leur IC_{50} .

4.4. Activation de la voie G alpha 13

La voie de signalisation induite par la sous unité G alpha 13 a été observée dans cette étude (Figure 15). Au cours de cette expérience, la capacité des ligands à induire l'activation de la sous unité $G\alpha_{13}$ a été regardée. L'UII ainsi que l'URP induisent une activation de la voie $G\alpha_{13}$. Lorsque ce biosenseur $G\alpha_{13}$ RlucII est couplé aux sous unités $G\gamma_1$ -GFP10 et $G\beta_3$. L'Orn8 UII, l'Orn5 URP ainsi que UII (4-11) induisent tous les trois une diminution du ratio de BRET, de 20% moins importante que UII ou URP. Enfin, l'urantide et la Nle8 UII induisent une très faible dissociation des sous unités $G\alpha$, β et γ .

En effet, la Nle8 induit un recrutement équivalent à 50 % du signal induit par UII et l'urantide induit un signal de 65 % du ligand endogène.

4.5. Activation du recrutement de la Béta Arrestine-2

Enfin, le recrutement de la β -arrestine-2 a été analysé dans cette étude (Figure 16). Contrairement aux précédents résultats, ce résultat montre le rapprochement des deux sous unités du biosenseur. Le récepteur UT est couplé ici à la GFP10 et l'arrestine-2 couplé à la RLucII.

UII, URP et UII (4-11) induisent un plus fort recrutement de la β -arrestine-2 que l'Orn8 UII (65 %) et l'Orn5 URP (61 %). L'urantide et la Nle8 UII quant à eux induisent un très faible recrutement de la β -arrestine-2. La Nle8 UII plus particulièrement, entraîne un recrutement équivalent à 16% de celui induit par les ligands endogènes, alors que l'urantide induit un recrutement équivalent à 31 %.

4.6. Activation de la voie des MAPs Kinases ERK1/2

Le récepteur de l'urotensine-II active la voie de signalisation des MAPK. Dans cette étude, nous avons réalisé une cinétique pour chacun de nos ligands en présence ou non d'inhibiteurs de la PKC (Gö6983) et de l'EGFR (PD168393). Ces deux inhibiteurs nous permettent de dissocier les deux voies de signalisation par lesquelles les MAPK peuvent être activées. Les cellules ont été préincubées 30 min avec 1 μ M de Gö6983 et/ou 250 nM de PD168393 puis stimulées à 1 μ M avec les ligands (Figure 17). UII, URP et UII (4-11) ont une cinétique d'activation similaire avec un pic d'activation équivalent à 17 fois le taux de phosphorylation basale au bout de 20 minutes, puis une légère diminution dans le temps. En ce qui concerne l'Orn5 URP et l'Orn8 UII, ces ligands montrent le même profil d'activation dans le temps mais induisent un E_{max} à 20 minutes de 13 fois le niveau basal de phosphorylation. En revanche, la Nle8 UII montre un pic d'activation à 5 minutes de 9 fois la valeur de base, puis une chute brutale de la phosphorylation, pour revenir au niveau basal à 60 minutes. L'urantide, montre également un pic d'activation à

5 minutes, puis une légère baisse de la phosphorylation des ERK1/2 entre 5 et 15 minutes pour ensuite induire à nouveau une activation maximale à 20 minutes et diminuer sans revenir à l'état basal au bout d'une heure.

4.7. Activation de la voie NFκB

Le récepteur de l'urotensine-II est impliqué dans de nombreux phénomènes inflammatoires qui emploient souvent la voie NFκB. En conséquent, nous avons étudié l'activation de ce facteur (Figure 18). UII, URP et UII (4-11) sont capables d'activer cette voie de signalisation alors que la substitution du résidu lysine en position 8 ou 5 respectivement de l'UII ou de l'URP par un résidu ornithine cause un changement dans l'induction de ce signal, plus particulièrement pour l'Orn5 URP qui est capable d'induire une phosphorylation équivalent à 70% de celle induite par l'UII. La Nle8 UII montre une faible capacité (50%) à induire la phosphorylation de ce facteur de transcription.

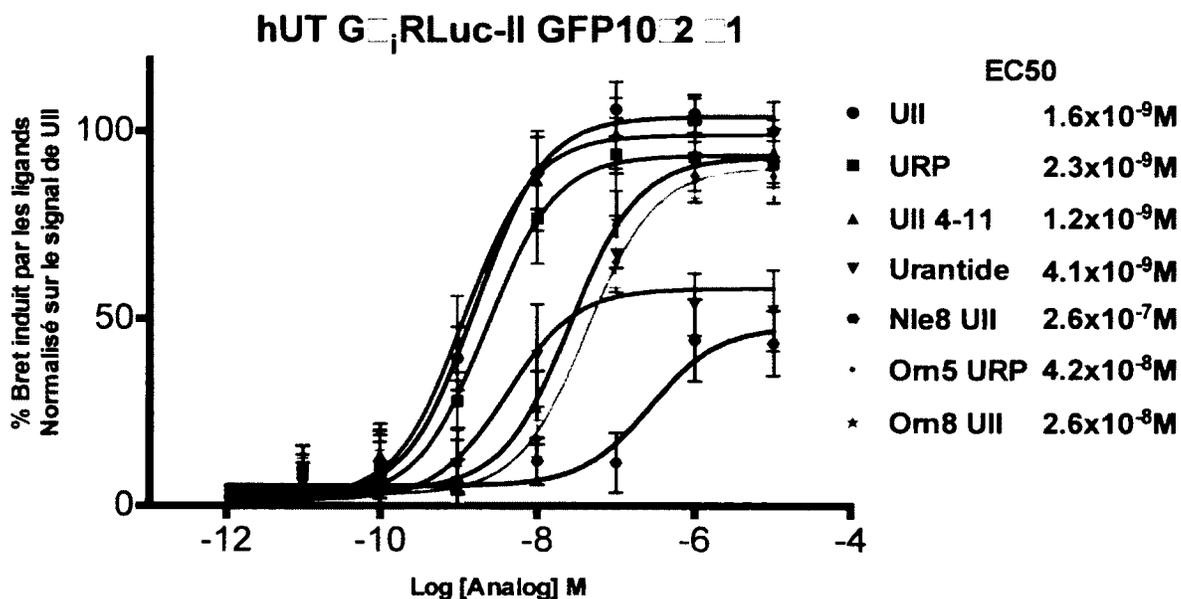


Figure 14 : Activation de la voie G α_i par les différents ligands. Changement du ratio de BRET mesuré sur des HEK 293 exprimant le biosenseur G α_i RLucII, GFP10 γ_2 , β_1 et le récepteur hUT.

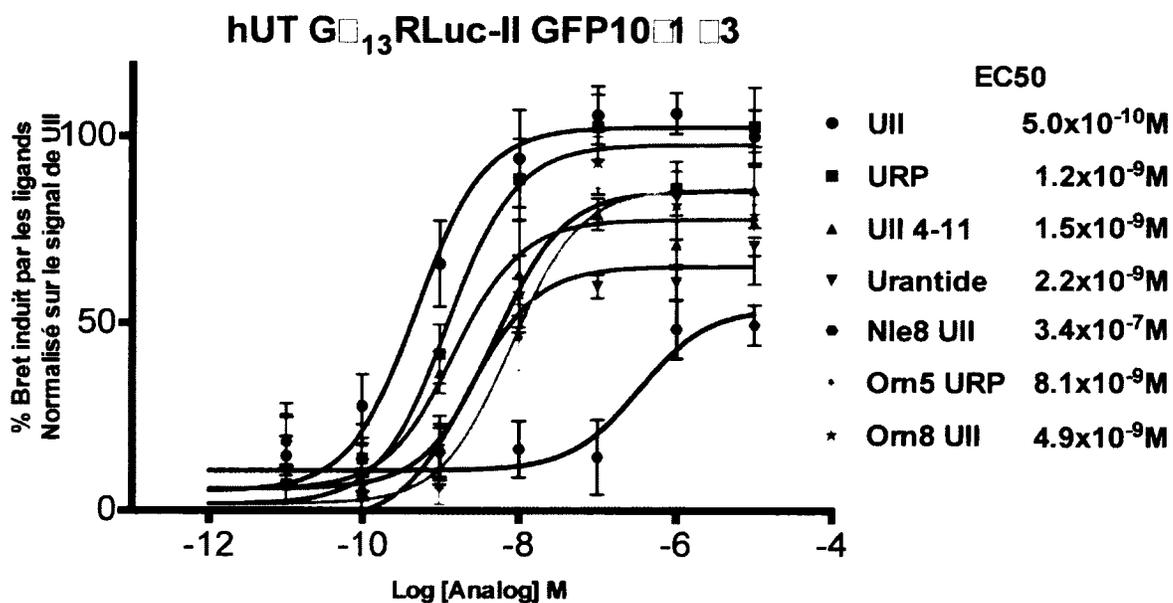


Figure 15 : Activation de la voie G α_{13} par les différents ligands. Changement du ratio de BRET mesuré sur des HEK 293 exprimant le biosenseur G α_{13} RLucII, GFP10 γ_1 , β_3 et le récepteur hUT.

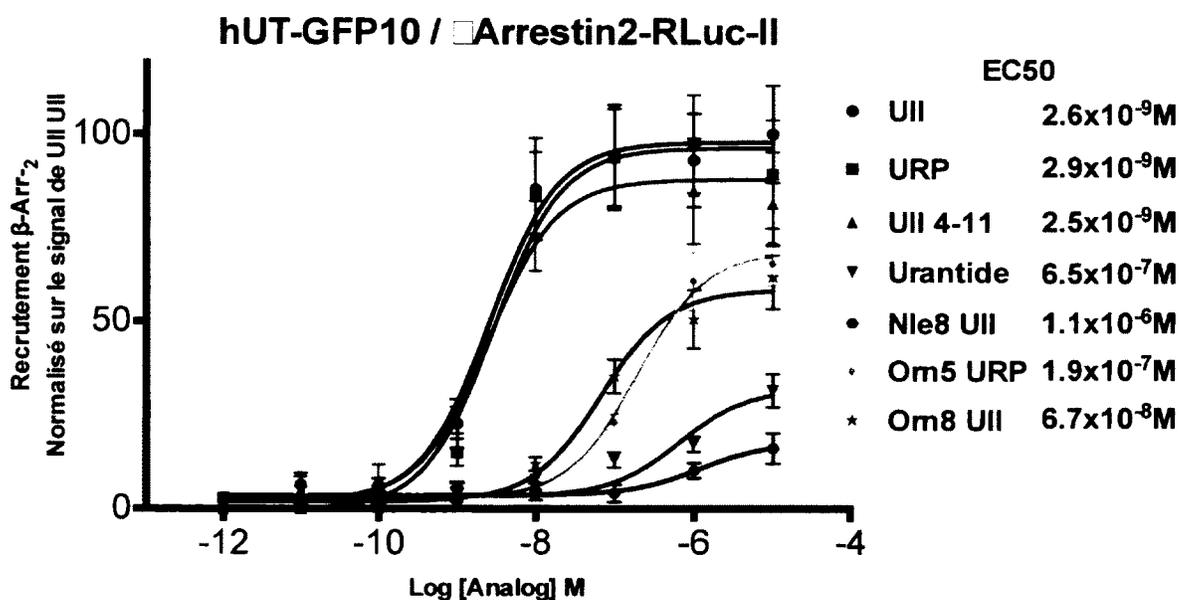


Figure 16 : Recrutement de la β -arrestine-2 par les différents ligands. Changement du ratio de BRET intermoléculaire mesuré sur des HEK 293 exprimant le biosenseur β Arrestin-2-RLucII et le récepteur hUT-GFP10.

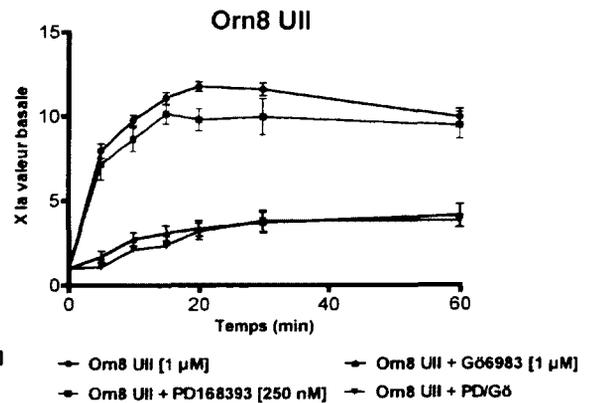
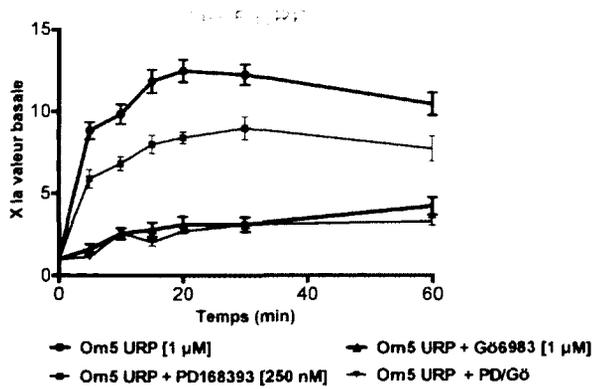
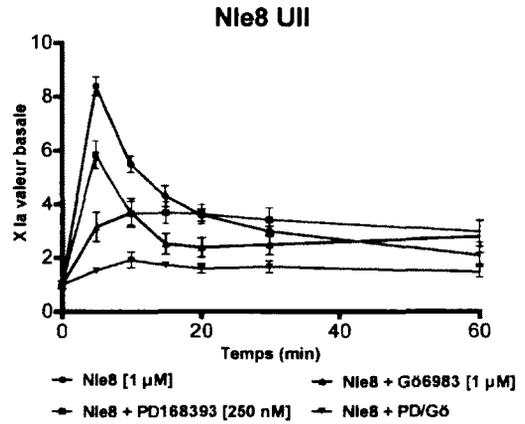
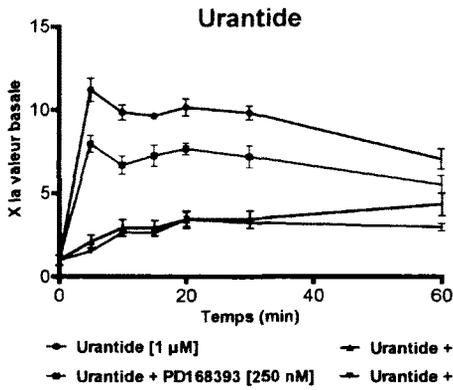
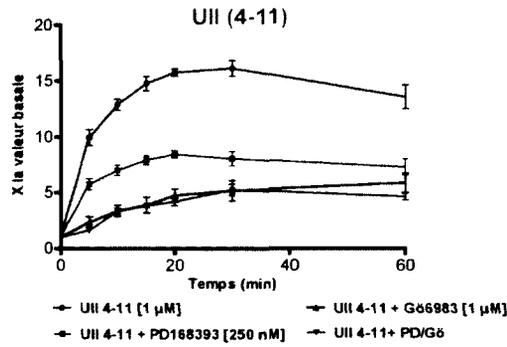
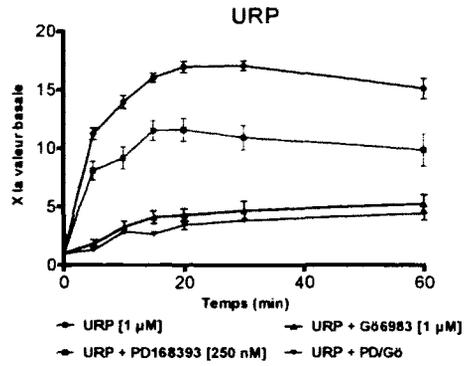
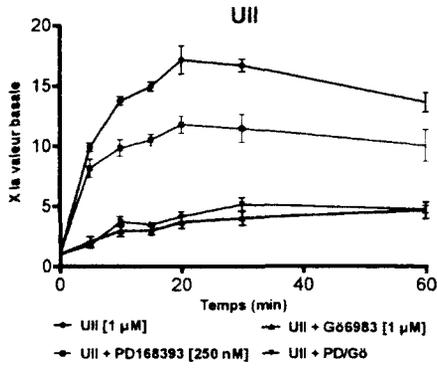


Figure 17 : Cinétique de phosphorylation de ERK1/2 en présence ou non d'inhibiteurs de la PKC et de l'EGFR. Les cellules ont été incubées en présence ou non des inhibiteurs de la PKC et de l'activation de l'EGFR. Une cinétique a ensuite été réalisée avec tous les ligands à une concentration de 1 μ M.

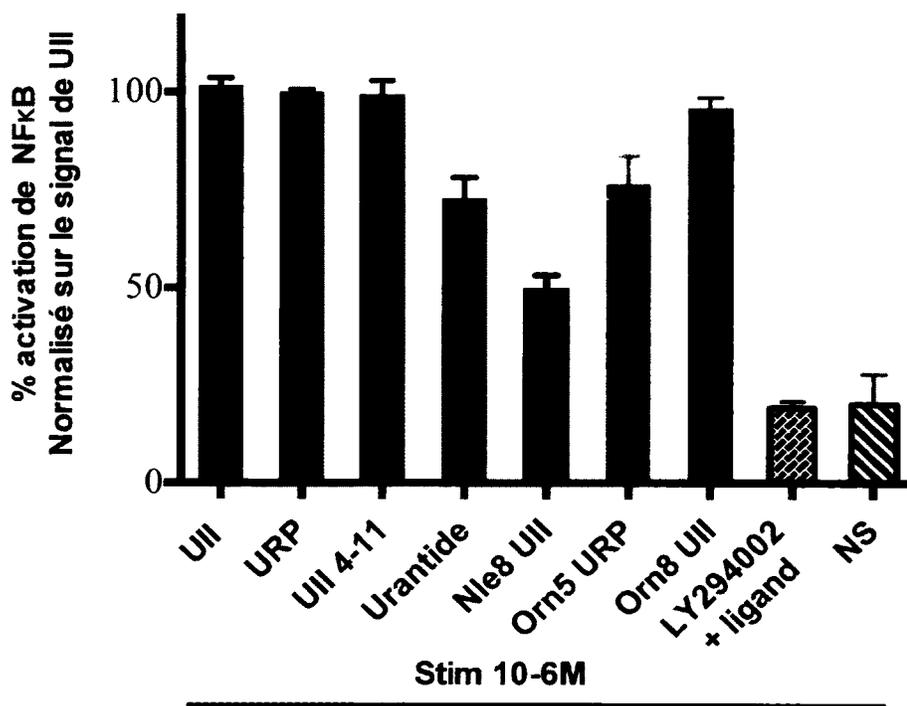


Figure 18 : Capacité des ligands à induire la phosphorylation de NFκB. Tous les ligands ont montré le même profil d'activation que Ull lors de la stimulation en présence du LY294002, un inhibiteur de Akt.

5. Discussion

Les récepteurs couplés aux protéines G sont la plus grande famille de protéines de signalisation du génome humain. Ces protéines transmembranaires sont impliquées dans la détection et la transmission intracellulaire des stimuli provenant de l'extérieur de la cellule, ces signaux pouvant être du type neurotransmetteur, endocrinien, olfactif ou lumineux. En retour, ces récepteurs activeront et contrôleront différents processus physiologiques comme la neurotransmission, le métabolisme cellulaire, la différenciation et la croissance cellulaire, l'inflammation et la réponse immunitaire. Les GPCR sont la cible d'environ 40 % des thérapeutiques pharmacologiques et sont de ce fait une source importante d'opportunités pour la recherche et le développement de médicaments. En décembre 2012, le Prix Nobel de Chimie a été décerné aux Professeurs Robert J. Lefkowitz et Brian K. Kobilka pour leurs travaux sur la structure fonction des GPCR. Leurs travaux des dix dernières années ont permis non seulement d'obtenir des cristaux de GPCR mais également de confirmer l'hypothèse que le changement de conformation suite à la liaison d'un ligand sur son récepteur était fondé.

Les maladies du système cardiovasculaire causent la mort de 17 millions de personnes chaque année selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les nombreux GPCR impliqués dans ce système sont donc des cibles importantes dans le but de mieux comprendre l'implication de chacun d'entre eux ainsi que l'interaction qu'ils peuvent avoir entre eux afin de pouvoir cibler et traiter un plus grand nombre de personnes.

L'UT est impliqué dans cette régulation physiologique cardiovasculaire et il est maintenant établi qu'il intervient dans de nombreuses pathologies. La découverte quoique récente de ce récepteur en fait une cible attirante du fait des nombreuses perspectives qu'il peut apporter ce qui a conduit notre laboratoire à s'intéresser au mode de fonctionnement de ce récepteur et plus particulièrement à sa structure fonction. Une meilleure compréhension des voies de signalisation que peut induire UII ainsi que des déterminants moléculaires nous permettra de concevoir des ligands plus spécifiques et de découvrir un ligand avec un biais sur une voie de signalisation spécifique de ce récepteur.

Pour ce travail, nous avons étudié différentes voies de signalisation à l'aide de ligands peptidiques afin de pouvoir comprendre et caractériser un ligand qui serait biaisé sur une voie de signalisation du UT. Même si des études de structure activité ont déjà été effectuées auparavant par de nombreux laboratoires sur l'importance de chaque acide aminé de UII, ces travaux ont majoritairement tous été conduits sur un modèle murin et uniquement sur la capacité à induire la contraction d'anneaux aortiques. De plus, d'autres études ont montré que malgré leur haut pourcentage d'identité, les récepteurs murin et humain peuvent avoir des différences significatives sur certains ligands comme par exemple avec l'urantide (Camarda et al., 2002a; 2002b; Patacchini et al., 2003). C'est pourquoi, notre analyse porte uniquement sur le récepteur humain et certains ligands de cette étude ont des propriétés différentes de celles décrites dans la littérature.

Nous avons donc étudié sept ligands qui ont tous montré une affinité pour le récepteur. Les deux ligands endogènes UII et URP ont une affinité comparable à celle retrouvée dans la littérature (Behm et al., 2004). De plus, la modification de la longueur de la chaîne latérale n'altère pas la liaison de UII (4-11) et montre même une meilleure affinité de ce ligand pour le récepteur. La partie N-terminale de l'urotensine II n'est donc pas nécessaire pour la liaison du ligand sur le récepteur. Il est également important de remarquer que l'UII (4-11) diffère de l'URP par le premier acide aminé, une alanine qui est apolaire pour un acide aspartique qui est un acide chargé. En revanche, la substitution de la lysine sur l'UII et l'URP en position 8 et 5 respectivement induit un changement de l'IC₅₀ de ces deux ligands. L'affinité pour UII qui était de 3.2 nM passe à 75 nM et l'affinité de 1.1 nM de l'URP est décalée à 23 nM pour l'Orn8 UII. La position 8 de UII qui est située dans la partie la plus conservée de l'UII entre les espèces (résidus 5 et 10 du ligand) montre que sa position aurait un rôle important dans la liaison du ligand au niveau de la pochette de liaison. En effet, les acides aminés Trp7, Lys8 et Tyr9 sont critiques quant à la liaison du ligand et l'induction de la voie calcique. Ces trois acides aminés possèdent en effet des éléments pharmacophoriques de par leurs chaînes latérales hydrophobes (Trp7 et Tyr9) et la charge positive de la lysine 8 (Grieco et al., 2002) (Merlino et al., 2013). Une étude précédemment réalisée dans notre laboratoire avait

démontré par des études de SCAM (*substituted-cysteine accessibility method*) que grâce à l'homologie de séquence entre UII et la somatostatine, la lys8 se fixerait sur le résidu Asp130 (3.32) (transmembrane 3 en position 32 par rapport au résidus le plus conservé) dans la pochette de liaison (Holleran et al., 2007).

L'urantide, un ligand antagoniste sur la contraction d'anneau aortique de rat possède une meilleure affinité (6.7 nM) par rapport à l'Orn5 URP (23nM). En effet, ce ligand regroupe les changements combinés de l'URP, UII (4-11) et Orn5 URP et possède en plus une Penicillamine (Pen) en remplacement de la première cystéine de la chaîne latérale. L'affinité de l'Orn5 URP est diminuée par rapport à celle de l'URP. L'affinité du ligand Pen5 UII (4-11) a été confirmée dans notre laboratoire. Elle a montré que le remplacement de la Cys 5 en Pen 5 ne modifiait pas l'affinité du ligand pour UT. Il semblerait donc que la modification de la chiralité du Trp 7 en D-Trp 7 redonne une meilleure affinité à l'urantide par rapport à l'Orn 5 URP. Par ailleurs, l'équipe de Boivin a démontré en 2006 par des études de biotinylation que l'UUI et l'URP se fixaient au niveau de la deuxième moitié de la boucle extracellulaire 2 et de la première moitié de la boucle extracellulaire 3, mais que l'urantide se fixait uniquement sur la première moitié de la boucle extracellulaire 2 (Boivin et al., 2006). Enfin, le dernier ligand de cette étude qui possède une Norleucine en substitution du résidu lysine en position 8 de l'UUI (Nle8 UUI) montre une affinité 1 000 fois inférieure à celle de l'UUI (3000 nM *versus* 3.2 nM). Cela confirme que les acides aminés situés dans la portion cyclique de UUI et plus particulièrement les résidus 7, 8 et 9 sont importants pour la reconnaissance du site de liaison du ligand sur le récepteur (Flohr et al., 2002). Tous les ligands de cette étude montrent donc une affinité pour le récepteur de l'urotensine II. Ces ligands, avec une caractéristique propre à chacun d'entre eux montrent que la lysine en position 8 de l'UUI, par son groupement amine (Figure 19) est une position importante pour la liaison du ligand à son récepteur. Avec l'ornithine, le raccourcissement de la chaîne carbonée entraîne une légère diminution de l'affinité du ligand. Enfin, le remplacement du groupement amine pour un groupement hydrophobe à la position 8 de l'UUI induit alors une importante diminution telle qu'observée avec la norleucine.

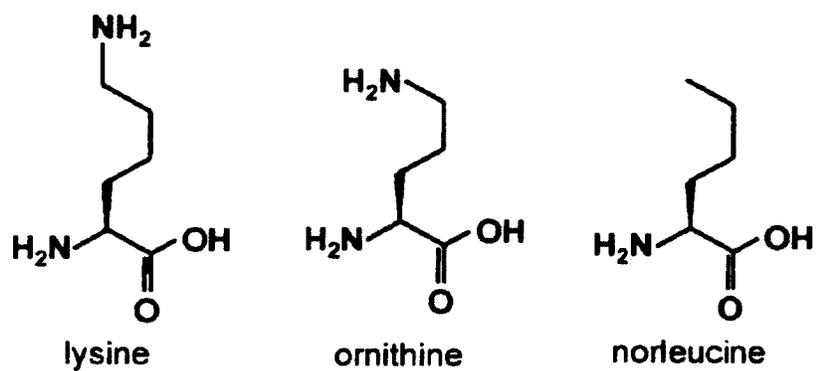


Figure 19: Comparaison de la chaîne latérale de la Lysine, Ornithine et Norleucine.

Suite à cette étude de l'affinité de nos ligands, nous nous sommes intéressés aux différentes voies de signalisations induites par UII. Les voies de signalisation de l'activation calcique, la phosphorylation des Erk1/2 (p-Thr202/Tyr204), l'activation de NfκB p65 (p-Ser536), le recrutement des sous unités Gq, Gi, G13 ainsi que le recrutement de la β-arrestine-2 par Bret ont d'abord été étudiés sur UII et URP puis avec tous les ligands de l'étude.

L'activation de la voie calcique est la principale voie de signalisation du UT. A l'aide du biosenseur BRET Gαq, nous pouvons observer la capacité de chacun des ligands à dissocier le complexe hétérotrimérique, synonyme d'activation de cette voie de signalisation. Les ligands endogènes induisent tous les deux la même dissociation alors que leurs homologues possédant une ornithine à la place de la lysine ont une perte d'efficacité dans l'induction de cette voie de signalisation. Le Nle8 UII est quant à lui capable de dissocier la sous unité Gαq de la sous unité Gγ à seulement à 70 % de celle induite par l'UII. Par ailleurs, son EC₅₀ de 190 nM qui est supérieur à son IC₅₀ laisse penser à la présence de récepteur de réserve. Ces récepteurs ont la capacité d'induire une réponse maximale avec moins de ligands que le récepteur naturel. L'urantide, dans cette expérience est considérée comme un agoniste partiel. Ces résultats montrant l'activation de la sous unité Gαq ont ensuite été mis en relation avec l'étude de l'accumulation du second messenger de cette voie calcique, IP3, mesurée ici en quantifiant l'IP1. Nous observons que tous les ligands par leur liaison sur le récepteur activent cette voie de signalisation. UII, URP et UII (4-11) induisent la production de second messenger de cette voie de signalisation avec le même E_{max} que UII. Cela est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature concernant la partie cyclique du peptide et plus particulièrement l'importance des résidus 7, 8 et 9 pour la liaison et l'activation des voies de signalisation. Une légère diminution d'intensité est tout de même observée entre le ligand UII comparé à l'URP ou à UII (4-11) suggérant que la partie N-terminale est importante pour induire une réponse maximale. En effet cette légère diminution non significative du E_{max} est également retrouvée lorsque l'on a remplacé la lysine par une ornithine sur l'UII et l'URP. Lorsque l'on compare ces deux ligands, l'orn8 UII a un potentiel d'activation supérieure à celui de l'Orn5 URP sur l'activation du second messenger IP3 qui est

quantifié par le test IPone. Le ligand Nle8 UII qui possède une modification de sa position 8 voit son potentiel d'activation supérieur à celui de l'orn5 URP mais seulement à des concentrations de l'ordre du micro-molaire. L'urantide, qui a des modifications dans sa partie cyclique est toujours considéré dans cette expérience comme un agoniste partiel pour l'activation de la voie calcique. Les modifications de ces acides aminés permettent en effet l'activation d'environ 60% de cette voie par rapport à UII.

Avec ces deux séries d'expériences, nous avons étudié une voie de signalisation complète, allant de l'activation de la sous unité $G\alpha_q$ jusqu'à la quantification du second messenger activé par cette sous unité.

La sous unité $G\alpha_q$ induit également l'activation de la protéine Kinase C. Cette dernière va activer la cascade des MAPK. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'activation de cette voie de signalisation en utilisant des inhibiteurs dirigés contre les isoformes α , β , γ , δ , ζ et μ de la PKC et contre l'EGFR. L'activation de cette voie de signalisation montre des profils d'activation différents entre les ligands de cette étude. UII, URP et UII (4-11) montrent une cinétique d'activation similaire avec un pic d'activation à 20 minutes puis une légère diminution dans le temps. En ce qui concerne l'Orn5 URP et l'Orn8 UII, ces ligands montrent le même profil d'activation dans le temps mais induisent un E_{max} à 20 minutes, inférieur au profil des cinétiques des ligands UII et URP. En revanche, la Nle8 UII montre un pic d'activation à 5 minutes, puis une chute brutale de la phosphorylation, pour revenir au niveau basal à 60 minutes. L'urantide, montre également un pic d'activation à 5 minutes, puis une légère baisse de la phosphorylation des ERK1/2 entre 5 et 15 minutes pour ensuite réinduire une activation maximale à 20 minutes pour ensuite diminuer sans revenir à l'état basal au bout d'une heure. Cela suggère un double mécanisme d'activation qui serait plus dissocié que pour les autres ligands de l'étude. Ces mécanismes pourraient être la PKC et la transactivation de l'EGFR.

Cette activation totale peut être dissociée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques rentrant en jeu dans cette activation. En effet, lorsque l'on utilise le Gö6983, nous pouvons observer que la PKC est le médiateur principal de l'activation de la cascade des

MAPK. Toutes les cinétiques ont vu leur profil d'activation être réduit à moins de 5 fois le signal obtenu lors de l'état basal des cellules. Seul le profil de la Nle8 UII a montré une augmentation entre 5 et 10 minutes de stimulation pour ensuite diminuer à 20 minutes, suggérant que la lysine en position 8 est importante pour l'activation de cette voie de signalisation. Par ailleurs, aucune augmentation du niveau de phosphorylation des MAPK ERK1/2 n'a été observée lors des stimulations tardives à 30 et 60 minutes. Enfin, lors de l'utilisation de l'inhibiteur contre l'EGFR, nous avons pu vérifier l'importance de la PKC dans l'activation des MAPK. La phosphorylation de ERK1/2 est pour tous les ligands dépendante de la PKC ainsi que de l'EGFR. Il y a cependant une exception pour l'Orn8 UII. La cinétique d'activation de ce ligand en présence de l'inhibiteur de l'EGFR montre que ce ligand induit un recrutement moins important de l'EGFR pour activer la phosphorylation de ERK1/2. Cette activation passerait uniquement par la PKC.

Enfin, pour la dernière série d'expériences concernant la voie des MAPK ERK1/2, nous avons incubé les deux inhibiteurs en même temps afin d'observer si une activation tardive des MAPK s'opérait suite au recrutement de la β -arrestine. Aucun effet n'a été observé en présence des deux inhibiteurs sur une durée de 60 minutes. Cela est en accord avec les précédents résultats obtenus dans notre laboratoire qui avaient montré sur un autre système que la phosphorylation de ERK1/2 était PKC dépendante dans les premières minutes de stimulation puis EGFR dépendant à 30 minutes. Il a également démontré que l'inhibition de la PKC et l'EGFR induisait une complète abolition de la phosphorylation de ERK1/2 (Proulx et al., 2008). De plus, les arrestines peuvent activer certaines voies de signalisation. Suite à leur recrutement, elles servent de plateforme multifonctionnelle pour le recrutement de nouvelles protéines et sont capables d'induire notamment la cascade d'activation des MAPK. Dans nos expériences, l'importance de la transactivation de l'EGFR, mise en évidence grâce à l'inhibiteur, a montré le rôle qu'il avait dans l'activation des ERK1/2. Mais, lors de l'utilisation de l'inhibiteur de la PKC, aucune activation tardive induite par les arrestines n'a été observée lors de cette cinétique sur 60 minutes, ou alors la faible activation observée avec les deux inhibiteurs serait le résultat du recrutement des β -arrestines. Dans cette expérience, une seule concentration de stimulation a été étudiée. De plus ces expériences ont été conduites sur des HEK

transfectées de manière stable avec le récepteur humain contrairement aux autres études citées précédemment qui avaient utilisées une transfection transitoire du récepteur sur des cellules COS7. Il est possible que dans ce système, l'activation tardive des MAPK par les arrestines ne puisse pas s'exprimer, ou alors que l'utilisation des deux inhibiteurs chimiques masque ce recrutement. L'utilisation de siRNA dirigés contre les β -arrestines 1 et 2 nous permettrait de conclure quant à l'implication de ces arrestines dans l'activation de la cascade des MAPK. Par ailleurs, le remplacement de la lysine de UII et URP par une ornithine montre une diminution de l'activation des MAPK sans changer le profil de la cinétique. En revanche, le remplacement de la lysine en position 8 de UII par une ornithine montre que ce ligand active cette voie de signalisation principalement via la PKC, ne recrutant pas l'EGFR contrairement aux autres ligands de l'étude.

Des expériences utilisant des biosenseurs BRET ont ensuite été réalisées afin d'observer la capacité de chacun de nos ligands à activer certaines sous unités $G\alpha$ ainsi que le recrutement de la β -arrestine-2. La première expérience fut menée en utilisant un biosenseur RlucII- β -arrestine-2 et un récepteur UT-GFP10. Des cinétiques d'activation ont préalablement été réalisées afin de connaître le temps nécessaire à ce recrutement et de conduire par la suite des expériences de courbes doses réponses. Le recrutement des arrestines permet à la cellule de stopper la signalisation et d'internaliser le récepteur. Les ligands ont donc été testés pour leur capacité à recruter la β -arrestine-2 au niveau du récepteur. UII, URP et UII (4-11), malgré leur différence de chaîne latérale induisent tous les trois un recrutement équivalent. En revanche, la modification de la position 8 et 5 de l'UII et URP montre que le remplacement de la lysine par une ornithine diminue de 40 % la capacité de UII et URP à recruter la β -arrestine-2. Cette modification avait également induit une diminution d'efficacité lors de la cinétique d'activation des MAPK. Enfin, les deux derniers ligands de cette étude, la Nle8 UII et l'Urantide montrent une capacité de recrutement de la β -arrestine-2 de 30 % pour l'urantide et de 16 % pour la Nle8 UII par rapport aux recrutements induits par les ligands endogènes. La modification de cette lysine montre cette fois une incapacité dans l'induction d'une voie de signalisation. De plus, nous avons vu précédemment dans la cinétique d'activation de ERK1/2 induite par

la Nle8 UII que son activation était uniquement dépendante de la PKC et qu'aucune activation n'était détectée après 15 minutes de stimulation.

Ces données montrent que le récepteur de l'urotensine II est capable de recruter la β -arrestine-2 comme l'avait montré sur le récepteur de rat l'équipe de Giebing (Giebing et al., 2005). De plus, la lysine présente dans la chaîne latérale des deux ligands endogène est un acide aminé important pour l'induction du recrutement de la β -arrestine-2. Enfin la Nle8 UII est incapable de recruter la β -arrestine-2 dans ce système.

Une expérience complémentaire utilisant la technologie Alpha Screen nous a permis de regarder l'activation de la voie inflammatoire induite par NF κ B. Il existe de nombreux types de cellules inflammatoires dans le micro-environnement tumoral, et les tumeurs associées aux macrophages (TAM) sont une de ces composantes majeures (Shree et al., 2011). Les TAM contribuent au développement tumoral par l'activation de plusieurs mécanismes comme la libération des facteurs angiogéniques, favorisant la prolifération des cellules tumorales, et facilitant ainsi l'invasion tumorale et les métastases. Le récepteur de l'urotensine II est impliqué dans de nombreux phénomènes inflammatoires (Yin, 2012). L'activation de la voie NF κ B a été démontrée comme étant la principale cause de l'augmentation des niveaux d'expression de IL6, TNF α et MMP-9 responsables du développement des TAM dans le cancer du poumon. Ce facteur de transcription est activé suite à la libération par phosphorylation de I κ B, elle-même activée par la protéine Akt et la PI3K. De plus l'induction de la PI3K est induite par les sous unités $\beta\gamma$ et non α des GPCR (Engelman et al., 2006). Dans cette expérience, UII, URP et UII (4-11) ont tous les trois la même capacité d'induire la phosphorylation de ce facteur de transcription. En revanche, la substitution de la lysine par une ornithine montre une plus grande diminution de la phosphorylation sur l'Orn5 URP par rapport à l'Orn8 UII. L'urantide montre le même taux de phosphorylation de NF κ B suggérant que la partie N-terminale est importante pour l'activation de cette voie. Mais le remplacement de cette lysine sur UII par une norleucine montre une diminution plus importante par rapport au signal induit par UII. Par ailleurs, l'utilisation de l'inhibiteur contre l'activation d'Akt montre une complète inhibition de la phosphorylation de NF κ B ce qui

permet de conclure que les sous unités $\beta\gamma$ sont capables de signaler indépendamment de la sous unité α .

Les deux dernières séries d'expériences utilisant la technologie BRET nous ont permis de valider que le récepteur de l'urotensine était capable d'activer les sous unités $G\alpha_i$ et $\beta\gamma$ suite à la liaison du ligand dans sa pochette de liaison. L'équipe d'Hélène Castel a démontré en 2010 que UT était capable d'activer la sous unité $G\alpha_i/o$ sensible au PTX dans des HEK transfectées avec le récepteur humain (Jarry et al., 2010). De manière différente, nous avons regardé l'activation de cette voie de signalisation en utilisant un biosenseur $G\alpha_i$ RlucII associé au couple $\gamma 2$ -GFP10 et $\beta 1$. Suite à la liaison de UII, URP et UII (4-11), le récepteur couplé à la protéine $G\alpha_i$ a été capable de dissocier le complexe heterotrimérique $G\alpha\beta\gamma$. Ce changement de distance entre la RlucII et la GFP10 s'est traduit par une variation du ratio de BRET comme décrit précédemment par l'équipe de Castel. Le remplacement de la lysine de l'UII et URP montre une légère diminution d'activation correspondant à 90% de l'activation maximale induite par UII. Le remplacement de la lysine par une ornithine n'affecte donc pas la capacité du récepteur à signaler via la sous unités $G\alpha_i$. L'urantide qui possède également une ornithine en position 5 est un agoniste partiel sur cette voie de signalisation. Comme montré avec le biosenseur $G\alpha_q$, ce ligand est un agoniste partiel sur le récepteur humain contrairement à ce qui est décrit dans la littérature. Enfin, le remplacement de la lysine de l'UII par une norleucine permet à ce ligand d'activer seulement 43% de la voie G_i .

Enfin, plusieurs études ont montré que le récepteur de l'urotensine II induisait l'activation de la voie RhoA-Rho Kinase et que cette activation contribuait à la contraction, à la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi qu'à la prolifération des muscles lisses vasculaires. L'activation de Rho est généralement associée à la sous unité $G\alpha_{12/13}$ comme montré sur le récepteur CXCR4 (Tan and Martin, 2006) mais il a été également montré que cette activation pouvait être menée via les sous unités $G\alpha_q/11$ pour le récepteur de l'angiotensine II (Barnes, 2004). Aujourd'hui, aucune étude n'a démontré que le récepteur de l'urotensine II était capable de signaler via les sous unités

G α 12/13. A l'aide du biosenseur G α 13 RlucII nous avons montré pour la première fois dans cette étude que UII et URP étaient capables d'activer ce biosenseur avec les couples γ 1-GFP10 et β 3. De plus l'UII (4-11), l'Orn8 UII et l'Orn5 URP ont également montré une activation qui était 20% inférieure à celle des ligands endogènes. Il est à noter que l'UII (4-11) à montrer uniquement dans cette expérience une diminution de son E_{max} . Cela suggère que la partie N-terminale serait importante dans l'activation de cette sous unité. Par ailleurs, l'urantide ainsi que le Nle8 UII agissent comme des agonistes partiels dans l'activation de cette voie de signalisation. L'activation de la voie RhoA est peut être induite via la sous unités G13 comme dans d'autres récepteurs.

6. Conclusion

Dans cette étude, les ligands endogènes de récepteur de l'urotensine-II, UII et URP, ont été modifiés afin d'observer l'importance de certains déterminants moléculaires sur l'activation et la signalisation du récepteur. Les biosenseurs BRET $G\alpha$ nous ont permis d'étudier la capacité du UT à activer ces sous unités pour ensuite induire la voie de signalisation sous-jacente. En effet, trois des quatre grandes sous familles des sous unités alpha ont été regardées et la voie $G\alpha_q$ a été plus particulièrement étudiée en regardant l'activation du messenger secondaire de cette voie ainsi que l'activation de la voie ERK1/2 et le recrutement de la β -arrestine-2. Nous avons vu tout d'abord que la partie N-terminale des ligands qui se fixe au niveau des régions extracellulaires du récepteur n'avait pas d'importance dans la reconnaissance de ce dernier alors que la partie C-terminale, cruciale pour l'activité du peptide est en contact avec le haut des domaines transmembranaires du récepteur. Cette portion montre en effet que la substitution et/ou le changement de la chiralité d'un acide aminé de la chaîne latérale induit un déplacement vers la droite de la courbe d'affinités.

De plus nous avons vu que les ligands endogènes UII et URP activent de manière équivalente toutes ces voies de signalisation sans montrer une activation supérieure sur une voie par rapport à une autre comme a pu le montrer l'équipe de D. Chatenet très récemment (Chatenet et al., 2013). Il est à noter également que nous avons montré pour la première fois à l'aide des biosenseurs BRET que le récepteur humain de l'urotensine était capable d'activer la sous unités $G\alpha_{13}$.

Par ailleurs, l'urantide, un antagoniste du UT sur le récepteur de rat est considéré dans cette étude comme un agoniste partiel pour toutes les voies de signalisation étudiées excepté le recrutement de la β -arrestine-2.

Il est maintenant reconnu que les acides aminés 7, 8 et 9 de la chaîne latérale de l'UII sont importants pour la reconnaissance du ligand et l'activation du récepteur. En effet, cette lysine se retrouve dans la pochette de liaison à proximité de l'Asp 130 au niveau de la troisième partie transmembranaire du récepteur qui est conservé dans de

nombreux GPCR. Cette interaction entre le ligand et le récepteur serait impliquée dans le changement de conformation du récepteur afin de recruter les sous unités α et d'activer les voies de signalisation sous-jacentes. Nous avons démontré, en effet, que la modification de cette lysine en une ornithine ou une norleucine entraîne systématiquement une diminution dans la reconnaissance et l'activation du UT. La lysine serait un déterminant moléculaire important pour l'activation des voies de signalisation du UT. Les nombreuses voies de signalisation étudiées ont montré que cette substitution diminuait le potentiel d'activation de chacun ces ligands.

Parmi ces trois ligands, la Nle8 UII, malgré une stimulation à 1 μ M, a montré une activation PKC dépendante seulement dans la cinétique d'activation de la phosphorylation ERK1/2. Les autres voies étudiées ont par ailleurs toutes montré qu'à cette concentration de ligand, la Nle8 UII avait atteint son plateau d'activation.

Il est à noter également, que lors de l'étude du recrutement de la β -arrestine-2, ce ligand a de plus montré une très faible capacité de recrutement, suggérant un biais de signalisation potentiel sur la voie de recrutement des β -arrestines.

Cette étude a prouvé que la longueur et la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé présent en position 8 de UII ou 5 de URP est un déterminant moléculaire important dans l'activation du récepteur de l'urotensine II.

Des expériences complémentaires sur un récepteur où l'Asp130 du TDMIII serait muté ainsi que l'étude de nouveaux ligands sur lesquels la lysine serait substituée par un autre acide aminé avec une chaîne latérale de nature différente, nous permettraient de mieux comprendre l'implication de cette position dans l'activation du UT. De l'activation des MAPK avec l'utilisation de siRNA dirigés contre les β -arrestine-1 et 2 nous permettrait de mieux comprendre leur rôle dans l'activation de cette voie.

Cette étude a montré que UT est capable d'activer différentes voies de signalisation. La substitution de la lysine de UII par une norleucine entraîne une diminution de l'affinité pour cet analogue qui agit malgré tout même comme un agoniste

complet sur la voie Gq mais active faiblement le recrutement de la β -arrestine-2. Cette différence majeure dans l'activation du recrutement de la β -arrestine-2 n'a pas été retrouvée avec les autres analogues possédant une ornithine substituée à la lysine. La substitution de la lysine par un autre acide aminé avec de nouvelles propriétés chimiques pourrait amener à la découverte d'un ligand biaisé de haute affinité agissant sur le système urotensinergique.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Richard Leduc pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour tout ce que tu m'as appris, notamment l'importance des nombreux contrôles qui permettent d'analyser de manière plus approfondis les résultats obtenus. Merci de m'avoir montré que la Maîtrise correspondait mieux au profil de carrière auquel je me destine. Je n'oublierai pas ces conseils qui me seront utiles pour le reste de ma vie professionnelle.

Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leurs soutiens ainsi que les nombreuses discussions que nous avons pu partager ensemble. Vous m'avez beaucoup appris par vos nombreuses connaissances scientifiques, et m'avez réussi à m'initier à vie à la culture du hockey, bien joué les gars.

Merci à Antoine, Brian, Jean-Michel, François, Philip, Xavier, Élie, sans oublier Éloïc et Dany.

Merci aux Docteurs Jean-Bernard Denault et Pédro Miguel Geraldès d'avoir bien voulu évaluer ce mémoire.

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien durant ces trois années, certains moments ne furent pas faciles, leurs conseils m'ont beaucoup apporté. Je remercie également mes deux grands-mères qui se sont mises à internet pour suivre ma vie ici, même si ça ne fonctionnait pas toujours, ce fut agréable de les voir.

7. Bibliographie

- Ahn, S., Shenoy, S.K., Wei, H., and Lefkowitz, R.J. (2004). Differential Kinetic and Spatial Patterns of β -Arrestin and G Protein-mediated ERK Activation by the Angiotensin II Receptor. *J Biol Chem* 279, 35518–35525.
- Barnes, W.G. (2004). β -Arrestin 1 and G q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following Receptor Stimulation. *J Biol Chem* 280, 8041–8050.
- Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2005). ScienceDirect.com - Cell - An Akt/ β -Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. *Cell* 122, 261–273.
- Behm, D.J., Herold, C.L., Camarda, V., Aiyar, N.V., and Douglas, S.A. (2004). Differential agonistic and antagonistic effects of the urotensin-II ligand SB-710411 at rodent and primate UT receptors. *Eur J Pharmacol* 492, 113–116.
- Bilodeau, J., Désilets, A., MacDuff, F.-O., St-Pierre, C., Barbar, E., Leduc, R., and Lavigne, P. (2011). ScienceDirect.com - FEBS Letters - Influence of Ca²⁺ and pH on the folding of the prourotesin II precursor.
- Boivin, S., Guilhaudis, L., Milazzo, I., Oulyadi, H., Davoust, D., and Fournier, A. (2006). Characterization of Urotensin-II Receptor Structural Domains Involved in the Recognition of U-II, URP, and Urantide †. *Biochemistry* 45, 5993–6002.
- Boucard, A.A., Sauvé, S.S., Guillemette, G., Escher, E., and Leduc, R. (2003). Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem J* 370, 829–838.
- Bousette, N., Patel, L., Douglas, S.A., Ohlstein, E.H., and Giaid, A. (2004). Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 176, 117–123.
- Brkovic, A. (2003). Functional and Binding Characterizations of Urotensin II-Related Peptides in Human and Rat Urotensin II-Receptor Assay. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 1200–1209.
- Camarda, V., Guerrini, R., Kostenis, E., Rizzi, A., Calo, G., Hattenberger, A., Zucchini, M., Salvadori, S., and Regoli, D. (2002a). A new ligand for the urotensin II receptor. *Br J Pharmacol* 137, 311–314.
- Camarda, V., Rizzi, A., Calo, G., Gendron, G., Perron, S.I., Kostenis, E., Zamboni, P., Mascoli, F., and Regoli, D. (2002b). Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365, 141–149.

- Camarda, V., Song, W., Marzola, E., Spagnol, M., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Thompson, J.P., Rowbotham, D.J., Behm, D.J., et al. (2004). Urotensin-II mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *Eur J Pharmacol* 498, 83–86.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.
- Chatenet, D., Létourneau, M., Nguyen, Q., Doan, N., Dupuis, J., and Fournier, A. (2013). Discovery of new antagonists aimed at discriminating UII and URP-mediated biological activities: insight into UII and URP receptor activation. *Br J Pharmacol* 168, 807–821.
- Clozel, M. (2005). The Urotensin-II Receptor Antagonist Palosuran Improves Pancreatic and Renal Function in Diabetic Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316, 1115–1121.
- Croston, G.E., Olsson, R., Currier, E.A., Burstein, E.S., Weiner, D., Nash, N., Severance, D., Allenmark, S.G., Thunberg, L., Ma, J.-N., et al. (2002). Discovery of the first nonpeptide agonist of the GPR14/urotensin-II receptor: 3-(4-chlorophenyl)-3-(2-(dimethylamino)ethyl)isochroman-1-one (AC-7954). *J Med Chem* 45, 4950–4953.
- Davis, R.J. (2000). Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Sciencedirect.com* 1–14.
- DeWire, S.M., Kim, J., Whalen, E.J., Ahn, S., Chen, M., and Lefkowitz, R.J. (2008). Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem* 283, 10611–10620.
- Diebold, I., Petry, A., Sabrane, K., Djordjevic, T., Hess, J., and Gorlach, A. (2012). The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *J Cell Sci* 125, 956–964.
- Douglas, S.A., and Ohlstein, E.H. (2000). Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 10, 229–237.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606–619.
- Flohr, S., Kurz, M., Kostenis, E., Brkovich, A., Fournier, A., and Klabunde, T. (2002). Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J Med Chem* 45, 1799–1805.
- Fournier, D.C.A.A. (2012). Update on the urotensinergic system: new trends in receptor localization, activation, and drug design. 1–13.

- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharm. Aspetjournals.org*.
- Galandrin, S., and Bouvier, M. (2006a). Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* 70, 1575–1584.
- Galandrin, S., and Bouvier, M. (2006b). Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* 70, 1575–1584.
- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., and Pei, G. (2004). Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol. Cell* 14, 303–317.
- Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21, 90–113.
- Giebing, G., Tölle, M., Jürgensen, J., Eichhorst, J., Furkert, J., Beyermann, M., Neuschäfer-Rube, F., Rosenthal, W., Zidek, W., van der Giet, M., et al. (2005). Arrestin-Independent Internalization and Recycling of the Urotensin Receptor Contribute to Long-Lasting Urotensin II-Mediated Vasoconstriction. *Circ Res* 97, 707–715.
- Grieco, P., Carotenuto, A., Campiglia, P., Zampelli, E., Patacchini, R., Maggi, C.A., Novellino, E., and Rovero, P. (2002). A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *J Med Chem* 45, 4391–4394.
- Guidolin, D., Albertin, G., and Ribatti, D. (2010a). Urotensin-II as an angiogenic factor. *Peptides* 31, 1219–1224.
- Guidolin, D., Albertin, G., Oselladore, B., Sorato, E., Rebuffat, P., Mascarini, A., and Ribatti, D. (2010b). The pro-angiogenic activity of urotensin-II on human vascular endothelial cells involves ERK1/2 and PI3K signaling pathways. *Regul Pept* 162, 26–32.
- Gurevich, E.V., Tesmer, J.J.G., Mushegian, A., and Gurevich, V.V. (2012). G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther.* 133, 40–69.
- Holleran, B.J., Beaulieu, M.-E., Proulx, C.D., Lavigne, P., Escher, E., and Leduc, R. (2007). Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem J* 402, 51–61.
- Iglewski, M., and Grant, S.R. (2010). Urotensin II-induced signaling involved in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vasc Health Risk Manag* 6, 723–734.

- Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C., Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., Leprince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M.-C., et al. (2010). The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J* 428, 113–124.
- Johns, D.G., Ao, Z., Naselsky, D., Herold, C.L., Maniscalco, K., Sarov-Blat, L., Steplewski, K., Aiyar, N., and Douglas, S.A. (2004). Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370, 238–250.
- Johnson, G.L. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 298, 1911–1912.
- Kenakin, T., Kenakin, T., Christopoulos, A., and Christopoulos, A. (2012). Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. 1–12.
- Kniazeff, J., Prézeau, L., Rondard, P., Pin, J.-P., and Goudet, C. (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol. Ther.* 130, 9–25.
- Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 63, 9–18.
- Krum, H., and Kemp, W. (2007). Therapeutic Potential of Blockade of the Urotensin II System in Systemic Hypertension. *Current Hypertension Reports* 1–6.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Leprince, J., Chatenet, D., Dubessy, C., Fournier, A., Pfeiffer, B., Scalbert, E., Renard, P., Pacaud, P., Oulyadi, H., Ségalas-Milazzo, I., et al. (2008). Structure-activity relationships of urotensin II and URP. *Peptides* 29, 658–673.
- Liu, J.-C., Chen, C.-H., Chen, J.-J., and Cheng, T.-H. (2009). Urotensin II induces rat cardiomyocyte hypertrophy via the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol Pharmacol* 76, 1186–1195.
- Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455–465.
- Ma, L., and Pei, G. (2007). Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci* 120, 213–218.
- Maguire, J.J., Kuc, R.E., Wiley, K.E., Klein, M.J., and Davenport, A.P. (2004). Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to

large coronary arteries. *Peptides* 25, 1767–1774.

Malagon, M.M., Molina, M., Gahete, M.D., Duran-Prado, M., Martinez-Fuentes, A.J., Alcain, F.J., Tonon, M.-C., Leprince, J., Vaudry, H., Castaño, J.P., et al. (2008). Urotensin II and urotensin II-related peptide activate somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Peptides* 29, 711–720.

marchese, A., heiber, M., nguyen, T., h, H., O'Dowd, B., and docherty, J.M. (1995). Cloning and Chromosomal Mapping of Three Novel Genes, GPR9, GPR10, and GPR14, Encoding Receptors Related to Interleukin 8, Neuropeptide Y, and Somatostatin Receptors. *Genomics* 29, 335–344.

Maryanoff, B.E., and Kinney, W.A. (2010). Urotensin-II receptor modulators as potential drugs. *J Med Chem* 53, 2695–2708.

Meloche, S., and Pouysségur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227–3239.

Merlino, F., Di Maro, S., Munaim Yousif, A., Caraglia, M., and Grieco, P. (2013). Urotensin-II Ligands: An Overview from Peptide to Nonpeptide Structures. *Journal of Amino Acids* 2013, 1–15.

Mori, M., Sugo, T., Abe, M., Shimomura, Y., Kurihara, M., Kitada, C., Kikuchi, K., Shintani, Y., Kurokawa, T., Onda, H., et al. (1999). Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* 265, 123–129.

Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60–71.

Onan, D., Hannan, R.D., and Thomas, W.G. (2004a). Urotensin II: the old kid in town. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 15, 175–182.

Onan, D., Pipolo, L., Yang, E., Hannan, R.D., and Thomas, W.G. (2004b). Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol. Endocrinol.* 18, 2344–2354.

Papadopoulos, P., Bousette, N., and Giaid, A. (2008). Urotensin-II and cardiovascular remodeling. *Peptides* 29, 764–769.

Patacchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S., Grieco, P., Novellino, E., Rovero, P., and Maggi, C.A. (2003). Urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* 140, 1155–1158.

Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T.B., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. Edrv.Endojournals.org.

Premont, R.T., Macrae, A.D., Aparicio, S.A., Kendall, H.E., Welch, J.E., and Lefkowitz, R.J. (1999). The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation. *J Biol Chem* 274, 29381–29389.

Proulx, C.D., Holleran, B.J., Boucard, A.A., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2008). Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol Pharmacol* 74, 552–561.

Rajagopal, S., Ahn, S., Rominger, D.H., Gowen-MacDonald, W., Lam, C.M., DeWire, S.M., Violin, J.D., and Lefkowitz, R.J. (2011). Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol* 80, 367–377.

Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012a). Molecular Mechanism of β -Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 179–197.

Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012b). Molecular Mechanism of β -Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 179–197.

Ross, B., McKendy, K., and Giaid, A. (2010). Role of urotensin II in health and disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1156–R1172.

Sauzeau, V., Le Mellionnec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P., and Loirand, G. (2001). Human Urotensin II-Induced Contraction and Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation Are Mediated by RhoA and Rho-Kinase. *Circ Res* 88, 1102–1104.

Segain, J.-P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Bl ti re, D., Loirand, G., and Pacaud, P. (2007). Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J. Immunol.* 179, 901–909.

Seifert, R., and Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 381–416.

Shree, T., Olson, O.C., Elie, B.T., Kester, J.C., Garfall, A.L., Simpson, K., Bell-McGuinn, K.M., Zabor, E.C., Brogi, E., and Joyce, J.A. (2011). Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes & Development* 25, 2465–2479.

Silvestre, R.A., Egido, E.M., Hernandez, R., Leprince, J., Chatenet, D., Tollemer, H., Chartrel, N., Vaudry, H., and Marco, J. (2004). Urotensin-II is present in pancreatic extracts and inhibits insulin release in the perfused rat pancreas.

Sugo, T., Murakami, Y., Shimomura, Y., Harada, M., Abe, M., Ishibashi, Y., Kitada, C., Miyajima, N., Suzuki, N., Mori, M., et al. (2003). Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys*

Res Commun 310, 860–868.

Suguro, T., Watanabe, T., Ban, Y., Kodate, S., Misaki, A., Hirano, T., Miyazaki, A., and Adachi, M. (2007). Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 20, 211–217.

Tan, W., and Martin, D. (2006). The Galpha13 Rho signaling axis is required for SDF-1 induced migration through CXCR4. 1–8.

Tsao, P., Cao, T., and Zastrow, von, M. (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 91–96.

Tsoukas, P., Kane, É., and Giaid, A. (2011). Potential Clinical Implications of the Urotensin II Receptor Antagonists. *Front. Pharmacol.* 2, 1–11.

Vaudry, H., Do Rego, J.-C., Le Mevel, J.-C., Chatenet, D., Tostivint, H., Fournier, A., Tonon, M.-C., Pelletier, G., Conlon, J.M., and Leprince, J. (2010). Urotensin II, from fish to human. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1200, 53–66.

Violin, J.D., DeWire, S.M., Yamashita, D., Rominger, D.H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E.J., Gowen, M., and Lark, M.W. (2010). Selectively Engaging β -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *Jpet.Aspetjournals.org*.

Violin, J.D., Soergel, D.G., Boerrigter, G., Burnett, J.C., Jr., and Lark, M.W. (2013). GPCR biased ligands as novel heart failure therapeutics. *Trends Cardiovasc Med*.

Watanabe, T., Kanome, T., Miyazaki, A., and Katagiri, T. (2006). Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res* 29, 375–387.

Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2003). Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 10782–10787.

Whalen, E.J., Rajagopal, S., and Lefkowitz, R.J. (2011). Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med* 17, 126–139.

Wortzel, I., and Seger, R. (2012). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Nippon Rinsho* 70 Suppl 8, 195–209.

Xiao, K., McClatchy, D.B., Shukla, A.K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S.K., Yates, J.R., and Lefkowitz, R.J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12011–12016.

Yang, W.L. (1996). Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-linked Dimer.

Journal of Biological Chemistry 271, 28612–28616.

Yin, X.-X. (2012). Urotensin II contributes to the formation of lung adenocarcinoma inflammatory microenvironment through the NF- κ B pathway in tumor-bearing nude mice. *Oncol Lett* 4, 1259.

You, Z., Genest, J., Barrette, P.-O., hafiane, A., Behm, D.J., D'Orleans-Juste, P., and schwertani, A.G. (2012). Genetic and Pharmacological Manipulation of Urotensin II Ameliorate the Metabolic and Atherosclerosis Sequale in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.

Zhang, Y., Li, J., Cao, J., Chen, J., Yang, J., Zhang, Z., Du, J., and Tang, C. (2002). Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin II and its functional receptors in rat myocardium. *Heart Vessels* 16, 64–68.