

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
INRS – Institut Armand-Frappier

Pharmacologie intracrine du système urotensinergique

Par
Jessyca Pitt

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Pr Cathy Vaillancourt INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Pr Steve Bourgault Département de chimie Université du Québec à Montréal
Directeur de recherche	Pr Alain Fournier INRS – Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Pr David Chatenet INRS – Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le professeur Fournier de m'avoir accueillie dans le Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides après mon premier stage à l'Institut. Malgré ses tâches administratives, il a su s'impliquer dans mon projet et trouver le temps d'être présent.

J'aimerais aussi remercier le professeur Chatenet et Myriam Létourneau pour m'avoir initiée à toutes les techniques de laboratoire. Vous m'avez aidée à vaincre la « terrible » synthèse peptidique alors que je ne croyais pas y réussir. Merci d'avoir été patients et de m'avoir « endurée » pendant ces deux années.

Merci à mes collègues de laboratoire, Asma, Anh, Duc, Mai, Nhung et Thérèse pour tous vos précieux conseils. Votre appui inconditionnel m'a permis de passer à travers la maîtrise. Un merci tout spécial à Asma pour nos *lab meetings* du vendredi et à Nhung pour m'avoir comblée de nombreuses fois avec ses bons plats et pour m'avoir appris quelques expressions gentilles et... « moins gentilles » en vietnamien.

Un gros merci à mes parents et mes beaux-parents qui m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise. Merci maman d'avoir toujours répondu au téléphone et d'avoir toujours écouté mes innombrables états d'âme. Merci papa de toujours trouver les mots qui me font rire et qui me redonnent du courage pour continuer.

Un merci tout spécial à Isabelle, ma grande sœur, qui a corrigé, à n'importe quelle heure du jour, mon mémoire. Tes conseils et ta belle énergie ont su me donner la force de terminer ce document.

Le dernier remerciement (et non le moindre) est destiné à Maxime. À chaque fois que je me décourageais, tu as tendu l'oreille (ou tu m'as tendue une bière !). Merci d'être un pilier si important dans ma vie et de me soutenir constamment, dans tous mes rêves et projets. Je sais que ce fut aussi une aventure pour toi et qu'elle nous a rapprochés. Sache que sans toi, je n'y serais pas arrivée.

Merci à la Fondation Armand-Frappier pour les bourses d'études.

RÉSUMÉ

L'urotensine II humaine (UII_h), un peptide de 11 acides aminés, est identifiée à ce jour comme le plus puissant vasoconstricteur. Son peptide paralogue, l'*urotensin II-related peptide* (URP), est formé de huit résidus dont sept d'entre eux sont identiques à ceux retrouvés dans l'urotensine II. L'UII et l'URP se lient à un seul et même récepteur : le GPR14 ou UT. Ces trois éléments, composant le système urotensinergique, sont présents chez plusieurs espèces de poissons et d'amphibiens, de même que chez les mammifères. Leur transcrite est retrouvé chez l'homme et le rat dans presque tous les organes, particulièrement au niveau du système nerveux central et du système cardiovasculaire. Cependant, l'expression de chaque élément de ce système varie l'un par rapport à l'autre et ce, d'un organe à l'autre. De plus, des études récentes ont démontré la présence du récepteur UT au niveau du noyau de certains types cellulaires dont les cardiomyocytes. Cette découverte a permis d'observer l'existence d'une fonction intranucléaire pour ce système et de réorienter conséquemment l'appréciation globale de son rôle physiologique.

À la lumière de ces informations, le but de ce travail a été d'étudier le système urotensinergique nucléaire. Pour ce faire, nous avons d'abord synthétisé les peptides concernés. En second lieu, nous avons sélectionné un modèle cellulaire de cardiomyocytes de rat ainsi qu'un modèle *ex vivo* de cœur de rat. Nous avons vérifié dans ces modèles la présence du récepteur UT dans la cellule totale, ainsi qu'au noyau, par l'utilisation de l'immunobuvardage de type Western. Nous nous sommes par la suite intéressés à identifier, au moyen d'inhibiteurs spécifiques, des voies de signalisation intranucléaire impliquées dans l'activation du récepteur de l'urotensine II. Nous avons également utilisé la méthode d'initiation de la transcription pour vérifier si les récepteurs nucléaires sont fonctionnels et finalement, nous avons amorcé une étude de l'activation du calcium nucléaire sur des cellules intactes à l'aide d'un peptide cagé.

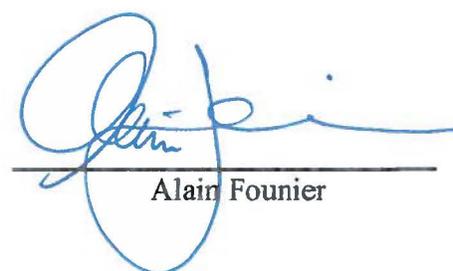
Dans un premier temps, les résultats obtenus lors de la production des peptides montrent que la synthèse peptidique a été satisfaisante. De plus, les immunobuvardages de type Western ont montré la présence du récepteur dans la cellule et au noyau sur les modèles d'étude sélectionnés.

Aussi, les tests d'initiation de la transcription ont provoqué sur les deux modèles une forte amorce de la transcription d'ARN messenger avec l'urotensine II, alors qu'une élévation moins importante a été observée avec l'URP. Finalement, à l'aide de molécules inhibitrices, nous avons pu démontrer l'implication de voies de signalisation majeures dans les cellules.

Pour conclure, le travail effectué a apporté des éclaircissements sur la pharmacologie du système urotensinergique. Le fait de constater une différence entre les réponses obtenues par les deux peptides supporte l'hypothèse qu'ils ont la capacité de médier des effets physiologiques distincts. De plus, la connaissance d'un fonctionnement de nature intracrine, impliquant diverses voies de signalisation, apporte de nouveaux éléments pour établir la pharmacologie du système urotensinergique et développer ultimement des dérivés affichant des propriétés thérapeutiques.



Jessyca Pitt



Alain Fournier

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION.....	1
1.1	Historique.....	1
1.2	UII et URP : structure et localisation.....	4
1.2.1	<i>Structure de l'UII.....</i>	4
1.2.2	<i>Structure de l'URP.....</i>	7
1.2.3	<i>Localisation des peptides.....</i>	8
1.3	Le récepteur UT : structure et localisation.....	11
1.3.1	<i>Récepteurs couplés aux protéines G.....</i>	11
1.3.2	<i>Structure du récepteur UT.....</i>	12
1.3.3	<i>Localisation du récepteur UT.....</i>	14
1.4	Mécanismes intracrines.....	17
1.4.1	<i>Récepteurs nucléaires.....</i>	17
1.4.2	<i>Signalisation intracrine.....</i>	20
1.5	Voies de signalisation de UT.....	23
1.5.1	<i>Signalisation intracellulaire.....</i>	23
1.5.2	<i>Signalisation intranucléaire.....</i>	26
1.6	Actions cardiovasculaires du système urotensinergique.....	27
1.6.1	<i>Effets neurologiques et comportementaux.....</i>	27
1.6.2	<i>Effets sur le coeur.....</i>	28
1.6.3	<i>Effets sur les vaisseaux sanguins.....</i>	28
1.7	Pathologies associées au système urotensinergique.....	32
1.7.1	<i>Insuffisance cardiaque.....</i>	32
1.7.2	<i>Hypertension.....</i>	33
1.7.3	<i>Athérosclérose et infarctus myocardial.....</i>	33
1.7.4	<i>Hypertrophie.....</i>	35
1.7.5	<i>Cardioprotection.....</i>	35
1.8	Objectifs de la recherche.....	36

2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	40
2.1	Synthèse des peptides du système urotensinergique.....	40
2.2	Présence des récepteurs UT dans la lignée H9C2 et dans les cellules de cœur de rat... 47	
2.2.1	<i>Modèles d'étude.....</i>	47
2.2.2	<i>Immunobuvardage de type Western.....</i>	49
2.3	Identification des voies de signalisation activées par le récepteur nucléaire de l'urotensine II et de l'URP.....	55
2.3.1	<i>Initiation de la transcription.....</i>	55
2.3.2	<i>Initiation de la transcription en présence d'inhibiteurs des voies de signalisation.....</i>	57
2.4	Analyses statistiques	58
3	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	59
3.1	Synthèse des peptides du système urotensinergique.....	59
3.2	Présence des récepteurs UT dans la lignée H9C2 et dans les cellules de cœur de rat... 63	
3.3	Identification des voies de signalisation activées par le récepteur nucléaire de l'urotensine II et de l'URP.....	66
4	CONCLUSION.....	72
5	PROJETS FUTURS.....	75
5.1	Activation du calcium au noyau suite à la liaison de l'UII introduite dans la cellule par l'utilisation de peptides cagés.....	75
5.2	Autres perspectives.....	77
6	RÉRÉRENCES.....	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Isoforme de l'urotensine II et de l'URP.....	6
Tableau II : Distribution des ARNm du récepteur UT dans le système cardiovasculaire humain.....	15
Tableau III : Distribution des ARNm du récepteur UT dans le système cardiovasculaire du rat.....	16
Tableau IV : Protocole de synthèse en chimie Fmoc.....	42
Tableau V : Protocole de synthèse en chimie Boc.....	44
Tableau VI : Masses et pureté des peptides synthétiques.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'urophyse du poisson téléostéen.....	2
Figure 2 : Précurseurs de l'UII <i>h</i>	5
Figure 3 : Distribution des ARNm de la prépro-UII <i>h</i> (en orange) et du prépro-URP (en bleu)	7
Figure 4 : Distribution des ARNm de la prépro-UII <i>h</i> dans le SNC	9
Figure 5 : Distribution des ARNm de la prépro-UII <i>r</i> (en orange) et du prépro-URP (en bleu)	10
Figure 6 : Structure générale des récepteurs couplés aux protéines G.....	11
Figure 7 : Structure du récepteur UT.....	13
Figure 8 : Signalisation intracellulaire du système urotensinergique.....	21
Figure 9 : Voies de signalisation dans les CMVL et les cellules endothéliales.....	24
Figure 10 : Présence de UT dans le noyau de cellules cardiaques de rat.....	36
Figure 11 : Voies potentielles de signalisation intranucléaire de UT	37
Figure 12 : Cellules H9C2.....	47
Figure 13 : Montage du « Sandwich ».....	52
Figure 14 : Séparation des couches nucléaires.....	56
Figure 15 : CLHP analytique de UII <i>r</i>	60
Figure 16 : Spectre de masse de UII <i>r</i>	60
Figure 17 : CLHP analytique de UII <i>h</i>	61
Figure 18 : Spectre de masse de UII <i>h</i>	61
Figure 19 : CLHP analytique de URP.....	62
Figure 20 : Spectre de masse de URP.....	62
Figure 21 : Immunobuvardage des H9C2 pour le récepteur UT.....	63
Figure 22 : Présence de la nucléoporeine 62 à la membrane cellulaire et nucléaire.....	64
Figure 23 : Présence de la cavéoline 3 uniquement dans l'échantillon total.....	64
Figure 24 : Présence du cytochrome c uniquement dans l'échantillon total.....	64
Figure 25 : Effet de l'UII <i>r</i> et de l'URP sur la transcription d'ARN des noyaux isolés des H9C2.....	66
Figure 26 : Effet de l'UII <i>r</i> et de l'URP sur la transcription d'ARN des noyaux isolés des cellules de cœur de rat...	67
Figure 27 : Effet d'inhibiteurs de voies de signalisation, seuls ou en présence d'UII <i>r</i> , sur la transcription des ARN dans des noyaux de cellules de cœur de rat.....	68
Figure 28 : CLHP analytique de [Tyr(DMNB) ⁹]UII <i>h</i>	76
Figure 29 : Spectre de masse de [Tyr(DMNB) ⁹]UII <i>h</i>	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
AC	Adénylyl cyclase
ACAT-1	Acétyl-CoA acétyltransférase-1
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANG-II	Angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT	Récepteur de l'angiotensine II
BDC	Brut de clivage
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CREB	<i>C-AMP Response Element-binding</i>
CLHP-PI	Chromatographie en phase liquide à haute performance – phase inverse
CMVL	Cellules musculaires vasculaires lisses
DAG	Diacylglycérol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ERK	Kinase extracellulaire <i>signal-regulated</i>
ET	Récepteur de l'endothéline-1
ET-1	Endothéline-1
FHDE	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
ICV	Intracérébroventriculaire
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate

IV	Intraveineux
LDL	Lipoprotéines de basse densité
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MAPK	Kinase <i>mitogen-activated protein</i>
MLC	Chaîne légère de la myosine
MLCK	Kinase des chaînes légères de la myosine
MMP-1	Métalloprotéinase de la matrice-1
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NTP	Nucléotide triphosphates
ON	Oxyde nitrique
ONS	Oxyde nitrique synthase
PA	Pression artérielle
Pb	Paire de bases
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PGE2	Prostaglandines E2
PGI2	Prostacycline
PIP	Polyphosphoinositides
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique

RFCE	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ROCK	Kinase de la protéine Rho
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SENR	<i>Sensory epithelium neuropeptide-like receptor</i>
SLN	Signal de localisation nucléaire
SNC	Système nerveux central
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
SU	Système urotensinergique
TIS	Triisopropylsilane
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
U _{II}	Urotensine II
U _{IIg}	Urotensine II de gobie
U _{IIh}	Urotensine II humaine
U _{IIr}	Urotensine II de rat
URP	<i>Urotensin II-related peptide</i>
UT	Récepteur de l'urotensine II
U _{Th}	Récepteur humain de l'urotensine II
U _{Tn}	Récepteur nucléaire de l'urotensine II
U _{Tr}	Récepteur de rat de l'urotensine II

1 INTRODUCTION

1.1 Historique

L'urotensine II (UII) a été isolée en 1980 à partir de l'urophyse, un organe neurosécréteur caudal uniquement présent chez les poissons téléostéens (*Gillichthys mirabilis*) et apparenté au système hypothalamo-neurohypophysaire (Pearson *et al.*, 1980). Des effets hypertenseurs et osmorégulateurs avaient déjà été attribués à l'UII chez les poissons alors qu'une action spasmogène a été montrée sur l'urètre et le rectum de la truite (Bern *et al.*, 1969, Bern *et al.*, 1985, Zelnik *et al.*, 1973). Une étude de Gibson *et al.* (1984), démontrant l'effet vasoconstricteur puissant de l'UII du poisson téléostéen sur le muscle ano-coccygéen de la souris, a permis de démontrer que ce système était aussi présent chez les mammifères. Il fut également observé que ce peptide pouvait être présent dans des cellules sécrétoires de la moelle épinière, confirmant ainsi l'existence du peptide dans un contexte extraurophysaire (Yulis *et al.*, 1986). Des variations de pression artérielle (PA) ont alors été observées sur des rats anesthésiés ayant reçu l'UII de gobie (UIIg) (Gibson *et al.*, 1986) ainsi que des effets sur la contractibilité des aortes de rat (Itoh *et al.*, 1988).

Un étude de Gibson (1987) a montré deux effets physiologiques opposés pour ce peptide. Sur des anneaux d'aorte de rat, une injection *ex vivo* d'une faible dose d'UIIg (10^{-11} à 50^{-11} M) a causé la relaxation du tissu alors qu'en employant une dose plus élevée d'urotensine II (10^{-10} à 10^{-9} M), il y a eu contraction des anneaux d'aorte de rat. Ces auteurs ont également observé que sur des aortes de rat désendothélialisées, de faibles doses d'UIIg ne provoquaient aucune réaction sur le tissu alors qu'une constriction était observée avec de hautes doses du peptide (Gibson, 1987). Faisant suite à cette étude, la présence de sites fonctionnels de liaison pour l'UIIg au niveau du

système vasculaire murin fut démontrée (Itoh *et al.*, 1988). L'ensemble de ces découvertes a permis d'émettre l'hypothèse qu'un système urotensinergique (SU) existait chez les vertébrés et en particulier chez les mammifères.

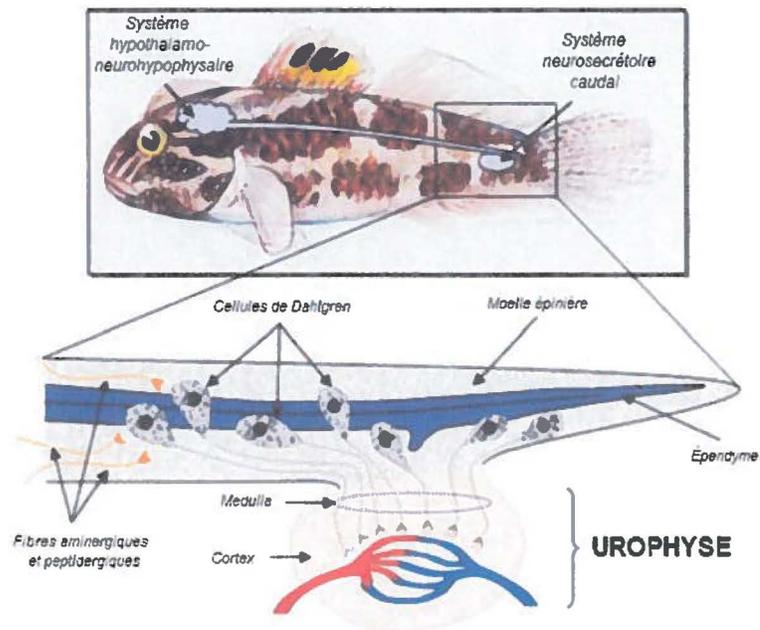


Figure 1: L'urophyse du poisson téléostéen (Vaudry *et al.*, 2010)

Il fut ainsi possible d'isoler une isoforme de l'UII à partir d'extraits de cerveau provenant de la grenouille *Rana ridibunda* (Conlon *et al.*, 1992). Moins de vingt ans après l'extraction de l'UII chez le poisson, les ADNc de la prépro-urotensine II ont été identifiés chez les amphibiens et les mammifères, incluant l'homme (Coulouarn *et al.*, 1998).

En 1995, les groupes de Marchese *et al.* (1995) et de Tal *et al.* (1995) ont identifié un gène codant pour un récepteur à 7 domaines transmembranaires présentant une forte homologie de séquence avec les récepteurs de la somatostatine (SSTR2/4), les récepteurs δ des opioïdes et le récepteur de la galanine, donnant ainsi un bon indice sur la nature peptidique du ligand endogène. Ce récepteur, jusqu'ici nommé GPR14 ou encore *sensory epithelium neuropeptide-*

like receptor (SENR) a pu être associé à ses peptides endogènes par pharmacologie inverse. Cette technique consiste à cribler un récepteur au moyen d'une librairie de divers composés afin de trouver le ligand approprié. C'est ainsi que 4 groupes de chercheurs ont démontré, à quelques mois d'intervalle, que l'urotensine II était le ligand endogène du GRP14 (Ames *et al.*, 1999, Q. Liu *et al.*, 1999, M. Mori *et al.*, 1999, Nothacker *et al.*, 1999). Le GPR14 est désormais connu sous le nom du récepteur de l'urotensine II ou UT (Davenport *et al.*, 2000).

En 2003, Sugo *et al.* (2003) ont préparé un anticorps dirigé contre la partie cyclique de l'U11g. Étonnamment, ils ont isolé à partir d'extraits de cerveaux de rat non pas l'U11 mais un peptide partageant une homologie de séquence importante avec ce dernier et qu'ils ont appelé *Urotensin II-related peptide* (URP). Contrairement à l'urotensine II dont les isoformes diffèrent d'une espèce à l'autre, l'URP adopte la même séquence chez la souris, le rat et l'humain (Tostivint *et al.*, 2006). L'URP se lie au récepteur UT avec la même affinité que l'U11 mais la distribution des ARNm de ces deux molécules diffère. De plus, Sugo *et al.* (2003) ont constaté avec l'URP, comme pour l'U11, un effet hypotenseur de longue durée lorsque le peptide est donné en intraveineuse sur des rats inconscients. Ces observations portent à croire que ces deux peptides peuvent exercer des effets complémentaires ou distincts selon leur localisation (Sugo *et al.*, 2003, Vaudry *et al.*, 2010).

L'U11 est maintenant reconnue comme étant la molécule vasoconstrictive la plus puissante, surpassant de loin l'endothéline-1 (ET-1). Son action dans les pathologies cardiovasculaires apparaît par conséquent plus que probable (Douglas *et al.*, 2000, Maguire *et al.*, 2002).

1.2 UII et URP : structure et localisation

1.2.1 Structure de l'UII

Il fut initialement considéré que l'UII de gobie pouvait être un analogue de la somatostatine. En effet, la séquence mature de l'UIIg partage une forte homologie avec celle de la somatostatine. De plus, ces deux peptides possèdent la triade Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹, maintenue structurellement par un pont disulfure dans les deux cas (Pearson *et al.*, 1980). Puisqu'il existait une forte homologie entre les séquences matures de la somatostatine et de l'urotensine II, l'hypothèse d'une origine commune a été émise. Elle a cependant été écartée à la suite du clonage et de l'alignement de leur séquence préproprotéique respective puisque l'homologie n'était que de 27% (Coulouarn *et al.*, 1998, Marchese *et al.*, 1995).

Les différents précurseurs de l'urotensine II identifiés chez les mammifères présentent en somme la même organisation (Coulouarn *et al.*, 1999). La séquence d'ADNc de l'UII de rat est constituée de 529 paires de base (pb). Le transcrit de la séquence d'ADN du précurseur, formé de 123 acides aminés, comprend un peptide signal d'une vingtaine de résidus ainsi que trois sites de clivage (Arg⁸⁵-Lys⁸⁶, Arg¹⁰⁵-Arg¹⁰⁶, Arg¹⁰⁸-Lys¹⁰⁹) qui permettent d'engendrer un peptide mature de 14 acides aminés (Coulouarn *et al.*, 1999). Autant chez l'homme que chez le rongeur, la partie C-terminale du précurseur contient la séquence produisant le peptide mature. La prépro-UII humaine est encodée par le gène UTS2, retrouvé sur le chromosome 1. Elle est aussi constituée d'un peptide signal, d'un segment central non-codant suivi du site protéolytique Lys¹⁰⁹-Lys¹¹⁰-Arg¹¹¹. Trois types de prépro-UII_h peuvent être produits à partir de leurs séquences d'ADN : les deux premiers (prépro-UII_{hA} et prépro-UII_{hB}) donneront des transcrits de 139 et 124 acides aminés respectivement et ne diffèrent que par leur peptide signal. Ils produisent donc le même peptide une fois clivé. Le troisième transcrit, composé de 139 acides aminés, possède le même

segment N-terminal que prépro-UIII_B avec quelques différences dans la partie non codante en C-terminal (Figure 2) (Saez *et al.*, 2011). La région située entre le peptide signal et le site de clivage diffère au niveau des séquences des précurseurs de l'humain et de celles, par exemple, de la grenouille et de la carpe. Cela porte à croire que l'urotensine II est la seule molécule bioactive issue du peptide précurseur (Coulouarn *et al.*, 1999). En comparant les séquences de la prépro-UIII_h et du prépro-UIII_r, Coulouarn *et al.* (1999) ont observé une homologie de seulement 48%, alors que le peptide mature des deux espèces se différencie au niveau de quelques résidus seulement. L'alignement de leur région C-terminale confirme une homologie de 63%

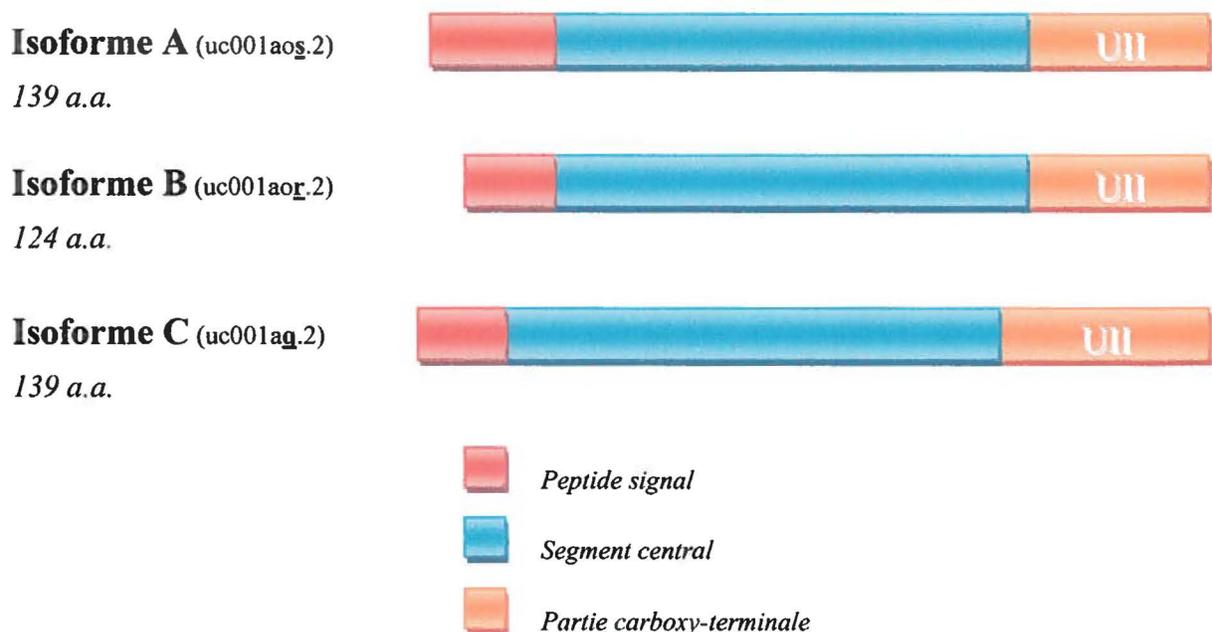


Figure 2: Précurseurs de l'UIII_h

Comme mentionné précédemment, chez le rat et l'homme, le clivage du précurseur pour l'obtention de l'UIII mature a lieu au niveau d'un site riche en acides aminés basiques. Cette coupure est effectuée par les prohormone convertases (Coulouarn *et al.*, 1998). Même si toutes les isoformes de l'urotensine II partagent des séquences identiques, la composition en acides

aminés de l'UII est propre à chaque espèce. Comme le Tableau I l'indique, l'UII de gobie est un peptide de 12 résidus tandis que l'urotensine II de truite possède le même nombre d'acides aminés sans présenter toutefois la même séquence au niveau de leur région N-terminale. Par ailleurs, les UII de grenouille, de souris, de rat et d'humain contiennent respectivement 13, 17, 14 et 11 acides aminés (Tableau I).

Tableau I: Isoformes de l'urotensine II et de l'URP

* Les résidus en orange représentent les acides aminés conservés chez toutes les isoformes des UII et de l'URP (<Gln: pyroglutamine)

	Séquence	Références
UII <i>gobie</i>	H- Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH	(Pearson <i>et al.</i> , 1980)
UII <i>truite</i>	H- Gly-Gly-Asn-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys- Val-OH	(Waugh <i>et al.</i> , 1993)
UII <i>grenouille</i>	H- Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH	(Conlon <i>et al.</i> , 1992)
UII <i>souris</i>	<Gln-His-Lys-Asn-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH	(Coulouarn <i>et al.</i> , 1999, Dubessy <i>et al.</i> , 2008)
UII <i>rat</i>	<Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH	(Coulouarn <i>et al.</i> , 1999)
UII <i>humain</i>	H- Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH	(Chartrel <i>et al.</i> , 2004, Coulouarn <i>et al.</i> , 1999)
URP (<i>souris, rat et humain</i>)	H- Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH	(Sugo <i>et al.</i> , 2003)

Le dénominateur commun de chacune des isoformes est la partie C-terminale, composée des résidus Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys (Conlon, 2008). Cet hexapeptide, contrairement à la partie N-terminale des différentes séquences de l'UII, a été hautement préservé au cours de l'évolution. Cette région cyclique est toujours précédée d'un résidu acide et terminée par un résidu hydrophobe (Coulouarn *et al.*, 1999). Des études de type structure-activité réalisées sur des

aortes de rat ont confirmé que ce domaine est essentiel à l'activité biologique de la molécule (Itoh *et al.*, 1988). Une particularité de l'UII de souris et de rat est que la glutamine située en N-terminal est convertie en acide pyroglutamique (<Gln) lors de la traduction de la séquence d'ARNm par une glutamine cyclase (Coulouarn *et al.*, 1999). Cette modification est connue pour jouer un rôle important dans l'activité biologique de certains neuropeptides comme l'hormone thyroïdienne (TRH) et la gonadolibérine (GRH) (Vale *et al.*, 1975; (Coulouarn *et al.*, 1999)

1.2.2 Structure de l'URP

Sugo *et al.* (2003) ont procédé à une immunoréactivité dirigée contre l'UII sur des extraits de cerveau de rat et ont identifié un octapeptide reconnu par des anticorps anti-UII (Tableau I). Cette molécule, dont l'hexapeptide en C-terminal est de même composition que celle de l'urotensine II, a été nommée *Urotensin II-related peptide* (URP).

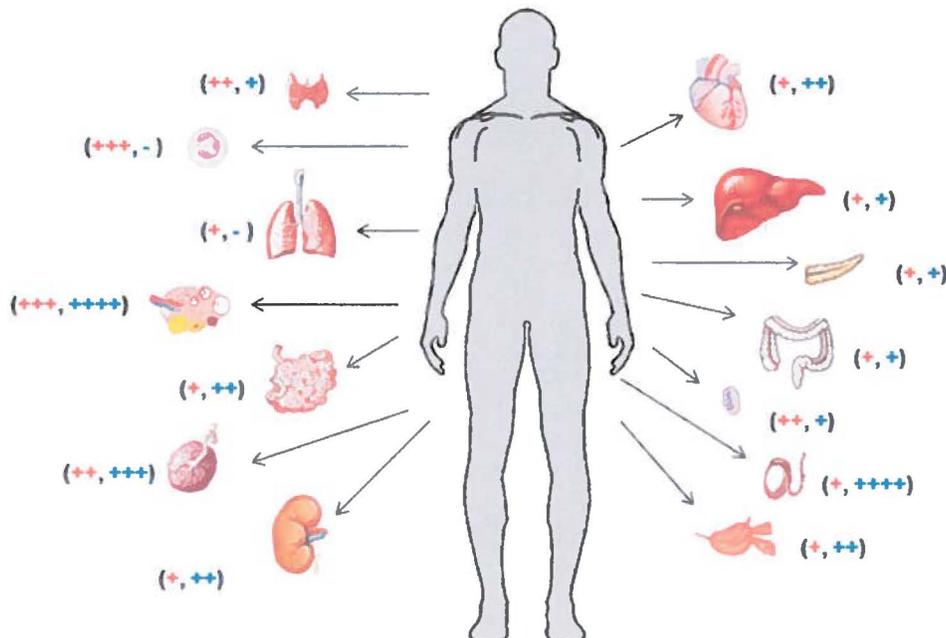


Figure 3: Distribution des ARNm de la prépro-UIIh (en orange) et du prépro-URP (en bleu) chez l'homme (Sugo *et al.*, 2003)

Le prépro-URP chez l'homme est composée de 119 acides aminés alors qu'elle est de 118 acides aminés chez le rat. L'alignement de ces séquences présentent 54% d'homologie (Sugo *et al.*, 2003). Tout comme pour l'urotensine II, le précurseur possède un site de clivage basique (Lys¹¹⁰-Arg¹¹¹) qui génère un peptide mature retrouvé à l'extrémité de la portion carboxy-terminale (Sugo *et al.*, 2003). La comparaison des séquences de la prépro-UIIIh et du prépro-URP a démontré une faible homologie de 19%. De plus, ces deux dernières se retrouvent sur deux chromosomes différents : le gène de l'UUI, situé sur le chromosome 1, est proche de celui de la somatostatine 2, tandis que le gène de l'URP, situé sur le chromosome 3, est à proximité de celui de la somatostatine 1. La somatostatine 2, renommée cortistatine chez les mammifères, est retrouvée chez ces derniers au niveau du cerveau, plus précisément dans le télencéphale. Chez le poisson téléostéen, ce gène n'est exprimé qu'au niveau du pancréas. Quant à la somatostatine 1, elle est composée de 14 acides aminés. Elle est présente chez tous les vertébrés et est majoritairement exprimée au niveau du cerveau, du pancréas et des intestins (Tostivint *et al.*, 2006). Cela permet donc de conclure que la paire somatostatine 2/UUI ainsi que la paire somatostatine 1/URP dérivent de la duplication locale du même gène ancestral. La séquence de l'URP, indiquée au Tableau I, est strictement conservée chez les espèces murines ainsi que chez l'homme (Sugo *et al.*, 2003).

1.2.3 Localisation des peptides

Par des études d'hybridation *in situ*, on a pu retrouver les précurseurs de l'UUIh dans les tissus périphériques, notamment au niveau du système cardiovasculaire, du foie, du pancréas, des glandes surrénales, des reins, du côlon, des ovaires, du placenta, de l'intestin grêle, de la rate et des muscles squelettiques (Figure 3) (Coulouarn *et al.*, 1998, Maguire *et al.*, 2008, Matsushita *et al.*, 2001, Sugo *et al.*, 2003). De plus, une quantité importante de l'ARNm de la prépro-UUI a été

retrouvée dans le système nerveux central (SNC), plus précisément au niveau des motoneurones (Figure 4).

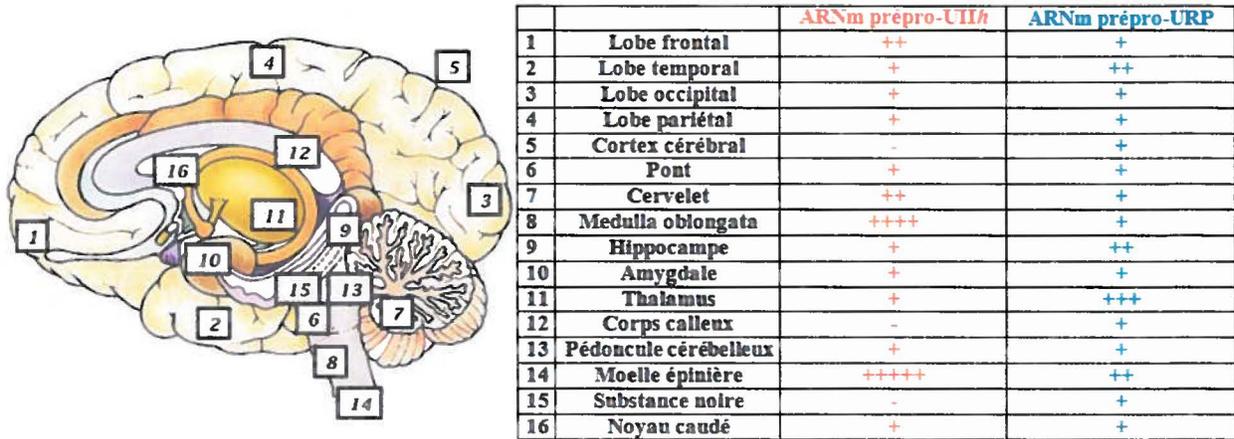


Figure 4: Distribution des ARNm de la prépro-UIIIh et du prépro-URP dans le SNC
(Sugo *et al.*, 2003)

En ce qui concerne le cœur humain, les ARNm de l'UUI ont été retrouvés notamment dans le tissu musculaire (myocarde) des oreillettes et des ventricules (Douglas *et al.*, 2002, Matsushita *et al.*, 2001, Totsune *et al.*, 2001). Les transcrits du précurseur sont aussi localisés au niveau des tissus artériels ainsi que dans les cellules musculaires lisses. L'urotensine II mature est retrouvée dans les artères coronaires, l'aorte et plusieurs lits capillaires (Douglas *et al.*, 2002, Matsushita *et al.*, 2001)

Le prépro-URP chez l'homme a été retrouvé aussi dans l'encéphale, le cervelet, la moelle épinière, le thymus, les poumons, le cœur, l'estomac, le foie, les glandes surrénales, les reins, le placenta, la rate, les ovaires, l'intestin grêle, le côlon, la prostate et les testicules (Sugo *et al.*, 2003). Il y a une forte concentration d'ARNm d'URP dans le noyau réticulaire ventrolatéral rostral

du thalamus, suggérant fortement que cette molécule agit au niveau de la régulation cardiovasculaire (Dubessy *et al.*, 2008, Sugo *et al.*, 2003).

Les précurseurs de l'UII ont pu être retrouvés aux mêmes endroits chez le rat ; la plus grande concentration des ARNm de la prépro-UII étant observée dans les motoneurons de la moelle épinière (Figure 5) (Coulouarn *et al.*, 1998; Coulouarn *et al.*, 1999). Le précurseur de l'URP, par le biais de ses ARNm, a été identifié chez le rat au niveau du cerveau, de la moelle épinière, du thymus, des poumons, de l'estomac, du foie, de l'intestin grêle, de la rate, des glandes surrénales, de l'épididyme, de la prostate et des testicules (Sugo *et al.*, 2003).

Au niveau des tissus périphériques comme des tissus du SNC, les niveaux de prépro-URP sont plus bas que ceux de la prépro-UII et ce, pour tous les tissus énumérés ci-dessus. Par contre, l'URP mature a été retrouvé dans le cerveau du rat (Sugo *et al.*, 2003).

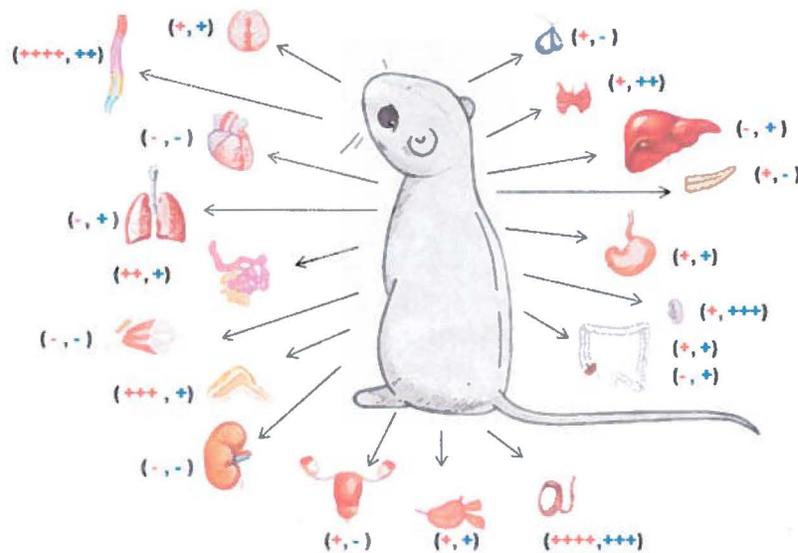


Figure 5: Distribution des ARNm de la prépro-UII (en orange) et du prépro-URP (en bleu) chez le rat

(Douglas, 2003, Sugo *et al.*, 2003)

1.3 Le récepteur UT : structure et localisation

1.3.1 Récepteurs couplés aux protéines G

Le récepteur UT est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). Tous les récepteurs couplés aux protéines G sont formés à partir de la même charpente soit sept hélices alpha transmembranaires, reliées entre elles par des boucles intracellulaires et extracellulaires de longueurs variables. L'extrémité amino-terminale du récepteur est retrouvée à l'extérieur de la cellule alors que le domaine carboxy-terminal est quant à lui cytoplasmique et intervient dans les interactions avec les protéines G et les β -arrestines (Jacoby *et al.*, 2006). Les segments intracellulaires I2, I3 ainsi que I4 des RCPG (tout comme l'extrémité C-terminale) sont également impliqués dans l'interaction avec les protéines G (Figure 6). Le RCPG est une structure massive qui est d'abord stabilisée dans la membrane plasmique par la présence d'acides aminés hydrophobes à sa surface, lui permettant de s'implanter dans le cœur hydrophobe de la bicouche phospholipidique.

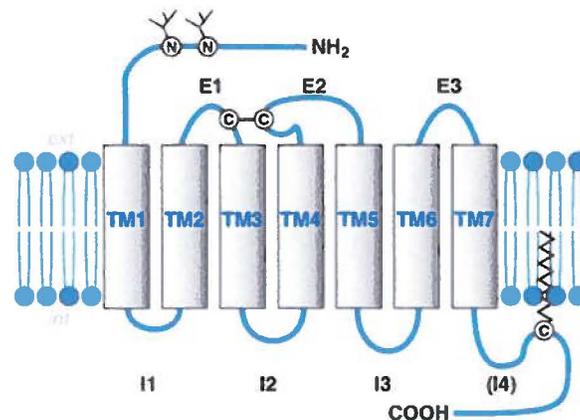


Figure 6: Structure générale des récepteurs couplés aux protéines G (Spiegel *et al.*, 1996)

(^Y : sites de glycosylation; E : boucle extracellulaire; TM : domaine transmembranaire; I : boucle intracellulaire; ^C : site de palmitoylation)

La présence d'un pont disulfure créé entre la première boucle extracellulaire (E1) et la deuxième boucle extracellulaire (E2) consolide la stabilité des RCPG (Figure 6) (Brzostowski *et al.*, 2001). Cette architecture leur donne une structure topographique commune qui est cependant assez flexible pour fournir différents types de poches pour plusieurs ligands.

Malgré des similitudes structurales importantes, les RCPG présentent des divergences significatives au niveau de leur domaine amino-terminal et de leur(s) ligand(s) endogène(s). La classification la plus utilisée pour les identifier les regroupe par homologie de structures: les familles A à F (Gether, 2000). Les trois premières sont retrouvées chez l'homme et font donc l'objet de nombreuses études. Parmi celles-ci, on retrouve les récepteurs de la famille A, aussi connue sous le nom de la famille des récepteurs associés à la rhodopsine. Englobant plus de 80% de tous les RCGP, ce sous-type est l'un des mieux caractérisés. Cette classe inclut entre autres les récepteurs β -adrénergiques, ainsi que ceux de l'endothéline et de l'urotensine II (Ames *et al.*, 1999, Gether, 2000). La classe A est une cible thérapeutique intéressante puisqu'elle contient des récepteurs de neuropeptides et d'hormones glycoprotéiques (Fernandez *et al.*, 1996, Trumpp-Kallmeyer *et al.*, 1995).

1.3.2 *Structure du récepteur UT*

Le récepteur UT a été identifié, à quelques mois d'intervalle, par quatre groupes de chercheurs distincts (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1999 ; Nothacker *et al.*, 1999). Ce récepteur est composé de 386 résidus chez le rat contre 389 acides aminés chez l'homme (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999). On peut également trouver des sites de N-glycosylation au niveau de Asn²⁹ et Asn³³ du domaine N-terminal. De nombreux résidus Ser et Thr (illustrés en vert à la Figure 7) sont des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase A (PKA), la protéine

kinase C (PKC) ainsi que la kinase couplée aux RCPG (GRK) impliquée dans la désensibilisation du récepteur (Onan *et al.*, 2004).

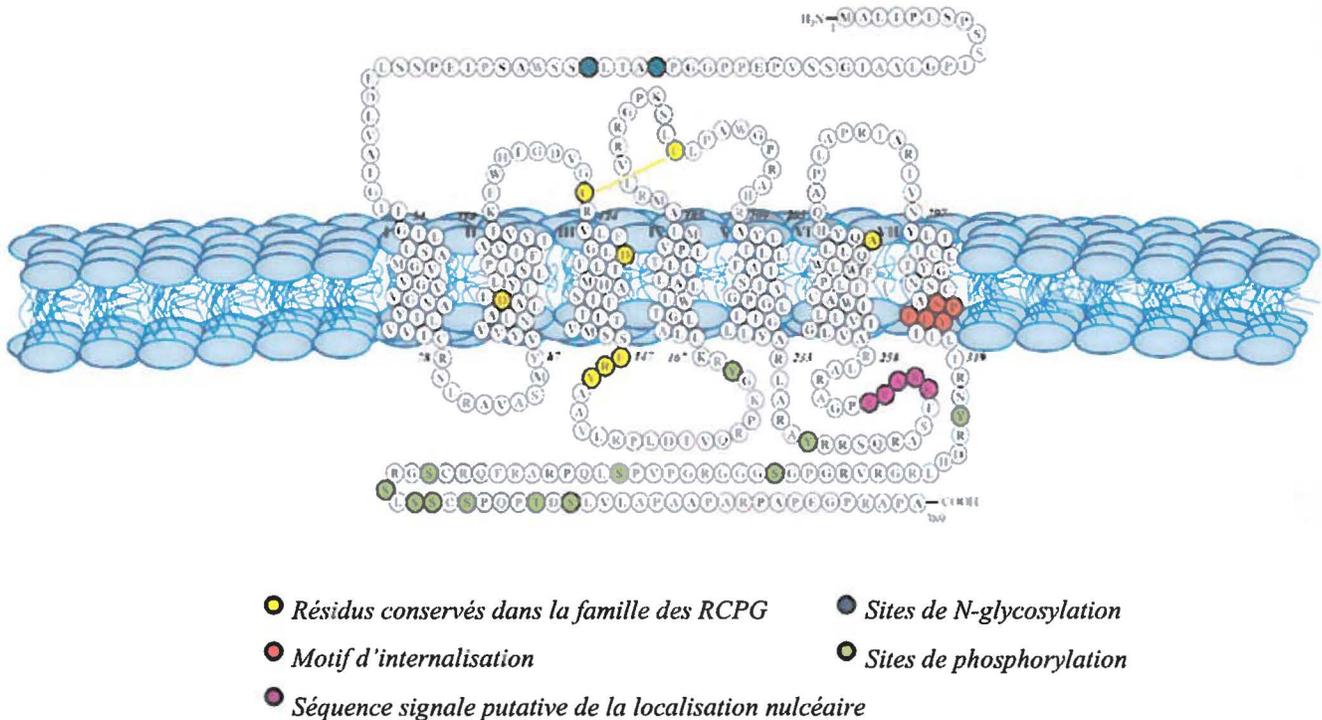


Figure 7: Structure du récepteur UT chez l'homme (Chatenet *et al.*, 2012)

Le récepteur de l'urotensine II possède également un motif Glu-Arg-Tyr (ERY) sur la deuxième boucle intracellulaire (I2) servant à l'activation de la protéine $G\alpha_{q11}$ (Proulx *et al.*, 2008). De plus, une séquence d'internalisation Asn-Pro-X-X-Tyr (où X peut être n'importe quel acide aminé) est présente sur le septième domaine transmembranaire (TM7) entre Asn³¹¹ et Tyr³¹⁵. Ce motif, représenté en orange à la Figure 7, est capable de lier la cavéoline (Ames *et al.*, 1999; Onan *et al.*, 2004). Sur l'UT de rat, contrairement à l'UT humain, on retrouve un site de palmitoylation dans la partie cytoplasmique (Chatenet *et al.*, 2012). De nombreux travaux de recherche ont mis en lumière le rôle fonctionnel important de la palmitoylation des RCPGs. C'est effectivement le cas de récepteurs du système cardiovasculaire dont le récepteur β -

adrénergique et le récepteur de la vasopressine V_{1A} (Hawtin *et al.*, 2001, O'Dowd *et al.*, 1989). De plus, le groupe de Zheng *et al.* (2013) a démontré que la palmitoylation du récepteur μ -opioïde (OPMR1) joue un rôle au niveau de la signalisation biaisée des agonistes (Zheng *et al.*, 2013). Il est donc possible que cette modification post-traductionnelle joue un rôle clé dans la signalisation biaisée d'agonistes du système urotensinergique. Ce concept est basé sur l'observation qu'un agoniste liant un récepteur donné peut activer partiellement les voies de signalisation qui en découlent et ce, avec une efficacité différente de celle d'un autre agoniste de ce même système (Zheng *et al.*, 2013).

L'UT h est situé sur le chromosome 17 et présente 75% d'homologie avec son cousin l'UT r (Elshourbagy *et al.*, 2002, Protopopov *et al.*, 2000) . L'UII, comme l'URP, sont les deux seuls ligands endogènes connus à ce jour qui se lient à ce récepteur.

1.3.3 Localisation du récepteur UT

Tout comme pour les peptides du système urotensinergique, les ARN messagers du récepteur sont retrouvés dans de nombreux organes. Chez l'homme, on retrouve ainsi une quantité importante d'UT dans l'hypophyse, le tronc cérébral, la moelle épinière, le pancréas, les glandes surrénales, les reins et la vessie (Ames *et al.*, 1999, Chartrel *et al.*, 2004, Q. Liu *et al.*, 1999, Totsune *et al.*, 2003, Totsune *et al.*, 2001).

L'expression du récepteur est aussi retrouvée, mais à un degré moindre, dans le foie, le côlon et les muscles squelettiques (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999). Au niveau du cœur, les transcrits du récepteur ont pu être identifiés aux endroits énumérés dans le Tableau II.

Tableau II: Distribution des ARNm du récepteur UT dans le système cardiovasculaire humain

<i>Tissus, cellules</i>	<i>Références</i>
Aorte	Ames <i>et al.</i> , 1999 ; Matsushita <i>et al.</i> , 2001
Aorte thoracique	Ames <i>et al.</i> , 1999
Artères coronaires	Ames <i>et al.</i> , 1999 ; Maguire <i>et al.</i> , 2004
Artères périphériques	Matsushita <i>et al.</i> , 2001
Artères pulmonaires	Maguire <i>et al.</i> , 2000
Cardiomyocytes (oreillette droite)	Maguire <i>et al.</i> , 2000 ; Douglas <i>et al.</i> , 2002
Cardiomyocytes (ventricule gauche)	Maguire <i>et al.</i> , 2000 ; Douglas <i>et al.</i> , 2002
Cellules endothéliales*	Ames <i>et al.</i> , 1999 ; Douglas <i>et al.</i> , 2002 ; Totsune <i>et al.</i> , 2003
Cellules endothéliales (veine ombilicale) *	Albertin <i>et al.</i> , 2009
Cellules endothéliales (aorte) *	Albertin <i>et al.</i> , 2009
Cellules endothéliales (veine saphène) *	Matsushita <i>et al.</i> , 2001
Cellules endothéliales (veine jugulaire) *	Albertin <i>et al.</i> , 2009
Cellules musculaires vasculaires lisses	Ames <i>et al.</i> , 1999 ; Douglas <i>et al.</i> , 2002 ; Totsune <i>et al.</i> , 2003
Cœur	Ames <i>et al.</i> , 1999 ; Douglas <i>et al.</i> , 2002 ; Matsushita <i>et al.</i> , 2001
Myocarde	Maguire <i>et al.</i> , 2000 ; Douglas <i>et al.</i> , 2002
Oreillettes*	Ames <i>et al.</i> , 1999
Veine saphène*	Albertin <i>et al.</i> , 2009
Ventricules	Totsune <i>et al.</i> , 2001

* Non identifié chez le rat

Tableau III: Distribution des ARNm du récepteur UT dans le système cardiovasculaire du rat

<i>Tissus, cellules</i>	<i>Références</i>
Aorte thoracique	Nothacker <i>et al.</i> , 1999; Maguire <i>et al.</i> , 2000
Artères coronaires	Bottril <i>et al.</i> , 2000; Maguire <i>et al.</i> , 2008
Artères mésentériques*	Maguire <i>et al.</i> , 2008
Artères pulmonaires	Nothacker <i>et al.</i> , 1999
Cellules musculaires lisses des vaisseaux	Maguire <i>et al.</i> , 2008
Cœur	Nothacker <i>et al.</i> , 1999
Cardiomyocytes (oreillettes)	Maguire <i>et al.</i> , 2008
Cardiomyocytes (ventricule droit)*	Maguire <i>et al.</i> , 2008
Ventricule gauche (myocarde)	Gong <i>et al.</i> , 2004; Maguire <i>et al.</i> , 2008

* Non identifié chez l'homme

Une distribution très vaste des transcrits de l'UT peut être observée chez le rat. On peut ainsi les retrouver entre autres dans plusieurs régions du cerveau, ainsi que dans la moelle épinière (de manière beaucoup moins importante que chez la souris), le foie, les reins, le côlon et les testicules (Gartlon *et al.*, 2001, Jegou *et al.*, 2006). Comme chez l'homme, l'UT de rat est présent dans les tissus cardiovasculaires (Tableau III).

1.4 Mécanismes intracrines

1.4.1 Récepteurs nucléaires

La communauté scientifique a longtemps promu le paradigme que les RCPG étaient uniquement des récepteurs logés dans la membrane plasmique. Or, tout particulièrement au cours de la dernière décennie, il a été possible d'identifier des RCPG à la membrane nucléaire (Boivin *et al.*, 2008). Ainsi, la présence de récepteurs nucléaires fonctionnels de l'endothéline-1 (ET) et de l'angiotensine-II (AT1) a permis d'établir que le noyau ne devait pas être considéré comme un organe mais bien comme une cellule dans une cellule (Boivin *et al.*, 2008). Ces récepteurs nucléaires, isolés de tissus et cellules variés, appartiennent aux classes A, B et C de la famille des RCPG. De plus, comme observé avec les récepteurs nucléaires AT1 et ET, leur distribution est généralement cohérente avec celle de leurs homologues membranaires (Nguyen *et al.*, 2012). Il est à noter que plusieurs de ces systèmes exprimant un récepteur à la surface nucléaire sont reconnus pour leur implication dans la physiopathologie cardiaque et leur participation très significative à l'activité contractile (Tadevosyan *et al.*, 2010).

En ce qui concerne l'ET-1, on a observé une augmentation de calcium intranucléaire à la suite de sa liaison avec son récepteur sur des modèles cellulaires cardiaques (Bkaily *et al.*, 2002). De plus, ET nucléaire a été identifié au noyau de cardiomyocytes ventriculaires de rat (Boivin *et al.*, 2003). Le même constat a été réalisé avec des cardiomyocytes de rat, en lien avec les récepteurs AT1 et AT2 de l'angiotensine II (Tadevosyan *et al.*, 2010).

Puisque les systèmes urotensinergique, angiotensinergique et endothélinergique font partie de la famille A des RCPG et qu'ils participent grandement au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire, l'hypothèse que le phénomène intranucléaire existe pour l'UT a pu être avancée. Ainsi, en amplifiant le gène de l'UTr dans un plasmide contenant la protéine

fluorescente verte, une localisation périnucléaire de UT a été observée par imagerie cellulaire (Giebing *et al.*, 2005).

Par ailleurs, par immunobuvardage de type Western, par photomarquage et par tests de liaison, notre laboratoire a montré la présence de UT dans des extraits nucléaires de cœur de rat et de singe (Doan *et al.*, 2012). Également, au moyen de ces méthodes, le même constat a été effectué sur les tissus cérébraux des espèces mentionnées ci-haut. L'utilisation de deux lignées cellulaires cérébrales humaines a aussi permis d'observer, par microscopie confocale, la présence du récepteur UT au niveau nucléaire. Ces informations ont montré la nature intracrine probable de l'urotensine II et de son paralogue, l'URP (Nguyen *et al.*, 2012). Au niveau du cœur, notre laboratoire a aussi démontré par microscopie confocale que le récepteur UT est présent uniquement dans le ventricule gauche du cœur de rat (Doan *et al.*, 2012). Finalement, il nous est apparu que l'urotensine II humaine et l'URP ont la capacité de pénétrer dans la cellule sans l'aide de leur récepteur avec cependant des niveaux plus élevés pour l'UII. En utilisant une lignée n'exprimant pas les récepteurs UT et des ligands fluorescents développés dans notre laboratoire, nous avons été en mesure de mettre en évidence une accumulation importante de fluorescence à l'intérieure des cellules démontrant clairement une endocytose indépendante du récepteur. Par la suite, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifique de différentes voies de translocation a permis de mettre en évidence la participation des vésicules de clathrine, plus efficace pour l'UIIh que pour l'URP, dans ce phénomène. Les deux peptides ne différant que par leur segment N-terminal, il apparait clair que ce dernier influence la capacité de ces peptides à pénétrer la cellule (Doan *et al.*, 2012).

Tout porte à croire que les récepteurs nucléaires n'activent pas les mêmes voies de signalisation que leurs homologues à la membrane plasmique (Jong *et al.*, 2009, Vaniotis *et al.*, 2011b).

Même s'ils lient le même agoniste avec la même affinité, les récepteurs membranaires et nucléaires pourraient avoir des rôles distincts et complémentaires (Chatenet *et al.*, 2012, Vaniotis *et al.*, 2011b). La différence de localisation de l'UT pourrait provenir de 1) un épissage alternatif différent entre les deux protéines, 2) un site de traduction alternatif ou 3) un site d'entrée particulier dans la machinerie ribosomale (Amitai *et al.*, 2004, Tadevosyan *et al.*, 2012).

Les récepteurs nucléaires peuvent être constitutivement présents, comme démontré sur les noyaux de coeur de rat (Doan *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2012). Ils peuvent être le produit d'une synthèse ou provenir d'une translocation de UT membranaire. Cette internalisation pourrait être rendue possible grâce aux importines α et β qui reconnaissent une courte séquence d'acides aminés basiques nommée *signal de localisation nucléaire* (SLN) (Chatenet *et al.*, 2012). Une séquence de ce type est ainsi retrouvée chez l'homme (Lys-Arg-Ala-Arg-Arg) et le rat (Lys-Asn-Thr-Arg-Arg) au niveau de la troisième boucle intracellulaire (Chatenet *et al.*, 2012).

Les récepteurs nucléaires sont d'abord impliqués dans la transcription des gènes via la signalisation calcique. En effet, il est connu que les ions calciques affectent la réponse nucléaire (amplitude, fréquence, activité) de la transcription génique (Dolmetsch *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré que la machinerie cellulaire du calcium est bien présente au noyau (Bootman *et al.*, 2009). De plus, de nombreux récepteurs nucléaires, dont ceux de l'angiotensine II, sont impliqués dans l'homéostasie ionique, la prolifération cellulaire et le remodelage (Chatenet *et al.*, 2012). L'expression génique peut donc être augmentée par la libération de calcium. Cette hausse est possible via les récepteurs de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) (Bootman *et al.*, 2009). Plusieurs systèmes peptidergiques impliqués dans la physiologie cardiovasculaire, dont l'ANG-II et l'ET-1, ont démontré une action au niveau de l'initiation de la transcription. Des noyaux isolés de cellules cardiaques mis en contact avec l'ET-1 ont montré une diminution de la

production d'ARNm via le calcium (Merlen *et al.*, 2013). Ce même traitement par l'ANG-II agit à l'opposé et augmente la transcription de l'initiation.

De plus, de nombreux éléments impliqués dans la régulation de la transcription des gènes (énumérés au point 1.5.2), dépendants ou non des RCPG, sont aussi en lien avec les récepteurs nucléaires (F. Gobeil *et al.*, 2006, Merlen *et al.*, 2013, Tadevosyan *et al.*, 2012, Vaniotis *et al.*, 2011a). Une relation existe également entre les récepteurs nucléaires et l'épigénétique. Par exemple, une modification de l'histone a été observée à la suite de l'activation du récepteur δ -opioïde via les β -arrestines au niveau nucléaire.

L'orientation des RCPG nucléaires n'est pas connue. Si le récepteur est synthétisé *de novo* et provient du réticulum endoplasmique (RE), le segment amino-terminal serait alors situé face au cytosol pour pouvoir lier le ligand. Seraient ensuite recrutés l'un et/ou l'autre des nombreux agents effecteurs (dont l'ion calcique, les phospholipases A et C, etc.) et seconds messagers (dont l'inositol 1,4,5-triphosphate) qui ont été identifiés au niveau nucléaire (Tadevosyan *et al.*, 2012). Il est aussi possible que les récepteurs nucléaires utilisent les complexes de pores du noyau pour déterminer leur orientation, l'espace périnucléaire procurant les signaux nécessaires pour définir la position finale (Vaniotis *et al.*, 2011).

1.4.2 Signalisation intracrine

Une molécule intracrine est une substance intracellulaire qui lie un récepteur présent dans la cellule et active des composantes intracellulaires (Kiefer *et al.*, 1994, Lee-Kirsch *et al.*, 1999, F. Re *et al.*, 1994). Il s'agit d'un ligand produit par la cellule dans le but d'agir sur cette même cellule, soit après sécrétion ou immédiatement après sa synthèse. Tout comme pour les voies

autocrines et paracrines, où une substance produite sera exportée dans le milieu extracellulaire pour, dans le premier cas, se lier à des récepteurs membranaires et dans le second cas, aller agir sur les cellules voisines, la signalisation intracrine fait partie d'un système hormonal local (Carretero *et al.*, 1991).

Comment la cellule peut-elle produire un ligand identique qui peut agir comme molécule intracrine, autocrine ou paracrine? Tout porte à croire que le gène de la molécule en question peut subir une modification qui permet d'indiquer à la molécule sa destination. Cette divergence pourrait provenir de sites d'initiation de transcription distincts ou d'une maturation différente des ARNm qui amputerait le ligand de sa séquence sécrétoire (Kiefer *et al.*, 1994; Lee-Kirsh *et al.*, 1999). Il pourrait aussi s'agir d'une modification post-traductionnelle comme la glycosylation (Gobeil *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2012). Ces allégations sont d'autant plus intéressantes au vu de l'existence de trois isoformes humaines du précurseur de l'urotensine II (Coulouarn *et al.*, 1999; Ames *et al.*, 1999; Chatenet *et al.*, 2012).

Le fait qu'une cellule produise un ligand à vocation intracellulaire permet de suggérer que des récepteurs intracellulaires sont également présents pour ce peptide. Deux études de notre laboratoire ont démontré la présence de UT au noyau (Doan *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2012). De plus, le peptide URP auquel de la fluorescéine a été attachée se retrouve dans des vésicules endocytiques par un mécanisme d'internalisation récepteur-indépendant. Ceci permet aussi de considérer l'internalisation d'un récepteur comme un processus pouvant favoriser sa présence au noyau, avant d'être activé par son agoniste (comme mentionné au point 1.4.1).

Ainsi, un ligand intracrine peut avoir de nombreuses cibles : les récepteurs membranaires (Boivin *et al.*, 2006; Tadevosyan *et al.*, 2010), les récepteurs nucléaires (Bouche *et al.*, 1987; Nguyen et Karapolis *et al.*, 1998; Nugyen *et al.*, 2001), les récepteurs du réticulum

endoplasmique (Fleming *et al.*, 1989; Lee et Donogue *et al.*, 1992) ainsi que les récepteurs intravésiculaires (Willey *et al.*, 2008; Doan *et al.*, 2011) (Figure 8).

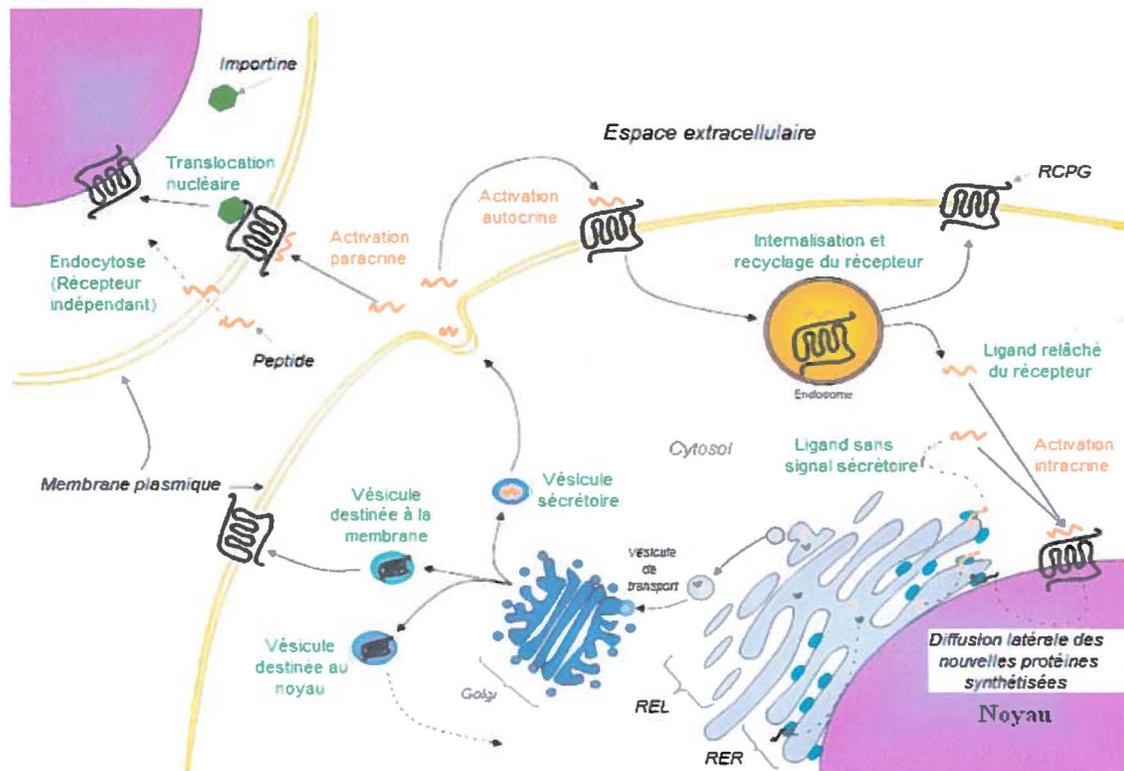


Figure 8: Signalisation intracellulaire du système urotensinergique (Chatenet *et al.*, 2013)

La liaison ligand-UT n peut se faire par signalisation autocrine et/ou paracrine. Ainsi, il peut d'abord s'agir d'une internalisation du complexe ligand-récepteur provenant de la membrane plasmique. Comme documenté, après pénétration dans la cellule, les conditions environnantes (de l'endosome par exemple) font en sorte que le ligand se détache du récepteur. Ce ligand pourrait donc rejoindre ensuite les UT nucléaires constitutivement présents (Chatenet *et al.*, 2013). Il est également possible que l'UII et l'URP, qui sont tous deux capables de pénétrer à l'intérieur de la cellule sans l'intervention de leur récepteur mais plutôt par endocytose, puissent se diriger alors vers le noyau pour interagir avec UT n (Giebing *et al.*, 2005 ; Doan *et al.*, 2011).

1.5 Voies de signalisation de UT

1.5.1 Signalisation intracellulaire

Bien que les mécanismes d'action de l'UII et de l'URP puissent parfois être distincts, leur interaction avec UT entraîne l'activation de nombreux processus cellulaires. Par exemple, en utilisant l'urotensine II humaine, Watanabe *et al.* (2006) et Pakala (2008) ont mis en évidence l'implication importante de la voie de la phospholipase C (PLC) et de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). De plus, ils ont aussi identifié le rôle partiel des kinases extracellulaires *signal-regulated* (ERK) et des kinases associées à la protéine Rho (ROCK) dans le mécanisme de vasoconstriction induit par l'urotensine II sur les Cellules musculaires vasculaires lisses (CMVL) (Figure 8). Après activation du récepteur par l'UII, on observe généralement une mobilisation de nombreux seconds messagers comme l'IP₃ ou encore le diacylglycérol (DAG), lesquels stimulent la libération du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique (Castel *et al.*, 2006, Coulouarn *et al.*, 1999, Q. Liu *et al.*, 1999, Nothacker *et al.*, 1999, Rossowski *et al.*, 2002, Vaudry *et al.*, 2010). Le calcium stimulera ensuite plusieurs voies comme les kinases *mitogen-activated protein* (MAPK) et les ROCK qui iront à leur tour phosphoryler la MLC, provoquant ainsi le processus de contraction (Doan *et al.*, 2012, Proulx *et al.*, 2008, Sauzeau *et al.*, 2001, Ziltener *et al.*, 2002). D'autres voies comme celles des phospholipases A2 (PLA2) ou celle de l'oxyde nitrique synthase (ONS) font aussi partie de la signalisation impliquée dans la vasodilatation induite par l'UII (Gibson, 1987, Gibson *et al.*, 1988, Katano *et al.*, 2000, Vaudry *et al.*, 2010, Yano *et al.*, 1995). Par contre, les effets vasodilatateurs, également attribués à une interaction de l'UII avec UT, seraient quant à eux médiés via l'oxyde nitrique (ON) libéré par les cellules endothéliales, les prostaglandines E2 (PGE2) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (FHDE) (Figure 9) (Ross *et al.*,

2010). De plus, Mori *et al.* (1999) ont aussi observé une élévation de l'acide arachidonique, connu pour son rôle dans la vasodilatation et l'inflammation.

Sur les cellules endothéliales, l'UII augmente la production de collagène-1, de la métalloprotéinase de la matrice-1 (MMP-1), de l'acétyl-CoA acétyltransférase-1 (ACAT-1) (impliquée dans la formation des cellules spumeuses), de l'ONS et de la Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Djordjevic *et al.*, 2005, Ross *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2004, Watanabe *et al.*, 2006). Cette dernière enzyme est responsable de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) connus pour leur implication dans l'athérosclérose (Ross *et al.*, 2010).

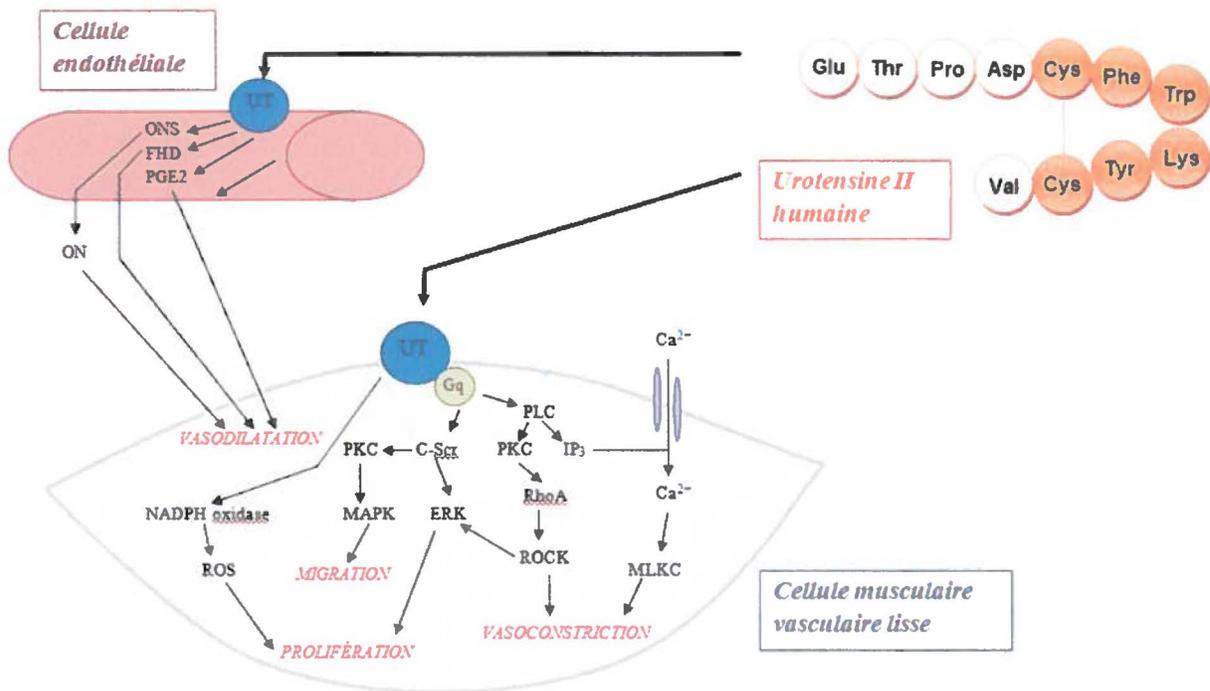


Figure 9: Voies de signalisation dans les CMVL et les cellules endothéliales (Ross *et al.*, 2010)

Puisque le système urotensinergique possède deux ligands pour un seul récepteur, il fut récemment proposé que chaque peptide pouvait parfois activer des voies de signalisation distinctes ou les moduler avec une efficacité différente (Chatenet *et al.*, 2012). Étant l'objet d'une découverte plus tardive, les voies de signalisation impliquant l'URP ont été beaucoup moins étudiées. En ce qui concerne ses voies d'activation, il est établi que l'URP est capable, tout comme l'U1, de provoquer la décharge des calciosomes de leur contenu (Dubessy *et al.*, 2008). Néanmoins, dans une étude de Jarry *et al.* (2010), il a été démontré avec des astrocytes que l'U1 et l'URP n'ont pas du tout les mêmes effets sur la voie des polyphosphoinositides (PIP). Par exemple, après utilisation de la toxine pertussique qui catalyse une ADP-ribosylation de la $G_{\alpha i}$, une modification qui maintient la sous-unité α dans une forme inactive provoquant ainsi une augmentation de l'AMPc suite à une réduction de l'inhibition de l'adénylyl cyclase (AC), la formation des PIP via l'U1 est inhibée de 50% alors qu'elle n'est pas affectée après stimulation par l'URP. Il est bien connu qu'une molécule, une fois liée à son récepteur, entraîne un changement de conformation qui permet au complexe d'activer des voies intracellulaires et ce, à des niveaux distincts (Kohout *et al.*, 2004, Roettger *et al.*, 1997). En fait, il ne faut pas considérer un récepteur comme une protéine statique mais bien comme une structure dynamique. Ainsi, lorsque le récepteur est activé par un ligand, il subit un changement de conformation propre à la molécule liée et ceci entraîne au final une réponse cellulaire modulée par la nature même de ce ligand. Donc, la conformation du récepteur indiquerait à la cellule quels éléments de la signalisation sont à privilégier et par conséquent, il y aurait des différences parfois même très marquées au niveau des effets biologiques obtenus (Chatenet *et al.*, 2012, Kenakin *et al.*, 2010).

1.5.2 Signalisation intranucléaire

L'ensemble des données obtenues à ce jour par différents groupes permet d'établir un modèle de signalisation intranucléaire complexe. Puisqu'il s'agit du même récepteur au noyau et à la membrane, il est probable que soient retrouvés les mêmes éléments de signalisation dans le cytosol et dans le nucléoplasme. Dans le cas des systèmes de l'angiotensine II, de l'entohéline-1 et des ligands β -adrénergiques, les voies PKC, PLC, IP₃, ERK 1/2 et de l' adénylyl cyclase (AC) sont bien interpellées lors de l'activation de leur récepteur nucléaire au niveau du cœur (Tadevosyan *et al.*, 2012). De ce fait, il a été démontré que plusieurs protéines G (G_s, G_i/G_o) et canaux ioniques (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Zn²⁺) faisaient aussi partie de la signalisation intranucléaire de nombreux systèmes peptidergiques (Bkaily *et al.*, 2002, Chatenet *et al.*, 2012, F. Gobeil *et al.*, 2006, F. Gobeil, Jr. *et al.*, 2003, Marrache *et al.*, 2004, Vaniotis *et al.*, 2011a, Willard *et al.*, 2000). De plus, Bkaily *et al.* (2009) ont montré l'implication importante du calcium nucléaire sur les pathologies cardiovasculaires. Le calcium intranucléaire peut agir sur la transcription des gènes, entre autres, par la voie de la protéine *C-AMP Response Element-binding* (CREB) (Bootman *et al.*, 2009).

1.6 Actions cardiovasculaires du système urotensinergique

Puisque les premiers effets observés chez le rat par l'UHG étaient reliés directement à la physiologie cardiovasculaire, l'importance du système urotensinergique (SU) sur l'activité du cœur et des vaisseaux était donc évidente. Toutefois, ce qui complique la compréhension du SU, c'est la divergence des réponses obtenues qui varient selon l'espèce, le type cellulaire, les tissus et le peptide impliqué (Douglas *et al.*, 2000 ; Prosser *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, 2010 ; Doan *et al.*, 2012).

1.6.1 Effets neurologiques et comportementaux

Cursoux *et al.* (2012) ont publié une revue qui décrit les effets dramatiques de l'épuisement professionnel sur la physiologie cardiovasculaire. Cette pathologie, qui résulte du stress, de l'anxiété et de la dépression, a de nombreux effets nocifs sur le cœur, les vaisseaux sanguins et les composantes du système nerveux régulant la machinerie cardiovasculaire. Bien qu'encore peu documenté, il est donc attendu que l'UHG et l'URP aient des actions significatives sur la physiologie du système nerveux. D'ailleurs, on retrouve une quantité importante d'UT dans le SNC, ce qui renforce l'hypothèse que le système urotensinergique intervient à ce niveau. Ainsi, *in vitro*, l'UHG agit comme un stimulateur de la libération de noradrénaline sur des coupes cérébrocorticales (Ono *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que l'administration centrale d'UHG et d'URP influençait le comportement de différents mammifères (Vaudry *et al.*, 2010). Notamment, chez le rat, nombreuses sont les actions centrales de l'urotensine II, comme le montrent les effets engendrés par une administration intracérébroventriculaire (ICV). Tout d'abord, on a constaté une augmentation de l'activité locomotrice du rat ainsi qu'un comportement relié à l'anxiété (Matsumoto *et al.*, 2004). Jégou *et al.* (2006) ont aussi montré la

présence du récepteur UT dans le septum latéral, connu pour son rôle essentiel dans les réponses comportementales liées au stress (Watson *et al.*, 2003 ; Singewald *et al.*, 2011). Ils ont aussi retrouvé ces récepteurs dans la *lamina terminalis*, dont le rôle est essentiel au contrôle des hormones agissant sur l'homéostasie cardiovasculaire (Jégou *et al.*, 2006). Finalement, une injection ICV chez le rat produit une augmentation du débit sanguin cérébral (Chuquet *et al.*, 2008) et lorsque l'UII est injectée dans le bulbe rachidien (régulateur de la pression sanguine et du rythme cardiaque), il y a bradycardie et dépression selon la dose (Lu *et al.*, 2002).

La sécrétion de facteurs de stress influence alors tout le métabolisme cardiaque : modification des effets inotropes, chronotropes et de l'osmorégulation, ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle (PA) (Watson *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2006).

1.6.2 Effets sur le coeur

Tout comme le SNC, le cœur est un des organes majeurs de production de l'UIIh (Charles *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2009). *In vitro*, l'urotensine II, selon la dose administrée, peut augmenter la force contractile du myocarde chez l'homme (Russell *et al.*, 2001). À fortes doses chez le rat, l'UIIh altère la contractilité myocardique et peut entraîner une tachycardie (Ames *et al.*, 1999 ; Gardiner *et al.*, 2001). Si cet animal reçoit une faible quantité d'UIIh, son débit cardiaque est alors légèrement augmenté, tandis qu'une diminution de ce dernier survient à concentrations élevées (Ames *et al.*, 1999).

1.6.3 Effets sur les vaisseaux sanguins

La communauté scientifique a longtemps cru que l'endothéline était l'agent vasoconstricteur le plus puissant. Il est vrai que l'effet observé à faibles concentrations est très significatif. Or, il a été démontré sur des artères désendothélisées de rat et d'homme que l'urotensine II et l'URP

peuvent avoir une puissance de 8 à 110 fois plus importante que l'ET-1 (Ames *et al.*, 1999; Maguire et Davenport, 2000; MacLean *et al.*, 2000; Labarère *et al.*, 2003 ; Chatenet *et al.*, 2004). L'action de l'UII est maximale sur les artères radiales, mammaires et coronaires pour lesquelles Maguire *et al.* (2000) ont observé une constriction 50 fois plus intense que celle observée avec l'ET-1. Les taux circulants d'UII sont de l'ordre du picomolaire autant chez l'homme que la femme. Ce taux est normal puisque l'UII n'est pas considérée comme une hormone circulante mais plutôt comme un peptide doté d'un mécanisme d'action intracrine/autocrine/paracrine. De plus, il est important de souligner que dans la majorité des pathologies cardiaques étudiées jusqu'à maintenant, ce niveau basal augmente grandement jusqu'à atteindre parfois des concentrations de l'ordre du nanomolaire. On peut donc envisager un rôle clé pour l'UII dans le système cardiovasculaire (Matsushita *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2010).

L'administration *in vitro* d'UII sur des tissus humains et de rat cause la constriction de l'aorte, des artères coronaires et des artères pulmonaires, en plus des artères radiales et des veines saphènes et ombilicales chez l'homme (Maguire *et al.*, 2000; MacLean *et al.*, 2000). Au niveau de l'aorte, la partie thoracique semble répondre plus intensément que les autres segments de ce vaisseau (Douglas *et al.*, 2000). De façon intéressante, chez le rongeur, une vasodilatation s'observe sur les artères rénales *in vitro* (Zhang *et al.*, 2003).

In vivo, chez le rat, une injection intraveineuse (IV) en bolus du peptide produit une baisse de longue durée de la PA. Par contre, une infusion constante de l'urotensine II ne semble avoir aucun effet (Sugo *et al.*, 2000 ; Gardiner *et al.*, 2001; Vaudry *et al.*, 2010). Böhm *et al.* (2002) soutiennent que l'administration IV de l'UII chez l'homme cause une vasoconstriction locale

uniquement tandis que Krum et Kemp (2007) concluent que les taux circulants d'urotensine II influencent la résistance périphérique vasculaire de manière hétérogène.

La vasodilatation, chez le rongeur, s'observe *in vivo* sur les artères mésentériques (Gardiner *et al.*, 2001). De plus, une constriction des vaisseaux de l'avant-bras et de la microvascularisation chez des patients hypertendus, par opposition à une dilatation chez des patients normotendus, sont dans les faits des effets caractéristiques de l'UII chez l'homme (Bohm *et al.*, 2002, Sondermeijer *et al.*, 2005).

L'urotensine II et l'URP possèdent donc des capacités vasoactives disparates. En effet, sur un vaisseau sanguin complet (*i.e.* en présence d'endothélium), on peut observer une vasoconstriction directe ainsi qu'une vasodilatation indirecte; cette dernière résultant probablement de la libération d'ON (par la voie L-arginine/ON chez le rat), de prostacycline (PGI₂) et de FHDE, mais qui peut être contrée par une augmentation des concentrations d'UII (Gibson *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 2004). Les puissants effets de l'UII_h et de l'UII_r chez le rat perfusé sont aussi observés sur les artères coronaires. Cette action a aussi été rapportée mais de manière moins impressionnante avec l'URP (Katano *et al.*, 2000; Prosser *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2010). Une injection d'UII provoque une modulation de la pression artérielle sur toutes les espèces étudiées, ainsi qu'une hausse du rythme cardiaque chez le rat (Conlon *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2003). Chez des patients, une dose de l'ordre du nanomolaire d'UII, injectée IV, a causé une élévation significative du rythme cardiaque et de la pression artérielle. À une dose mille fois moindre, ces effets n'ont pas été observés (Affolter *et al.*, 2002).

Lorsqu'une dose massive d'UII est injectée chez l'homme, il n'y a aucun changement physiologique marquant qui est observé. Ce phénomène se distingue de façon notable de ce que l'on obtient avec l'ANG-II et l'ET-1, à concentrations égales (Wilkinson *et al.*, 2002). Ainsi, une

faible quantité d'UII humaine administrée à un rat provoque une diminution de la résistance vasculaire locale alors qu'à plus fortes doses apparaissent les effets vasoconstricteurs typiques du peptide (Ames *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 2010). Finalement, l'UII est un agent angiogène puissant, autant sur des cellules en culture que sur des modèles vivants (Spinazzi *et al.*, 2006; Guidolin *et al.*, 2010) et possède aussi un effet proliférateur sur les CMVL (Ames *et al.*, 1999).

1.7 Pathologies associées au système urotensinergique

Ames *et al.* (1999) ont démontré qu'à des concentrations importantes d'urotensine II ($300 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1}$), les fonctions cardiovasculaires devenaient déficientes chez les macaques. Ainsi, ils ont observé une diminution importante du débit cardiaque, un affaiblissement de la contractilité du myocarde ainsi qu'une augmentation de la résistance vasculaire périphérique. Ces résultats ont laissé présager les effets nocifs que l'UII pouvait avoir sur la physiologie cardiovasculaire des mammifères lors d'un dysfonctionnement du système urotensinergique (SU). En revanche, les effets du SU varient selon l'espèce et le type cellulaire impliqué (Ames *et al.*, 1999). Il a d'ailleurs été démontré que l'UII, chez l'homme, pouvait augmenter la force contractile du cœur (Russell *et al.*, 2001).

1.7.1 Insuffisance cardiaque

Au niveau du cœur, on peut observer une augmentation de tous les éléments du système urotensinergique dans les ventricules et oreillettes du rat atteint d'insuffisance cardiaque. Des immunomarquages sur le myocarde de rats sains et de rats présentant une insuffisance cardiaque ont permis de constater une forte augmentation de l'expression des ARNm de l'UII et de l'URP chez ces derniers par rapport aux animaux sains. Les auteurs ont rapporté qu'une augmentation de 10% des ARNm de l'UII par rapport à son paralogue (Nakayama *et al.*, 2008). Les deux coupes cardiaques (ventricules et oreillettes) montraient des expressions identiques du récepteur UT. Les taux circulants d'urotensine II chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque sont élevés mais les taux d'URP le sont davantage (Richards *et al.*, 2002; Jani *et al.*, 2013). *Ex vivo*, des échantillons de coeurs provenant d'humains affectés par cette pathologie ont montré une présence importante d'urotensine II, particulièrement au niveau des cardiomyocytes. De plus, la

quantité d'UII et d'URP augmente au fur et à mesure que la maladie s'aggrave. De plus, les quantités d'UII et d'URP augmentent au fur et à mesure que la maladie s'aggrave au niveau des tissus myocardiaux (UII) et au niveau de la circulation sanguine (URP) (Douglas *et al.*, 2002 ; Janni *et al.*, 2013).

1.7.2 Hypertension

Dans les organes cardiovasculaires et rénaux de rats souffrant d'hypertension, des ARNm d'UII, d'URP et d'UT ont été trouvés (Douglas *et al.*, 2002, Nayakama *et al.*, 2008, Hirose *et al.*, 2009, Mori *et al.*, 2009). De plus, une hausse de la PA et du rythme cardiaque a pu être observée avec l'UIIr sur des rats hypertendus (Lin *et al.*, 2003). Une étude de Hirose *et al.* (2009) a montré que l'UII et l'URP n'agissent pas de la même façon dans l'hypertension. En comparant la production d'ARNm chez les rats normotendus *versus* des rats hypertendus, ils ont constaté en situation pathologique une hausse des ARNm codant pour l'UII dans les oreillettes, alors qu'une augmentation de ceux codant pour l'URP ne fut observée que dans l'aorte. Une vasoconstriction additionnelle est induite à la suite d'injections d'UII chez des patients hypertendus alors que les mêmes doses entraînent l'effet vasculaire opposé chez des sujets sains (Sondermeijer *et al.*, 2005). Aussi, des analyses d'échantillons d'urine ont montré une forte hausse de l'UII par rapport au taux des volontaires sains (Matsushita *et al.*, 2001).

1.7.3 Athérosclérose et infarctus myocardial

Chez le rat, on a constaté une élévation du peptide UII et de son récepteur UT dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'infarctus du myocarde (Zou *et al.*, 2001, Tzanidis *et al.*, 2003; Pakala *et al.*, 2008). L'UII accélère aussi le processus athérosclérotique qui, fait à noter, peut être bloqué par

l'urantide. Cette molécule est l'antagoniste compétitif le plus puissant connu du système urotensinergique (Patacchini *et al.*, 2003).

Plusieurs indices permettent d'affirmer que l'UII est impliquée dans l'athérosclérose chez l'homme. Premièrement, les taux d'UII chez les patients atteints d'athérosclérose sont élevés, particulièrement aux endroits où sont retrouvés les plaques athéromateuses (Bousette *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2005; Suguro *et al.*, 2007). De plus, ce peptide est capable d'agir en synergie avec les lipoprotéines de basse densité (LDL) en induisant une voie de signalisation dans les CMVL qui augmente la formation de ces plaques (Watanabe *et al.*, 2001). Troisièmement, l'analyse de lésions athérosclérotiques cardiaques chez l'humain a montré une augmentation de l'UII et de son récepteur (Bousette *et al.*, 2004; Maguire *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2005). Comme le rôle des monocytes est reconnu dans l'aggravation de cette pathologie, il n'est pas surprenant de retrouver le récepteur UT à leur surface (Ségain, *et al.*, 2007). De plus, tout porte à croire que la prolifération des CMVL *via* l'UII serait impliquée dans la formation de plaques athérosclérotiques. La théorie du rôle autocrine et paracrine de ce peptide dans la formation des plaques d'athéromes a aussi été avancée (Ross *et al.*, 2010). L'UII et l'URP ont la capacité de diminuer les dommages causés au muscle cardiaque humain lors d'une ischémie en agissant sur la créatine kinase. Par contre, seule l'UII peut diminuer la présence du peptide natriurétique de l'oreillette (Prosser *et al.*, 2008). Des taux plutôt bas d'UII plasmatique (2.61 ± 1.47 ng/ml vs. 3.60 ± 2.20 ng/ml) ont été retrouvés chez des patients présentant des lésions myocardiales sérieuses (Babińska *et al.*, 2012). Finalement, une étude récente de You *et al.* (2012) a démontré qu'une délétion de l'UII ou l'utilisation d'un antagoniste sur des souris, chez qui une athérosclérose a été induite, ont permis une réduction importante de cette pathologie.

1.7.4 Hypertrophie

L'urotensine II possède également un rôle dans l'hypertrophie cardiaque et vasculaire (Chatenet *et al.*, 2012). Chez le rat hypoxique, le myocarde surexprime UT, entraînant une hypertrophie cardiaque (Zhang *al.*, 2002). Par exemple, Tzanidis *et al.* (2003) ont proposé un modèle d'hypertrophie chez le rat. Pour mimer la réponse pathologique cellulaire du SU, les auteurs ont transfecté des cardiomyocytes néonataux de rat. Ainsi, la surexpression du récepteur, mimant la condition pathologique a permis d'observer une réponse hypertrophique.

1.7.5 Cardioprotection

Même s'il semble que le système urotensinergique joue un rôle nocif dans plusieurs cas, certains auteurs ont rapporté des effets cardioprotecteurs pour l'UII et l'URP. Par de nombreuses actions, UII_r et URP seraient capables de protéger le cœur de l'ischémie en augmentant le débit sanguin de la vascularisation coronaire et en diminuant la contractilité et la demande énergétique du muscle cardiaque (Prosser *et al.*, 2008). Khan *et al.* (2007) ont notamment démontré que des patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont une meilleure chance de guérison si les taux d'UII circulants sont élevés. Par ailleurs, il a aussi été démontré que la transactivation du *récepteur du facteur de croissance épidermal* (RFCE) aurait des effets cardioprotecteurs (Esposito *al.*, 2011).

Le fait que l'UII et l'URP soient modulés, parfois très intensément, dans une multitude de maladies suggère que ces peptides pourraient être utilisés dans le pronostic et la thérapie subséquente de nombreuses pathologies. Des antagonistes du SU ont déjà été développés dans le but de combattre des maladies comme l'asthme et la néphropathie diabétique. Toutefois, dû à leur faible puissance, aucun traitement impliquant ce système n'existe à l'heure actuelle (Chatenet *et al.*, 2012).

1.8 Objectifs de la recherche

La pharmacologie nucléaire des RCPG est maintenant bien connue pour quelques systèmes peptidiques retrouvés dans la physiologie cardiovasculaire. Autant avec l'angiotensine II (Tadevosyan *et al.*, 2012), l'endothéline-1 (Merlen *et al.*, 2013) et les ligands β -adrénergiques (Vaniotis *et al.*, 2011), ces systèmes nucléaires ont un rôle à jouer dans l'homéostasie cardiaque et lors de pathologies. De ce fait, les RCPG nucléaires peuvent être vus comme de nouvelles cibles thérapeutiques pour moduler la progression d'une maladie cardiovasculaire (Tadevosyan *et al.*, 2012).

Comme mentionné précédemment, le récepteur UT a été identifié au noyau de cellules humaines comme des astrocytes (U87) et des neuroblastomes (SH-SY5Y) (Nguyen *et al.*, 2012). De plus, à l'aide d'immunobuvardage de type Western, notre laboratoire a montré que ce récepteur est retrouvé chez le rat et le singe, au niveau d'extraits de tissus de cerveau, de moelle épinière et de cœur (Doan *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2012) (Voir Figure 10).

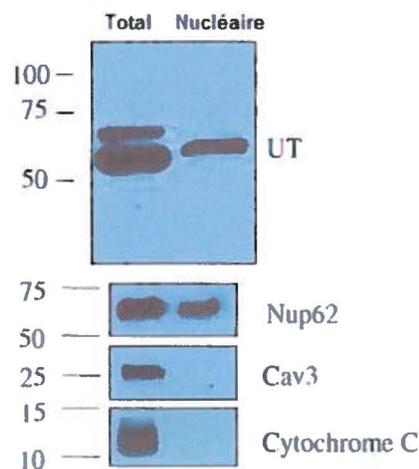


Figure 10: Présence de UT dans le noyau de cellules cardiaques de rat (Doan *et al.*, 2012)
(Nup62 : Nucléoporine 62, Cav3 : Cavéoline 3)

Des études de liaison sur les noyaux de cœur de cellules de rat ont aussi été effectuées avec l'UIIh, l'URP, l'urantide (un antagoniste du SU) et la somatostatine. Ces travaux ont permis de confirmer la présence de UT au noyau des cellules cardiaques (Doan *et al.*, 2012).

Au niveau du mode d'action, une fois l'internalisation complétée au niveau de l'endosome, le ligand se détacherait du récepteur grâce aux conditions acides de cet organelle (Giebing *et al.*, 2005). L'une des tâches attribuées aux RCPG nucléaires serait la régulation de nombreux phénomènes nucléaires : ils pourraient influencer directement l'initiation de transcription (Boivin *et al.*, 2006), les facteurs de transcription (Robitaille *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2011), l'expression des gènes (Vaniotis *et al.*, 2011), la synthèse d'ADN (Watson *et al.*, 2000) ainsi que la modification d'histones (Re *et al.*, 2010).

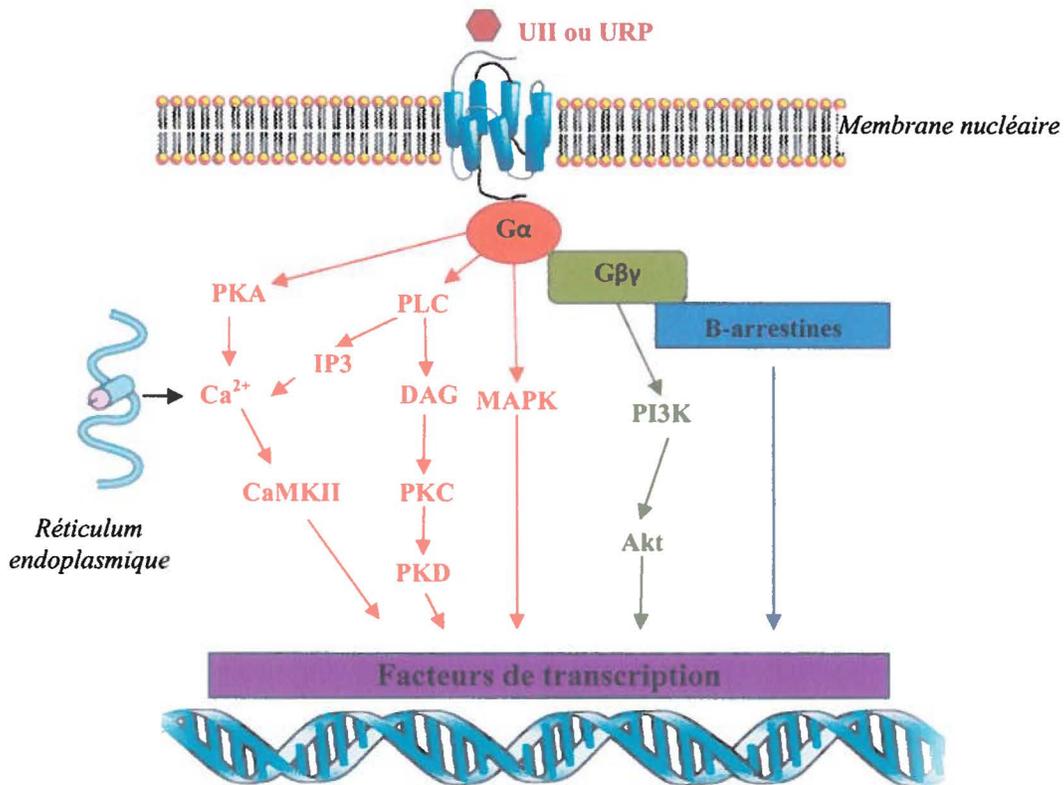


Figure 11: Voies potentielles de signalisation intranucléaire de UT
(Orange ; voie Gα , Vert ; voie Gβγ, Bleu ; voie des β-arrestines) (Vaniotis *et al.*, 2011)

Par ailleurs, le déclenchement des voies de signalisation nucléaires peut provenir d'un amalgame spécifique des protéines G, puisqu'il est bien connu que ces dernières ont un impact sur ce phénomène (Figure 11) (Pétrin *et al.*, 2011; Vaniotis *et al.*, 2013). Il a d'ailleurs été démontré que les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G, libérées suite à l'activation de G_q , permettent la phosphorylation de ERK1/2 ainsi que son accumulation dans le noyau (Lorenz *et al.*, 2009). Il est d'autant plus intéressant de savoir que la voie ERK1/2 et la voie MAPK sont recrutées sur différents sites transcriptionnels de la chromatine (Ferreiro *et al.*, 2010; Pokholok *et al.*, 2006).

Le but de ce travail de recherche a été de contribuer à la compréhension du rôle du système urotensinergique au noyau. ***L'hypothèse émise à partir des faits connus du système urotensinergique a été la suivante : l'urotensine II et l'URP activent ou inhibent des voies de signalisation nucléaires distinctes .*** Pour ce faire, nous avons établi deux objectifs :

1. Caractériser un modèle cellulaire de cardiomyocytes de souris et un modèle de cellules de cœur de rat pour étudier le système urotensinergique au noyau;
2. Identifier les voies de signalisation activées par le récepteur nucléaire de l'urotensine II et de l'URP ;

Pour atteindre nos objectifs, nous avons d'abord synthétisé les peptides d'intérêt soit l'UII h , l'UII r et l'URP en utilisant la synthèse peptidique sur phase solide. Nous avons par la suite établi deux modèles d'étude : un modèle *in vitro*, constitué de cardiomyocytes murins ainsi qu'un modèle *ex vivo* faisant usage de noyaux de cellules de cœur de rat. La présence des récepteurs UT sur le modèle cellulaire a été confirmée par immunobuvardage de type Western.

Par la suite, nous avons mesuré l'effet des peptides sur les noyaux isolés des deux modèles en évaluant la production de transcrits d'ARNm. Finalement, pour identifier quelle(s) voie(s) de

signalisation est/sont activée(s) par l'Ull ou l'URP, nous avons utilisé des inhibiteurs connus des voies les plus significatives soit celles de l'activation de MEK 1/2 (PD98059), de la PKC (Gö 6983), de la PKA (H89), des MEK1 et MEK2 (U0126) et de l'IP₃ (*2-Aminoethoxyphenyl borate* ou 2-APB).

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Synthèse des peptides du système urotensinergique

Pour produire l'UII humaine et de rat, ainsi que l'URP, nous avons utilisé la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS). Deux types de chimie ont été utilisés à des fins pédagogiques pour les synthèses peptidiques : Fmoc et Boc. Le choix de l'une ou l'autre de ces méthodologies dépend entre autres de la séquence du peptide.

Pour ce faire, les résines et acides aminés ont été achetés chez Chem-Impex (Wood Dale, IL, USA). Les solvants employés pour les lavages ont été le diméthylformamide (DMF), le méthanol (MeOH) et le dichlorométhane (DCM). Ils ont été obtenus de Fisher Scientific (Nepean, ON, CAN). La pipéridine utilisée en chimie Fmoc pour les déprotections des dérivés d'acides aminés a également été obtenue de ce fournisseur. Comme réactifs de condensation nous avons privilégié d'une part, le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium (chimie Boc) et d'autre part, le COMU (hexafluorophosphate de (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidénaminoxy) diméthylamino-morpholino-carbénium (chimie Fmoc). Les couplages ont été réalisés en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) ou de collidine. Le BOP et le DIEA ont été achetés chez Matrix Innovation (Montréal, QC, CAN), le COMU chez Luxembourg Biotechnologies (Rehovot, ISR) et la collidine chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). L'acide trifluoroacétique (TFA), servant en chimie Boc à la déprotection des dérivés d'acides aminés ou comme réactif de clivage des peptides de leur résine lorsque l'on est en chimie Fmoc, provient de PSIG (Montréal, QC, CAN). Finalement, l'acide fluorhydrique (HF) utilisé en chimie Boc comme réactif de clivage des peptides de leur résine a été acheté chez Matheson Gas Products (Ottawa, ON, CAN).

Les synthèses ont été réalisées manuellement au moyen d'une rampe à réacteurs multiples. Pour l'UIIr, la synthèse a été effectuée en chimie Fmoc (Tableau IV). Deux grammes de résine Wang (substitution 0,8 mmole/g) ont été utilisés. Ensuite, 4 équivalents de Fmoc-L-isoleucine (dernier acide aminé du peptide), soit 0,2 g, dissous dans du DMF, ont été versés dans le milieu réactionnel. Pour activer la liaison du résidu, 3.3 équivalents de pyridine (poids moléculaire : 79,1g/mole, densité : 0,978 g/L) et 2 équivalents de chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl (poids moléculaire : 209,46 g/mole, densité : 1,462 g/L) ont été ajoutés à la suspension de résine maintenue sous atmosphère d'argon. Ce mélange a été agité pendant 20 heures.

Pour calculer la substitution, environ 10 mg du support solide ont été prélevés après lavages (Tableau IV) et le poids exact a été établi après séchage. Cet échantillon a été suspendu dans environ 3 mL de 20% pipéridine/DMF (v/v) et agité sans arrêt pendant 3 minutes. L'absorbance du complexe formé par la libération du groupe Fmoc par la pipéridine. À 290 nm, le coefficient d'extinction molaire de l'adduit dibenzofulvène-pipéridine est $\epsilon = 5800 \text{ mL}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Par analogie avec la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot l \cdot C$), et en fonction de la méthode utilisée, on calcule la substitution de la résine en mmole/g au moyen de l'équation

$$\text{Substitution} = (A \times 3 \text{ mL}) / (5800 \text{ mL}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times \text{poids en mg} \times 10^{-3})$$

Si la lecture d'absorbance était de 0,506 alors, calculée à partir d'un échantillon de résine de 1 mg, la substitution de la résine était de 0,260 mmole/g.

Pour la synthèse, 0,5 g du support polymérique Fmoc-Ile-Wang a été transféré dans un réacteur. Des volumes de 10 mL de DMF et de 10 mL de DCM ont ensuite été ajoutés et le tout a été agité pendant 45 minutes. Par la suite, la fonction amine de l'acide aminé a été déprotégée (retrait du

groupe protecteur Fmoc) en utilisant un mélange de 20% pipéridine dans le DMF, pendant 15 minutes. L'acide aminé suivant dans la synthèse soit Fmoc-Cys(Trt)-COOH a ensuite été attaché en utilisant 3 équivalents du dérivé de l'acide aminé, 3 équivalents de COMU et 3 équivalents de collidine. Après vérification de l'achèvement du couplage et les lavages appropriés, le cycle d'incorporation d'un acide aminé a été repris en substituant cependant la collidine par le DIEA s'il ne s'agit pas d'une cystéine.

Tableau IV: Protocole de synthèse en chimie Fmoc

<i>Étapes</i>	<i>Produit</i>	<i>Durée</i>	<i>Nombre de répétitions</i>
1. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
2. Déprotection de NH ₂ -α	20% Pipéridine/DMF	15 minutes	1
3. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
4. Lavage de la résine	MeOH	2 minutes	3
5. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
6. Couplage	Fmoc-Acide aminé-protection R + DMF	60 minutes	1*
7. Lavage de la résine	DMF	2 minutes	3
8. Lavage de la résine	MeOH	2 minutes	3
9. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
10. Test de Kaiser	Phénol, KCN et ninhydrine	2 minutes	1

* Dépend du résultat obtenu avec le test de Kaiser

Les acides aminés employés pour cette synthèse ont été les suivants : Fmoc-pGlu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

Le peptide a été clivé de la résine avec un mélange de 95% TFA, 2.5% de triisopropylsilane (TIS) et 2,5% d'H₂O, pendant 2 heures. Il a par la suite été précipité dans l'éther, a été isolé et a été cyclisé en le solubilisant d'abord dans de l'acide acétique (70%). La réaction de cyclisation a été effectuée par ajout d'iode (10% (p/v) dans MeOH) jusqu'à ce que la solution ait une couleur orange (réaction d'environ 30 minutes). Pour stopper la réaction, nous avons ajouté de l'acide ascorbique jusqu'à ce que la décoloration soit persistante. Le liquide a été évaporé afin d'obtenir un peptide brut de clivage (BDC) cyclisé. La masse du BDC a été confirmée par spectrométrie MALDI-TOF. Le peptide a ensuite été purifié par chromatographie en phase liquide à haute performance sur phase inverse (CLHP-PI) préparative. La purification a été effectuée à l'aide d'une colonne Phenomenex Jupiter C₁₈ (15-20 μm, 300Å) fixée à un appareil Waters muni d'une pompe 590. La longueur d'onde du détecteur a été établie à 229 nm et le débit à 5 mL/minute. Le gradient utilisé a été de 0-48% d'ACN (60% dans H₂O) (en commençant dans H₂O/0,05% TFA) sur une plage de 90 minutes. Toutes les fractions correspondant à un pic d'élution majeur ont été soumises à la CLHP-PI analytique au moyen d'un appareil Beckam Goldsystem (modèle 128). La phase inverse était contenue dans une colonne de type Phenomenex Jupiter C₁₈ (250 x 4,6 mm, 4 μm, 90 Å) et le débit a été fixé à 1 mL/min.

Tableau V: Protocole de synthèse en chimieBoc

<i>Étapes</i>	<i>Produit</i>	<i>Durée</i>	<i>Nombre de répétitions</i>
1. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
2. Déprotection de NH ₂ -α	80% TFA avec 1% de <i>para</i> -crésol	15 minutes	1
3. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
4. Lavage de la résine	MeOH	2 minutes	3
5. Neutralisation	10% DIEA/DCM	2 minutes	3
6. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
7. Couplage	Boc-Acide aminé- protection R + DCM	60 minutes	1*
8. Lavage de la résine	DMF	2 minutes	3
9. Lavage de la résine	MeOH	2 minutes	3
10. Lavage de la résine	DCM	2 minutes	3
11. Test de Kaiser	Phénol, KCN et ninhydrine	2 minutes	1

* Dépend du résultat obtenu avec le test de Kaiser

Les synthèses de l'UIIIh et de l'URP ont été réalisées en chimie Boc, en utilisant une résine chlorométhylée comme support solide (résine de Merrifield) et selon les étapes apparaissant au Tableau V. Le couplage du premier acide aminé a été réalisé au moyen de sel de césium (3 équivalents) dissous dans un mélange 4 :1 d'EtOH/H₂O.

Ce sel de l'acide aminé (Boc-Val dans les deux cas) a été obtenu par neutralisation de la fonction acide du résidu en additionnant du bicarbonate de césium jusqu'à pH neutre. Le produit a été séché par évaporation azéotrope en présence de toluène et les cristaux obtenus ont été dissous dans du DMF contenant une petite quantité d'iodure de potassium, lequel sert à catalyser la réaction de substitution sur la résine. La réaction est d'une durée de 20 heures, sous agitation, à 50°C. La substitution est alors établie par comparaison du poids de la résine séchée, avant et après l'introduction du premier résidu du peptide.

Pour la synthèse, une quantité de 0,5 g de la résine Boc-Val-Merrifield a été utilisée pour chacun des peptides. La fonction amine de l'acide aminé a été déprotégée (retrait du groupement Boc) avec un mélange de 80% TFA et 1% de *para*-crésol dans le DCM pendant 15 minutes. L'addition des acides aminés a ensuite été réalisée en utilisant comme agent de couplage 3 équivalents de BOP. Les bases utilisées (3 équivalents également) ont été le DIEA ou la collidine selon l'acide aminé couplé. Les acides aminés employés pour la synthèse d'UIIIh et d'URP ont été les suivants : Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Cys(*p*MeO-Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Trp(For)-OH, Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH, Boc-Tyr(2-Br-Z)-OH, Boc-Val-OH et Boc-Ala-OH. L'ajout des acides aminés a été vérifié au moyen d'un

test à la ninhydrine (test de Kaiser). Après l'assemblage du peptide, son clivage du support solide a été obtenu par traitement au HF liquide, en présence de *m*-crésol et d'éthanethiol.

Les synthèses n'ont pas été effectuées dans un contexte d'optimisation. Le poids obtenu pour UIIr est de 31,6 mg et de 22 mg pour l'URP. L'UIIh provient d'un lot de quatre synthèses différentes et la quantité initiale est donc inconnue.

2.2 Présence des récepteurs UT dans la lignée H9C2 et dans les cellules de cœur de rat

2.2.1 Modèles d'étude

Culture cellulaire

Nous avons utilisé la lignée cellulaire H9C2 comme modèle de cellules cardiomyocytes de rat pour le système urotensinergique (Figure 12). Elles ont été fournies par le Dr Bruce Allen de l'Institut de cardiologie de Montréal. Ces cellules proviennent du myocarde de la lignée cellulaire embryonique du rat BD1X. Les H9C2 sont cultivées dans le

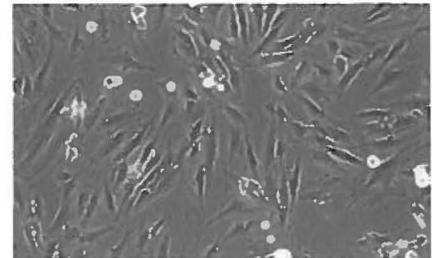


Figure 12: Cellules H9C2

milieu « Eagle modifié Dulbecco » (DMEM) contenant 4.5 g/L de glucose, 4 mM de L-glutamine et 1.5 g/L de bicarbonate de sodium (NaHCO_3). Une proportion de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) ainsi que 1% de pénicilline-streptomycine 100x sont ajoutés au milieu. Tous ces composants ont été achetés chez Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA).

Ces cellules ont été congelées dans leur milieu contenant 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour assurer leur intégrité. Pour leur culture, elles ont été décongelées et centrifugées pour éliminer le maximum de DMSO. Elles ont ensuite été incubées dans un flacon de 175 cm² de culture traité spécialement pour les cellules adhérentes (Cell+), dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO₂. Chaque jour, le milieu de culture a été vérifié et changé s'il contenait quelques cellules mortes. Lorsque leur croissance a atteint environ 70% de confluence, le milieu de culture a été aspiré et le tapis cellulaire a été rincé avec du tampon « *phosphate buffer saline* » (PBS). Par la suite, un traitement à la trypsine/PBS (0,05%) a permis de détacher les cellules du

fond du flacon. Cette incubation a été de 5 minutes à 37°C, sans secouer le flacon. L'action de la trypsine a ensuite été ralentie en remettant du milieu de culture frais (4 fois plus que la quantité de trypsine ajoutée). Le nombre de cellules vivantes par mL a été mesuré par décompte sous microscope, en présence du bleu de trypan qui colore les cellules mortes. La trypsine a été obtenue de Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA) et les flacons ont été achetés chez Starstedt (Montréal, QC, CAN). Les cellules n'ont jamais été utilisées au-delà du passage 20.

Cœurs de rat

Pour étudier le système urotensinergique nucléaire *ex vivo*, l'isolation des noyaux de cœurs de rat a été employée. Uniquement des rats mâles Sprague-Dawley provenant de Charles River (St-Constant, QC, CAN) ont été utilisés. Chaque expérience a été exécutée avec des rats âgés de 4 à 6 semaines et dont le poids variait entre 200 g et 300 g. Chaque animal a reçu la même nourriture et a été gardé dans le même environnement, en accord avec les directives du Comité institutionnel de protection des animaux.

Le jour de l'expérience, un ou deux rats ont été sacrifiés dans une chambre à CO₂. La mort de l'animal a été confirmée par vérification du réflexe pupillaire. Ensuite, la colonne vertébrale du rat a été sectionnée et la partie avant de l'animal a été ouverte en commençant l'incision au niveau ventral et en la poursuivant jusqu'à la base du cou. L'aorte lombaire a été incisée afin de saigner l'animal et de laisser ainsi le cœur dégagé. L'aorte thoracique a ensuite été coupée au niveau de sa partie ascendante et de la crosse aortique puis, après l'avoir détachée des tissus avoisinants et nettoyée, elle a été placée dans du PBS refroidi sur glace.

2.2.2 Immunobuvardage de type Western

A. Lyse cellulaire et nucléaire

A1. Lyse de H9C2

Les H9C2 ont été cultivées dans trois flacons de 175 cm², en démarrant avec 100 000 cellules par flacon. Lorsqu'une confluence de 70-80% a été atteinte, le milieu de culture a été retiré et les échantillons ont été rincés avec 8 mL de PBS stérile froid. Un des trois flacons a été utilisé pour isoler les protéines totales (TOT) tandis que les deux autres ont servi pour la préparation des protéines nucléaires (NUC). Les cellules ont été délicatement détachées avec un grattoir et mises dans des tubes afin d'être centrifugées (1200 rpm, 5 minutes, 4°C). Le surnageant a été remplacé par du PBS non stérile froid (même volume) et les échantillons ont été centrifugés à nouveau (1200 rpm, 5 minutes, 4°C). Pour l'échantillon TOT, le surnageant a été enlevé et du tampon de lyse a été ajouté (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,5% (v/v) Igepal; 0,1% (p/v) SDS; 0,1% (v/v) Triton X-100; Inhibiteurs de protéases (10 µl/mL) (Sigma Aldrich, ON, CAN)). Le détergent Igepal permet de solubiliser la membrane cellulaire. Les cellules ont été dispersées au vortex et lysées par rotation à 4°C pendant 60 minutes. Une dernière centrifugation a permis de sédimenter les débris membranaires et le surnageant contenant les protéines a été conservé à -20°C. Pour obtenir l'échantillon NUC, deux étapes supplémentaires ont été nécessaires. Elles ont permis de fragiliser encore davantage la membrane cytoplasmique avant de procéder à dernière étape de la lyse. Ainsi, après avoir enlevé le PBS, nous avons ajouté 500 µL d'un tampon A (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0,5% (v/v) Igepal). L'échantillon a été incubé sur glace pendant 15 minutes puis a été centrifugé à 1400 rpm pendant 10 minutes (toujours à 4°C). Le surnageant a été jeté et une seconde incubation a été effectuée avec cette fois-ci le tampon B, qui est constitué du tampon A avec une concentration double d'Igepal. L'échantillon a

été incubé à nouveau sur glace pendant 15 minutes et a été centrifugé à 1400 rpm pendant 10 minutes (toujours à 4°C). Le surnageant a été jeté et le tampon de lyse régulier (50 mM Tris-HCl pH=8; 150 mM NaCl; 0,5% (v/v) Igepal; 0,1% (p/v) SDS; 0,1% (v/v); Triton X-100; Inhibiteurs de protéases) est ensuite ajouté.

A2. Lyse des cellules de cœur de rat

La procédure a été différente pour les tissus cardiaques. Les tissus congelés ont d'abord été amenés à 4°C. Ils ont ensuite été coupés en petits morceaux puis homogénéisés au moyen d'un Polytron (6000 rpm) gardé à 4°C. Pour obtenir les protéines totales, la même technique qu'au point précédent (A1) a été utilisée. Toutefois, pour les protéines nucléaires, une centrifugation a d'abord été effectuée à 500 rpm (à 4°C) pendant deux minutes afin d'éliminer les fragments cellulaires. Le surnageant a ensuite été récupéré et centrifugé à nouveau (2000 rpm, 5 minutes, 4°C). Le culot a été suspendu dans du tampon B contenant 1% d'Igepal et après une incubation de 5 minutes, une autre centrifugation a été réalisée pendant 10 minutes, à 1550 rpm. Les étapes impliquant les tampons A et B, décrites précédemment, ont été appliquées, de même que la méthodologie pour les protéines totales.

B. Quantification protéique et préparation des échantillons

Le dosage des protéines a été réalisé en utilisant le test « *Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay* » (Pierce Biotechnology, IL, USA) qui permet une quantification par colorimétrie. D'abord, pour la production d'une courbe standard, des dilutions d'albumine sérique bovine (BSA) variant entre 25 µg et 2000 µg, ont été préparées selon les indications du fournisseur. Puis, dans une plaque de 96 puits, un volume de 5 µL de chaque standard et de chaque échantillon a été ajouté en triplicata. Nous avons ensuite complété chaque puits avec 150 µL de

la solution de Coomassie, à l'abri de sources lumineuses pour éviter la dégradation de la molécule. Après 30 secondes d'agitation, le mélange a été laissé au repos pendant 10 minutes à la température de la pièce (TP). L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de marque Spectramax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La concentration en protéines (en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de chaque extrait a été établie à l'aide de la courbe standard.

C. *Migration sur gel SDS-PAGE*

Connaissant la concentration en protéines des échantillons, une quantité connue (généralement entre 30 μg et 70 μg) a été ajoutée au tampon de charge sur gel (3,0 mL H_2O distillée; 1,0 mL Tris-HCl 0,5 M (pH=6,8); 1,6 mL glycérol; 1,6 mL de 10% SDS; 0,4 mL β -mercaptoéthanol; 0,4 mL 0,5% (v/v) de bromophénol bleu) pour obtenir un volume de chargement final se situant entre 10 μL et 20 μL . Les échantillons ont été chauffés deux minutes à 95°C, pour optimiser la dénaturation protéique, avant l'injection dans un puits du gel de concentration. La migration des protéines a été réalisée sur un gel de polyacrylamide constitué de deux parties à pH distinct: le gel de concentration et le gel de résolution. Ce dernier était composé de 10% acrylamide/bis-acrylamide (3,3 mL de 30% bis-acrylamide; 4,0 mL H_2O distillée; 2,5 mL Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8); 100 μL de 10% SDS; 50 μL de 10% persulfate d'ammonium; 10 μL TEMED) à pH basique. Quant au gel de concentration, il possédait 4% en acrylamide (1,3 mL 30% de bis-acrylamide; 6,1 mL H_2O distillée; 2,5 mL Tris-HCl 1,5 M (pH=6.8); 100 μL de 10% SDS; 50 μL de 10% persulfate d'ammonium; 10 μL TEMED) avec un pH final de 6,8. Les gels de résolution et de concentration ont été successivement coulés et polymérisés et après l'ajout des échantillons dans les puits d'injection du gel de concentration, l'électrophorèse a été effectuée à voltage constant (120 V) au moyen d'un système baignant dans une cuve contenant un tampon glycine

(8,8 g glycine; 6,04 g Tris-base; 20 g SDS; 1 L H₂O ; pH=8,3). Un puits a été utilisé pour la migration de marqueurs de poids moléculaire *Precision Plus Protein*[®] de Bio-Rad.

D. Transfert sur membrane PVDF

Après la migration des protéines, celles-ci ont été transférées sur une membrane de PVDF (Bio-Rad, Montréal, QC, CAN) activée en la plongeant dans du méthanol. Par la suite, comme montré à la Figure 13, un montage de type « sandwich » a été assemblé. Le montage a été installé dans une cuve contenant du tampon de transfert (700 mL H₂O; 200 mL MeOH; 100 mL tampon 10 X (250 mM Tris-Base; 1920 mM glycine; 20% (v/v) MeOH ; pH 8,3).

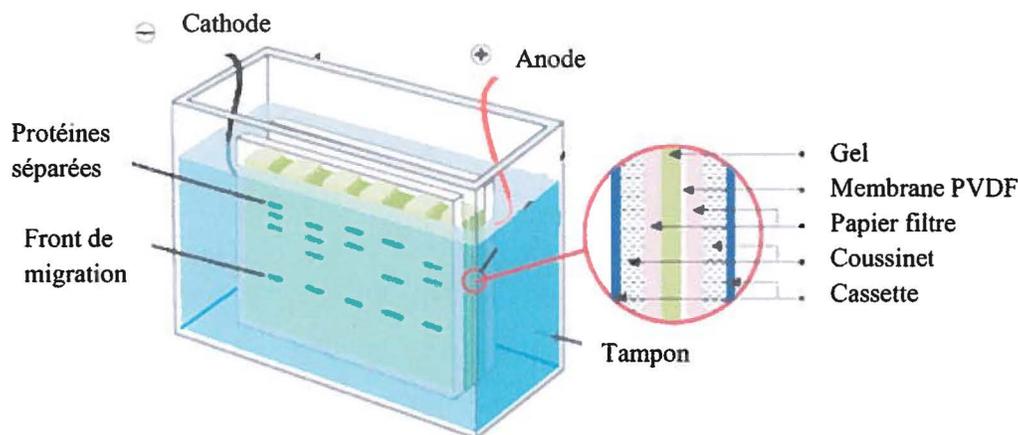


Figure 13: Montage du "sandwich"

(<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=C946AFF6-CCD2-A65C-8A96-03C4AC3E1E07#overview>)

Puisque le transfert des protéines, du gel vers la membrane, produit beaucoup de chaleur, des blocs glacés étanches (*Ice packs*) ont été placés à l'intérieur de la cuve et la solution a été constamment agitée au moyen d'un barreau magnétique. Le transfert a été effectué à 30V durant toute la nuit dans une pièce à 4°C.

E.

Immunobuvardage

Une fois les protéines des échantillons transférées sur la membrane de PVDF, une solution de 5% (p/v) de lait écrémé dans du *Tris-buffered saline* 10 X (TBS) (12,2 g Tris-base ; 90 g NaCl ; 1 L H₂O ; pH 7,4) a été utilisée pour la saturer en protéines. Cette étape a duré environ 90 minutes, avec une agitation constante. La membrane a ensuite été lavée trois fois avec du *Tris-buffered saline* 1X auquel on a ajouté 0,1% Tween (TBST).

Pour détecter le récepteur de l'urotensine II, un anticorps polyclonal anti-UT de rat, produit chez la chèvre (dilution 1:200) (Genetex, San Antonio, TX, USA) et étant dirigé contre le C-terminal de la protéine, a été employé. De plus, pour s'assurer de la pureté de nos échantillons nucléaires, la présence de la nucléoporeine 62, ainsi que l'absence de cavéoline-3 et du cytochrome *c* ont été vérifiées au moyen d'anticorps dirigés contre ces protéines (dilution 1:500). L'anti-nucléoporeine 62 (monoclonal), l'anti-cavéoline-3 (monoclonal) et l'anti-cytochrome *c* (monoclonal), produits chez le lapin, ont été commandés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps primaires ont été dilués dans du TBST, auquel a été ajouté 1% p/v de BSA pour éviter des liaisons non spécifiques. Chacune des membranes a été incubée avec l'anticorps désiré, en gardant une agitation constante et ce, pendant une heure à TP ou une nuit à 4°C.

La membrane a été subséquemment lavée trois fois avec du TBST avant la seconde incubation avec l'anticorps secondaire. Pour l'anti-UT, un anticorps anti-chèvre a été utilisé (dilution 1:1000), alors qu'un anticorps anti-lapin a été nécessaire pour les trois autres protéines à l'étude (dilution 1:5000) (Vector Laboratories, Burlington, ON, CAN). Chaque anticorps secondaire a été préparé dans du TBST en ajoutant 5% (p/v) de lait écrémé. Chacune de ces molécules est porteuse d'une peroxydase qui permettra par la suite la révélation sur film des protéines

transférées. Le traitement avec l'anticorps secondaire a été réalisé à température pièce pendant une heure. Trois autres lavages aux TBST ont suivi cette incubation.

L'étape finale a été la révélation des bandes protéiques sur film. Ainsi, après l'addition de 1 mL d'une solution chémiluminescente Luminata Crescendo (Millipore, Bedford, MA, USA), un film a été placé sur la membrane, en chambre noire. Après une exposition (généralement quelques minutes), les bandes ont été dévoilées en utilisant un développeur de film. Le poids des molécules détectées a été confirmé à l'aide de l'échelle de poids moléculaire.

2.3 Identification des voies de signalisation activées par le récepteur nucléaire de l'urotensine II et de l'URP

Pour vérifier l'impact des peptides du SU sur la machinerie nucléaire, l'étude de l'initiation de la transcription a été effectuée, en utilisant l'approche décrite par Vaniotis *et al.* (2011).

2.3.1 Initiation de la transcription

Comme expliqué au point A2 *Lyse des cellules de cœur de rat*, nous avons d'abord isolé les noyaux cellulaires en appliquant toutefois deux différences au protocole afin de garder la machinerie nucléaire fonctionnelle. Par conséquent, il ne faut pas congeler les cœurs et pour garder le noyau de la cellule intact, il ne faut pas rajouter de tampon de lyse après avoir solubiliser la membrane cytoplasmique.

Donc, après avoir obtenu les noyaux frais de cellules de cœur de rat, ils ont été suspendus (20 μ L/réaction) dans un tampon de réaction (50 mM Tris-HCl pH 7,9; 150 mM KCl; 1 mM $MnCl_2$; 6 mM $MgCl_2$) préalablement autoclavé et auquel, juste avant utilisation, 1mM d'ATP, 2mM de DTT et 1U/ μ L d'inhibiteur de ARNase ont été additionnés. Les noyaux en suspension, dont la quantité est proportionnelle au volume, ont alors été répartis selon le nombre de tests voulus. Cinq conditions ont été établies: le contrôle (CTL) contenant uniquement du PBS, ainsi que UIIr 10^{-6} M, UIIr 10^{-7} M, URP 10^{-6} M et URP 10^{-7} M. L'UIIh a été utilisée comme témoin dans chacun des tests d'initiation de la transcription. Tous les peptides ont été dissout dans de l' H_2O . Chaque condition a été effectuée en quintuplicata. Pour chacune d'elles, 5 μ Ci de 32 P-UTP (Perkin Elmer, Montréal, QC, CAN) ainsi que les concentrations respectives de peptide ont été combinés et les échantillons ont alors été incubés à 30°C pendant 30 minutes. Le mélange de chaque condition a été subdivisé en 5 tubes différents auxquels ont été rajoutés 100 μ L du tampon de lyse nucléaire autoclavé (10 mM Tris-HCl (pH 8); 10 mM EDTA; 1% SDS). L'ARN a ensuite été extrait avec

une solution 1:1 de phénol et de chloroforme, avec des quantités dont le volume égalait celui déjà présent dans les tubes. Chaque échantillon a été mélangé au vortex et centrifugé à 10 000 rpm, pendant 10 minutes. Trois phases ont été obtenues : la phase d'ARN sur le dessus, une mince couche d'ADN juste en-dessous, et le reste des composants cellulaires au fond (voir Figure 14). Il est essentiel de récupérer uniquement la

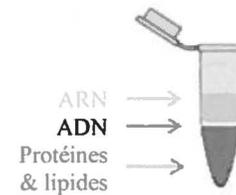


Figure 14: Séparation des couches nucléaires.

couche supérieure sans toucher aux autres fragments cellulaires. Le volume récupéré varie d'une expérience à l'autre et d'un échantillon à l'autre. Une fois les ARN retirés et remis dans un nouveau tube, une solution d'acétate d'ammonium (concentration finale de 2,5 M) a été ajoutée afin de retirer les nucléosides triphosphates (NTP) qui pourraient être libres dans le milieu. Le contenu des échantillons a été précipité avec de l'isopropanol à -20°C , en quantité 1:1, durant la nuit (conservé à -20°C). Le lendemain, les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm, pendant 20 minutes, à 4°C . Le surnageant a été retiré et le précipité a été nettoyé avec $50\ \mu\text{L}$ d'EtOH 70%. Le culot a été resuspendu et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions pendant 10 minutes. Le surnageant a été enlevé et le culot a été séché (pendant environ 30 minutes) sous une hotte à radioactivité, avant d'être resuspendu dans $50\ \mu\text{L}$ d' H_2O .

Puisque le but de cette expérience est de vérifier l'impact de l'UII et de l'URP sur les sites de transcription de l'ADN, il faut établir le ratio de la radioactivité obtenu sur la quantité d'ADN contenue dans chaque échantillon. Deux étapes ont alors été nécessaires : a) Un volume de $10\ \mu\text{L}$ (en duplicata) de chaque échantillon a été pipeté dans des tubes à radioactivité pour rayons β , auxquels a été additionné du liquide à scintillation avant de mesurer l'émission lumineuse sur un compteur ; b) La quantité d'ADN obtenue a été dosée par densité optique (D.O.) à $260\ \text{nm}$, à

l'aide d'un spectrophotomètre, et la pureté de l'ADN a été mesurée par le ratio des D.O. obtenues à 260 nm et à 280 nm (280 nm étant une longueur d'onde d'absorbance pour les acides aminés aromatiques des protéines). Le ratio a été calculé au moyen du logiciel de Kenkyuu-Ryuugaku NET (<http://www.kenkyuu.net/js/nacalc.html>). Ainsi, en divisant la valeur du signal β en cpm par la quantité d'ADN, et en regroupant les quintuplicatas en une seule donnée, la quantité d'incorporation du ^{32}P -UTP a été obtenue.

2.3.2 Initiation de la transcription en présence d'inhibiteurs des voies de signalisation

Nous avons d'abord utilisé deux inhibiteurs des MAPK, soit le PD98059 et le U0126. Le PD98059 (Sigma Aldrich, Missisauga, ON, CAN) est un inhibiteur spécifique de l'activation de la MAPK, particulièrement au niveau des protéines MEK qui font partie de la cascade de signalisation des MAPK. Le U0126 (Promega, Madison, WI, USA) est un inhibiteur hautement sélectif des protéines MEK1 et MEK2. Ces deux molécules se lient au même site de la kinase mais vont l'influencer de manière différente. Le PD98059 bloque davantage le MEK1 alors que le U0126 est équipotent sur les deux isoformes (Favata *et al.*, 1998).

Nous avons aussi évalué l'impact de la voie PKC en utilisant le Gö6983 (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA). Ce composé est capable d'empêcher l'action de nombreuses isoformes de cette enzyme. Aussi, l'inhibiteur H89 (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) nous a permis de bloquer l'activité de la voie des PKA. Cette molécule agit par contre sur d'autres voies comme PKG et PKC μ (Johannes *et al.*, 1995). Finalement, nous avons utilisé le 2-APB (Tocris Bioscience, Bristol, UK), un antagoniste du récepteur de l'IP $_3$, empêchant la libération de calcium des réserves intracellulaires (Tadevosyan *et al.*, 2010).

Plus précisément, après avoir observé les effets des peptides sur les noyaux isolés de cellules de cœur de rat, nous avons répété le protocole en présence des molécules inhibitrices : PD98059 (10 μ M dans le DMSO), Gö6983 (10 μ M dans le DMSO), H89 (10 μ M dans l'eau), U0126 (20 μ M dans le DMSO) et 2-APB (10 μ M dans le DMSO). La concentration finale de DMSO pour chaque échantillon est de 0,1%. L'inhibition a été poursuivie pendant une heure pour PD98059 et Gö6983, alors que 30 minutes ont été préférées pour les autres composés. Nous avons aussi testé le DMSO seul pour s'assurer de son innocuité dans nos expériences. Chaque inhibiteur a été testé seul et en présence de l'UII_r. Les concentrations et temps d'incubation de chacun des inhibiteurs sont tirés de Vaniotis *et al.* (2011).

2.4 Analyses statistiques

Tous les résultats d'initiation de transcription sont présentés sous la forme des moyennes \pm SEM en fonction de l'échantillon contrôle. La significativité a été déterminée par un test d'analyse de variance (ANOVA une voie), au moyen du logiciel Prism.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Synthèse des peptides du système urotensinergique

L'UII_r a été purifiée en deux étapes de CLHP préparative. À la fin de la deuxième purification, 85 fractions ont été récoltées et analysées par spectroscopie de masse MALDI-TOF et par CLHP analytique. Les fractions dont la pureté était satisfaisante (pureté supérieur à 95% pour le pic majoritaire telle que déterminée par HPLC analytique et dont le peptide présentait la masse moléculaire attendue) ont donc été combinées et lyophilisées.

Les masses théorique et observée sont indiquées au Tableau VI. Le profil de CLHP analytique est retrouvé à la Figure 15 et le résultat de spectrométrie de masse à la Figure 16.

Tableau VI: Masses et pureté des peptides synthétiques

<i>Petides</i>	<i>Masse théorique</i> (g/mol)	<i>Masse observée</i> (g/mol)	<i>% de pureté</i>
UII humaine	1388,60	1389,19	>92%
UII de rat	1663,87	1664,78	>90%
URP	1017,23	1018,05	>93%

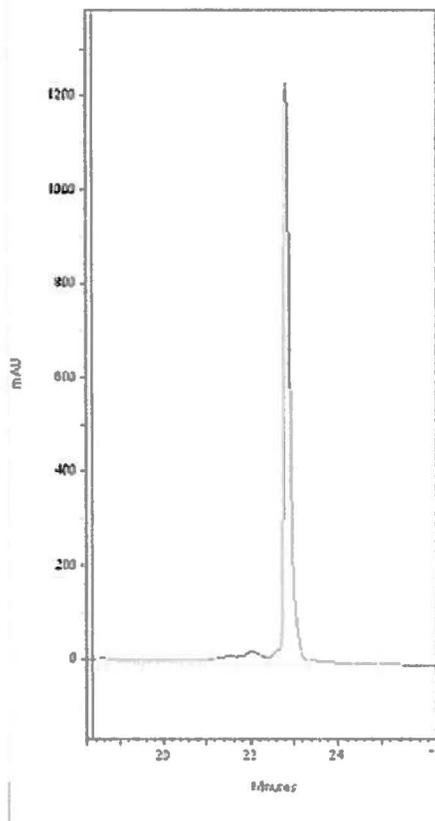


Figure 15: CLHP analytique de UIIr

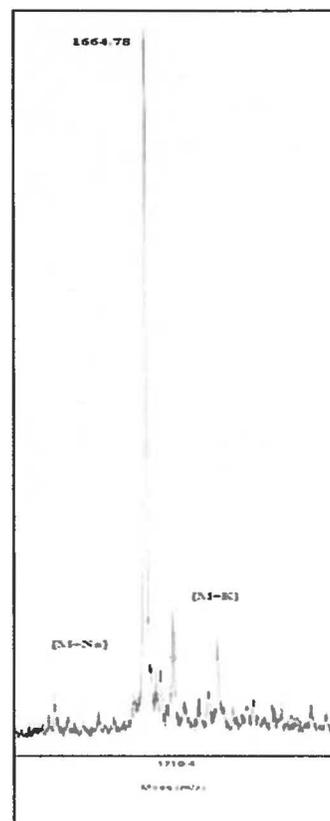


Figure 16: Spectre de masse de UIIr

L'UIIr a été purifiée en trois étapes par CLHP préparative. Dix fractions ont été obtenues à la dernière purification. Elles ont été analysées par spectroscopie de masse MALDI-TOF ainsi que par CLHP analytique. Les fractions dont la pureté était satisfaisante ont donc été combinées et lyophilisées. Les masses théorique et observée sont indiquées au Tableau VI. Le profil de CLHP analytique est retrouvé à la Figure 17 et le résultat de spectrométrie de masse à la Figure 18.

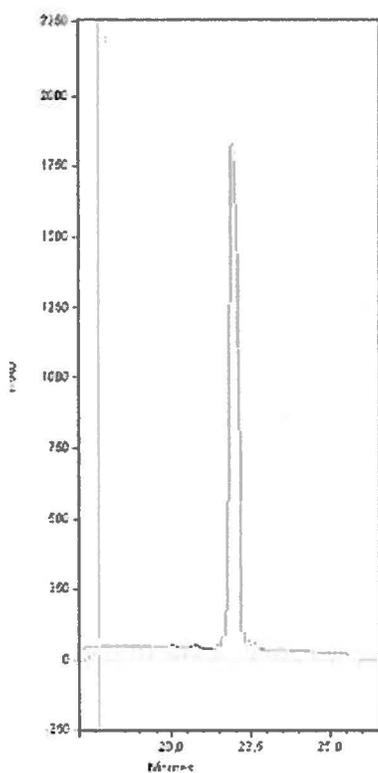


Figure 17: CLHP analytique de UIIh

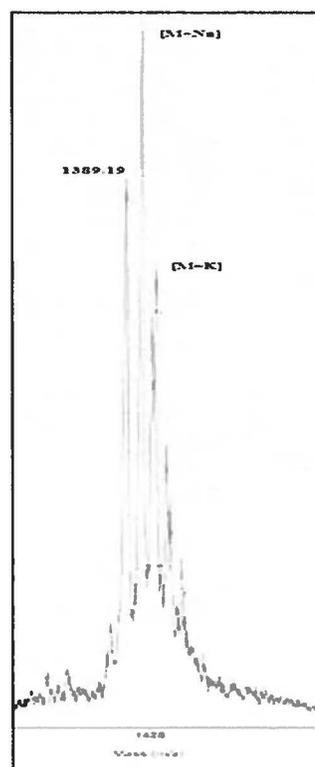


Figure 18: Spectre de masse de UIIh

Les fractions ont été vérifiées par spectroscopie de masse MALDI-TOF ainsi que par CLHP analytique. Les fractions présentant un pourcentage de pureté approprié ont été combinées et lyophilisées. Les masses théorique et observée sont indiquées au Tableau VI. Le profil de CLHP analytique est retrouvé à la Figure 19 et le résultat de spectrométrie de masse à la Figure 20.

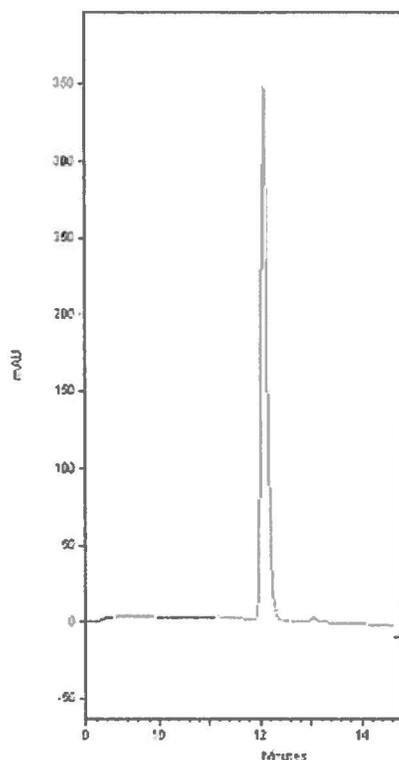


Figure 19: CLHP analytique de URP

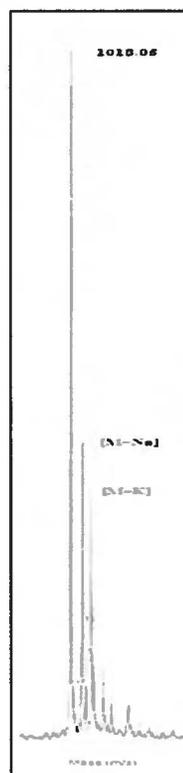


Figure 20: Spectre de masse de URP

Comme indiqué au Tableau VI, chaque peptide synthétisé possède une masse fidèle à la masse théorique. Les synthèses ont donc donné le matériel attendu et leur réussite réside notamment dans les contrôles qui ont été effectués durant l'assemblage de la chaîne peptidique. Ainsi, pour valider l'incorporation des résidus en cours de synthèse, des clivages ont été effectués sur des aliquots de résine-peptide. Cette technique est particulièrement pertinente suite à l'incorporation de l'acide aminé suivant une proline. En effet, la proline étant un acide aminé porteur d'une amine secondaire, la réaction de son amine libre avec la ninhydrine (test de Kaiser) ne donne pas une coloration bleue intense de sorte que la confirmation de la complétion du couplage du résidu introduit après Pro est difficile (par ex. Thr sur Pro dans l'U11*h*).

3.2 Présence des récepteurs UT dans la lignée H9C2 et dans les cellules de cœur de rat

Dans le but de s'assurer que le modèle cellulaire H9C2 possède bien le récepteur UT autant à la membrane cellulaire que nucléaire, nous avons effectué un immunobuvardage de type Western. Pour détecter le récepteur de l'urotensine II, nous avons utilisé un anticorps polyclonal anti-UT de rat, produit chez la chèvre (dilution 1:200) (Genetex, San Antonio, TX, USA) et dirigé contre la partie C-terminale de la protéine.

Comme précédemment publié par notre groupe et d'autres, le poids moléculaire observé pour UT est de 60 kDa (Doan *et al.*, 2012). Le film à la Figure 21 montre deux bandes autour de 60 kDa (56 kDa et 62 kDa) pour la fraction protéique totale contre une bande pour la portion nucléaire, ce qui correspond au poids attendu.

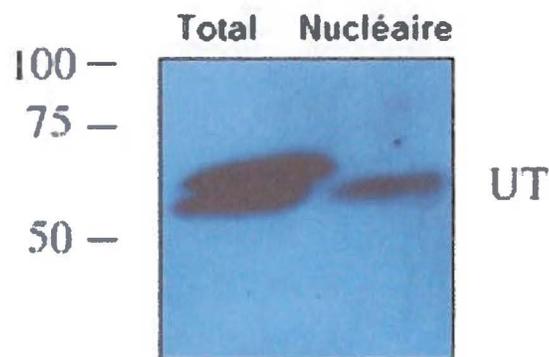


Figure 21: Immunobuvardage de type Western sur les H9C2 pour le récepteur UT ; localisation du récepteur au niveau des fractions membranaires et nucléaires

Afin de confirmer qu'il s'agit bien d'un échantillon du noyau exclusivement, nous avons déterminé la pureté de la fraction nucléaire. Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence de la nucléoporeine 62, une protéine ubiquitaire de la membrane nucléaire. La Figure 22

montre sa présence dans les deux échantillons, correspondant respectivement aux fractions totale et nucléaire.

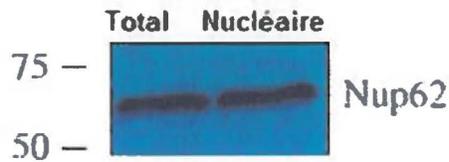


Figure 22: Immunobuvardage de type Western sur les H9C2; présence de la nucléoporine 62 à la membrane cellulaire et nucléaire

Ensuite, nous avons prouvé l'absence de protéines de la membrane cellulaire dans notre échantillon nucléaire par la détection de la cavéoline-3, une protéine impliquée dans l'invagination de la membrane plasmique. Nous avons aussi démontré l'absence d'une protéine cytosolique, le cytochrome *c*, qui fait partie de la machinerie mitochondriale. Les Figures 23 et 24 attestent de la pureté de l'échantillon nucléaire.

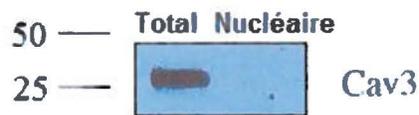


Figure 23: Immunobuvardage de type Western sur les H9C2; présence de la cavéoline 3 uniquement dans l'échantillon total



Figure 24: Immunobuvardage de type Western sur les H9C2; présence du cytochrome c uniquement dans l'échantillon total

Comme on peut voir à la Figure 21, le récepteur UT est effectivement retrouvé autant à la membrane qu'au noyau. Ce résultat était prévisible puisque la présence du SU, ainsi que d'autres systèmes peptidergiques, au niveau des noyaux des cellules du système cardiovasculaire de rat, a été démontrée par le passé (Boivin *et al.*, 2003; Gong *et al.* 2004; Castel *et al.*, 2006). Deux bandes de poids moléculaire similaire peuvent être observées dans le cas de la fraction totale. L'apparition d'une deuxième bande provient vraisemblablement d'une modification post-traductionnelle ou d'une glycosylation du récepteur UT mise en évidence chez le rat par Marchese *et al.* (1995). En effet, il est probable que le récepteur montrant un poids moléculaire plus élevé possède un niveau de glycosylation supérieur à celui de son homologue. Ce résultat est fréquemment observé lors de l'analyse de récepteurs (Doan *et al.* 2012). Également, bien que l'électrophorèse sur gel ait été effectuée dans des conditions dénaturantes, nous avons aussi vérifié s'il y avait des bandes aux environs de 120 kDa, ce qui aurait suggéré la présence de dimères du récepteur. Dans nos conditions, aucune bande n'a été visualisée à cette masse.

En ce qui concerne l'immunobuvardage de la nucléoporine 62, on peut voir à la Figure 22 deux bandes d'une intensité assez semblable dans les deux échantillons. Ce constat confirme l'efficacité de notre démarche puisque la nucléoporine 62, un élément exclusif à la membrane nucléaire, est aussi présente dans notre échantillon total. De plus, leur intensité montre une similitude dans la quantité de protéines, ce qui est attendu puisqu'il s'agit du même lot de cellules lysées.

L'immunobuvardage des deux autres protéines, la cavéoline-3 et le cytochrome *c*, montre une bande pour chacune d'elles dans la fraction membranaire totale. L'absence de bandes dans la fraction nucléaire confirme la qualité de notre protocole d'isolation des noyaux.

3.3 Identification des voies de signalisation activées par le récepteur nucléaire de l'urotensine II et de l'URP

Pour confirmer l'action de l'UII_r et de l'URP sur les récepteurs UT nucléaires (UT_n), il était nécessaire de vérifier la réponse de UT_n lorsque son ligand s'y lie. En utilisant une technique de mesure de l'initiation de la transcription, nous avons vérifié l'activation du récepteur UT nucléaire avec UII_r, à une concentration supramaximale (selon la littérature décrite précédemment) de 10⁻⁶ M. L'URP a aussi été testé à cette même concentration. La Figure 25 montre l'effet de l'UII_r et de l'URP sur les cellules H9C2 au niveau de l'augmentation des transcrits d'ARN.

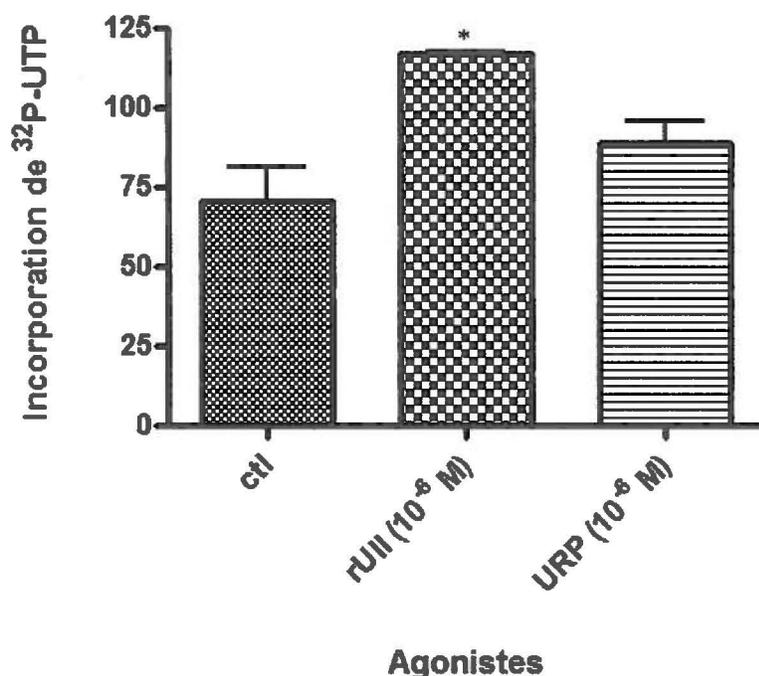


Figure 25: Effet de l'UII_r et de l'URP sur la transcription d'ARN des noyaux isolés des H9C2. Les noyaux de cellules de cœur de rat ont été ajoutés à un tampon de réaction, avec 5μCi de ³²P-UTP et ont été traités avec UII_r 10⁻⁶M (rUII) ou URP 10⁻⁶M. (*p <0,01)

La Figure 26 montre l'effet de ces deux mêmes peptides (toujours à 10^{-6} M) mais cette fois-ci, sur les noyaux de cellules de cœur de rat.

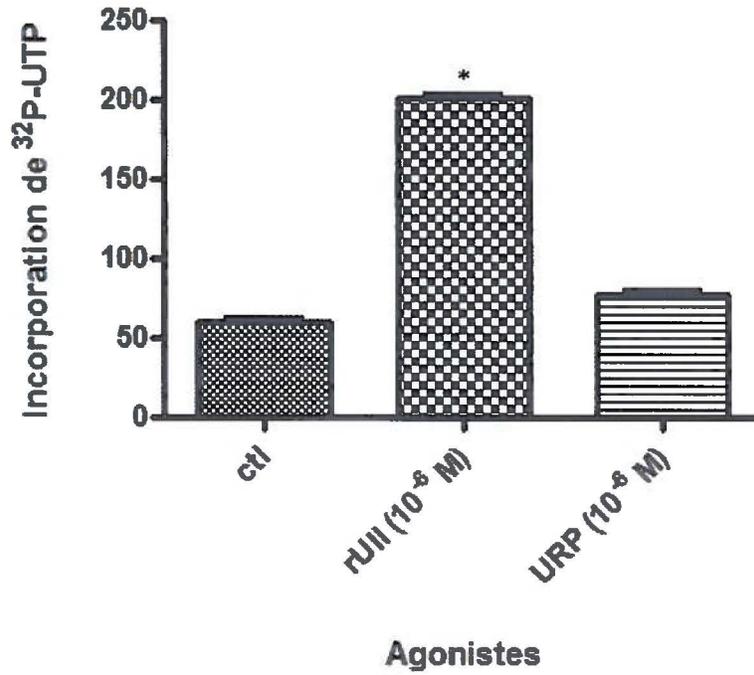


Figure 26: Effet de l'UII_r et de l'URP sur la transcription d'ARN des noyaux isolés des cellules de cœur de rat. Les noyaux de cellules de cœur de rat ont été ajoutés à un tampon de réaction, avec 5 μ Ci de ^{32}P -UTP et ont été traités avec UII_r 10^{-7} M (rUII) ou URP 10^{-7} M (*p <0,01)

Puisque les peptides modulent effectivement l'initiation de transcription et ce, autant sur le modèle cellulaire que sur le modèle animal, la prochaine étape a donc été de vérifier quelles voies de signalisation intervenaient dans ce processus (Voir Figure 11). Cette analyse a été réalisée à l'aide des inhibiteurs suivants soit PD98059 (MAPK), Gö6983 (PKC), H89 (PKA), U0126 (MEK1 et MEK2) et 2-APB (IP₃), en utilisant les noyaux isolés de cellules de cœur de rat qui permet d'observer une forte variation dans l'incorporation de notre nucléotide radiomarqué. La Figure 27 décrit l'action de chaque inhibiteur seul ou en présence d'une concentration

supramaximale de l'UII_r (10^{-6} M). Le test d'analyse de variance (ANOVA une voie) a été utilisé pour les figures 25 à 27.

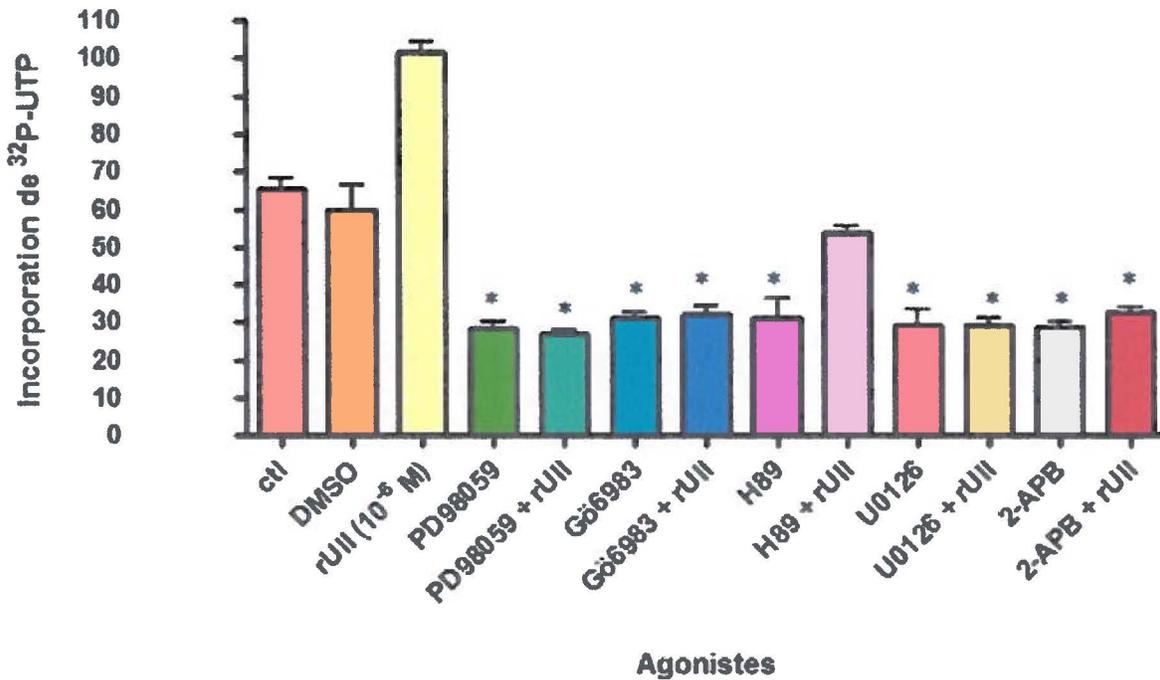


Figure 27: Effet d'inhibiteurs de voies de signalisation, seuls ou en présence d'UII_r, sur la transcription des ARN dans des noyaux de cellules de cœur de rat. Les noyaux de cellules de cœur de rat ont été ajoutés à un tampon de réaction, avec 5μCi de ³²P-UTP, UII_r 10^{-6} M (rUII) ainsi qu'un des inhibiteurs suivants : 10 μM de PD98059, 10 μM de Gö6983, 10 μM de H89, 20 μM de U0126 et 10 μM de 2-APB. (*p <0,01)

En temps normal, l'urotensine II n'est exprimée que faiblement et n'influence que légèrement ses systèmes cibles. Toutefois, en conditions pathologiques, cette molécule agit de façon notable sur ses organes cibles, comme le système cardiovasculaire. Nous avons donc choisi d'utiliser une concentration élevée pour obtenir une réponse optimale.

La Figure 25 montre d'abord les résultats pour l'UII_r sur des noyaux de cellules H9C2. À 10⁻⁶ M, une augmentation importante de la transcription d'ARN est notée. Étonnamment, l'URP n'induit pas la même hausse que celle observée avec l'urotensine II, bien qu'elle soit encore substantielle. Au niveau des cellules de cœur de rat (Figure 26), des résultats similaires ont été obtenus. Cependant, nous avons mesuré une différence beaucoup plus marquée entre la production d'ARN du contrôle versus l'échantillon traité avec UII_r (10⁻⁶M). De plus, nous avons remarqué une efficacité beaucoup moindre, voire nulle, de l'URP à influencer l'initiation de la transcription sur les cœurs de rat. La raison exacte de ce comportement nous est inconnue. Toutefois, la nature embryonnaire des cellules H9C2, par rapport au caractère mature des cellules cardiaques du rat, peut constituer un élément de réponse à cette observation.

Néanmoins, les résultats dans ces deux modèles nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'action de l'UII et de l'URP serait distincte au niveau du récepteur UT, et notamment au niveau du noyau. Ainsi, comment UT peut-il donner lieu à une augmentation de la production d'ARN après interaction avec son ligand UII et être moins actif, sinon passif, en présence de l'URP, son second ligand endogène ? Lie-t-il les deux peptides de la même manière ? Est-ce que le changement conformationnel du récepteur est identique dans les deux cas ? Cette divergence trouve peut-être sa réponse dans le fait que l'UII possède un segment N-terminal plus long que l'URP. Même si cette partie ne contient pas les acides aminés nécessaires à l'activité biologique, les résidus additionnels de l'UII pourraient influencer la réponse du récepteur. Par conséquent, l'URP amputé de cette courte séquence, ne serait pas en mesure d'activer nécessairement les mêmes voies de signalisation que celles de l'UII.

Quant aux résultats avec les inhibiteurs, l'histogramme présenté à la Figure 27 montre les données d'initiation de transcription au niveau des noyaux de cellules de cœur de rat. Les résultats sont illustrés en pourcentage de radioactivité selon la quantité d'ARN mesurée par spectrophotométrie. Puisque la majorité des inhibiteurs sont véhiculés dans le DMSO, un contrôle avec le DMSO seul a été effectué. Le résultat montre que ce solvant n'influence pas l'initiation de la transcription. Nous avons aussi inclus le peptide seul dans chaque expérimentation.

La première molécule inhibitrice à avoir été utilisée est le PD98059. Ce composé, fréquemment utilisé dans divers laboratoires, inactive la voie des MAPK, particulièrement les sous-unités de MEK. À la Figure 27, on observe avec le PD98059, seul ou en présence de l'UII_r, une baisse drastique de la transcription d'ARN. Puisque la voie des MAPK est essentielle dans un très grand nombre de types cellulaires, il était attendu que PD98059 agisse sur l'initiation de la transcription. L'effet est d'ailleurs maintenu en présence du peptide. Nous pouvons dès lors confirmer que la cascade MAPK est initiée lorsque l'UII_r se lie à UT_n.

Les colonnes 6 et 7 de l'histogramme représentent respectivement l'inhibiteur Gö 6983 seul et en combinaison avec l'UII_r. Cette molécule, comme mentionné au chapitre 2, inhibe les éléments de la superfamille des protéines kinases C. Ces enzymes sont connues, entre autres, pour leur implication dans l'hypertrophie cardiaque (Kerkelä *et al.*, 2002). Encore une fois, on voit que l'inhibiteur diminue l'initiation de transcription d'ARN et que même si on ajoute le peptide, les taux de transcrits restent bas. L'implication de la voie PKC dans la signalisation nucléaire de UT est donc également confirmée.

Les colonnes 8 et 9 montrent les résultats obtenus après utilisation de l'inhibiteur H89. Ce dernier bloque principalement la protéine kinase A, responsable notamment de l'activation de

canaux calciques pour la contraction cardiaque. Ce composé est néanmoins connu pour inhiber d'autres molécules et n'est donc pas entièrement spécifique aux PKA. On remarque encore une fois une chute de la production de transcrits avec l'inhibiteur. Par contre, au moment où le peptide est ajouté à l'échantillon, il y a augmentation de transcription par rapport à l'inhibiteur seul, ce qui suggère que la voie des PKA n'est pas impliquée dans le processus d'initiation de la transcription. Toutefois, contrairement aux attentes, le pourcentage d'incorporation de ^{32}P -UTP de l'échantillon H89/U11r n'atteint pas le pourcentage contrôle. Puisque H89 n'est pas spécifique aux PKA, on peut alors soupçonner que cet inhibiteur se lie à une autre enzyme/d'autres enzymes contribuant à la production de transcrits. Selon la littérature, H89 inhibe au moins 8 autres types de kinases, en plus d'afficher des effets sur des systèmes biologiques autres (Lochner *et al.*, 2006).

Un autre inhibiteur des MAPK a été employé soit le U0126. Ce composé est plus spécifique aux sous-unités MEK1 et MEK2. Les résultats avec U0126 corroborent les données obtenues précédemment avec PD98059 à savoir que l'UTn active la voie MAPK, et par le fait même, MEK1 et MEK2. Finalement, nous avons utilisé le 2-APB, un antagoniste du récepteur IP_3 , une protéine réputée pour son influence importante sur les systèmes peptidergiques cardiovasculaires (Boivin *et al.*, 2006 ; Merlen *et al.*, 2013 ; Tadevosyan *et al.*, 2012). D'ailleurs, Proulx *et al.* (2008) ont démontré que les protéines G activées par UT vont toutes influencer les taux d' IP_3 . Cette activation entraîne alors une accumulation de calcium nucléaire et par le fait même, engendre la contraction myocardiale. Les résultats de la Figure 27 (colonnes 12 et 13) confirment que UTn influence l'activation du récepteur IP_3 .

4 CONCLUSION

De nombreuses avancées ont été faites sur les RCPG nucléaires et ce nouveau concept pharmacologique est une avenue qui exige d'être bien comprise. Par ailleurs, il a été démontré avec quelques peptides (notamment ANG-II et ET-1) ayant une implication importante dans l'homéostasie cardiaque que ceux-ci peuvent avoir des récepteurs au niveau de la membrane nucléaire. L'urotensine II est un peptide aux effets cardiovasculaires multiples et il est par conséquent logique de présumer que son récepteur UT est présent au noyau et qu'il est important pour le fonctionnement de la cellule. De plus, l'étude de récepteurs nucléaires fonctionnels prend toute son importance quand vient par exemple le moment d'expliquer certaines réponses observées notamment en situations pathologiques. Le but de notre projet a donc été d'étudier le système urotensinergique présent au niveau du noyau de cellules cardiaques.

Afin d'avoir les outils pharmacologiques de base pour notre étude, nous avons débuté nos travaux par la synthèse de peptides-clés du système urotensinergique soit l'urotensine II humaine, l'urotensine II de rat et l'*urotensin II-related peptide*. La technique utilisée pour produire ces molécules a été la synthèse peptidique sur phase solide. La synthèse de l'UII_r s'est faite à l'aide de la chimie Fmoc alors que l'UII_h et l'URP ont été produits par chimie Boc. D'une part, le rendement obtenu pour chaque peptide n'a pas été maximisé mais il s'est avéré adéquat pour nos besoins. D'autre part, les analyses effectuées par CLHP et par spectroscopie de masse MALDI-TOF ont démontré un degré satisfaisant de pureté et ce, pour toutes les trois molécules produites.

Deux modèles ont été choisis pour nos bioessais: les cardiomyocytes H9C2, qui ont servi de modèle cellulaire, et les noyaux isolés de cellules de cœur de rat qui ont été utilisés comme modèle biologique plus complet. Ces choix reposaient sur des bases solides puisqu'au cours de

travaux précédents, le récepteur UT avait été observé dans des cellules cardiaques de rat. Ainsi, par immunobuvardage de type Western au moyen d'un anticorps dirigé contre le récepteur UT et d'un deuxième anticorps porteur d'une peroxydase capable de produire de la chémiluminescence en présence d'un substrat approprié, nous avons démontré que UT était présent sur la membrane plasmique et sur la membrane nucléaire des cellules H9C2. D'ailleurs, à ce chapitre, nous avons utilisé une méthodologie récente qui nous a permis d'isoler une fraction nucléaire des cellules dépourvue de contaminants protéiques du cytoplasme ou de la membrane plasmique. Ceci a été démontré au moyen de marqueurs spécifiques soit la nucléoporeine 62 pour le noyau, la cavéoline-3 pour la membrane cellulaire, et le cytochrome *c* pour le cytosol. Ainsi, les tests d'immunobuvardage ont effectivement montré la présence de la nucléoporeine 62 et l'absence de la cavéoline-3 et du cytochrome *c* dans l'échantillon nucléaire.

Pour mieux comprendre l'effet du peptide sur son récepteur nucléaire, nous avons isolé des noyaux de cellules cardiaques de rat et évalué l'initiation de la transcription. Ainsi, nous avons observé que l'UII r (10^{-6} M) a provoqué une augmentation de la production de transcrits d'ARN dans les cellules H9C2. De plus, cette hausse a été encore plus importante dans les noyaux de cellules de cœur de rat, fraîchement isolés. En parallèle, avec l'URP (10^{-6} M), aucun changement significatif de la transcription d'ARN n'a été observé.

Finalement, toujours en utilisant l'initiation de la transcription, nous avons étudié quelques voies de signalisation connues des RCPGs, qui pourraient être associées à la production de transcrits. Nos travaux ont permis de confirmer l'implication des MAPK, des MEK1 et MEK2, de la voie des PKC, ainsi que de la voie de l'IP $_3$. Par contre, les résultats avec l'inhibiteur H89 suggèrent que la PKA ne participerait pas à la signalisation associée à la transcription initiée par UII.

En conclusion, un récepteur UT_n fonctionnel existe au niveau des noyaux des cellules cardiaques du rat. Il n'est pas activé de la même manière par l'urotensine II et l'URP et les voies de signalisation MAPK, MEK1/2, PKC et IP_3 sont recrutées lorsqu'il est activé. Cette observation permet d'identifier les propriétés communes et distinctes des deux peptides et contribue à l'amélioration des connaissances concernant la pharmacologie du système urotensinergique. Ces informations faciliteront l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques ciblant le système cardiovasculaire.

5 PROJETS FUTURS

5.1 Activation du calcium au noyau suite à la liaison de l'UII introduite dans la cellule par l'utilisation d'un analogue peptidique cagé

Des travaux préliminaires ont été réalisés afin que soit poursuivie ultérieurement une étude visant à évaluer le phénomène de mobilisation calcique, suite à l'interaction de l'UII avec son récepteur nucléaire. Afin de court-circuiter tout *input* pouvant provenir d'une interaction du ligand avec les récepteurs présents sur la membrane cytoplasmique, nous souhaitons mettre à profit une méthodologie faisant appel à des peptides dits « cagés ». Un peptide cagé est un composé auquel on a ajouté un dérivé photoclivable sur un résidu clé afin de rendre la molécule temporairement non reconnaissable par son récepteur.

Nous utiliserons un analogue cagé de l'UII, comme décrit précédemment par notre laboratoire (Bourgault *et al.*, 2005). Ainsi, le rôle reconnu de la tyrosine-9 de l'UII pour l'affinité du peptide vis-à-vis UT et la présence sur sa chaîne latérale d'une fonction phénolique pouvant être substituée et donc masquée, faisait de ce site un choix à privilégier. Par conséquent, l'analogue [Tyr(DMNB)⁹]UII h , synthétisé par notre équipe au moyen d'une tyrosine porteuse sur sa chaîne latérale d'un groupe 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle, a montré après analyse des caractéristiques correspondant au peptide souhaité, comme démontré par le profil de CLHP (Figure 28) et une vérification de la masse par spectrométrie MALDI-TOF (Figure 29). Ce matériel sera utilisé pour la réalisation de l'étude projetée selon l'approche décrite ci-après. Des cellules H9C2 sont cultivées dans des plaques à 6 puits spécialement conçues pour la microscopie confocale (MatTek, Ashland, MA, USA). À 70% de confluence, 3 μ M de fluo-4 AM, un indicateur

calcique intracellulaire qui émet dans le vert, sont ajoutés à chaque puits. Le peptide cagé est aussi additionné et l'incubation dure 30 minutes, à TP. Par la suite, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées trois fois avec du tampon de stimulation (10 mM HEPES pH 7,4; 134 mM NaCl; 6 mM KCl; 10 mM glucose; 2 mM CaCl₂ et 1 mM MgCl₂). Un volume de 1 µL de DRAQ5 (BioStatus Ltd., Leicestershire, UK) est finalement ajouté afin de colorer l'ADN puis du milieu de culture est remis.

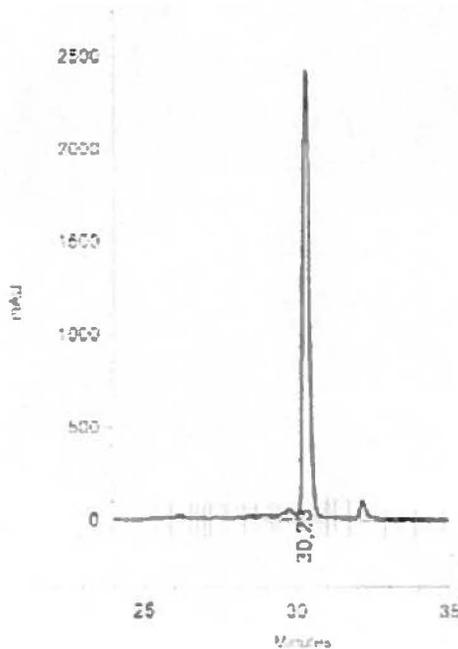


Figure 28: CLHP de [Tyr(DMNB)9]UIIh

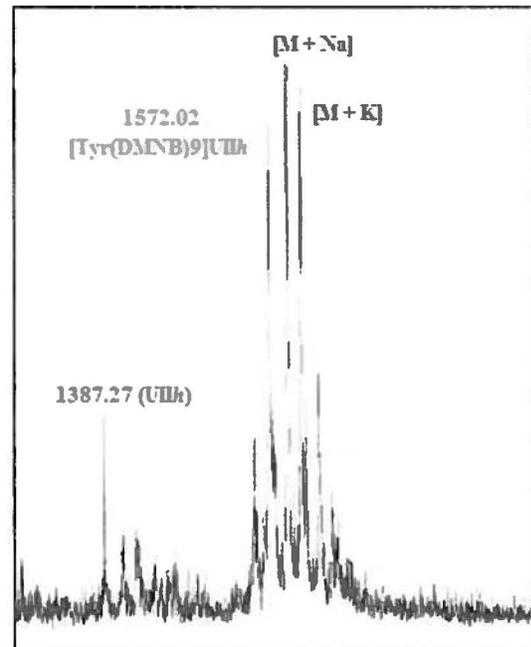


Figure 29: Spectroscopie de masse de [Tyr(DMNB)9]UIIh

La plaque est placée sur la chambre à 37°C d'un microscope Zeiss LSM780 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Munich, DEU). Après avoir établi le niveau basal de calcium d'une cellule non stimulée, une autre cellule contenant le peptide qui est pénétré à l'intérieur est irradiée pendant 7 secondes à l'aide d'un laser UV, afin de libérer l'UIIh native qui possède maintenant

ses caractéristiques de liaison usuelles au récepteur. La mesure de l'augmentation de calcium engendrée par la présence intracellulaire du peptide est alors amorcée, ce qui montrera le caractère fonctionnel du récepteur nucléaire.

Cette approche a été utilisée récemment par un collaborateur (Merlen *et al.*, 2013), pour l'étude du récepteur nucléaire de l'endothéline-1. Pour ce travail, Merlen *et al.* (2013) ont exploré le relâchement calcique au noyau de l'analogue cagé [Trp-ODMNB²¹]ET-1.

5.2 Autres perspectives

Le peu d'informations que nous détenons jusqu'à maintenant sur la pharmacologie intracrine du système urotensinergique montre que nous n'avons vu à date que la pointe de l'iceberg. Ainsi, plusieurs aspects de ce système restent encore inexplorés, en particulier en lien avec les actions biologiques distinctes des paralogues que sont l'urotensine II et l'*urotensin II-related peptide*.

Comme prochaine étape des travaux, il serait essentiel de vérifier d'autres voies de signalisation nucléaire, telles celles qui sont associées à UT de la membrane plasmique. Deux d'entre elles apparaissent particulièrement intéressantes : la voie des RhoA kinases et celle des β -arrestines (Proulx *et al.*, 2008; Guidolin *et al.*, 2010). Les Rho-A kinases sont connues pour être grandement impliquées dans la régulation de la tension artérielle dans les CMVL (Sauzeau *et al.*, 2001). Par ailleurs, la présence même des β -arrestines au noyau et leur implication constitue un élément de recherche puisqu'il a été démontré que les β -arrestines 1 sont capable de se déplacer au noyau et d'activer des facteurs de transcription (Ma *et al.*, 2007). Par la suite, il serait également utile d'évaluer les effets de l'inhibition des voies membranaires sur celles retrouvées au niveau nucléaire, et d'explorer si une communication existe entre les deux RCPGs.

Enfin, est-ce que le récepteur retrouvé à la membrane nucléaire est uniquement un récepteur produit *de novo* et/ou s'agit-il d'un récepteur UT internalisé ? La synthèse du récepteur pourrait se vérifier sur les noyaux isolés H9C2 par l'utilisation d'un nucléotide radiomarqué et par *Réaction en chaîne par polymérase* (PCR). Pour confirmer ou non l'internalisation, la transfection plasmidique du récepteur UT liée à la protéine fluorescente verte (GFP) dont on vérifie la localisation par microscopie confocale sur le modèle cellulaire mentionné ci-haut pourrait répondre à cette question.

6 RÉFÉRENCES

- Affolter JT, Newby DE, Wilkinson IB, Winter MJ, Balment RJ & Webb DJ (2002) No effect on central or peripheral blood pressure of systemic urotensin II infusion in humans. *British journal of clinical pharmacology* 54(6):617-621.
- Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Spinazzi R, Mascarini A, Oselladore B, Montopoli M, Antonello M & Ribatti D (2009) Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations. *Regulatory peptides* 157(1-3):64-71.
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ & Douglas SA (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 401(6750):282-286.
- Amitai G, Dassa B & Pietrokovski S (2004) Protein splicing of inteins with atypical glutamine and aspartate C-terminal residues. *The Journal of biological chemistry* 279(5):3121-3131.
- Babinska M, Holecki M, Prochaczek F, Owczarek A, Kokocinska D, Chudek J & Wiecek A (2012) Is plasma urotensin II concentration an indicator of myocardial damage in patients with acute coronary syndrome? *Archives of medical science : AMS* 8(3):449-454.
- Bern HA & Lederis K (1969) A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *The Journal of endocrinology* 45(1):Suppl:xi-xii.
- Bern HA, Pearson D, Larson BA & Nishioka RS (1985) Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent progress in hormone research* 41:533-552.
- Bkaily G, Avedanian L & Jacques D (2009) Nuclear membrane receptors and channels as targets for drug development in cardiovascular diseases. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 87(2):108-119.
- Bkaily G, Massaad D, Choufani S, Jacques D & D'Orleans-Juste P (2002) Role of endothelin-1 receptors in the sarcolemma membrane and the nuclear membrane in the modulation of basal cytosolic and nuclear calcium levels in heart cells. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48:141S-147S.
- Bohm F & Pernow J (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. *British journal of pharmacology* 135(1):25-27.
- Boivin B & Allen BG (2003) Regulation of membrane-bound PKC in adult cardiac ventricular myocytes. *Cellular signalling* 15(2):217-224.
- Boivin B, Lavoie C, Vaniotis G, Baragli A, Villeneuve LR, Ethier N, Trieu P, Allen BG & Hebert TE (2006) Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular research* 71(1):69-78.

- Boivin B, Vaniotis G, Allen BG & Hebert TE (2008) G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *Journal of receptor and signal transduction research* 28(1-2):15-28.
- Bootman MD, Fearnley C, Smyrnias I, MacDonald F & Roderick HL (2009) An update on nuclear calcium signalling. *Journal of cell science* 122(Pt 14):2337-2350.
- Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR & White R (2000) Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *British journal of pharmacology* 130(8):1865-1870.
- Bourgault S, Letourneau M & Fournier A (2005) Development and pharmacological characterization of "caged" urotensin II analogs. *Peptides* 26(8):1475-1480.
- Bousette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH & Giaid A (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 176(1):117-123.
- Brzostowski JA & Kimmel AR (2001) Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends in biochemical sciences* 26(5):291-297.
- Carretero OA & Scicli AG (1991) Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension* 18(3 Suppl):I58-69.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihrmann I, Scalbert E, Malagon M, Vaudry H, Tonon MC & Gandolfo P (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *Journal of neurochemistry* 99(2):582-595.
- Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM & Yandle TG (2005) Urotensin II: evidence for cardiac, hepatic and renal production. *Peptides* 26(11):2211-2214.
- Chartrel N, Leprince J, Dujardin C, Chatenet D, Tollemer H, Baroncini M, Balment RJ, Beauvillain JC & Vaudry H (2004) Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. *Journal of neurochemistry* 91(1):110-118.
- Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boularan C, Carlier L, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Davoust D, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Tonon MC, Lihrmann I, Pacaud P & Vaudry H (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 25(10):1819-1830.
- Chatenet D, Nguyen TT, Letourneau M & Fournier A (2012) Update on the urotensinergic system: new trends in receptor localization, activation, and drug design. *Frontiers in endocrinology* 3:174.
- Chen YH, Yandle TG, Richards AM & Palmer SC (2009) Urotensin II immunoreactivity in the human circulation: evidence for widespread tissue release. *Clinical chemistry* 55(11):2040-2048.
- Chuquet J, Lecrux C, Chatenet D, Leprince J, Chazalviel L, Roussel S, MacKenzie ET, Vaudry H & Touzani O (2008) Effects of urotensin-II on cerebral blood flow and ischemia in anesthetized rats. *Experimental neurology* 210(2):577-584.

- Conlon JM (2008) Liberation of urotensin II from the teleost urophysis: an historical overview. *Peptides* 29(5):651-657.
- Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC & Vaudry H (1992) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochemical and biophysical research communications* 188(2):578-583.
- Conlon JM, Yano K, Waugh D & Hazon N (1996) Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *The Journal of experimental zoology* 275(2-3):226-238.
- Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H & Lihrmann I (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS letters* 457(1):28-32.
- Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA & Vaudry H (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15803-15808.
- Cursoux P, Lehucher-Michel MP, Marchetti H, Chaumet G & Delliaux S (2012) [Burnout syndrome: a "true" cardiovascular risk factor]. *Presse Med* 41(11):1056-1063.
- Davenport AP & Maguire JJ (2000) Urotensin II: fish neuropeptide catches orphan receptor. *Trends in pharmacological sciences* 21(3):80-82.
- Djordjevic T, BelAiba RS, Bonello S, Pfeilschifter J, Hess J & Gorkach A (2005) Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25(3):519-525.
- Doan ND, Nguyen TT, Letourneau M, Turcotte K, Fournier A & Chatenet D (2012) Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart. *British journal of pharmacology* 166(1):243-257.
- Dolmetsch RE, Xu K & Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392(6679):933-936.
- Douglas SA (2003) Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Current opinion in pharmacology* 3(2):159-167.
- Douglas SA, Ashton DJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ohlstein DH, Ruffolo MR, Ohlstein EH, Aiyar NV & Willette RN (2000) Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate. *Journal of cardiovascular pharmacology* 36(5 Suppl 1):S163-166.
- Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N & Giaid A (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 359(9322):1990-1997.
- Dubessy C, Cartier D, Lectez B, Bucharles C, Chartrel N, Montero-Hadjadje M, Bizet P, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, Leprince J, Vaudry H, Jegou S & Lihrmann I (2008) Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin II-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: evidence of urotensin II at the neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry* 107(2):361-374.

- Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U, Harrison S, Duddy G, Sechler JL, Ao Z, Maleeff BE, Naselsky D, Disa J & Aiyar NV (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *British journal of pharmacology* 136(1):9-22.
- Esposito G, Perrino C, Cannavo A, Schiattarella GG, Borgia F, Sannino A, Pironti G, Gargiulo G, Di Serafino L, Franzone A, Scudiero L, Grieco P, Indolfi C & Chiariello M (2011) EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by beta-arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic research in cardiology* 106(4):577-589.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA & Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry* 273(29):18623-18632.
- Fernandez LM & Puett D (1996) Lys583 in the third extracellular loop of the lutropin/choriogonadotropin receptor is critical for signaling. *The Journal of biological chemistry* 271(2):925-930.
- Ferreiro I, Barragan M, Gubern A, Ballestar E, Joaquin M & Posas F (2010) The p38 SAPK is recruited to chromatin via its interaction with transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 285(41):31819-31828.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP & Bennett T (2001) Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *British journal of pharmacology* 132(8):1625-1629.
- Gartlon J, Parker F, Harrison DC, Douglas SA, Ashmeade TE, Riley GJ, Hughes ZA, Taylor SG, Munton RP, Hagan JJ, Hunter JA & Jones DN (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology* 155(4):426-433.
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21(1):90-113.
- Gibson A (1987) Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *British journal of pharmacology* 91(1):205-212.
- Gibson A, Bern HA, Ginsburg M & Botting JH (1984) Neuropeptide-induced contraction and relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(2):625-629.
- Gibson A, Conyers S & Bern HA (1988) The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 40(12):893-895.
- Gibson A, Wallace P & Bern HA (1986) Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats. *General and comparative endocrinology* 64(3):435-439.
- Giebing G, Tolle M, Jurgensen J, Eichhorst J, Furkert J, Beyermann M, Neuschafer-Rube F, Rosenthal W, Zidek W, van der Giet M & Oksche A (2005) Arrestin-independent internalization and recycling of the urotensin receptor contribute to long-lasting urotensin II-mediated vasoconstriction. *Circulation research* 97(7):707-715.

- Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, Heveker N, Bkaily G, Chemtob S & Barbaz D (2006) G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84(3-4):287-297.
- Gobeil F, Jr., Vazquez-Tello A, Marrache AM, Bhattacharya M, Checchin D, Bkaily G, Lachapelle P, Ribeiro-Da-Silva A & Chemtob S (2003) Nuclear prostaglandin signaling system: biogenesis and actions via heptahelical receptors. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81(2):196-204.
- Gong H, Wang YX, Zhu YZ, Wang WW, Wang MJ, Yao T & Zhu YC (2004) Cellular distribution of GPR14 and the positive inotropic role of urotensin II in the myocardium in adult rat. *J Appl Physiol* 97(6):2228-2235.
- Guidolin D, Albertin G & Ribatti D (2010) Urotensin-II as an angiogenic factor. *Peptides* 31(6):1219-1224.
- Hassan GS, Douglas SA, Ohlstein EH & Giaid A (2005) Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides* 26(12):2464-2472.
- Hawtin SR, Tobin AB, Patel S & Wheatley M (2001) Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *The Journal of biological chemistry* 276(41):38139-38146.
- Hirose T, Takahashi K, Mori N, Nakayama T, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Totsune K & Imai Y (2009) Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides* 30(6):1124-1129.
- Itoh H, McMaster D & Lederis K (1988) Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries. *European journal of pharmacology* 149(1-2):61-66.
- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M & Seuwen K (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 1(8):761-782.
- Jani PP, Narayan H & Ng LL (2013) The differential extraction and immunoluminometric assay of Urotensin II and Urotensin-related peptide in heart failure. *Peptides* 40:72-76.
- Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, LePrince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon MC, Prezeau L, Castel H & Gandolfo P (2010) The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *The Biochemical journal* 428(1):113-124.
- Jegou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, LePrince J, Vaudry H & Lihmann I (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 495(1):21-36.
- Johannes FJ, Prestle J, Dieterich S, Oberhagemann P, Link G & Pfizenmaier K (1995) Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu. *European journal of biochemistry / FEBS* 227(1-2):303-307.

- Jong YJ, Kumar V & O'Malley KL (2009) Intracellular metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) activates signaling cascades distinct from cell surface counterparts. *The Journal of biological chemistry* 284(51):35827-35838.
- Katano Y, Ishihata A, Aita T, Ogaki T & Horie T (2000) Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *European journal of pharmacology* 402(1-2):R5-7.
- Kenakin T & Miller LJ (2010) Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacological reviews* 62(2):265-304.
- Kerkela R, Ilves M, Pikkarainen S, Tokola H, Ronkainen J, Vuolteenaho O, Leppaluoto J & Ruskoaho H (2002) Identification of PKC α isoform-specific effects in cardiac myocytes using antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Molecular pharmacology* 62(6):1482-1491.
- Khan SQ, Bhandari SS, Quinn P, Davies JE & Ng LL (2007) Urotensin II is raised in acute myocardial infarction and low levels predict risk of adverse clinical outcome in humans. *International journal of cardiology* 117(3):323-328.
- Kiefer P, Acland P, Pappin D, Peters G & Dickson C (1994) Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3. *The EMBO journal* 13(17):4126-4136.
- Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, Reinhart G, Junger S & Struthers RS (2004) Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *The Journal of biological chemistry* 279(22):23214-23222.
- Krum H & Kemp W (2007) Therapeutic potential of blockade of the urotensin II system in systemic hypertension. *Current hypertension reports* 9(1):53-58.
- Labarrere P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon MC, Dubessy C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Calas B, Pacaud P & Vaudry H (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 18(2):77-88.
- Lee-Kirsch MA, Gaudet F, Cardoso MC & Lindpaintner K (1999) Distinct renin isoforms generated by tissue-specific transcription initiation and alternative splicing. *Circulation research* 84(2):240-246.
- Lin L, Ding WH, Jiang W, Zhang YG, Qi YF, Yuan WJ & Tang CS (2004) Urotensin-II activates L-arginine/nitric oxide pathway in isolated rat aortic adventitia. *Peptides* 25(11):1977-1984.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K & Iida M (2003) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 26(10):839-845.
- Liu GQ, Zeng ZP, Li HZ, Fan XR, Liu DM, Tong AL & Zheng X (2003) [Expression of urotensin II mRNA in normal adrenal medulla and pheochromocytoma tissues]. *Zhonghua yi xue za zhi* 83(14):1225-1228.

- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL, Jr., Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF & Caskey CT (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochemical and biophysical research communications* 266(1):174-178.
- Lochner A & Moolman JA (2006) The many faces of H89: a review. *Cardiovascular drug reviews* 24(3-4):261-274.
- Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM & Lohse MJ (2009) A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 15(1):75-83.
- Lu Y, Zou CJ, Huang DW & Tang CS (2002) Cardiovascular effects of urotensin II in different brain areas. *Peptides* 23(9):1631-1635.
- Ma L & Pei G (2007) Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *Journal of cell science* 120(Pt 2):213-218.
- MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I & Pollard K (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *British journal of pharmacology* 130(2):201-204.
- Maguire JJ & Davenport AP (2002) Is urotensin-II the new endothelin? *British journal of pharmacology* 137(5):579-588.
- Maguire JJ, Kuc RE & Davenport AP (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *British journal of pharmacology* 131(3):441-446.
- Maguire JJ, Kuc RE, Kleinz MJ & Davenport AP (2008) Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* 29(5):735-742.
- Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Kleinz MJ & Davenport AP (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(10):1767-1774.
- Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P & et al. (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(2):335-344.
- Marrache F, Megarbane B, Pirnay S, Rhaoui A & Thuong M (2004) Difficulties in assessing brain death in a case of benzodiazepine poisoning with persistent cerebral blood flow. *Human & experimental toxicology* 23(10):503-505.
- Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, Sugo T, Mori M, Kitada C, Kurokawa T & Fujino M (2004) Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents. *Neuroscience letters* 358(2):99-102.

- Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu N & Hirata Y (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *Journal of hypertension* 19(12):2185-2190.
- Merlen C, Farhat N, Luo X, Chatenet D, Tadevosyan A, Villeneuve LR, Gillis MA, Nattel S, Thorin E, Fournier A & Allen BG (2013) Intracrine endothelin signaling evokes IP3-dependent increases in nucleoplasmic Ca²⁺(+) in adult cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 62:189-202.
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O & Fujino M (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochemical and biophysical research communications* 265(1):123-129.
- Mori N, Hirose T, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, Kohzuki M, Takahashi K & Totsune K (2009) Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* 30(2):400-408.
- Nakayama T, Hirose T, Totsune K, Mori N, Maruyama Y, Maejima T, Minagawa K, Morimoto R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Kohzuki M, Takahashi K & Imai Y (2008) Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides* 29(5):801-808.
- Nguyen TT, Letourneau M, Chatenet D & Fournier A (2012) Presence of urotensin-II receptors at the cell nucleus: specific tissue distribution and hypoxia-induced modulation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44(4):639-647.
- Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP & Civelli O (1999) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nature cell biology* 1(6):383-385.
- O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ & Bouvier M (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *The Journal of biological chemistry* 264(13):7564-7569.
- Onan D, Pipolo L, Yang E, Hannan RD & Thomas WG (2004) Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* 18(9):2344-2354.
- Pakala R (2008) Role of urotensin II in atherosclerotic cardiovascular diseases. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* 9(3):166-178.
- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P & Maggi CA (2003) Urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *British journal of pharmacology* 140(7):1155-1158.
- Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind, II, Barkley M, Nishioka RS & Bern HA (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(8):5021-5024.

- Petrin D, Robitaille M & Hebert TE (2011) Real-time BRET assays to measure G protein/effector interactions. *Methods Mol Biol* 756:245-261.
- Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB & Young RA (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* 313(5786):533-536.
- Prosser HC, Forster ME, Richards AM & Pemberton CJ (2008) Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Peptides* 29(5):770-777.
- Protopopov A, Kashuba V, Podowski R, Gizatullin R, Sonnhammer E, Wahlestedt C & Zabarovsky ER (2000) Assignment of the GPR14 gene coding for the G-protein-coupled receptor 14 to human chromosome 17q25.3 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 88(3-4):312-313.
- Proulx CD, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, Guillemette G & Leduc R (2008) Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides* 29(5):691-699.
- Re F, Muzio M, De Rossi M, Polentarutti N, Giri JG, Mantovani A & Colotta F (1994) The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *The Journal of experimental medicine* 179(2):739-743.
- Re M, Pampillo M, Savard M, Dubuc C, McArdle CA, Millar RP, Conn PM, Gobeil F, Jr., Bhattacharya M & Babwah AV (2010) The human gonadotropin releasing hormone type I receptor is a functional intracellular GPCR expressed on the nuclear membrane. *PLoS one* 5(7):e11489.
- Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, Fisher S & Yandle TG (2002) Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* 360(9332):545-546.
- Robitaille M, Gora S, Wang Y, Goupil E, Petrin D, Del Duca D, Villeneuve LR, Allen BG, Laporte SA, Bernard DJ & Hebert TE (2010) Gbetagamma is a negative regulator of AP-1 mediated transcription. *Cellular signalling* 22(8):1254-1266.
- Roettger BF, Ghanekar D, Rao R, Toledo C, Yingling J, Pinon D & Miller LJ (1997) Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Molecular pharmacology* 51(3):357-362.
- Ross B, McKendy K & Giaid A (2010) Role of urotensin II in health and disease. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 298(5):R1156-1172.
- Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R & Coy DH (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *European journal of pharmacology* 438(3):159-170.
- Russell FD, Molenaar P & O'Brien DM (2001) Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro. *British journal of pharmacology* 132(1):5-9.
- Saez ME, Smani T, Ramirez-Lorca R, Diaz I, Serrano-Rios M, Ruiz A & Ordonez A (2011) Association analysis of urotensin II gene (UTS2) and flanking regions with biochemical parameters related to insulin resistance. *PLoS one* 6(4):e19327.

- Sato T, Okumura F, Kano S, Kondo T, Ariga T & Hatakeyama S (2011) TRIM32 promotes neural differentiation through retinoic acid receptor-mediated transcription. *Journal of cell science* 124(Pt 20):3492-3502.
- Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P & Loirand G (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circulation research* 88(11):1102-1104.
- Segain JP, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Bletiere D, Loirand G & Pacaud P (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J Immunol* 179(2):901-909.
- Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N & Ebner K (2011) The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36(4):793-804.
- Sondermeijer B, Kompa A, Komesaroff P & Krum H (2005) Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension. *American journal of hypertension* 18(9 Pt 1):1195-1199.
- Song W, Abdel-Razik AE, Lu W, Ao Z, Johns DG, Douglas SA, Balment RJ & Ashton N (2006) Urotensin II and renal function in the rat. *Kidney international* 69(8):1360-1368.
- Spiegel HU, Uhlmann D, Scommotau S, Giersch B & Sulkowski U (1996) Effect of the endothelin receptor antagonist bosentan on postischemic oxygen supply of the liver. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* 9(6):439-445.
- Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D & Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *International journal of molecular medicine* 18(6):1107-1112.
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M & Fujino M (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochemical and biophysical research communications* 310(3):860-868.
- Suguro T, Watanabe T, Ban Y, Kodate S, Misaki A, Hirano T, Miyazaki A & Adachi M (2007) Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *American journal of hypertension* 20(2):211-217.
- Tadevosyan A, Maguy A, Villeneuve LR, Babin J, Bonnefoy A, Allen BG & Nattel S (2010) Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *The Journal of biological chemistry* 285(29):22338-22349.
- Tadevosyan A, Vaniotis G, Allen BG, Hebert TE & Nattel S (2012) G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *The Journal of physiology* 590(Pt 6):1313-1330.
- Tostivint H, Joly L, Lihrmann I, Parmentier C, Lebon A, Morisson M, Calas A, Ekker M & Vaudry H (2006) Comparative genomics provides evidence for close evolutionary

- relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7):2237-2242.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S & Murakami O (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 104(1):1-5.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Murakami O, Ito S, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J & Imai Y (2004) Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy. *Peptides* 25(10):1809-1814.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H & Murakami O (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* 358(9284):810-811.
- Trumpp-Kallmeyer S, Chini B, Mouillac B, Barberis C, Hoflack J & Hibert M (1995) Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae* 70(3):255-262.
- Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE & Krum H (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circulation research* 93(3):246-253.
- Vaniotis G, Allen BG & Hebert TE (2011a) Nuclear GPCRs in cardiomyocytes: an insider's view of beta-adrenergic receptor signaling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301(5):H1754-1764.
- Vaniotis G, Del Duca D, Trieu P, Rohlicek CV, Hebert TE & Allen BG (2011b) Nuclear beta-adrenergic receptors modulate gene expression in adult rat heart. *Cellular signalling* 23(1):89-98.
- Vaniotis G, Glazkova I, Merlen C, Smith C, Villeneuve LR, Chatenet D, Therien M, Fournier A, Tadevosyan A, Trieu P, Nattel S, Hebert TE & Allen BG (2013) Regulation of cardiac nitric oxide signaling by nuclear beta-adrenergic and endothelin receptors. *Journal of molecular and cellular cardiology* 62:58-68.
- Vaudry H, Do Rego JC, Le Mevel JC, Chatenet D, Tostivint H, Fournier A, Tonon MC, Pelletier G, Conlon JM & Leprince J (2010) Urotensin II, from fish to human. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1200:53-66.
- Wang H, Mehta JL, Chen K, Zhang X & Li D (2004) Human urotensin II modulates collagen synthesis and the expression of MMP-1 in human endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* 44(5):577-581.
- Watanabe T, Pakala R, Katagiri T & Benedict CR (2001) Synergistic effect of urotensin II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 104(1):16-18.
- Watanabe T, Takahashi K, Kanome T, Hongo S, Miyazaki A, Koba S, Katagiri T, Pakara R & Benedict CR (2006) Human urotensin-II potentiates the mitogenic effect of mildly oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells: comparison with other vasoactive agents and hydrogen peroxide. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 29(10):821-831.

- Watson AM, Lambert GW, Smith KJ & May CN (2003) Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension* 42(3):373-379.
- Watson MA, Gowers DM & Halford SE (2000) Alternative geometries of DNA looping: an analysis using the SfiI endonuclease. *Journal of molecular biology* 298(3):461-475.
- Wilkinson IB, Affolter JT, de Haas SL, Pellegrini MP, Boyd J, Winter MJ, Balment RJ & Webb DJ (2002) High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. *Cardiovascular research* 53(2):341-347.
- Willard FS & Crouch MF (2000) Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins. *Immunology and cell biology* 78(4):387-394.
- Yano K, Hicks JW, Vaudry H & Conlon JM (1995) Cardiovascular actions of frog urotensin II in the frog, *Rana catesbeiana*. *General and comparative endocrinology* 97(1):103-110.
- Yoshimoto T, Matsushita M & Hirata Y (2004) Role of urotensin II in peripheral tissue as an autocrine/paracrine growth factor. *Peptides* 25(10):1775-1781.
- You Z, Genest J, Jr., Barrette PO, Hafiane A, Behm DJ, D'Orleans-Juste P & Schwertani AG (2012) Genetic and pharmacological manipulation of urotensin II ameliorate the metabolic and atherosclerosis sequelae in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(8):1809-1816.
- Yulis CR & Lederis K (1986) Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(18):7079-7083.
- Zelnik PR & Lederis K (1973) Chromatographic separation of urotensins. *General and comparative endocrinology* 20(2):392-400.
- Zhang AY, Chen YF, Zhang DX, Yi FX, Qi J, Andrade-Gordon P, de Garavilla L, Li PL & Zou AP (2003) Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology* 285(4):F792-798.
- Zhang Y, Li J, Cao J, Chen J, Yang J, Zhang Z, Du J & Tang C (2002) Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin II and its functional receptors in rat myocardium. *Heart and vessels* 16(2):64-68.
- Zhao J, Yu QX, Kong W, Gao HC, Sun B, Xie YQ & Ren LQ (2013) The urotensin II receptor antagonist, urantide, protects against atherosclerosis in rats. *Experimental and therapeutic medicine* 5(6):1765-1769.
- Zheng H, Loh HH & Law PY (2013) Posttranslation modification of G protein-coupled receptor in relationship to biased agonism. *Methods in enzymology* 522:391-408.
- Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW & Nayler O (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *Journal of receptor and signal transduction research* 22(1-4):155-168.
- Zou Y, Nagai R & Yamazaki T (2001) Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats. *FEBS letters* 508(1):57-60.