

Institut National de la Recherche Scientifique – INRS - Institut Armand-Frappier

Université de Rouen

Développement d'agonistes stables du récepteur PAC1: étude des relations structure-activité du *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*

Par
Steve Bourgault

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Pr Michel Charbonneau INRS - Institut Armand-Frappier
Examineur interne	Dr Alain Couvineau Inserm U773 Faculté de Médecine Xavier Bichat
Examineur externe	Pr Réjean Couture Faculté de Médecine Université de Montréal
Examineur externe	Dr Catherine Llorens-Cortes Inserm U691 Collège de France
Codirecteur de recherche	Dr David Vaudry Inserm U413 Université de Rouen
Codirecteur de recherche	Pr Alain Fournier INRS - Institut Armand-Frappier

Résumé

Le PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) est un neuropeptide initialement isolé pour sa capacité à stimuler la formation d'AMPc dans des cellules antéhypophysaires en culture. Jusqu'à présent, trois types de récepteurs du PACAP ont été caractérisés, nommés respectivement VPAC1, VPAC2 et PAC1. La large distribution du PACAP et de ses récepteurs suggère que ce système pourrait être impliqué dans la régulation de nombreux effets physiologiques. À cet égard, le PACAP, que l'on retrouve sous deux isoformes biologiquement actives de 38 et 27 résidus respectivement, agit tant au niveau du système nerveux central qu'au niveau des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, digestif, endocrinien, reproducteur et immunitaire. Parmi ses nombreux effets, le PACAP favorise la survie neuronale dans divers modèles *in vitro* et *in vivo* d'atteintes neurologiques. Les propriétés neuroprotectrices du PACAP reposent principalement sur son activité anti-apoptotique régulée par l'activation du récepteur PAC1. À cet égard, le récepteur PAC1 est actuellement considéré comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de maladies neurodégénératives. En revanche, de par sa nature moléculaire peptidique, le ligand endogène du récepteur PAC1 présente des paramètres pharmacocinétiques qui limitent son utilisation comme composé médicinal cliniquement efficace. Dans l'optique de valider le potentiel thérapeutique du PACAP, il importe donc de développer de puissants agonistes du récepteur PAC1 affichant une stabilité métabolique accrue.

Afin de conférer au PACAP une résistance face à la protéolyse, une librairie d'analogues comportant des modifications chimiques ciblant les principaux sites potentiels de clivage enzymatique a été initialement développée. Ces dérivés ont été testés pour leur résistance face à la dipeptidyl-peptidase IV, enzyme clé du métabolisme du PACAP, pour leur stabilité plasmatique et pour leur capacité à lier et à activer le récepteur PAC1. De cette librairie, un analogue du PACAP38 s'est avéré plus puissant que le peptide natif et a présenté une stabilité métabolique améliorée. L'évaluation de son activité neuroprotectrice dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat a montré que ce

composé réduit significativement les atteintes neurologiques et favorise la reprise des comportements moteurs.

Afin d'acquérir des informations pouvant soutenir la conception rationnelle de peptides de petite taille ou même d'agonistes non-peptidiques sélectifs du récepteur PAC1, une étude de relations structure-activité a été entreprise. Au moyen de délétions ciblées et d'études structurales par dichroïsme circulaire, nous avons démontré que de nombreux domaines du PACAP27 sont cruciaux pour le maintien de l'activité biologique et que la conformation hélicoïdale du peptide n'est pas une composante suffisante pour la liaison du PACAP au récepteur PAC1. Par cette approche nous avons néanmoins identifié un analogue tronqué du PACAP27 agissant comme un agoniste complet du récepteur PAC1, bien que celui-ci présente une structure secondaire aléatoire. Nous avons également caractérisé les déterminants moléculaires et structuraux de la région N-terminale du PACAP, segment responsable de l'activation du récepteur PAC1. Cette étude a conduit à l'identification de pharmacophores du récepteur PAC1. De même, par l'application de contraintes conformationnelles supportée par la modélisation moléculaire sous contraintes des données de spectroscopie RMN, un modèle de la conformation bioactive du PACAP a été proposé. Les résultats de cette étude s'inscrivent dans une démarche globale visant une meilleure compréhension du mécanisme d'action du PACAP à l'échelle moléculaire.

Steve Bourgault

Pr Alain Fournier

Dr David Vaudry

Résumé en anglais

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) was initially isolated from ovine hypothalamic extracts on the basis of its ability to stimulate cAMP formation in anterior pituitary cells. Three distinct subtypes of PACAP receptors were subsequently characterized, named VPAC1, VPAC2 and PAC1, respectively. The wide distribution of PACAP and its receptors suggests that the PACAP system could be involved in the regulation of numerous physiological processes. Indeed, PACAP, which exists in two biologically active isoforms of 27 and 38-residue respectively, acts in the central nervous system as well as in the airways, gonads, endocrine glands and cardiovascular, digestive and immune systems. Particularly, PACAP induces neuronal survival in various *in vitro* and *in vivo* models of neurological insults. The neuroprotective properties of PACAP are mainly attributed to its anti-apoptotic activity involving the activation of the PAC1 receptor. Therefore, the PAC1 receptor is actually considered as a potential therapeutic target for the treatment of several neurodegenerative diseases. However, as a peptide, the endogenous ligand of the PAC1 receptor shows pharmacokinetics parameters which limit its use as a clinically efficient drug. The development of potent PAC1 agonists with increased metabolic stability appears as an important issue to evaluate the therapeutic potential of PACAP.

A library of PACAP analogs containing chemical modifications targeting potential enzymatic cleavage sites was initially developed to identify derivatives resistant to proteolysis. These compounds were tested for their resistance against dipeptidyl-peptidase IV, a major enzyme of PACAP metabolism, for their stability in human plasma and for their capacity to bind and activate the PAC1 receptor. From this library, a PACAP38 analog was shown to be more potent than the native peptide and presented an improved metabolic stability. Evaluation of its neuroprotective activity in a rat cerebral ischemia model showed that this compound significantly reduced the infarct volume and the behavioral deficits.

A structure-activity relationships study was also undertaken to acquire valuable information that could eventually support the rational design of short peptides or even non-peptide agonists of the PAC1 receptor. By means of various deletions supported by circular dichroism structural studies, we demonstrated that several domains of PACAP27 are crucial for the preservation of the biological activity and that the helical conformation of the peptide is not a sufficient component to allow the binding of PACAP to the PAC1 receptor. Nonetheless, using this approach, we identified a truncated analog of PACAP behaving as a complete agonist of the PAC1 receptor even if this peptide was mainly unstructured. We also characterized the molecular and the structural determinants of the N-terminal region of PACAP responsible for the activation of the PAC1 receptor. This study conducted to the identification of the pharmacophores of the PAC1 receptor. Moreover, with introduction of conformational constraints supported by NMR spectroscopy, a model of the bioactive conformation of PACAP was proposed. The results of this study should also lead to a better comprehension of the mode of action of PACAP at the molecular level.

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus sincères remerciements à mes directeurs de recherche, le Pr Alain Fournier et le Dr David Vaudry pour la formation et la rigueur scientifique qu'ils m'ont transmises. David, merci de ta disponibilité, de ton enthousiasme et de ta participation active dans mon projet de thèse malgré les quelques milliers de kilomètres qui séparent Rouen de Montréal. Alain, merci de la confiance que tu m'as témoignée tout au long de mon séjour au sein de ton équipe, merci pour l'ensemble des possibilités que tu m'as offertes et merci pour tes nombreux encouragements. Je remercie également tous les membres du Laboratoire d'Études Moléculaires et Pharmacologiques des Peptides de l'Institut Armand-Frappier ainsi que mes collègues de l'Inserm U413 à l'Université de Rouen. Finalement, je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), la Fondation des Maladies du Cœur du Canada (FMCC), le Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) pour leur soutien financier.

Table des matières

Résumé	II
Résumé en anglais	IV
Remerciements	VI
Table des matières	VII
Liste des articles	IX
Liste des figures	X
Liste des tableaux	XII
Liste des abréviations	XIII
Introduction	XVI
Chapitre 1: Revue de la littérature	
<i>1. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>	1
1.1 Découverte du PACAP.....	1
1.2 Structure primaire du PACAP.....	2
1.3 Évolution phylogénique du PACAP.....	3
1.4 Structure secondaire du PACAP.....	5
1.5 Biosynthèse du PACAP.....	9
1.6 Distribution du PACAP.....	10
1.7 Passage du PACAP à travers la barrière hématoencéphalique.....	11
1.8 Digestion protéolytique du PACAP.....	14
<i>2. Récepteurs du PACAP</i>	16
2.1 RCPG de la classe B.....	17
2.2 Outils pharmacologiques des récepteurs du PACAP.....	20
2.3 Distribution des récepteurs du PACAP.....	21
2.4 Variants d'épissage alternatif du récepteur PAC1.....	23
2.5 Mécanismes de transduction du signal.....	24
<i>3. Activité biologique du PACAP</i>	25
3.1 Effets du PACAP sur le système nerveux central.....	26
3.1.1 Effets neurotrophiques du PACAP.....	27
3.1.2 Effets neuroprotecteurs du PACAP.....	27
3.1.3 Mécanismes des effets neuroprotecteurs du PACAP.....	30
3.1.4 Effets du PACAP sur le comportement.....	32
3.2 Effets du PACAP sur d'autres organes.....	33
3.3 Souris invalidées pour le gène du PACAP ou du récepteur PAC1.....	35
<i>4. Pharmacologie moléculaire et relations structure-activité</i>	37
4.1 Déterminants moléculaires du récepteur PAC1.....	38
4.1.1 Spécificité moléculaire de la liaison PACAP-PAC1.....	45
4.1.2 Études structurales du récepteur PAC1.....	46
4.1.3 Modèles d'activation du récepteur PAC1.....	48

4.1.4 Relations structure-activité du maxadilan.....	51
4.2 Déterminants moléculaires des récepteurs VPAC1 et VPAC2.....	53
4.2.1 Études structurales du récepteur VPAC1.....	57
Chapitre 2: Article 1.....	60
Résumé de l'article en français.....	61
Contribution de l'étudiant.....	62
<i>Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor.....</i>	63
Chapitre 3: Article 2.....	77
Résumé de l'article en français.....	78
Contribution de l'étudiant.....	79
<i>Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27.....</i>	80
Chapitre 4: Article 3.....	90
Résumé de l'article en français.....	91
Contribution de l'étudiant.....	92
<i>Molecular and conformational determinants of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor.....</i>	93
Supporting Information.....	102
Chapitre 5: Discussion.....	111
1. Développement de dérivés stables du PACAP.....	113
1.1 Évaluation de l'activité anorexigène.....	117
1.2 Évaluation de l'activité neuroprotectrice.....	121
2. Études des relations structure-activité.....	125
2.1 Études structurales du PACAP27.....	126
2.2 Segment minimal de liaison du PACAP au récepteur PAC1.....	133
2.3 Déterminants moléculaires et conformationnels du domaine N-terminal.....	135
Chapitre 6: Conclusion.....	143
Références.....	146

Liste des articles

Liste des articles inclus dans ma thèse

Bourgault S., Vaudry D., Ségalas-Milazzo I., Guilhaudis L., Couvineau A., Vaudry H., Fournier A. 2009. Molecular and conformational determinants of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 52, p. 3308-3316.

Bourgault S., Vaudry D., Raoult E., Guilhaudis L., Couvineau A., Laburthe M., Ségalas-Milazzo I., Vaudry H., Fournier A. 2008. Structural and biological analyses of truncated analogs of PACAP. *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 36, p. 260-269.

Bourgault S., Vaudry D., Botia B., Couvineau A., Laburthe M., Vaudry H. et Fournier A. 2008 Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides*, vol. 29, p. 919-932.

Liste des articles non-inclus dans ma thèse

Bourgault S., Vaudry D., Dejda A., Doan D., Vaudry H., Fournier A. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide: a Potential Therapeutic Neuroprotective Drug. *Current Medicinal Chemistry*, sous presse.

Vaudry D., Falluel-Morel A., **Bourgault S.**, Chow B.K., Basille M., Galas L., Fournier A., Hashimoto H., Vaudry H. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: from Structure to Function. *Pharmacological Reviews*, sous presse.

Bourgault S., Vaudry D., Couvineau A., Doan D., Laburthe M., Vaudry H., Fournier A. 2008. Structure-activity relationship studies of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: Alanine scan of the N-terminal domain. *Proceeding of the 30th European Peptide Symposium*.

Doan D., **Bourgault S.**, Létourneau M., Fournier A. 2008. Effectiveness of the Suzuki-Miyaura Cross-Coupling reaction for solid-phase peptide modification. *Journal of Combinatorial Chemistry*, vol. 10, p. 44-51.

Dejda A., Jolivel V., **Bourgault S.**, Seaborn T., Fournier A., Vaudry H., Vaudry D. 2008. Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: A better understanding toward a therapeutic potential in neurodegenerative diseases. *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 36, p. 26-37.

Ravni A., **Bourgault S.**, Lebon A., Chan P., Galas L., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J., Eiden L.E. Vaudry D. 2006. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *Journal of Neurochemistry*, vol. 98, p. 321-329.

Bourgault S., Vaudry D., Vaudry H. et Fournier A. Characterization of PACAP analogs resistant to dipeptidyl peptidase IV. 2006. *Proceeding of the 29th European Peptide Symposium*.

Liste des figures

1	Évolution temporelle et impact des mécanismes physiopathologiques observés lors d'AVC ischémique.....	XVII
2	Structure primaire du Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide...	2
3	Séquences des principaux membres de la superfamille VIP/GRF/Glucagon retrouvées chez l'humain.....	3
4	Séquences du PACAP38 retrouvées chez différentes espèces de vertébrés...	4
5	Structure du PACAP27 lié aux micelles de DPC.....	7
6	Structure en solution du PACAP38 de la carpe chinoise.....	8
7	Représentation schématique de la biosynthèse du PACAP.....	10
8	Représentation schématique des principaux seconds messagers associés à l'activation des récepteurs du PACAP.....	25
9	Coupes de cerveau provenant de souris sauvages et de souris PACAP knockout ayant subi une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne.....	29
10	Représentation schématique des mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'effet neuroprotecteur direct du PACAP.....	31
11	Représentation schématique du fragment PACAP(1-21) lorsque celui-ci est complexé au récepteur PAC1.....	44
12	Représentation du complexe formé par le domaine N-terminal du récepteur PAC1 et le fragment PACAP(6-38).....	45
13	Structure du domaine N-terminal du récepteur PAC1.....	48
14	Diagramme de Shiffer-Edmundson du segment hélicoïdal 10-27 du PACAP.....	49
15	Représentation schématique de l'activation du récepteur PAC1 par le PACAP selon le modèle <i>two-domain</i>	50
16	Représentation schématique de la structure du maxadilan obtenue suite à l'analyse prédictive de Chou & Fasman.....	52
17	Séquences primaires du PACAP et du VIP présentant les résidus du VIP impliqués dans la liaison aux récepteurs VPAC1 et VPAC2.....	56
18	Alignement des séquences des domaines N-terminaux des récepteurs VPAC1 et PAC1.....	57
19	Séquence primaire du PACAP illustrant les principaux sites de clivage enzymatique.....	114

20	Spectres de dichroïsme circulaire du PACAP38 et du [ψ CH ₂ -NH ²¹⁻²²] PACAP38.....	115
21	Effet d'un traitement par voie <i>icv</i> de PACAP38 et d'acétyl-[Ala ¹⁵ , Ala ²⁰]- PACAP38-propylamide sur la prise alimentaire cumulative	118
22	Effet d'un traitement par voie <i>iv</i> de PACAP38 et d'acétyl-[Ala ¹⁵ , Ala ²⁰]- PACAP38-propylamide sur la prise alimentaire cumulative.....	119
23	Effet d'un traitement par voie <i>iv</i> de PACAP38 et d'acétyl-[Ala ¹⁵ , Ala ²⁰]- PACAP38-propylamide sur la prise alimentaire périodique.....	120
24	Coupes de cerveau de rats ischémiés.....	122
25	Effets du PACAP et de l'acétyl-[Ala ¹⁵ , Ala ²⁰]-PACAP38-propylamide sur (A) le volume des zones infarctées et (B) sur les fonctions cognitives des animaux ischémiés.....	123
26	Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des différentes structures secondaires des peptides.....	127
27	Spectres de dichroïsme circulaire du PACAP27.....	128
28	Effets NOE caractéristiques des différents types de structures secondaires...	129
29	Diagramme des connectivités NOE séquentiels obtenus pour le PACAP27 dans 100 mM DPC/H ₂ O.....	130
30	Déplacements chimiques secondaires des protons α du PACAP27.....	131
31	(A) Superposition des atomes du squelette peptidique des 92 structures finales du PACAP27.....	132
32	Représentation schématique de la structure secondaire du PACAP27 en milieu micellaire.....	133
33	Représentation schématique de la conformation bioactive du segment 1-4 du PACAP suggérée par notre étude de relations structure-activité.....	139

Liste des tableaux

I	Affinité relative des différents ligands naturels des récepteurs du PACAP...	17
II	Classification des trois principales familles de GPCR.....	21
III	Principaux outils pharmacologiques pour l'étude des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2.....	21
IV	Résumé des différents modèles d'ischémie cérébrale ayant montré l'effet neuroprotecteur du PACAP.....	29
V	Activités biologiques du PACAP au niveau périphérique et expression relative des sites de liaison du PACAP.....	34
VI	Affinité de liaison et activité biologique de fragments du PACAP27 dans des essais pharmacologiques ciblant le récepteur PAC1.....	39
VII	Affinité de liaison et activité biologique de fragments du PACAP38 et du PACAP27 dans des essais pharmacologiques ciblant le récepteur PAC1.....	40
VIII	Affinité de liaison et activité biologique d'analogues du PACAP dans des essais pharmacologiques ciblant le récepteur PAC1.....	43

Liste des abréviations

Abu	Acide α -aminobutyrique
Aib	Acide aminoisobutyrique
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	<i>Apoptotic inducing factor</i>
AMP _c	Adénosine mono-phosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BHE	Barrière hématoencéphalique
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	Albumine sérique bovine
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRE	<i>cAMP response-like element</i>
CREB	<i>cAMP response-like element-binding</i>
Dab	Acide 2,4-diaminobutyrique
Dap	Acide 2,3-diaminopropionique
DC	Dichroïsme circulaire
DG	Diacylglycérol
DPC	Dodécylphosphocholine
DPP IV	Dipeptidyl-peptidase IV
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GH	Hormone de croissance
GHF-1	Facteur de transcription de l'hormone de croissance
GHRH	Hormone de libération de l'hormone de croissance
GIP	<i>Gastric inhibitory polypeptide</i>
Gla	Acide γ -carboxyglutamique
GLP-2	<i>Glucagon-like peptide-2</i>
GRF	Facteur de libération de l'hormone de croissance
HoSer	Homosérine

ICAM-1	<i>Inter-cellular adhesion molecule 1</i>
icv	Intracérébroventriculaire
IL-6	Interleukine-6
Inr	<i>Initiator-like element</i>
IP ₃	Inositol triphosphate
iv	Intraveineuse
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LH	Hormone lutéinisante
LHRH	Hormone de libération de l'hormone lutéinisante
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCAOp	Occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne
MCAOt	Occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne
NEP	Endopeptidase neutre
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NOE	Effet nucléaire Overhauser
NPY	Neuropeptide Y
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>
PC-12	Cellules de phéochromocytomes de rat
PHI	Peptide histidine-isoleucine
PHM	Peptide histidine-méthionine
PIP ₂	Phosphatidylinositol-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PRP	<i>PACAP-related peptide</i>
PTH-1	<i>Parathyroid hormone 1</i>
PTS-6	<i>Peptide transport system 6</i>
RAMP	<i>Receptor activity-modifying protein</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G

RIA	Dosage radioimmunologique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SNC	Système nerveux central
SPAK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
Sta	Statine (Acide 4-amino-3-hydroxy-6-méthylheptanoïque)
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
TRE	<i>12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate response element</i>
TRH	Hormone thyroïdienne
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>

Introduction

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent dans les pays industrialisés la deuxième cause de mortalité après les maladies coronariennes et devant les cancers et constituent à ce titre un important problème humain et socio-économique (Donnan *et al.*, 2008). Notamment, les AVC sont la première cause d'handicaps acquis chez l'adulte et les survivants présentent de graves séquelles physiques et mentales qui affectent fondamentalement leur qualité de vie (Donnan *et al.*, 2008). La majorité des AVC résulte d'une réduction importante du débit sanguin qui se manifeste localement au niveau de la région du cerveau irriguée par une artère cérébrale majeure obstruée par un caillot (AVC ischémique). Puisque les neurones dépendent presque exclusivement de la phosphorylation oxydative pour leur production d'énergie, la diminution du flux sanguin réduit l'apport de substrats, principalement de glucose et d'oxygène, engendrant un déficit énergétique. Cet événement qui survient dans les premiers instants suite au choc ischémique initial entraîne une perte du maintien du gradient ionique et donc une dépolarisation massive des neurones et des cellules gliales affectées par le déficit énergétique (Dirnagl *et al.*, 2003). Cette perte du potentiel membranaire basal active des canaux calciques voltage-dépendants induisant ainsi la libération d'acides aminés excitateurs dans l'environnement extracellulaire (Dirnagl *et al.*, 1999). En outre, la concentration de glutamate retrouvée dans le compartiment extracellulaire est amplifiée par le fait que les systèmes de recapture présynaptique ou des cellules gliales ne peuvent fonctionner adéquatement dû au déficit énergétique. L'activation des récepteurs du glutamate accroît ainsi la concentration cytoplasmique d'ion calcique et leur suractivation peut conduire à une augmentation des niveaux intracellulaires en Na^+ et en Cl^- (Dirnagl *et al.*, 2003). Ces événements conduisent à une profonde altération de l'homéostasie et entraînent la lyse osmotique des neurones et des cellules gliales provoquant ainsi la nécrose de la zone cérébrale initialement atteinte.

Cette mort nécrotique observée au site initial et l'excitotoxicité sont les principaux événements initiateurs de la cascade moléculaire amplificatrice qui conduisent à l'inflammation et à l'apoptose observées au niveau de l'aire secondaire de la lésion

neuronale (pénombre). De même, l'augmentation de la quantité en radicaux libres, l'acidose tissulaire ainsi que la dépolarisation neuronale retrouvée dans la pénombre contribuent à promouvoir l'inflammation et l'apoptose (Ferrer & Planas, 2003). Ces mécanismes physiopathologiques évoluent de façon spatio-temporelle, de l'instant immédiat suivant l'occlusion de l'artère cérébrale à plusieurs jours suite à l'accident ischémique et, du centre de la lésion vers la pénombre (Figure 1).

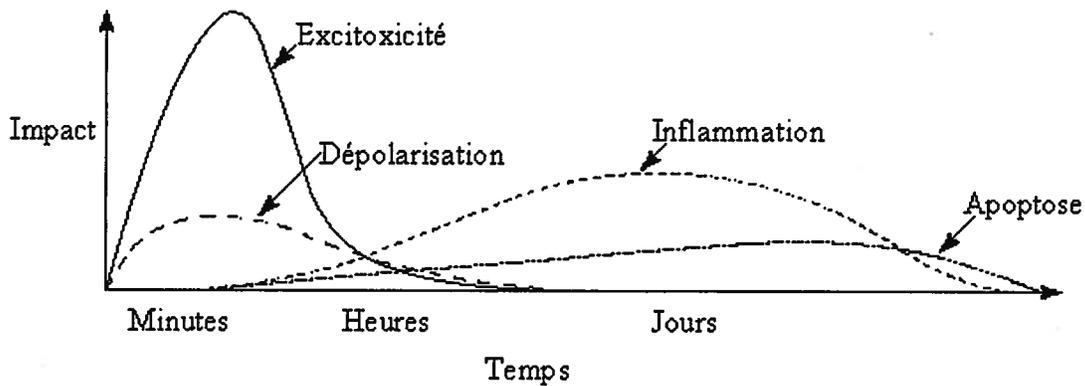


Figure 1: Évolution temporelle et impact des mécanismes physiopathologiques observés lors d'AVC ischémique. (Adapté de Dirnagl *et al.*, 1999)

Dès les premières heures après le choc ischémique initial, une augmentation de l'expression de facteurs de transcription pro-inflammatoires, tels que le NF- κ B (O'Neill & Kaltschmidt, 1997), l'*hypoxia inductible factor 1* (Ruscher *et al.*, 1998), l'*interferon regulatory factor* (Iadecola *et al.*, 1999) et STAT3 (Planas *et al.*, 1996) est observée dans la pénombre. Ces facteurs transcriptionnels induisent l'expression de médiateurs de la réaction inflammatoire tel que le TNF α et certaines interleukines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-8) (Mergenthaler *et al.*, 2004). Ces cytokines favorisent l'expression de molécules d'adhésion (E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1) à la surface luminale des cellules endothéliales des microvaisseaux de la région cérébrale affectée (Sughrue *et al.*, 2004). Les leucocytes peuvent alors adhérer aux vaisseaux sanguins et débiter leur migration vers le cerveau qui est facilitée par une rupture de l'étanchéité de la barrière hématoencéphalique. Les neutrophiles activés qui se sont infiltrés dans le cerveau produisent l'enzyme inductible iNOS, entraînant une augmentation de la concentration en oxyde nitrique. Ceci conduit à une élévation marquée de la cytotoxicité via la formation

de peroxy-nitrite (Forster *et al.*, 1999). De même, les neurones ischémiques et les monocytes-macrophages expriment à la hausse la cyclooxygénase-2 (COX-2). Par son action catalytique, la COX-2 libère des radicaux libres et produit certaines prostaglandines neurotoxiques (Nogawa *et al.*, 1997). Malgré les effets néfastes de la réaction inflammatoire observée au niveau de la pénombre, celle-ci semble nécessaire afin de permettre le nettoyage de la région neuronale affectée, le remodelage et la reconstruction tissulaire ainsi que la néovascularisation (Dirnagl *et al.*, 1999).

Une mort apoptotique est observée au niveau de la pénombre et son évolution spatio-temporelle est similaire à celle retrouvée pour la réaction inflammatoire. L'apoptose neuronale provient d'une activation simultanée des voies extrinsèque et intrinsèque (Ferrer & Planas, 2003). Les activateurs de la voie intrinsèque lors d'ischémie cérébrale sont les niveaux élevés d'ion calcique intracellulaire, les espèces réactives de l'oxygène et les dommages à l'ADN, qui entraînent l'activation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ces derniers convergent ultimement vers la mitochondrie (Hengartner, 2000). Les deux voies tendent, directement ou indirectement, vers l'activation des caspases (Friedlander, 2003). À cet égard, l'activation des caspases 1, 3, 8, 9 et 11 et la libération du cytochrome c dans le cytosol ont été observées dans des modèles *in vivo* d'ischémie cérébrale (Rabuffetti *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2000; Benchoua *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2002). De même, une augmentation de l'expression et de la translocation nucléaire du facteur inducteur de l'apoptose (AIF) a été observée chez des neurones de la pénombre (Ferrer & Planas, 2003). L'apoptose qui survient au niveau de la pénombre est régulée par de nombreux phénomènes dont les principaux agents initiateurs proviennent tant du milieu extracellulaire que du déséquilibre de l'homéostasie intracellulaire.

Nonobstant la forte prévalence des AVC en occident, aucun traitement satisfaisant permettant d'inhiber les mécanismes conduisant à cette deuxième vague de mort neuronale au niveau de la pénombre n'est actuellement disponible. En effet, lors d'AVC de type ischémique, les patients sont couramment traités à l'aide du tPA (*tissue plasminogen activator*) pour une courte période (3 à 5 heures) et par de simples mesures

stabilisatrices au niveau des apports hydro-électrolytiques et des paramètres hémodynamiques (Donnan *et al.*, 2008). Le tPA est employé afin de dissoudre le caillot, conduisant ainsi à la libération de l'artère cérébrale bloquée. Pour ses propriétés anticoagulantes, l'acide acétylsalicylique est également utilisé sur une plus longue période (2 à 4 jours) afin de prévenir la formation de nouveaux caillots (Donnan *et al.*, 2008). Malgré les effets bénéfiques du tPA sur la récupération neurologique, le développement de nouveaux outils thérapeutiques pouvant contrôler les voies biochimiques conduisant à l'inflammation et à l'apoptose pourrait contribuer à réduire le haut niveau de morbidité et d'invalidité associé aux AVC ischémiques.

Le *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP) est un neuropeptide initialement isolé à partir d'extraits hypothalamiques ovins pour sa capacité à stimuler la formation d'adénosine mono-phosphate cyclique (AMP_c) dans des cellules hypophysaires antérieures (Miyata *et al.*, 1989). Depuis sa découverte, les effets biologiques du PACAP ont été répertoriés tant au niveau du système nerveux central qu'au niveau des systèmes cardio-vasculaire, respiratoire, digestif, endocrinien, reproducteur et immunitaire. Notamment, le PACAP a montré des propriétés neuroprotectrices dans des modèles *in vitro* et *in vivo* variés d'atteintes neurologiques. Par exemple, le PACAP atténue la mort cellulaire associée à l'exposition à divers agents neurotoxiques tels que le peroxyde d'hydrogène, le glutamate, l'éthanol, le peptide β -amyloïde et les céramides (Vaudry *et al.*, 2002a; Shintani *et al.*, 2005; Vaudry *et al.*, 2002b; Onoue *et al.*, 2002a; Falluel-Morel *et al.*, 2004). En outre, l'effet neuroprotecteur du PACAP a également été observé dans des modèles *in vivo* de la maladie d'Huntington, de dommages traumatiques et de la maladie de Parkinson (Tamas *et al.*, 2006; Farkas *et al.*, 2004; Chen & Tzeng, 2005; Reglodi *et al.*, 2004b). Particulièrement, la capacité du PACAP à réduire le volume de la zone infarctée et à faciliter la reprise des comportements moteurs a été abondamment exposée à l'aide de divers modèles d'ischémie cérébrale chez le rat et la souris (Ohtaki *et al.*, 2008).

Le PACAP favorise la survie neuronale en inhibant directement l'apoptose par le biais de l'activation du récepteur spécifique PAC1, en favorisant la libération de facteurs

neuroprotecteurs par les cellules gliales et en agissant sur les mécanismes de régulation de la réaction inflammatoire (Ohtaki *et al.*, 2008). Par exemple, des évènements clés de l'apoptose observés dans l'aire de la pénombre tels que la libération du cytochrome c, l'expression de AIF et l'activation de la caspase 3 sont inhibés par le PACAP (Ohtaki *et al.*, 2008; Dejda *et al.*, 2008). En outre, le PACAP peut diminuer la production de facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et le monoxyde d'azote chez des cellules microgliales activées suite à l'accident cérébro-ischémique (Brenneman, 2007). Ceci permet de contrôler l'amplification de la réaction inflammatoire et de favoriser la survie neuronale. Le PACAP protège également les neurones de l'excitotoxicité induite par le glutamate et observée dès les premiers instants de l'ischémie cérébrale (Shintani *et al.*, 2005; Ràcz *et al.*, 2006). Les caractéristiques anti-apoptotiques et anti-inflammatoires observées dans divers modèles *in vivo* d'ischémie cérébrale indiquent que le PACAP agit comme un puissant bloqueur de la mort neuronale présente lors d'AVC ischémique. Le PACAP protège également les neurones même lorsqu'il est injecté par voie *iv* plus de vingt-quatre heures après l'ischémie cérébrale, témoignant ainsi de la fenêtre thérapeutique unique du PACAP (Uchida *et al.*, 1996).

L'ensemble de ces données suggère que le PACAP présente un potentiel thérapeutique pour le traitement de la neurodégénérescence observée au niveau de la pénombre suite à un accident ischémique. Toutefois, de par sa nature moléculaire peptidique, le PACAP dispose de paramètres pharmacocinétiques qui limitent son potentiel d'utilisation comme agent cliniquement efficace lors d'AVC ischémiques. Particulièrement, comme la majorité des peptides naturels, le PACAP subit une rapide dégradation par différentes peptidases endogènes suite à son entrée dans la circulation sanguine. Par exemple, une demi-vie dans le sang de 3.5 minutes a été observée suite à l'injection *iv* de PACAP38 chez l'humain (Birk *et al.*, 2007). Chez la souris, le PACAP38 a montré une demi-vie plasmatique de moins de 2 minutes suite à une injection par voie *iv* (Zhu *et al.*, 2003). Cette faible stabilité plasmatique a été principalement attribuée à l'action protéolytique de la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV). En plus de supprimer l'activité du peptide, le clivage du PACAP par la DPP IV libère des métabolites qui agissent comme antagonistes du récepteur PAC1 (Zhu *et al.*, 2003; Robberecht *et al.*,

1992b). Cette rapide conversion du peptide bioactif en antagoniste suite à une injection par voie intraveineuse compromet tout particulièrement le potentiel thérapeutique du PACAP comme composé cliniquement efficace réduisant les atteintes neurologiques observées au niveau de la pénombre lors d'AVC ischémiques.

Le présent projet de recherche s'inscrit dans cette problématique. En effet, afin de poursuivre l'évaluation du potentiel thérapeutique du PACAP pour le traitement des AVC, il importe de développer des dérivés du PACAP disposant de paramètres pharmacocinétiques améliorés. L'objectif global de cette étude était donc d'explorer différentes avenues pouvant conduire au développement d'agonistes à haute stabilité métabolique du récepteur PAC1, récepteur principalement responsable de l'effet neuroprotecteur du PACAP. Tout d'abord, pour contourner le problème de la rapide inactivation du PACAP suite à son injection par voie *iv*, une librairie de dérivés stables a été rationnellement conçue. Pour ce faire, nous avons initialement caractérisé les principaux sites de clivage enzymatique du PACAP pour ensuite appliquer à ceux-ci des modifications chimiques ciblées. Les analogues affichant un profil pharmacologique adéquat et une stabilité métabolique accrue ont été évalués pour leur capacité à réduire le volume de la zone infarctée et à faciliter la reprise des comportements moteurs dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat. Deuxièmement, une étude de relations structure-activité a été entamée afin d'explorer la possibilité de concevoir des analogues raccourcis et/ou structurellement contraints ou même des agonistes non-peptidiques. Pour ce faire, nous avons procédé à l'identification du segment minimal du PACAP qui permet la liaison au récepteur PAC1 et nous avons caractérisé les déterminants moléculaires et structuraux responsables de l'activation du récepteur PAC1. Cette deuxième approche s'inscrit dans une démarche globale visant une meilleure compréhension des interactions moléculaires existant entre les récepteurs couplés aux protéines G de la classe B et leurs ligands peptidiques.

La présente thèse comporte six chapitres. Premièrement, la revue de la littérature expose les connaissances actuelles concernant les principales caractéristiques chimiques, structurales, biologiques et pharmacologiques du neuropeptide PACAP. Notamment, une attention particulière est attribuée à la pharmacologie moléculaire et aux études de relations structure-activité antérieures portant sur l'interaction du PACAP avec le récepteur PAC1. Les chapitres 2, 3 et 4 présentent chacun un article. Le premier article, publié dans la revue *Peptides*, décrit le développement d'agonistes stables du récepteur PAC1. Le second article, paru dans *Journal of Molecular Neuroscience*, expose la caractérisation structurale et pharmacologique d'analogues tronqués du PACAP27. Le troisième article, publié dans *Journal of Medicinal Chemistry*, concerne une importante étude de relations structure-activité ciblant le domaine N-terminal du PACAP. Le chapitre 5 permet de présenter des résultats complémentaires et de discuter de la démarche scientifique entreprise lors de ce projet de recherche. De plus, différentes approches expérimentales pouvant servir pour la poursuite du projet sont proposées. Finalement, les principales conclusions de cette thèse ainsi que l'avancement des connaissances découlant de ces travaux sont présentées au sixième chapitre.

1. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

1.1 Découverte du PACAP

À la fin des années 80, les principaux agents hypophysiotropes de l'axe hypothalamo-hypophysaire tels que l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH), l'hormone thyroïdienne (TRH) et la gonadolibérine (LHRH) avaient été isolés et caractérisés. En particulier, il avait été établi que ces divers facteurs agissent sur les cellules hypophysaires en activant principalement l'adénylyl cyclase (Labrie *et al.*, 1979; Labrie *et al.*, 1982; Culler *et al.*, 1984). Néanmoins, ces hormones hypothalamiques ne pouvaient pas à elles seules rendre compte de l'ensemble des processus de régulation de l'adénohypophyse. Par exemple, des lésions ou des stimulations de diverses régions hypothalamiques suggéraient l'existence de neurohormones inconnues à ce jour et qui seraient impliquées dans la libération de l'hormone folliculostimulante (FSH) ou de la prolactine. Afin de répondre à cette interrogation, le Professeur Arimura et son équipe ont procédé à un criblage de fractions d'hypothalamus ovin en évaluant leur capacité à stimuler la formation d'adénosine mono-phosphate cyclique (AMP_c) au niveau de cellules hypophysaires de rat en culture. Les fractions hypothalamiques ont été obtenues suite à deux étapes successives de purification par chromatographie liquide; une première en phase inverse (C₁₈) et la seconde de type échangeur cationique. Les hormones classiques de libération déjà caractérisées ainsi que la somatostatine ont été assujetties aux mêmes étapes de purification et chacune des fractions démontrant des paramètres physico-chimiques différents de celles-ci furent testées sur des cellules hypophysaires. Certaines fractions possédant un caractère hautement basique et légèrement hydrophobe ont démontré une forte capacité à induire la formation d'AMP_c. De ces fractions, deux peptides furent successivement isolés, caractérisés et séquencés (Miyata *et al.*, 1989; Miyata *et al.*, 1990). Ces peptides, du fait de l'activité biologique menant à leur découverte, furent nommés *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*, d'où l'acronyme PACAP. Les deux formes du PACAP contenant respectivement 38 et 27

acides aminés ont ensuite été synthétisées par voie chimique et ont démontré une activité biologique comparable aux peptides initialement purifiés à partir de l'hypothalamus de mouton.

1.2 Structure primaire du PACAP

L'équipe du Pr Arimura a initialement identifié la forme de 38 résidus du PACAP et a mis en évidence la présence d'un groupement amide au niveau de l'extrémité C-terminale (Miyata *et al.*, 1989). L'analyse de la séquence peptidique a révélé la présence de sept résidus lysines ainsi que de quatre arginines qui confèrent au PACAP un caractère fortement basique (Miyata *et al.*, 1989; Figure 2). Néanmoins, son squelette peptidique étendu ainsi que ses nombreux résidus aliphatiques contribuent à son hydrophobicité. D'autre part, la séquence du PACAP38 renferme un doublet de résidus basiques (Lys²⁹, Arg³⁰) qui suite au clivage par des prohormones convertases génère le PACAP(1-27), présentant une extrémité C-terminale amidée (Miyata *et al.*, 1990). Il faut noter qu'au niveau du système nerveux central (SNC) et dans les tissus périphériques, les dosages radio-immunologiques effectués chez le rat indiquent que le PACAP38 représente la principale forme moléculaire (Arimura *et al.*, 1991). En effet, la forme tronquée (fragment 1-27) ne représente qu'en moyenne 10% du total. Toutefois, ce rapport est tissu-dépendant et des proportions variées peuvent être retrouvées dans divers organes.

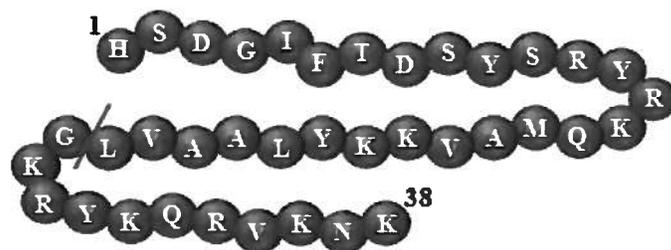


Figure 2: Structure primaire du *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*. Le site de clivage potentiel des prohormones convertases est représenté par le trait rouge.

La structure primaire du PACAP27, qui correspond au 27 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale du PACAP38, présente 68% d'identité avec celle du *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP), un neuropeptide initialement découvert lors de la

purification de la sécrétine à partir d'intestins de porc (Said & Mutt, 1970). Du fait de cette forte homologie de séquence, le PACAP a été incorporé à la superfamille VIP/GRF/glucagon, peptides montrant des similitudes structurales importantes. L'alignement des séquences primaires des principaux membres de cette famille indique que le résidu phénylalanine en position 6 est l'unique acide aminé commun à tous les peptides, suggérant ainsi que ce résidu pourrait être crucial au maintien de l'activité biologique de ces peptides, représenté en bleu à la Figure 3. On constate également que les principales similitudes de séquences entre les différents membres de la famille VIP/GRF/glucagon concernent essentiellement le domaine N-terminal : (i) le résidu en position 1 est de type aromatique (histidine ou tyrosine), (ii) le groupement carboxylique en position 3 est hautement conservé, (iii) la position 4 est occupée soit par une alanine, soit par une glycine et (iv) une thréonine est retrouvée à la position 7 dans la majorité des cas.

PACAP38	HSDGI F TDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL G KRYKQ R VKNK-NH ₂
PACAP27	HSDGI F TDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH ₂
VIP	HSD A V F T D N Y T R L R KQMAVKKY L N S I L N -NH ₂
Sécrétine	HSDG T F T S E L S R L R E G A R L Q R L L Q G L V -NH ₂
GRF	Y A D A I F T N S S Y S K V L G Q L S A R K L L Q D I M S R Q G E S N Q E R G A R A R L -NH ₂
Hélodermine	HSD A I F T E E Y S K L L A K L A L Q K Y L A S I L G S R T S P P -NH ₂
Glucagon	H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T
GLP-2	H A D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T K I T D
GIP	Y A E G T F I S D Y S I A M D K I H Q D F N W L L A Q K G K N D W K H N I T Q

Figure 3: Séquences des principaux membres de la superfamille VIP/GRF/Glucagon retrouvées chez l'humain. Les résidus en rouge diffèrent de ceux retrouvés chez le PACAP38. Le résidu phénylalanine hautement conservé en position 6 est représenté en bleu. (Vaudry *et al.*, 2000b)

1.3 Évolution phylogénique du PACAP

La structure primaire du PACAP a été remarquablement conservée tout au long du processus évolutif, comme démontré par la forte homologie de séquence retrouvée chez

de nombreux vertébrés (Figure 4). Notamment, les séquences identifiées chez les mammifères tels que l'homme (Ohkubo *et al.*, 1992), le rat (Ogi *et al.*, 1990), la vache (Sayasith *et al.*, 2007) et la souris (Okazaki *et al.*, 1995), sont totalement identiques à la séquence initialement découverte chez le mouton par le groupe d'Arimura (Miyata *et al.*, 1989). De même, la structure primaire retrouvée chez les mammifères ne diffère que d'un seul acide aminé avec celle de la grenouille *Rana Ridibunda*, soit une valine à la place d'une isoleucine en position 35 (Chartrel *et al.*, 1991). Une haute homologie, allant de 89 à 92%, a également été caractérisée chez différentes espèces de poissons telles que les salmonidés (Parker *et al.*, 1993) et les *Uranoscopidae* (Matsuda *et al.*, 1997). Le fait que les pressions évolutives aient donné lieu à une forte préservation de la structure primaire du PACAP indique que ce neuropeptide pourrait jouer un rôle physiologique important. D'autre part, les divergences de séquence entre les différentes espèces concernent principalement le domaine 28-38. À l'opposé, le segment 1-27 est identique chez la majorité des espèces de mammifères et ne diffère que d'un seul résidu avec la séquence retrouvée chez le poulet (McRory *et al.*, 1997) et chez le poisson *Uranoscopus japonicus* (Matsuda *et al.*, 1997).

Humain, souris, rat	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKNK-NH ₂
Poulet	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKNK-NH ₂
Grenouille	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRIKNK-NH ₂
Saumon	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYQRVYRKNK-NH ₂
Raie	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKPKVKNK-NH ₂
Poisson-chat	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGRRYRQRFRNK-NH ₂
Carpe Chinoise	HSDGIFTDIYSRYRKQMAVKKYLAAVLGRRYRQRIKNK-NH ₂
<i>Uranoscopus japonicus</i>	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLAAVLGRRYRQRVFRNK-NH ₂

Figure 4: Séquences du PACAP38 retrouvées chez différentes espèces de vertébrés. Les résidus en rouge diffèrent de ceux retrouvés chez les mammifères. (Vaudry *et al.*, 2000b)

1.4 Structure secondaire du PACAP

Plusieurs études spectroscopiques par dichroïsme circulaire (DC) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) combinées à la modélisation moléculaire sous contraintes RMN ont été effectuées afin de déterminer la structure secondaire du PACAP. La première série d'analyses conformationnelles du PACAP, réalisée au début des années 90, a révélé l'existence d'un domaine N-terminal (résidus 1-8) désordonné suivi par des structures relativement bien organisées dont la longueur et le positionnement varient en fonction du solvant employé. Initialement, Inooka *et al.* (1992), ont montré par DC que le PACAP27 adopte une structure principalement aléatoire lorsque le peptide se retrouve en solution aqueuse. De ce fait, des solutions de concentrations variées en méthanol et en dodécylsulfate de sodium (SDS) ont été utilisées afin de fournir un environnement plus hydrophobe et ainsi favoriser la formation d'une structure. Une structure secondaire principalement en hélice, caractérisée par la présence de deux minima à 208 et 222 nm sur les spectres CD, fut donc observée. Cette hélicité s'accroît graduellement lorsque la concentration en méthanol augmente (Inooka *et al.*, 1992). Les analyses par RMN ont finalement été effectuées dans une solution de 25% méthanol à pH 3.3, milieu dans lequel le PACAP27 avait préalablement dévoilé un contenu en hélice de 20%, déterminé suite à la déconvolution du spectre CD (Inooka *et al.*, 1992). La modélisation effectuée sous les contraintes de distance tirées des analyses RMN a révélé que la séquence 9-27 du PACAP27 est constituée de trois différents domaines structuraux: (i) une conformation similaire à celle d'un coude β retrouvée au niveau des résidus sérine-9 à arginine-12, (ii) une structure de type hélice α pour les régions 12-20 et 22-25 ainsi que (iii) certains segments désordonnés (21-22 et 25-27). Ces structures sont précédées d'un domaine N-terminal non structuré. En outre, il apparaît que les résidus non polaires tyrosine-10, tyrosine-13 et méthionine-17 sont en contact les uns avec les autres et forment un regroupement hydrophobe (Inooka *et al.*, 1992).

Des études de RMN effectuées dans un environnement plus hydrophobe (50% 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE)) ont établi que le segment 9-27 du PACAP27 est caractérisé par une conformation de type hélice α bien définie présentant une légère discontinuité au

niveau des résidus lysines en positions 20 et 21 (Wray *et al.*, 1993). L'absence du coude β pour les résidus 9 à 12 et de la structure aléatoire au niveau de l'extrémité C-terminale préalablement observés par Inooka *et al.* (1992), proviennent vraisemblablement de la stabilisation de l'hélice α conférée par le TFE. Ce solvant est couramment utilisé pour mimer l'environnement hydrophobe adjacent à la membrane cellulaire et est reconnu pour favoriser l'adoption de structures hélicoïdales. Lors de cette étude, la conformation de la forme allongée du PACAP a également été étudiée. La structure secondaire du segment 1-27 du PACAP38 reflète celle obtenue pour le PACAP27: une région N-terminale aléatoire (résidus 1-8) suivie de deux segments en hélice qui s'étendent respectivement des résidus sérine-9 à lysine-20 et de lysine-21 à valine-26. Pour sa part, le domaine C-terminal (28-38) consiste en une structure hélicoïdale stable qui est rattachée à la région centrale du PACAP par un connecteur flexible formé des résidus leucine-27 et glycine-28. Plus récemment, une analyse par spectroscopie RMN du PACAP27, effectuée dans 30% de TFE, a révélé que l'hélice α semble débiter au résidu thréonine-7 et que dans ce milieu, l'extrémité N-terminale désordonnée est limitée aux positions 1 à 6 (Gonzalez-Muniz *et al.*, 2001). Particulièrement, la discontinuité au niveau du doublet dibasique 20-21 mentionnée par Wray *et al.* (1993) n'a pas été retrouvée dans cette étude. De plus, la structure du PACAP27 a été caractérisée lorsque le peptide est lié à des micelles de dodécylphosphocholine (DPC). Les micelles de DPC constituent un modèle de choix pour étudier la conformation qu'adopte un peptide lorsque celui-ci est ancré à la membrane cellulaire (Braun *et al.*, 1983). Dans cet environnement micellaire, l'hélice α se prolonge jusqu'au résidu phénylalanine-6 (Inooka *et al.*, 2001). En outre, le positionnement des chaînes latérales des résidus hydrophobes, isoleucine-5, phénylalanine-6, tyrosine-10, tyrosine-13 et méthionine-17 sur la même face de l'hélice témoigne du caractère amphiphile du PACAP (Figure 5). La formation de cette hélice amphipathique est possiblement favorisée par les interactions hydrophobes existant entre la surface de la micelle et les chaînes latérales non polaires.

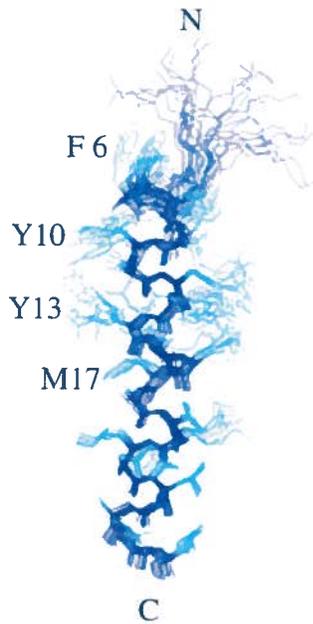


Figure 5: Structure du PACAP27 lié aux micelles de DPC. Superposition des atomes lourds de 25 structures modélisées sous les contraintes de distance des données RMN. (Adapté de Inooka *et al.*, 2001)

Récemment, une étude structurale effectuée à l'aide des deux isoformes du PACAP de la carpe chinoise (*Ctenopharyngodon idellus*) a confirmé la structure majoritairement hélicoïdale du PACAP (Sze *et al.*, 2007). La séquence primaire du PACAP38 provenant de la carpe est identique à 89 % avec celle retrouvée chez l'humain (Figure 4; Sze *et al.*, 2007). Les divergences structurales impliquent les résidus sérine-9, lysine-29, lysine-32 et valine-35, retrouvés chez l'humain et qui sont respectivement remplacés par les résidus isoleucine, arginine, arginine et isoleucine chez la carpe chinoise. Une solution contenant 30% de TFE a été utilisée pour la spectroscopie RMN à haute résolution. L'analyse des spectres et la modélisation moléculaire sous contraintes RMN subséquente ont révélé que l'hélice α du PACAP27 s'étend des résidus phénylalanine-6 à valine-26 (Sze *et al.*, 2007). Quant à elle, la structure de la forme allongée du PACAP de la carpe est composée de trois domaines distincts : (i) une région N-terminale flexible (1-5), (ii) une hélice α centrale (6-26) et (iii) un court segment C-terminal de conformation hélicoïdale (29-34) (Sze *et al.*, 2007). Contrairement aux résultats obtenus par Wray *et al.* (1993) concernant la structure du PACAP38 humain, l'hélice α du domaine C-terminal du PACAP38 de la carpe ne s'étire pas jusqu'au résidu lysine-38. De plus, Sze *et al.*, (2007) ont observé

certaines connectivités NOE (effet nucléaire Overhauser) qui témoignent d'un repliement du segment C-terminal. Tel qu'illustré à la figure 6, la flexibilité du squelette peptidique retrouvée aux positions leucine-27 et glycine-28 permet un rapprochement du domaine C-terminal avec la portion centrale du peptide.

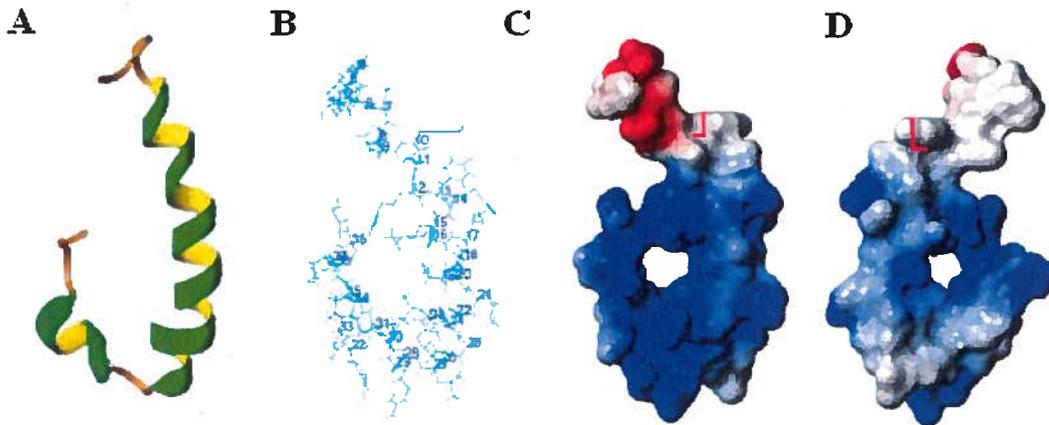


Figure 6: Structure du PACAP38 de la carpe chinoise en solution. (A) Représentation en ruban et (B) des atomes lourds de la moyenne des structures de basse énergie. Représentations de surface avec vues de face (C) et de l'arrière (D), présentant les résidus acides (rouge), basiques (bleu) et neutres (gris). (Adapté de Sze *et al.*, 2007)

Du fait de leur homologie de séquence relativement importante, les peptides de la superfamille VIP/GRF/Glucagon démontrent d'importantes similitudes structurales. De façon similaire au PACAP, ces peptides possèdent majoritairement un domaine N-terminal désordonné, suivi d'une hélice α stable de longueur variable (Thornton & Gorenstein, 1994; Gronenborn *et al.*, 1987; Thériault *et al.*, 1988; Blankenfeldt *et al.* 1996; Alana *et al.*, 2004). De plus, ceux-ci ne sont que peu structurés en milieu aqueux et requièrent l'ajout d'un solvant organique (méthanol, TFE) ou de micelles pour stabiliser leur structure secondaire. Généralement, l'hélice α débute aux alentours des résidus hautement conservés phénylalanine-6 et thréonine-7, s'étend jusqu'à l'extrémité C-terminale et contient certaines discontinuités. À titre d'exemple, la structure secondaire du VIP, qui possède 68% d'homologie de séquence avec le PACAP27, est caractérisée par la présence d'une hélice régulière localisée entre les résidus 8 à 26 et d'un coude β de type III formé par les résidus valine-5 à acide aspartique-8 (Fournier *et al.*, 1984; Fry *et al.*, 1989).

1.5 Biosynthèse du PACAP

Chez l'homme, le gène codant pour le PACAP est localisé au niveau de la région P11 du chromosome 18 (Hosoya *et al.*, 1992). Ce gène est composé de cinq exons avec la séquence codant pour le PACAP localisée au niveau du cinquième exon (Figure 7). La région promotrice contient certaines séquences typiques de sites de liaison pour des facteurs transcriptionnels. En effet, le promoteur du gène du PACAP possède deux séquences CRE (*cAMP response-like element*), un élément de réponse au *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* ainsi que deux séquences similaires à celle retrouvée pour le site de liaison du *growth hormone factor-1* (GHF-1) (Hosoya *et al.*, 1992). De ce fait, il a été démontré que la transcription du gène du PACAP, qui est exprimé de façon constitutive, peut être accrue en présence d'AMPC et de *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (Suzuki *et al.*, 1994). En outre, la région promotrice contient deux éléments typiques d'initiation de la transcription: un domaine riche en CT avec boîtes GC et une séquence *initiator-like* (Inr). La longueur de l'ARNm libéré suite à la transcription du gène du PACAP varie en fonction du type cellulaire et du tissu, suggérant ainsi l'utilisation de différents sites d'initiation de la transcription et l'existence de promoteurs tissus dépendants (Hosoya *et al.*, 1992; Ohkuba *et al.*, 1992; Hurley *et al.*, 1995; Harakall *et al.*, 1998; Daniel & Habener, 2000; Tabuchi *et al.*, 2001).

Chez l'humain, l'ARNm codant pour le PACAP est traduit en une prépro-protéine de 176 acides aminés, qui comprend entre autre un peptide signal (PS) de 24 résidus (Hosoya *et al.*, 1992). La séquence en acides aminés du prépro-PACAP renferme de nombreux sites mono ou dibasiques qui peuvent être reconnus par plusieurs prohormones convertases. Le clivage de cette prépro-protéine génère le big PACAP-related peptide (big PRP) et une forme allongée en C-terminal du PACAP (Figure 7). Des clivages subséquents du big PRP entraînent la formation du PRP, un peptide constitué de 29 acides aminés démontrant une homologie de séquence modérée avec le PACAP27 et dont la fonction biologique chez les mammifères n'est toujours pas clairement établie à ce jour (Tam *et al.*, 2007). Pour sa part, le prépro-PACAP subit des étapes de maturation (clivages, amidation) catalysées par des prohormones convertases et par la peptidyl

glycine monooxygénase, conduisant ainsi à la formation des deux isoformes du PACAP (Okazaki *et al.*, 1992).

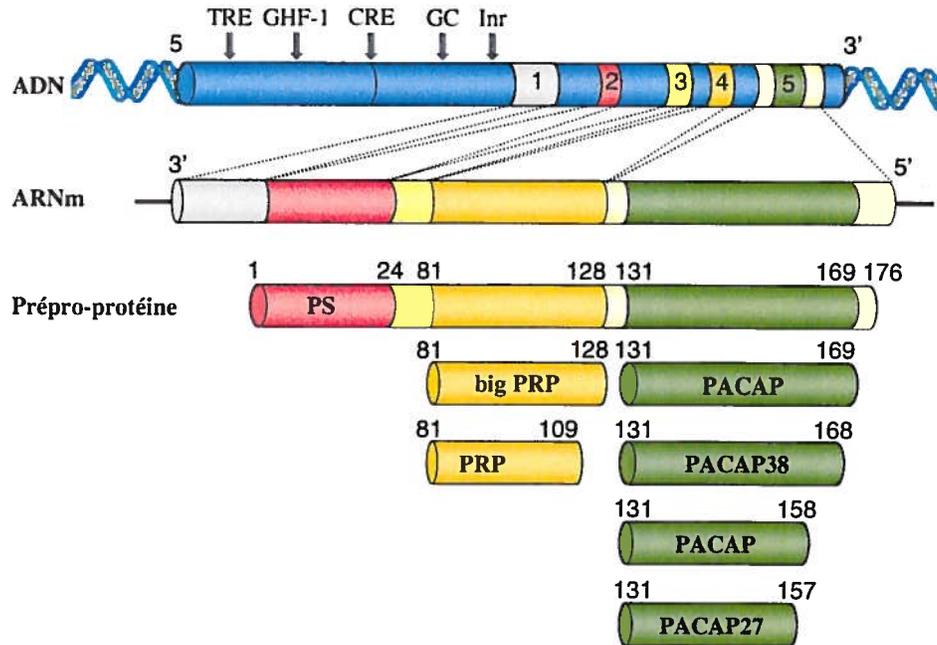


Figure 7: Représentation schématique de la biosynthèse du PACAP. Les cinq exons sont indiqués par les numéros. Les flèches indiquent l'emplacement approximatif des principaux sites de liaison pour des facteurs transcriptionnels. TRE, *12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate response element*; GHF-1, *growth hormone factor-1*; CRE, *cAMP response element*; GC, boîte GC; Inr, *initiator-like element*.

1.6 Distribution du PACAP

Le PACAP est largement distribué dans le système nerveux central (SNC) et dans de nombreux organes périphériques. Par dosage radioimmunologique (RIA), les concentrations les plus élevées dans le SNC de rat ont été retrouvées au niveau de l'hypothalamus (Arimura *et al.*, 1991; Ghatei *et al.*, 1993). En relation avec son action hypophysiotrope, une densité importante de neurones immunoréactifs pour le PACAP a été observée à proximité des capillaires du système porte hypophysaire (Tamada *et al.*, 1994). En outre, par dosage RIA, Dow *et al.* (1994) ont mis en évidence des concentrations plus élevées dans le sang du système porte hypophysaire que dans la circulation sanguine, suggérant ainsi que le PACAP pourrait agir comme neurohormone

de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Une densité élevée d'ARNm du PACAP a également été détectée par des études d'hybridation *in situ* au niveau de la substance noire, du cortex cérébral, du cervelet, du bulbe olfactif, du globus pallidus et de la moelle épinière (Vaudry *et al.*, 2000b).

Dans d'autres organes, le PACAP est principalement localisé dans des fibres nerveuses innervant différentes glandes endocrines (hypophyse antérieure, glandes surrénales, pancréas) et divers systèmes, tels que les systèmes digestif, respiratoire, reproducteur et urinaire (Vaudry *et al.*, 2000b). Chez le rat, une concentration très élevée en PACAP est retrouvée au niveau des testicules (Hannibal & Fahrenkrug, 1995). En fait, la quantité de PACAP dans les testicules est plus élevée que celle observée dans l'ensemble du cerveau (Arimura *et al.*, 1991). Par hybridation *in situ*, il fut démontré que l'ARNm du PACAP dans les testicules est majoritairement exprimé dans les cellules germinales et non pas dans les fibres nerveuses comme chez la majorité des autres tissus périphériques (Shioda *et al.*, 1994). De plus, l'expression du PACAP est restreinte à certains stades de la maturation des spermatozoïdes (Hannibal & Fahrenkrug, 1995). À l'opposé, la quantité observée dans les ovaires est beaucoup plus faible que celle retrouvée dans les testicules et le PACAP se situe alors principalement dans les fibres nerveuses (Steenstrup *et al.*, 1995). Finalement, le PACAP est abondamment exprimé par le système immunitaire, en particulier dans la rate, le thymus et la majorité des lymphocytes (Abad *et al.*, 2002).

1.7 Passage du PACAP à travers la barrière hématoencéphalique

La barrière hématoencéphalique (BHE) limite l'entrée dans le SNC de nombreuses molécules provenant de la circulation sanguine, permettant ainsi une régulation précise du milieu chimique du tissu neuronal. Les substances pénétrant ou sortant du SNC doivent transiter par cette barrière composée majoritairement de cellules endothéliales réunies entre elles par des jonctions serrées. Il a été démontré chez la souris que le PACAP, sous ses deux formes moléculaires, dispose de la capacité de traverser la BHE, et ce dans les deux directions (Banks *et al.*, 1993). Cette étude a également établi que la

vitesse d'influx du PACAP38 est approximativement 30% supérieure à celle répertoriée pour le PACAP27. Notamment, l'influx unidirectionnel du transport du PACAP38 vers le SNC, à travers la BHE, est le plus élevé des peptides de la superfamille VIP/GRF/glucagon et s'avère même 6 fois supérieur à celui observé pour la morphine (Dogrukol-Ak *et al.*, 2004; Banks *et al.*, 1996). Nonobstant la vitesse d'entrée supérieure du PACAP38, un pourcentage plus élevé (24%) de la dose initiale du PACAP27 accède au cerveau par rapport au PACAP38 après administration par voie *iv* (Banks *et al.*, 1993). Cette différence provient vraisemblablement de leurs paramètres pharmacocinétiques distincts, tels que le plus faible volume de distribution dans l'organisme du PACAP27 ainsi que son temps de demi-vie relativement plus élevé (Banks *et al.*, 1993). Par exemple, contrairement au PACAP27, la forme allongée du PACAP peut se lier au facteur plasmatique céruloplasmine, réduisant ainsi la fraction libre disponible pour pénétrer le SNC (Tams *et al.*, 1999).

Le PACAP38 pénètre dans le SNC par un système de transport saturable spécifique nommé *peptide transport system 6* (PTS-6). À l'opposé, la forme raccourcie du PACAP rejoint le SNC par le biais d'un mécanisme de transport non-saturable basé sur la diffusion transmembranaire passive (Banks *et al.*, 1993). Ainsi, le faible poids moléculaire relatif du PACAP27 associé à une lipophilicité accrue par rapport à la forme de 38 acides aminés facilite son passage à travers la bicouche lipidique. Il s'avère également que la présence du segment 28-38 du PACAP38 soit nécessaire pour permettre le transport médié du neuropeptide à travers la BHE. Chez la souris, le PACAP traverse la BHE plus rapidement au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe que dans les autres régions du cerveau (Nonaka *et al.*, 2002). L'influx supérieur de PACAP vers certaines régions précises du cerveau peut expliquer pourquoi en cas d'ischémie cérébrale, le PACAP exerce un effet neuroprotecteur puissant au niveau des neurones de l'hippocampe (Uchida *et al.*, 1996). Plus récemment, il fut montré dans des modèles d'ischémie cérébrale et de la maladie d'Alzheimer chez la souris, que l'inhibition de l'efflux de PACAP par le transporteur PTS-6 augmente l'activité neuroprotectrice du PACAP (Dogrukol-Ak *et al.*, 2008).

D'autres membres de la superfamille VIP/GRF/glucagon tels que le VIP, la sécrétine, le glucagon et le GLP-1 disposent également de la capacité à traverser la BHE (Banks & Kastin, 1985; Banks *et al.*, 2002; Kastin *et al.*, 2002). Toutefois, aucun mécanisme de transport saturable n'a été mis en évidence pour ces peptides, suggérant qu'ils traversent la BHE par simple diffusion passive. Le PACAP serait donc l'unique membre de cette superfamille à détenir un transporteur spécifique au niveau de la BHE. Des systèmes de transport spécifiques ont également été caractérisés pour d'autres peptides tels que la somatostatine, la vasopressine, l'enképhaline et la gonadolibérine (Dogrukol-Ak *et al.*, 2004). Cependant, contrairement au transport bidirectionnel du PACAP à travers la BHE, la majorité de ces peptides ne transitent que de façon unidirectionnelle à travers la BHE, soit du cerveau en direction de la périphérie (Dogrukol-Ak *et al.*, 2004).

Il faut également noter que la BHE ne constitue pas une barrière rigide et statique, mais bien une interface dynamique située entre la circulation sanguine et le SNC. Conséquemment, l'étanchéité et la perméabilité relatives à divers composés peuvent être affectées en fonction de conditions physiopathologiques particulières. Par exemple, un traumatisme induit par la rupture de la moelle épinière chez la souris provoque une diminution marquée de l'activité du transporteur PTS-6, conduisant ainsi à une réduction de l'apport en PACAP38 au cerveau (Banks *et al.*, 1998). À l'opposé, suite à un épisode ischémique, l'influx de PACAP au cerveau est accru dans l'ensemble des régions cérébrales. Cet accroissement provient d'une augmentation de l'efficacité du transporteur et non d'une rupture de l'étanchéité de la BHE (Uchida *et al.*, 1996; Mizushima *et al.*, 1999; Somogyvari-Vigh *et al.*, 2000). Toutefois, cette augmentation est transitoire avec un influx maximum 4 heures après l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne avant une baisse significative qui perdure jusqu'à 48 heures après le choc ischémique (Somogyvari-Vigh *et al.*, 2000). Finalement, l'activité du transporteur PTS-6 supporte la présence de lipopolysaccharides (LPS), suggérant ainsi que le transport du PACAP vers le cerveau n'est pas modifié suite à la libération de cytokines ou en cas de rupture partielle de la BHE (Nonaka *et al.*, 2005).

1.8 Digestion protéolytique du PACAP

Les peptides sont connus pour leur pauvre stabilité métabolique provenant de leur forte susceptibilité à subir la protéolyse. Cette prompté dégradation permet une inactivation rapide des hormones peptidiques après que celles-ci aient exercé leur(s) fonction(s) biologique(s). Au niveau cellulaire et tissulaire, la dégradation peptidique implique généralement des endopeptidases spécifiques. À l'inverse, la protéolyse répertoriée au niveau de la circulation systémique met usuellement en jeu des exopeptidases à spécificité réduite (Adessi & Soto, 2002). Il a été démontré chez la souris, que la principale enzyme de dégradation du PACAP est la dipeptidyl-peptidase IV (EC 3.4.14.5; DPP IV) (Zhu *et al.*, 2003). En effet, chez des souris dont le gène codant pour cette enzyme a été inactivé, la formation de métabolites du PACAP au niveau sanguin est pratiquement absente suite à une injection intraveineuse de PACAP38 (Zhu *et al.*, 2003). Notamment, la demi-vie plasmatique du PACAP chez ces souris déficientes pour le gène de la DPP IV est significativement augmentée en comparaison aux souris sauvages.

Le rôle clé de la DPP IV dans l'inactivation d'importants neuropeptides est connu depuis plus de 30 ans. Cette enzyme agit en clivant des dipeptides à partir de l'extrémité N-terminale de ses substrats (Mentlein, 1999). Malgré la modification relativement minime que peut représenter la perte de deux résidus N-terminaux chez des peptides de bonne dimension, l'activité biologique de nombreux peptides, tels que le NPY, le GLP-1, la GRH et l'endomorphine-2, est efficacement régulée par l'action catalytique de la DPP IV (Mentlein, 1999). La DPP IV a été isolée à partir d'homogénats de foie de rat sur la base de sa capacité à libérer le naphthylamine du dipeptide Gly-Pro-2-naphthylamine (Hopsu-Havu & Glenner, 1966). En fonction de cette propriété, cette enzyme fut initialement nommée glycylproline naphthylamidase. Il a été longtemps considéré que la DPP IV des mammifères reconnaît que les séquences Xaa-Pro ou Xaa-Ala à l'extrémité N-terminale des peptides (Mentlein, 1999). Néanmoins, il est maintenant reconnu que la DPP IV est capable de cliver après les dipeptides Xaa-Gly, Xaa-Ser, Xaa-Val et Xaa-Leu avec des rendements cependant inférieurs (Brandt *et al.*, 2006; Mentlein, 1999; Martin *et*

al., 1993). À la position N-terminale, la présence d'un résidu hydrophobe ou basique favorise la reconnaissance du peptide par la DPP IV (Mentlein, 1999). À l'opposé, la DPP IV présente une affinité modérée pour les peptides ayant un résidu chargé négativement à la position 1 (Mentlein, 1999). Un groupement amine libre est indispensable pour le clivage du dipeptide à partir de l'extrémité N-terminale (Mentlein, 1999). De plus, la longueur de la chaîne polypeptidique ainsi que la structure secondaire du peptide peuvent influencer l'affinité de la DPP IV pour ses substrats peptidiques (Kühn-Wache *et al.*, 2003; Mentlein, 1999). Par exemple, la DPP IV présente une très faible affinité pour le fragment 1-6 du *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP) en comparaison au peptide GIP(1-30) (Kühn-Wache *et al.*, 2003).

En ce qui concerne le PACAP, l'enlèvement des résidus histidine-1 et sérine-2 engendre la formation du fragment PACAP(3-38), conduisant à une diminution importante de l'activité biologique du peptide. La DPP IV est largement distribuée dans de nombreux tissus et on la retrouve abondamment à la surface luminale des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Mentlein, 1999). Des niveaux élevés d'activité de cette enzyme ont été observés dans les reins, les poumons, le foie et les glandes surrénales (Mentlein, 1999). Puisque la DPP IV est une protéine membranaire, celle-ci n'est que faiblement présente en tant qu'enzyme soluble véhiculée dans le sang (Mentlein, 1999). Finalement, une activité protéolytique significative de la DPP IV a également été caractérisée dans le SNC et au niveau de la BHE (Mentlein, 1999). Il faut également noter que la DPP IV possède une affinité 15 fois plus faible pour le PACAP27 que pour le PACAP38 (Lambeir *et al.*, 2001). En revanche, il a été observé que l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP) exprimée par les cellules endothéliales des poumons (Roques *et al.*, 1993), est incapable de dégrader le PACAP38, bien que celle-ci possède la capacité de réduire le PACAP27 (Gourlet *et al.*, 1997b). En effet, suite à une incubation *in vitro* de VIP et des deux formes moléculaires du PACAP en présence de NEP purifiée, des fragments (1-22) et (1-25) n'ont pas été obtenus dans le cas du PACAP38 (Gourlet *et al.*, 1997b).

2. Récepteurs du PACAP

Suite à la découverte du PACAP, deux types de sites de liaison ont été caractérisés sur la base de leurs affinités relatives envers le PACAP et le VIP. Les sites de liaison de type I montrent une haute affinité envers les deux formes moléculaires du PACAP mais lient le VIP avec une affinité 1000 fois inférieure (Vaudry *et al.*, 2000b). À l'opposé, les sites de liaison de type II présentent une affinité similaire envers le VIP, le PACAP27 et le PACAP38. Au cours des années 90, le clonage et la caractérisation pharmacologique de ces récepteurs ont révélé l'existence de trois récepteurs pour le VIP et le PACAP, nommés respectivement VPAC1, VPAC2 et PAC1 (Harmar *et al.*, 1998). Ces trois récepteurs correspondent à des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) et peuvent lier différents peptides de la superfamille VIP/GRF/glucagon avec des affinités variables (Tableau 1). En effet, le récepteur VPAC1 possède une certaine affinité pour le peptide histidine-isoleucine (PHI) (ou peptide histidine-méthionine (PHM) chez l'humain), le GRF, l'hélodermine ainsi que la sécrétine (Usdin *et al.*, 1994; Vaudry *et al.*, 2000b). Pour sa part, le récepteur VPAC2 ne peut lier la sécrétine, mais présente une affinité pour l'hélodermine supérieure à celle du récepteur VPAC1 (Svoboda *et al.*, 1994). Tous ces peptides naturels agissent comme agonistes des récepteurs VPAC1 et VPAC2 et ne peuvent, à l'exception de la sécrétine, différencier les récepteurs de la classe II. Il importe de mentionner que les profils pharmacologiques observés pour ces peptides naturels peuvent varier en fonction de l'espèce étudiée, comme décrit dans le cas de l'interaction du PHI avec le récepteur VPAC1 humain et murin (Couvineau *et al.*, 1996).

Les sites de liaison de type I reconnaissent les peptides VIP, hélodermine et PHI avec une faible affinité et ne peuvent lier le GRF et la sécrétine (Cauvin *et al.*, 1990; Morrow *et al.*, 1993). En revanche, le maxadilan, un peptide isolé à partir de la glande salivaire de la mouche *Lutzomyia longipalpis*, s'avère être un ligand sélectif à haute affinité du récepteur PAC1 (Moro & Lerner, 1997). Notamment, ce peptide agit comme un puissant agoniste du récepteur PAC1 et ne démontre aucune capacité à activer les récepteurs VPAC1 et VPAC2 (Uchida *et al.*, 1998). Ce résultat est surprenant, dans la

mesure où ce peptide de 61 acides aminés comprenant deux ponts disulfures ne présente aucune homologie de séquence significative avec le PACAP.

Tableau I: Affinité relative des différents ligands naturels des récepteurs du PACAP.

<i>Sites de liaison</i>	<i>Récepteurs</i>	<i>Ligands naturels</i>	
		<i>Haute affinité</i>	<i>Faible affinité</i>
Type I	PAC1	PACAP38, PACAP27, Maxadilan	Hélocodermine, VIP, PHI (PHM)
Type II	VPAC1	VIP, PACAP38, PACAP27, PHI (PHM)	Sécrétine, GRF, Hélocodermine
	VPAC2	VIP, PACAP38, PACAP27, PHI (PHM), Hélocodermine	GRF

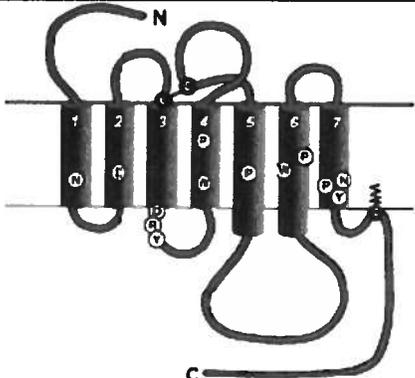
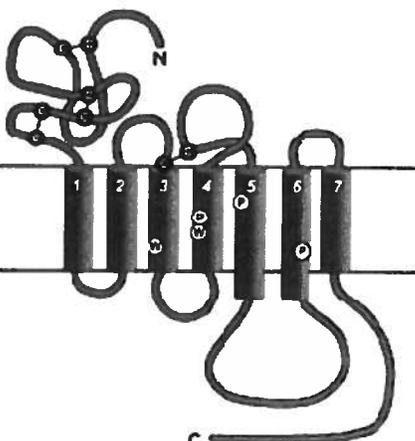
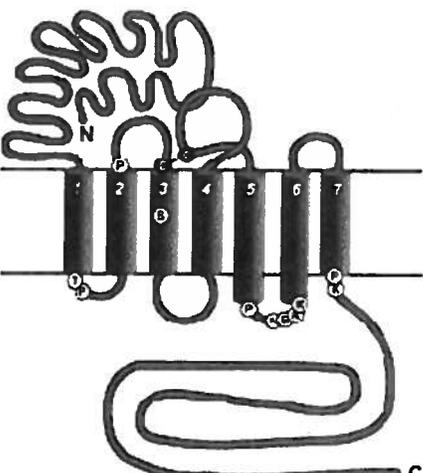
2.1 RCPG de la classe B

Les RCPG forment une grande famille de protéines membranaires à sept domaines transmembranaires hélicoïdaux qui peuvent lier diverses hormones ou transmetteurs, activant ainsi plusieurs cascades de signalisation intracellulaire. En fonction de leur séquence primaire, de leurs caractéristiques biochimiques et structurales et de la nature de leurs ligands endogènes, les RCPG peuvent être classifiés en différentes familles et plusieurs classifications sont actuellement retrouvées dans la littérature (Gether, 2000; Kolakowski, 1994; Bockaert & Pin, 1999; Fredriksson *et al.*, 2003). Par exemple, la classification de Kolakowski (1994) repose sur une numérotation en lettres (A à F), contrairement à la classification de Bockaert & Pin (1999) qui consiste en cinq familles, numérotée de 1 à 5 en fonction des caractéristiques structurales et des fonctions physiologiques des RCPG. Les trois principales familles de RCPG (Gether, 2000) sont présentées au Tableau II. Tout d'abord, la famille A (*Rhodopsin*, famille 1) est la famille de RCPG la plus importante et la plus abondamment étudiée, tant sur l'aspect structural que fonctionnel. Celle-ci peut être subdivisée en trois (ou six) catégories en fonction des ligands (Bockaert & Pin, 1999; Gether, 2000). Particulièrement, les RCPG de la classe A présentent une grande hétérogénéité au niveau de leurs ligands. La famille B (*Secretin* ou Famille 2) inclut plus d'une vingtaine de RCPG pour divers neuropeptides et hormones peptidiques (Gether, 2000). Finalement, les RCPG de la famille C (*Glutamate* ou famille

3) sont caractérisés par la présence d'un très large domaine N-terminal, pouvant atteindre près de 600 acides aminés (Gether, 2000).

Notamment, les peptides de la superfamille VIP/GRF/glucagon activent les RCPG de la classe B (Tableau II). Cette famille, classe II ou *secretine-like receptors*, comprend un nombre restreint de membres en comparaison avec la classe A des RCPG (*rhodopsin-like receptors*), qui en contient plusieurs centaines (Gether, 2000). Outre les peptides de la superfamille VIP/GRF/glucagon, on retrouve également parmi les ligands des RCPG de la classe B, la corticolibérine (CRF), la calcitonine et l'hormone parathyroïde (PTH) (Tableau II; Harmar, 2001; Gether, 2000). Tous ces ligands naturels des RCPG de la classe B correspondent à des peptides de haut poids moléculaire constitués d'un minimum de 27 résidus et présentant des structures primaires et secondaires relativement homogènes (Hoare, 2005). À l'opposé, les récepteurs de la classe A peuvent être activés par une large diversité de composés allant du photon aux peptides en passant par les lipides et les amines (Tableu II; Gether, 2000). D'autre part, les RCPG de la classe B renferment un motif structural distinctif constitué d'un large domaine N-terminal extracellulaire composé de plus de 120 acides aminés (Laburthe *et al.*, 1996). Ce domaine extracellulaire contient 10 résidus hautement conservés, dont six cystéines, ainsi que de nombreux sites potentiels de glycosylation (Laburthe *et al.*, 2007). De plus, les gènes codant pour les RCPG de la classe B présentent une organisation complexe avec de nombreux introns et un minimum de 12 exons (Laburthe *et al.*, 1996). Finalement, les récepteurs des peptides de la superfamille VIP/GRF/glucagon ne renferment qu'une faible homologie de séquence avec les autres groupes de RCPG (Laburthe *et al.*, 1996). L'ensemble de ces données indique que les RCPG de la classe B forment une famille relativement homogène tant au niveau de leur structure que de la nature moléculaire de leurs ligands endogènes (Tableau II).

Tableau II: Classification des trois principales familles de GPCR.
(Adapté de Gether, 2000)

Schéma*	Famille	Principaux ligands
	Famille A Famille I Famille <i>Rhodopsin</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sérotonine • Dopamine • Histmine • Endothéline • Urotensine • Vasopressine • LH / FSH • Somatostatine • Neuropeptide Y
	Famille B Famille II Famille <i>Secretin</i>	<ul style="list-style-type: none"> • VIP • PACAP • Sécrétine • Calcitonine • CGRP • PTH • Glucagon • GLP-1 • GIP • GHRH
	Famille C Famille III Famille <i>Glutamate</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Glutamate • Calcium • GABA • Péromones

*Les résidus hautement conservés au sein d'une même famille sont représentés par un cercle blanc.

*Les résidus cystéines impliqués dans un pont disulfure sont indiqués par un cercle noir.

2.2 Outils pharmacologiques des récepteurs du PACAP

Dans l'optique d'une meilleure caractérisation des effets biologiques médiés par les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2, plusieurs études ont tenté de développer des analogues sélectifs envers chacun de ces trois récepteurs. Le Tableau III résume les principaux outils pharmacologiques disponibles à ce jour. Comme mentionné précédemment, le maxadilan est le seul agoniste sélectif du récepteur PAC1 actuellement disponible. En outre, la délétion de 19 acides aminés situés entre les positions 24 et 42 du maxadilan a conduit au développement d'un puissant antagoniste sélectif du récepteur PAC1 (Moro *et al.*, 1999). Le fragment 6-38 du PACAP est quant à lui l'antagoniste du récepteur PAC1 le plus couramment employé à ce jour (Robberecht *et al.*, 1992a). Cependant, celui-ci s'avère également être un faible agoniste du récepteur VPAC2 (Dickenson *et al.*, 1997). De même, il a été récemment observé que le PACAP(6-38) induit, tout comme le PACAP38, une libération de neuropeptides au niveau des fibres sensorielles de la trachée de rat (Reglodi *et al.*, 2008). Ces observations soulignent les restrictions à l'égard de l'utilisation du PACAP(6-38) comme antagoniste lors d'essais biologiques complexes impliquant plusieurs types et sous-types de récepteurs. Dernièrement, suite au criblage de larges chimiothèques, les premiers antagonistes non-peptidiques de faibles poids moléculaire des récepteurs du PACAP et du VIP ont été caractérisés pour le récepteur PAC1 (Beebe *et al.*, 2008). Ces composés, de type hydrazide, possèdent un K_i variant de 56 à 204 nM. Il faut néanmoins noter que la sélectivité de ces composés envers le récepteur PAC1 n'a pas été confirmée puisqu'aucune étude concernant leurs affinités pour les récepteurs VPAC1 ou VPAC2 n'a été publiée à ce jour.

En ce qui concerne les dérivés sélectifs envers les récepteurs VPAC1 et VPAC2, ils sont principalement issus d'analogues modifiés du VIP. Par exemple, par une approche expérimentale de type *Ala-Scan* supportée par de la modélisation moléculaire, Nicole *et al.* (2000) ont développé un puissant agoniste sélectif envers le récepteur VPAC1, soit l'[Ala¹¹, Ala²², Ala²⁸]VIP. D'autre part, le dérivé (cyclo 21-25)[Ac-Glu⁸, OCH₃-Tyr¹⁰, Lys¹², Nle¹⁷, Ala¹⁹, Asp²⁵, Leu²⁶, Lys²⁷, Lys²⁸]VIP, ou Ro 25-1392, est

reconnu comme étant l'agoniste le plus sélectif du récepteur VPAC2 (Xia *et al.*, 1997; Tableau III). Il faut noter que le seul antagoniste hautement sélectif des récepteurs de type II présentement disponible consiste en un dérivé chimérique VIP/GRF, l'[Ac-His¹, D-Phe², Lys¹⁵, Arg¹⁶, Leu¹⁷]VIP(3-7)/GRF(8-27) ou PG-97-269, qui lie sélectivement le récepteur VPAC1 (Gourlet *et al.*, 1997a).

Tableau III: Principaux outils pharmacologiques pour l'étude des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2.

Récepteur	Agonistes		Antagonistes	
	Peptides	Limitations	Peptides	Limitations
PAC1	Maxadilan (Moro <i>et al.</i> , 1997)	-	des(24-42)Maxadilan (Moro <i>et al.</i> , 1999)	-
			PACAP(6-38) (Robberecht <i>et al.</i> , 1992a)	Faible agoniste VPAC2
			Hydrazides (Beebe <i>et al.</i> , 2008)	Aucune donnée pour VPAC1 et VPAC2
VPAC1	[A ¹¹ ,A ²² ,A ²⁸]VIP (Nicole <i>et al.</i> , 2000)	-	[Y ⁹ ,Dip ¹⁸]VIP(6-23) (Tams <i>et al.</i> , 2000)	Affinité moyenne envers VPAC2
	[K ¹⁵ ,R ¹⁶ ,L ²⁷]VIP (1-7)/GRF (8-27) (Gourlet <i>et al.</i> , 1997c)	-	PG 97-269 (Gourlet <i>et al.</i> , 1997a)	Faible affinité pour VPAC2
	[R ¹⁶]Sécretine (Gourlet <i>et al.</i> , 1996b)	Agoniste du récepteur de la sécrétine		
VPAC2	Ro 25-1392 (Xia <i>et al.</i> , 1997)	-	PG 99-465 (Moreno <i>et al.</i> , 2000)	Faible agoniste VPAC1
	Ro 25-1553 (O'Donnell <i>et al.</i> , 1994)	Activation de PAC1		

2.3 Distribution des récepteurs du PACAP

Comme le PACAP, les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 sont largement distribués tant au niveau du SNC que dans les tissus périphériques. Il est généralement admis que les sites de liaison de type I sont plus abondants et plus largement distribués dans l'ensemble du SNC que les sites de type II, dont la distribution est restreinte à des régions plus localisées du cerveau (Vaudry *et al.*, 2000b). Notamment, une densité élevée

de sites de liaison de type I a été mise en évidence au niveau du cortex cérébral, du bulbe olfactif, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du cervelet, du thalamus, de l'épithalamus et de la moelle épinière (Nakamachi *et al.*, 2008; Joo *et al.*, 2004; Cauvin *et al.*, 1991; Basille *et al.*, 1994). Les sites de liaison de type II sont principalement retrouvés dans le cortex cérébral, le thalamus, l'hypothalamus et le cervelet (Joo *et al.*, 2004; Vertongen *et al.*, 1997; Basille *et al.*, 1993). Chez le raton, les niveaux d'ARNm codant pour le récepteur PAC1 sont plus élevés que ceux codant pour les récepteurs VPAC1 et VPAC2 (Basille *et al.*, 2000). Dans le cervelet humain, le récepteur PAC1 est abondamment exprimé, le récepteur VPAC1 est présent dans une moindre mesure et le récepteur VPAC2 est pratiquement indétectable (Basille *et al.*, 2006). Au niveau cellulaire, les deux types de sites de liaison sont retrouvés dans les neurones, les cellules microgliales et les astrocytes, contrairement aux oligodendrocytes qui expriment exclusivement le récepteur PAC1 (Joo *et al.*, 2004; Tatsuno *et al.*, 1990). Dans les neurones, le récepteur PAC1 est principalement localisé sur la membrane cellulaire des corps cellulaires et des dendrites (Shioda *et al.*, 1997).

Les trois types de récepteurs sont aussi largement exprimés dans d'autres organes et leur distribution relative est tissus-dépendante (Vaudry *et al.*, 2000b). Des sites de liaison de type 1 sont fortement exprimés au niveau de l'hypophyse antérieure (Gottschall *et al.*, 1990) et des ARNm codant pour le récepteur PAC1 ont été mesurés dans différentes sous-divisions de l'hypophyse (Hashimoto *et al.*, 1996; René *et al.*, 1996; Vertongen *et al.*, 1995). Il a aussi été mis en évidence par hybridation *in situ*, que l'ARNm du récepteur VPAC2 est largement distribué dans l'hypophyse antérieure, contrairement au récepteur VPAC1, qui lui n'est pas exprimé (Vertongen *et al.*, 1995; Usdin *et al.*, 1994). Des sites de liaison pour le PACAP ainsi que des ARNm codant pour les trois récepteurs ont été identifiés dans la plupart des glandes endocrines (Vaudry *et al.*, 2000b). Les récepteurs VPAC1 et VPAC2 sont abondamment présents au niveau des muscles lisses (vaisseaux sanguins, systèmes digestif et reproducteur), des reins, des poumons et de la rate (Harmar *et al.*, 2004; Usdin *et al.*, 1994; Vaudry *et al.*, 2000b). L'expression du récepteur PAC1 en périphérie semble être restreinte à certains tissus spécifiques, tels que les testicules, les ovaires, le pancréas et les macrophages (Vaudry *et al.*, 2000b).

2.4 Variants d'épissage alternatif du récepteur PAC1

Parmi les trois récepteurs du PACAP, le récepteur PAC1 est caractérisé par la présence de nombreux variants d'épissage alternatif fonctionnels (Laburthe & Couvineau, 2002; Lutz *et al.*, 2006; Shioda *et al.*, 2003). Un minimum de neuf variants ont été décrits à ce jour, dont six découlent de la présence ou de l'absence de trois cassettes distinctes nommées *hip*, *hop1* et *hop2*, constituées de 28 acides aminés et qui s'insèrent à l'extrémité de la troisième boucle intracellulaire (IC-III) (Spengler *et al.*, 1993; Shioda *et al.*, 2003). Les variants ainsi obtenus se nomment PAC1-R (forme courte sans section), PAC1-hip, PAC1-hop1, PAC1-hop2, PAC1-hiphop1 et PAC1-hiphop2 (Spengler *et al.*, 1993). Deux autres variants, soit les formes courte (PAC1-S) et très courte (PAC1-VS), sont respectivement caractérisés par la délétion d'une séquence de 21 et de 57 acides aminés au niveau du domaine N-terminal (Dautzenberg *et al.*, 1999; Daniel *et al.*, 2001). Finalement, le variant PAC1-TM4 est défini par la présence de légères modifications de séquence au niveau des segments transmembranaires TM-II et TM-IV (Chatterjee *et al.*, 1996). Toutefois, cette liste n'est pas totalement exhaustive puisqu'une multitude de combinaisons d'épissage semble exister et que la littérature sur ce sujet reste encore aujourd'hui quelque peu contradictoire (Ushiyama *et al.*, 2007; Lutz *et al.*, 2006).

Il faut noter que chez la souris, le gène codant pour le récepteur PAC1 contient plus de 18 exons, favorisant ainsi cette importante hétérogénéité (Aino *et al.*, 1995). La présence de ces variants d'épissage a une incidence fonctionnelle puisque leurs profils pharmacologiques respectifs peuvent différer les uns des autres. Par exemple, les variants PAC1-VS et PAC1-S présentent une augmentation de leur affinité envers le VIP et une perte d'affinité pour les deux formes moléculaires du PACAP (Dautzenberg *et al.*, 1999). En outre, Ushiyama *et al.* (2007) ont récemment démontré que les affinités relatives du récepteur PAC1 envers le PACAP, le VIP et le maxadilan peuvent également être modulées par des altérations de la séquence au niveau de la troisième boucle intracellulaire (IC-3). À cet égard, la présence de la cassette *hop2* augmenterait l'affinité du récepteur PAC1 envers un antagoniste dérivé du VIP (Pilzer & Gozes, 2006). L'expression différentielle de ces variants, leurs profils pharmacologiques distinctifs ainsi

que les divergences au niveau des voies de transduction du signal qu'ils peuvent induire, compliquent considérablement l'étude des effets biologiques régulés par le système PACAPergique.

2.5 Mécanismes de transduction du signal

En fonction de l'espèce, du tissu, du type cellulaire et de l'expression relative des types et sous-types de récepteurs, le PACAP peut agir sur une variété de voies de signalisation intracellulaires. Globalement, il est reconnu que les récepteurs VPAC1 et VPAC2 sont majoritairement couplés à une protéine Gs qui stimule l'adénylyl cyclase, induisant ainsi la formation d'AMPc (Harmar *et al.*, 1998) (Figure 8). Une stimulation de la mobilisation calcique induite par l'activation des récepteurs VPAC a également été décrite dans quelques types cellulaires (DeHaven & Cuevas, 2004 ; Rangon *et al.*, 2005). Notamment, chez les ostéoclastes et les monocytes, les récepteurs VPAC peuvent être couplés aux protéines Gq, entraînant ainsi la stimulation de la voie phospholipase C (PLC) / inositol triphosphate (IP₃) / diacylglycérol (DG) et la libération de Ca²⁺ intracellulaire (Ransjo *et al.*, 2000; El Zein *et al.*, 2008). En outre, il a été montré par microscopie confocale, que le récepteur VPAC1 peut interagir avec différentes RAMP (*receptor activity-modifying protein*) et que cette interaction module les voies de signalisation cellulaire (Christopoulos *et al.*, 2003). Par exemple, le couplage du récepteur VPAC1 avec la protéine RAMP2 favorise l'hydrolyse du phosphatidylinositol-biphosphate (PIP₂) suite à l'activation du récepteur sans stimuler la formation d'AMPc (Christopoulos *et al.*, 2003). À cet égard, de nombreux RCPG de la classe B interagissent avec les RAMP affectant ainsi différentes fonctions telles que l'activation du récepteur, la stimulation des voies de transduction du signal, l'internalisation du récepteur et son recyclage subséquent (Sexton *et al.*, 2006).

Le récepteur PAC1 est habituellement couplé positivement à la voie de l'adénylyl cyclase et à celle de la phospholipase C (PLC) (Vaudry *et al.*, 2000b). De plus, suite à son activation, le récepteur PAC1 peut également induire une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire via l'ouverture de canaux calciques de type L

(Shioda *et al.*, 2000). Toutefois, en fonction du variant d'épissage exprimé, différentes voies de transduction de signal peuvent être privilégiées. Par exemple, les variants PAC1-Hip et PAC1-TM4 n'activent pas la PLC tandis que le variant PAC1-VS démontre une perte de son potentiel à stimuler la formation d'AMPc (Spengler *et al.*, 1993; Chatterjee *et al.*, 1996; Ushiyama *et al.*, 2007).

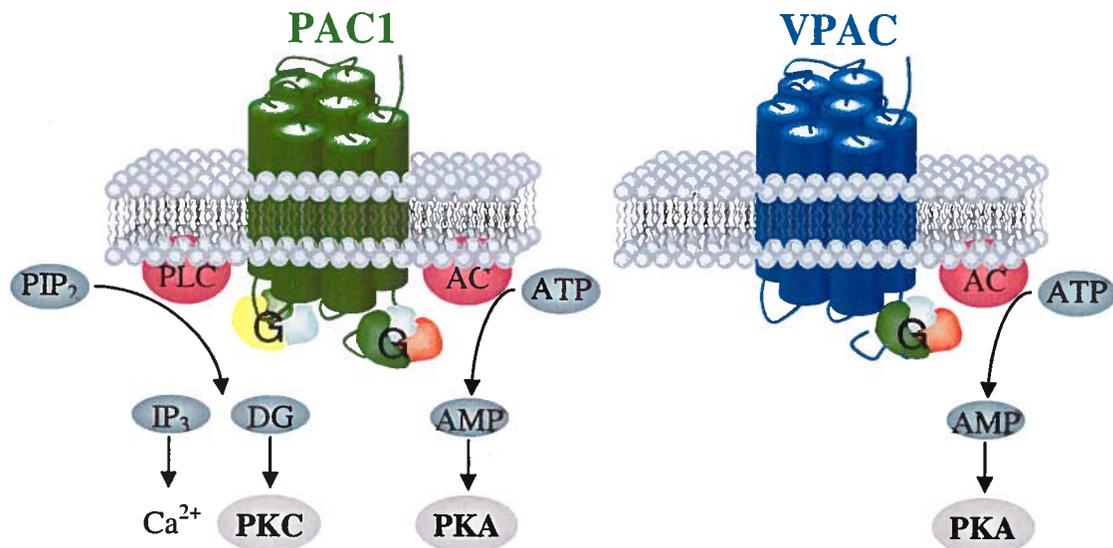


Figure 8: Représentation schématique des principaux seconds messagers associés à l'activation des récepteurs du PACAP.

3. Activité biologique du PACAP

La distribution ubiquitaire du PACAP et de ses récepteurs suggère que ce peptide exerce de nombreuses activités biologiques. De fait, le PACAP en agissant comme un neuropeptide, un neurotransmetteur, une (neuro)hormone ou un facteur trophique, induit des effets physiologiques variés au niveau du SNC, de l'hypophyse, des gonades, des glandes endocrines et des systèmes respiratoire, digestif, cardiovasculaire, urinaire et immunitaire (Vaudry *et al.*, 2000b).

3.1 Effets du PACAP sur le système nerveux central

Au niveau du SNC, la plus forte expression de PACAP et de ses récepteurs est retrouvée dans l'hypothalamus, où le neuropeptide semble réguler l'activité de diverses populations de neurones hypothalamiques. Par exemple, l'injection intracérébroventriculaire (*icv*) de PACAP stimule la synthèse et la libération de somatostatine, de gonadolibérine (GnRH), de corticolibérine (CRF) et de prolactine (Li *et al.*, 1996; Grinevich *et al.*, 1997; Bredow *et al.*, 1994). Néanmoins, les effets du PACAP sur le système de la gonadolibérine sont complexes et des effets contradictoires peuvent être observés entre les modèles *in vivo* et *in vitro* et en fonction de l'espèce étudiée, du sexe, du cycle menstruel et de la voie d'injection (*iv* ou *icv*) (Counis *et al.*, 2007). Par exemple, l'injection *icv* de PACAP à des rats femelles, juste avant l'ovulation (période proestrus), peut inhiber la libération de l'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse antérieure en influençant les niveaux de corticolibérine et d'opioïdes endogènes au niveau de l'hypothalamus, conduisant ainsi à une inhibition de l'ovulation chez la rate (Köves *et al.*, 2003). Cet effet physiologique est en contradiction avec la capacité du PACAP à induire la synthèse de la gonadolibérine par l'hypothalamus suite à une injection *icv* (Li *et al.*, 1996). De même, il a été abondamment décrit que le PACAP induit, de façon similaire à la gonadolibérine, la libération de gonadotrophines de cellules de l'hypophyse antérieure en culture (Culler *et al.*, 1991; Hart *et al.*, 1992; Perrin *et al.*, 1993). À l'opposé, l'injection *iv* de PACAP réduit l'expression du gène de la gonadolibérine au niveau de l'hypothalamus (Li *et al.*, 1996). Globalement, le PACAP agit au niveau de l'hypothalamus en tant que neuromodulateur et/ou neurotransmetteur régulant la synthèse et la libération d'agents hypophysiotropes classiques. D'autre part, en agissant sur l'hypophyse postérieure, le PACAP peut induire une libération d'ocytocine et de vasopressine dans la circulation sanguine (Gillard *et al.*, 2006; Lutz-Bucher *et al.*, 1996). En relation avec l'expression relative des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 dans de nombreux types cellulaires du SNC, le PACAP exerce des effets variés sur diverses populations de neurones et de cellules de soutien dans de nombreuses régions du SNC. Toutefois, les effets biologiques du PACAP sur le SNC les plus décrits concernent ses activités neurotrophiques et neuroprotectrices.

3.1.1 Effets neurotrophiques du PACAP

Les ARNm codant pour le PACAP et ses récepteurs sont détectables au niveau du SNC de l'embryon très tôt au cours de la gestation; dès E9.5 chez la souris et dès E11 chez le rat, suggérant ainsi un rôle clé du PACAP dans le développement neuronal (Sheward *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 1999). Chez l'humain, les ARNm codant pour les récepteurs PAC1 et VPAC1 sont exprimés dans le cervelet dès la quinzième semaine de gestation (Basille *et al.*, 2006). Au cours du développement, le PACAP contribue à la formation du tube neuronal, favorise la prolifération des neurones et retarde la myélinisation des précurseurs des oligodendrocytes (Washek *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). D'autre part, le PACAP induit la différenciation des cellules souches neuronales provenant d'embryons de souris à E14.5 en astrocytes (Ohno *et al.*, 2005) et stimule celle des neuroblastes cérébelleux issus de rats âgés de 8 jours (Gonzalez *et al.*, 1997). Particulièrement, le PACAP exerce des effets importants et complexes sur le développement du cervelet. Par exemple, ce neuropeptide induit à la fois un arrêt transitoire de la migration des neurones en grain au niveau de la couche des cellules de Purkinje (Cameron *et al.*, 2007) mais aussi une augmentation significative de l'épaisseur du cortex cérébelleux (Vaudry *et al.*, 1999). L'ensemble de ces résultats indique qu'au cours du développement du SNC, le PACAP est impliqué dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la migration et de la survie cellulaire. La variation spatio-temporelle des effets neurotrophiques induits par le PACAP provient vraisemblablement de l'expression relative de ses récepteurs et des différents variants, du type cellulaire, de la machinerie intracellulaire exprimée, ainsi que de la présence ou non d'autres facteurs trophiques.

3.1.2 Effets neuroprotecteurs du PACAP

Depuis la fin des années 90, de nombreuses études ont rapporté que le PACAP exerce un effet neuroprotecteur vis-à-vis de divers agents neurotoxiques dans des modèles d'expérimentation *in vitro* variés. Par exemple, le PACAP atténue la mort des cellules de phéochromocytome de rat (PC12) induite par le peptide β -amyloïde, le prion

ou la roténone (Onoue *et al.*, 2002a; Onoue *et al.*, 2002b; Wang *et al.*, 2005). Le PACAP favorise aussi la survie des cellules en grain du cervelet cultivées en conditions de privation de sérum ou exposées à des agents neurotoxiques tels que le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol ou les céramides (Bhave & Hoffman, 2004; Vaudry *et al.*, 2002a; Vaudry *et al.*, 2002b; Falluel-Morel *et al.*, 2004). L'effet anti-apoptotique du PACAP a également été démontré à l'aide de neurones corticaux exposés aux lipopolysaccharides ou au glutamate (Kong *et al.*, 1999; Shintani *et al.*, 2005). Le PACAP atténue aussi l'activation des cellules microgliales en conditions d'hypoxie, favorisant ainsi la survie des cellules neuronales maintenues en co-culture (Suk *et al.*, 2004). Ceci suggère que l'effet protecteur du PACAP sur les neurones peut être direct ou indirect.

Parallèlement, le potentiel neuroprotecteur du PACAP a été confirmé dans divers modèles *in vivo* d'atteintes du SNC. Par exemple, dans un modèle de maladie de Huntington, le PACAP réduit la mortalité neuronale induite par l'injection d'acide quinoléique (Tamas *et al.*, 2006). De même, le PACAP protège significativement les neurones dopaminergiques contre la neurotoxicité de la 6-hydroxydopamine, réactif couramment employé pour provoquer une neurodégénérescence similaire à celle retrouvée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Reglodi *et al.*, 2004b). Dans ce modèle, l'effet neuroprotecteur du PACAP s'accompagne d'une amélioration des fonctions motrices (Reglodi *et al.*, 2004b). En outre, l'injection de PACAP réduit les atteintes neurologiques et facilite la reprise comportementale chez le rat ayant subi des dommages traumatiques au cerveau et à la moelle épinière (Farkas *et al.*, 2004; Chen & Tzeng, 2005). Particulièrement, il a été établi que le PACAP exerce un effet neuroprotecteur chez les animaux ayant subi une ischémie cérébrale (Tableau IV; Ohtaki *et al.*, 2008). En effet, une injection *iv* de PACAP suivie d'une perfusion réduit considérablement la taille de la zone infarctée provoquée par une ischémie transitoire induite par l'obstruction de l'artère cérébrale moyenne (Reglodi *et al.*, 2000). Le PACAP protège également les neurones même lorsqu'il est injecté par voie *iv* vingt-quatre heures après l'ischémie (Uchida *et al.*, 1996). Ceci témoigne de l'intérêt thérapeutique unique du PACAP dans la mesure où celui-ci peut être administré assez longtemps après la survenue de l'AVC. L'effet protecteur du PACAP est également retrouvé lorsque le

peptide est injecté en une seule dose par voie *icv* avant l'épisode cérébro-ischémique (Dohi *et al.*, 2002; Tamas *et al.*, 2002). Récemment, en utilisant des souris dont le gène codant pour le PACAP a été invalidé, deux études ont montré que le PACAP endogène contribue à la protection des neurones (Figure 9) et favorise la récupération fonctionnelle en cas d'ischémie cérébrale (Chen *et al.*, 2006; Ohtaki *et al.* 2006).

Tableau IV: Résumé des différents modèles d'ischémie cérébrale ayant démontré un effet neuroprotecteur du PACAP.

<i>Espèce</i>	<i>Modèle*</i>	<i>Voie</i>	<i>Doses</i>	<i>Début</i>	<i>Référence</i>
Rat	4VO	icv	0.1-10 pmol/h	0 h	Uchida <i>et al.</i> , 1996
		iv	160 pmol/h	24 h après	
Rat	CA	icv	1 pmol/h	0 h.	Shioda <i>et al.</i> , 1998
Rat	MCAOt	iv	20 nmol/kg + 160 pmol/h	0 h. 4, 8, 12 h après	Reglodi <i>et al.</i> , 2000
Rat	MCAOp	icv	450 pmol/rat	avant	Tamas <i>et al.</i> , 2002
Rat	CA	icv	1 pmol/h	48 h avant	Dohi <i>et al.</i> , 2002
Rat	MCAOp	icv	0.25 à 4 µg/rat	avant	Reglodi <i>et al.</i> , 2004a
Souris	MCAOt	iv	5 nmol/kg + 16 pmol/h	0 h	Ohtaki <i>et al.</i> , 2006
Souris	MCAOp	iv	0.75 nmol/souris	1 h après	Chen <i>et al.</i> , 2006

* 4VO = occlusion des quatres vaisseaux CA = arrêt cardiaque
MCAOt = occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne
MCAOp = occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne

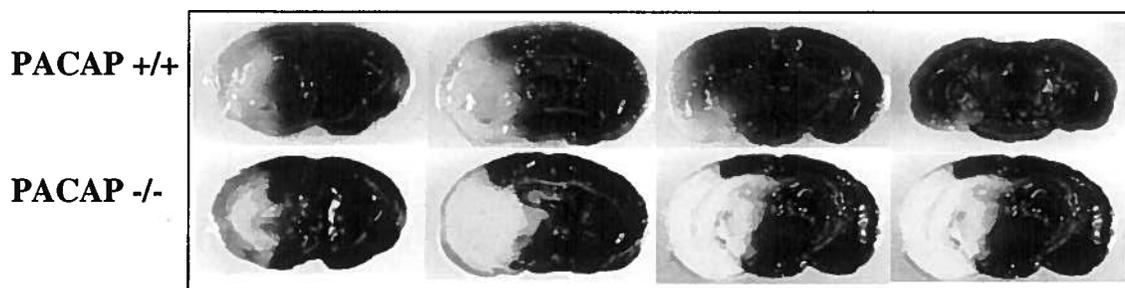


Figure 9: Coupes de cerveaux provenant de souris sauvages et de souris PACAP knockout ayant subi une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne. Les tranches de cerveaux ont été colorées à l'aide de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC). Les zones infarctées apparaissent en blanc. (Tiré de Ohtaki *et al.*, 2006)

3.1.3 Mécanismes des effets neuroprotecteurs du PACAP

L'activité neuroprotectrice du PACAP a été étudiée sur plusieurs modèles cellulaires comme les neurones corticaux et les cellules en grain du cervelet (Vaudry *et al.*, 2002b ; Vaudry *et al.*, 2003; Shintani *et al.*, 2005). Sur ces cellules, l'effet du PACAP peut être bloqué par un antagoniste du récepteur PAC1, le PACAP(6-38), et lorsque le VIP est utilisé aux mêmes concentrations, celui-ci n'a pas d'effet. Ces résultats indiquent que l'action du PACAP met principalement en jeu les récepteurs PAC1. Les études mécanistiques réalisées sur ces cellules en culture indiquent que l'effet neuroprotecteur du PACAP implique une inhibition de la cascade apoptotique (Dejda *et al.*, 2008). Comme schématisé à la figure 10, le PACAP, via l'activation du récepteur PAC1, peut agir sur les mécanismes d'induction de l'apoptose en réprimant principalement la voie mitochondriale. Sur les neurones en grain du cervelet en culture, le PACAP provoque une augmentation de la production d'AMPc, ce qui active en cascade la protéine kinase A (PKA) puis la *mitogen-activated protein* (MAP) kinase. La phosphorylation d'ERK induit l'expression du gène *c-fos* qui stimule ensuite la transcription de Bcl-2. Bcl-2 agit en compétition avec des protéines pro-apoptotiques comme Bax pour maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale et ainsi empêcher la libération du cytochrome C. Ceci réduit l'activation en chaîne des caspases initiateuses, comme la caspase-9, et effectrices, tel que la caspase-3 (Vaudry *et al.*, 2002b; Vaudry *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Falluel-Morel *et al.*, 2004; Aubert *et al.*, 2006). Dans plusieurs types cellulaires, le PACAP bloque également l'apoptose en inhibant l'activation de la *Jun N-terminal kinase* (JNK) / *stress-activated protein kinase* (SPAK) (Shioda *et al.*, 2006). Au niveau des cellules en grain de cervelet, le PACAP agit aussi en réduisant l'efflux potassique ce qui conduit ensuite à une inhibition de la caspase-3 (Mei *et al.*, 2004). La voie de la phospholipase C (PLC) peut également contribuer à l'inhibition par le PACAP de l'activité de la caspase-3 (Vaudry *et al.*, 2000a). L'ensemble des données *in vitro* indique que le PACAP favorise la survie neuronale en bloquant essentiellement la voie apoptotique mitochondriale, via la protéine Bcl-2, et en inhibant la caspase-3, enzyme-clé de l'apoptose (Dejda *et al.*, 2008). Toutefois, il importe de mentionner que les voies de transduction du signal régulées par le

récepteur PAC1 dépend du type cellulaire, du récepteur exprimé, de la concentration de PACAP utilisée et de la présence ou non d'autres facteurs neurotrophiques.

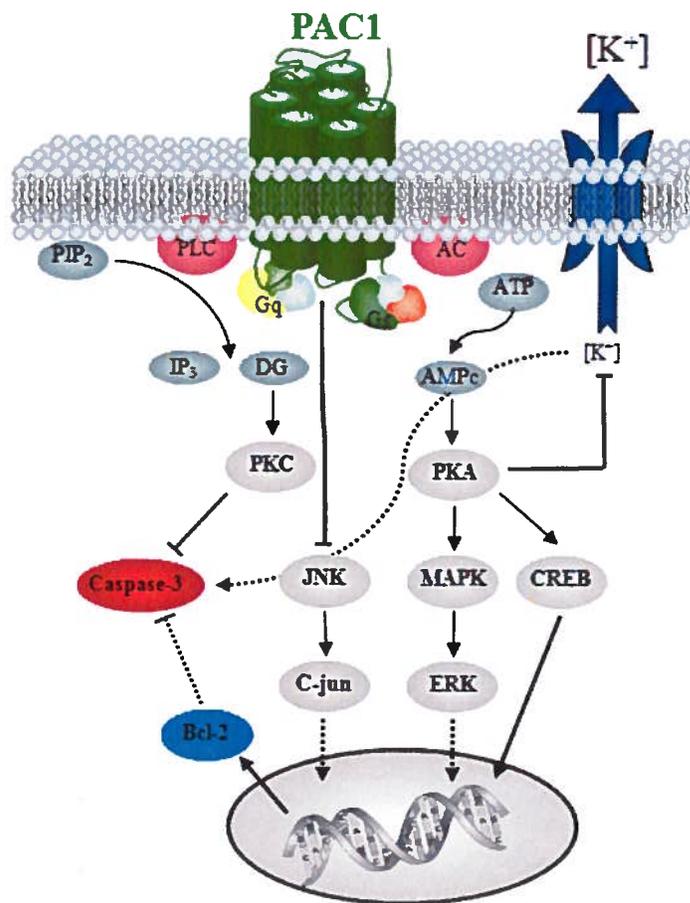


Figure 10: Représentation schématique des mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'effet neuroprotecteur direct du PACAP.

Le mécanisme direct d'inhibition de l'apoptose par le PACAP caractérisé dans diverses populations neuronales *in vitro* apparaît transposable *in vivo*. Par exemple, le récepteur PAC1 est largement distribué dans le SNC où il est exprimé par la majorité des populations neuronales (Vaudry *et al.*, 2000b). En outre, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris, le PACAP augmente l'expression de Bcl-2 et inhibe la libération de cytochrome C dans l'espace cytoplasmique (Ohtaki *et al.*, 2006). Cependant, plusieurs informations indiquent que les effets neuroprotecteurs du PACAP *in vivo* passent principalement par une action indirecte impliquant l'activation du récepteur PAC1 au niveau des astrocytes. En effet, l'incubation d'astrocytes en présence de PACAP induit

une augmentation du niveau d'interleukine-6 (IL-6) (Gottschall *et al.*, 1994), connue pour réduire le volume de la zone infarctée en cas d'ischémie cérébrale chez le rat (Loddick *et al.*, 1998). Parallèlement, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris, une augmentation de la région nécrotique a été observée suite à l'injection d'un anticorps ciblant le récepteur de l'IL-6 (IL-6R) (Yamashita *et al.*, 2005). En outre, chez le rat ayant subi un arrêt cardiaque, le PACAP stimule la libération d'IL-6 dans le liquide cébrospinal (Shioda *et al.*, 1998). Cette expression d'IL-6 s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation des kinases JNK et p38 au niveau de l'hippocampe, ce qui favorise la survie cellulaire (Shioda *et al.*, 1998). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité neuroprotectrice du PACAP pourrait également provenir de la libération d'IL-6 par les astrocytes. Notamment, Ohtaki *et al.* (2006) ont montré que le PACAP augmente l'expression de l'IL-6 dans le cerveau de souris et perd son activité neuroprotectrice chez les animaux IL-6 knockout. L'augmentation d'IL-6 induite par le PACAP favoriserait l'expression de la protéine anti-apoptique Bcl-2 afin de protéger les neurones du stress induit par l'ischémie cérébrale (Ohtaki *et al.*, 2006).

3.1.4 Effets du PACAP sur le comportement

Les effets du PACAP au niveau du SNC influencent également plusieurs aspects du comportement des animaux, tels que la prise alimentaire, la mémorisation, le rythme circadien, l'activité locomotrice et la transmission de la douleur (Hashimoto *et al.*, 2006). Tout d'abord, une concentration élevée de neurones exprimant le PACAP et ses récepteurs est retrouvée dans les régions hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire, suggérant ainsi que le PACAP pourrait réguler l'appétit (Arimura & Shioda, 1995). De fait, l'injection *icv* de PACAP réduit la consommation de nourriture chez le poulet, le rat et la souris (Tachibana *et al.*, 2003; Chance *et al.*, 1995 ; Morley *et al.*, 1992). Chez le rongeur, le PACAP bloque la consommation de nourriture préalablement induite par le neuropeptide Y (NPY) (Chance *et al.*, 1995). L'effet anorexigène du PACAP est principalement régulé par le récepteur PAC1 et semble impliquer le système hypothalamique de la mélanocortine (Mounien *et al.*, 2008).

D'autre part, des souris dont le gène codant pour le récepteur PAC1 a été invalidé, ont démontré des déficits d'apprentissage reliés à une perte d'excitabilité des fibres hippocampiques (Otto *et al.*, 2001). En outre, l'injection *icv* de PACAP chez le rat facilite les processus mnémotechniques, supportant l'implication du système PACAPergique dans les processus de mémorisation (Adamik & Telegdy, 2005 ; Sacchetti *et al.*, 2001). La densité élevée de sites de liaison du PACAP et les variations circadiennes des niveaux de PACAP retrouvées dans la glande pinéale suggèrent que le PACAP est impliqué dans la régulation des rythmes circadiens (Masuo *et al.*, 1992 ; Fukuhara *et al.*, 1998). De fait, le PACAP stimule la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale de rat (Simonneaux *et al.*, 1993). Des déficits dans la régulation de la réponse face aux variations de la luminosité conduisant à une désynchronisation du rythme circadien ont été observés chez les souris PACAP knockout, appuyant ainsi l'implication du PACAP dans le contrôle du rythme circadien (Colwell *et al.*, 2004).

3.2 Effets du PACAP sur d'autres organes

En relation avec l'activité biologique qui a conduit à la découverte du PACAP, les récepteurs de ce neuropeptide sont abondamment exprimés par l'ensemble des cellules endocrines de l'hypophyse antérieure (Vigh *et al.*, 1993). Au niveau de ces cellules, le PACAP favorise la libération de nombreuses hormones hypophysaires telles que l'hormone de croissance (GH), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH) (Vaudry *et al.*, 2000b). Le PACAP peut moduler l'activité de l'hypophyse soit en agissant directement sur les cellules hypophysaires suite à sa libération dans le système porte hypophysaire, soit en modulant l'activité de l'hypothalamus (voir section 3.1) ou encore en agissant comme hormone autocrine. Nonobstant le fait que le PACAP stimule la libération de la plupart des hormones hypophysaires et qu'il se retrouve en forte concentration dans le système porte hypophysaire, le rôle physiologique du PACAP au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire n'est toujours pas clairement établi et diffère certainement de la fonction des neurohormones classiques de stimulation telles que l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH), l'hormone thyroïdienne (TRH) ou la gonadolibérine.

De par ses rôles de neuropeptide, de neurotransmetteur et d'hormone, le PACAP agit également sur d'autres glandes endocrines, sur les gonades ainsi que sur de nombreux systèmes physiologiques. Par exemple, l'injection de PACAP chez l'humain (10 pmol/kg/min pendant 20 minutes) induit une augmentation du débit cardiaque ainsi qu'une augmentation de la force de contraction ventriculaire (Birk *et al.*, 2007). En outre, Li *et al.*, 2007 ont montré que l'injection *iv* de PACAP (4 pmol/kg/min pour 120 minutes) n'affecte pas significativement les niveaux de glucose sanguin et la pression artérielle. Le tableau V résume quelques-uns des effets biologiques induits par le PACAP en y associant l'expression relative des récepteurs retrouvés dans ces tissus.

Tableau V: Activités biologiques du PACAP au niveau périphérique et expression relative des sites de liaisons du PACAP.

<i>Tissus</i>	<i>Type I*</i>	<i>Type II*</i>	<i>Activités biologiques</i>	<i>(Référence)</i>
Hypophyse antérieure	+++	+	Stimulation de la libération de : <ul style="list-style-type: none"> • Hormone de croissance • Hormone adrénocorticotropique • Hormone lutéinisante • Hormone folliculo-stimulante 	(Vaudry <i>et al.</i> , 2000b)
Hypophyse postérieure	+		Stimulation de la libération de vasopressine	(Murase <i>et al.</i> , 1993)
Glandes surrénales	++	+/-	Stimulation de la sécrétion et la biosynthèse des catécholamines Stimulation de la libération d'enképhalines	(Hamelink <i>et al.</i> , 2002) (Hahm <i>et al.</i> , 1998)
Glande thyroïde	-	++	Stimulation de la sécrétion de thyroxine (T ₄)	(Chen <i>et al.</i> , 1993)
Pancréas	+	++	Stimulation de la sécrétion de lipase et d'amylase Stimulation des sécrétions d'insuline et glucagon	(Schmidt <i>et al.</i> , 1993) (Winzell & Ahren, 2007)
Foie	+	++	Stimulation de la libération de glucose	(Sekiguchi <i>et al.</i> , 1994)
Estomac		+	Effets sur la motilité gastrique (↑ <i>icv</i> / ↓ <i>iv</i>) Stimulation de la sécrétion d'acide gastrique (<i>icv</i>) Inhibition de la sécrétion d'acide gastrique (<i>iv</i>)	(Ozawa <i>et al.</i> , 1999) (Ozawa <i>et al.</i> , 1997) (Piqueras <i>et al.</i> , 2004)
Intestin	+	++	Stimulation de la sécrétion de bicarbonate (duodénum) Relaxation des muscles lisses	(Glad <i>et al.</i> , 2003) (Mungan <i>et al.</i> , 1992)
Rein	- / +	++	Protection contre les dommages rénaux ischémiques Protection rénale dans le cadre du myélome multiple	(Szakaly <i>et al.</i> , 2008) (Arimura <i>et al.</i> , 2006)

Poumons		+++	Bronchodilatation Stimulation de la sécrétion de mucus	(Lindén <i>et al.</i> , 1995) (Wagner <i>et al.</i> , 1998)
Trachée	-	++	Relaxation des muscles lisses	(Conroy <i>et al.</i> , 1995)
Testicules	+	+	Stimulation de la stéroïdogénèse des cellules de Leydig Stimule la sécrétion d'estradiol des cellules de Sertoli Implication dans la spermatogénèse	(El-Gehani <i>et al.</i> , 2000) (Heindel <i>et al.</i> , 1992) (Li & Arimura, 2003)
Ovaires		++	Stimulation de la synthèse de la progestérone Stimulation de la maturation de l'ovocyte Inhibition de l'apoptose du follicule	(Gräs <i>et al.</i> , 2005) (Cecconi <i>et al.</i> , 2004) (Lee <i>et al.</i> , 1999)
Macrophages	+	++	Stimulation de la migration, la phagocytose et la production de TNF- α et d'IL-6 chez les macrophages inactifs Effets anti-inflammatoires via la diminution de la sécrétion de TNF- α , de NO et d'IL-1 chez les macrophages activés Diminution de la réaction inflammatoire suite à un choc septique	(Delgado <i>et al.</i> , 2003) (Delgado <i>et al.</i> , 2003; Delgado <i>et al.</i> , 1999) (Martinez <i>et al.</i> , 2002)
Rate		++	Modulation de la synthèse de cytokines	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)
Cœur	-/+	++	Augmentation du débit cardiaque et de la force de contraction ventriculaire	(Birk <i>et al.</i> , 2007)
Artères Veines	+	++	Vasodilatation (cerveau, yeux, pancréas, testicules, peau...)	(Miyata, 2003)

*Expressions relatives des récepteurs du PACAP obtenues par des essais de radio-liaison et d'hybridation *in situ*. +++, haute densité, ++ densité modérée, + faible densité, - pas de sites de liaison et/ou de signal d'hybridation. (Adapté de Vaudry *et al.*, 2000b)

3.3 Souris invalidées pour le gène du PACAP ou du récepteur PAC1

Afin d'élucider le rôle physiologique d'une protéine spécifique, le développement d'une lignée de souris dont le gène codant pour celle-ci a été invalidé constitue une approche hautement informative. En particulier, cette avenue permet de savoir si la protéine concernée est essentielle pour un processus physiologique spécifique ou que son absence peut être compensée par d'autres systèmes. Nonobstant les effets du système PACAPergique répertoriés dans de nombreux phénomènes physiologiques, des lignées de souris déficientes pour le PACAP (Gray *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2001; Hamelink *et al.*, 2002; Colwell *et al.*, 2004) ou pour le récepteur PAC1 (Hashimoto *et al.*, 2000;

Jamen *et al.*, 2000; Otto *et al.*, 2001) ont été développées depuis le début des années 2000 par différents groupes. Les souris PACAP^{-/-} affichent habituellement une mortalité postnatale élevée ainsi qu'une diminution marquée de leur taille en comparaison aux souris sauvages. À cet effet, le groupe du Professeur Sherwood à l'Université de Victoria a révélé que plus de 90% des souris PACAP^{-/-} décèdent avant la fin de la seconde semaine postnatale et que cette importante mortalité précoce était associée à un dysfonctionnement des métabolismes lipidique et glucidique (Gray *et al.*, 2001). Cette mortalité élevée a considérablement été diminuée en augmentant la température de l'animalerie de 21°C à 24°C (Gray *et al.*, 2002). De même, la lignée PACAP knockout de l'équipe du Professeur Baba de l'Université d'Osaka présente un taux de mortalité de plus de 50% trois semaines après la naissance (Hashimoto *et al.*, 2001). Des difficultés respiratoires semblent constituer la principale cause de cette mortalité élevée (Cummings *et al.*, 2004). Les souris PAC1^{-/-} ont également montré une mortalité postnatale importante et celle-ci s'avère principalement associée à une pression artérielle pulmonaire très élevée engendrant un arrêt cardiaque (Otto *et al.*, 2004).

Malgré l'implication présumée centrale du système PACAPergique dans le développement neuronal, les souris PAC1^{-/-} et PACAP^{-/-} ne démontrent aucune anomalie morphologique majeure du SNC. Particulièrement, des analyses histologiques de l'hippocampe et de l'hypothalamus n'ont exposé aucune différence significative dans l'organisation des couches neuronales entre les souris PAC1 knockout et les souris sauvages (Hannibal *et al.*, 2001 ; Otto *et al.*, 2001). De plus, la morphologie du SNC chez des souris PACAP knockout âgées de P6 à P8 est sensiblement la même que chez les souris sauvages (Gray *et al.*, 2001). Ces résultats découlent vraisemblablement de la mise en place de mécanismes compensatoires impliquant d'autres systèmes neurotrophiques tels que les systèmes du *nerve growth factor* (NGF) et/ou du *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Néanmoins, Allais *et al.* (2007) ont observé une diminution de l'épaisseur de la couche granulaire du cervelet chez des souris PACAP^{-/-} à P4 conduisant ultérieurement à une altération morphologique du cervelet immature. Ceci suggère un rôle déterminant du PACAP dans le développement du cervelet.

Nonobstant une morphologie cérébrale normale, les souris dont le système du PACAP a été invalidé affichent de nombreuses anomalies comportementales. Tout d'abord, les souris PACAP^{-/-} présentent une augmentation de leurs activités locomotrices et exploratrices ainsi qu'un comportement hyperactif (Hashimoto *et al.*, 2001). Ces modifications comportementales sont associées à une diminution des niveaux des métabolites de la sérotonine au niveau du cortex et du striatum, régions impliquées dans la régulation de la motricité automatique (Hashimoto *et al.*, 2001). Une augmentation de l'activité locomotrice a également été observée chez les souris PAC1^{-/-} (Otto *et al.*, 2001). Ces informations suggèrent que le PACAP pourrait jouer un rôle dans la régulation des comportements psychomoteurs. D'autre part, des souris dont le gène du PACAP a été supprimé, présentent une réduction de la douleur inflammatoire et de la douleur associée à une neuropathie tout en conservant une nociception fonctionnelle (Mabuchi *et al.*, 2004). De même, une réduction substantielle de la réponse nociceptive chronique a été répertoriée chez des souris déficientes en récepteur PAC1 (Jongsma *et al.*, 2001). Comme mentionné précédemment, un déficit d'apprentissage ainsi que des anomalies dans la régulation du rythme circadien ont été observés chez les souris PAC1 knockout (Otto *et al.*, 2001; Hannibal *et al.*, 2001). Finalement, les souris femelles déficientes en PACAP ou en PAC1 présentent une fertilité réduite (Shintani *et al.*, 2002 ; Jamen *et al.*, 2000). Cette diminution de la fertilité provient vraisemblablement d'une implantation *in utero* déficiente de l'embryon et non de complications associées à l'ovulation, à la fécondation ou à l'histologie de l'ovule (Isaac & Sherwood, 2008).

4. Pharmacologie moléculaire et relations structure-activité

Depuis la découverte du PACAP, quelques études ont tenté d'identifier les pharmacophores de ce neuropeptide, soit les éléments chimiques responsables de l'activité biologique. Particulièrement, de nombreux analogues du PACAP ont été synthétisés dans le but de caractériser les déterminants moléculaires et structuraux impliqués dans la liaison et l'activation du récepteur PAC1. De même, afin d'obtenir des informations sur la conformation bioactive du PACAP, quelques études ont porté sur la relation tridimensionnelle existant entre les pharmacophores du PACAP. Il faut

néanmoins souligner que la majorité des études de relations structure-activité ciblant les récepteurs de la classe II a été réalisée à l'aide de dérivés du VIP.

4.1 Déterminants moléculaires du récepteur PAC1

La première étape pour déterminer les résidus clés d'un peptide dans le maintien de son activité biologique consiste usuellement à réduire le squelette peptidique à ses extrémités amino et carboxy terminales afin de trouver le segment minimal ayant un caractère agoniste. L'identification de segments courts agissant comme agonistes permet également de faciliter les analyses de relations structure-activité et de réduire les efforts déployés pour la synthèse chimique de bibliothèques d'analogues. En outre, cette approche permet couramment d'identifier des analogues tronqués qui agissent comme antagonistes, tel qu'observé dans le cas de la β -endorphine (Lee & Smith, 1980) et de certains peptides de la superfamille VIP/GRF/glucagon (Hoare, 2005).

Des délétions de longueur variable au niveau des domaines N- et C-terminaux du PACAP ont démontré que les résidus de la portion N-terminale sont cruciaux pour la conservation du potentiel d'activation du récepteur PAC1. Pour sa part, la région C-terminale s'avère principalement impliquée dans le maintien d'une interaction optimale avec le récepteur PAC1. En effet, comme présenté dans le Tableau VI, des délétions successives au niveau du domaine C-terminal du PACAP27 ont conduit à des analogues présentant une réduction d'affinité et d'activité biologique (Gourlet *et al.*, 1996c). Néanmoins, ces différents fragments sont des agonistes complets. Particulièrement, le potentiel d'activation du récepteur PAC1 de ces analogues est proportionnel à la quantité relative de ligands liée au récepteur puisque la perte de puissance observée est comparable à la diminution de l'affinité (Gourlet *et al.*, 1996c). En considérant l'hypothèse que la réponse biologique est proportionnelle au nombre de récepteurs liant l'agoniste, ces observations suggèrent qu'au niveau moléculaire tous ces fragments tronqués à l'extrémité C-terminale du PACAP27 peuvent activer le récepteur PAC1 de façon équipotente au peptide natif.

Tableau VI: Comparaison de l'affinité de liaison et de l'activité biologique de fragments du PACAP27 dans des essais pharmacologiques ciblant le récepteur PAC1. (Adapté de Gourlet *et al.*, 1996c)

Fragments	Affinité relative ^a	Activité relative ^b
PACAP(1-27)	1	1
PACAP(1-26)	0.1	0.2
PACAP(1-25)	0.03	0.05
PACAP(1-24)	0.1	0.2
PACAP(1-23)	0.03	0.05

^a Affinité de liaison relative d'analogues du PACAP exprimée en fonction de l'IC₅₀ obtenue pour le PACAP27 (IC₅₀ de l'analogue/ IC₅₀ du PACAP27 (0.4 nM)).

^b Potentiel d'activation relatif de l'adénylyle cyclase d'analogues du PACAP exprimé en fonction de l'EC₅₀ obtenue pour le PACAP27 (EC₅₀ de l'analogue/ EC₅₀ du PACAP27 (0.3 nM)).

À l'opposé, la région N-terminale du PACAP apparaît essentielle pour l'activation du récepteur PAC1 et facilite également la liaison du peptide au récepteur. Par exemple, la simple délétion du résidu histidine en position 1 chez les deux isoformes du PACAP entraîne une diminution marquée de l'affinité et de l'activité biologique (Gourlet *et al.*, 1991; Robberecht *et al.*, 1992b; Hou *et al.*, 1994). Toutefois, cette perte d'affinité et de puissance est moins importante pour le PACAP38 que pour le PACAP27, suggérant ainsi un rôle facilitateur du domaine 28-38 dans la liaison au récepteur PAC1 (Tableau VII). En outre, l'enlèvement des deux premiers résidus, histidine-1 et sérine-2, supprime totalement le potentiel d'activation du PACAP; les fragments PACAP(3-27) et PACAP(3-38) étant inactifs (Robberecht *et al.*, 1992b, Hou *et al.*, 1994). De même, la délétion successive de fragments à l'extrémité N-terminale a conduit à des analogues tronqués du PACAP27 et du PACAP38 démontrant une activité antagoniste (Robberecht *et al.*, 1992b; Hou *et al.*, 1994). Ces délétions successives ont permis de caractériser le fragment 6-38 comme le plus puissant antagoniste du récepteur PAC1 (Robberecht *et al.*, 1992a). En effet, le PACAP(6-38) démontre une plus grande affinité envers le récepteur PAC1 que les fragments inactifs 4-38, 5-38 et 7-38 (Robberecht *et al.*, 1992b). Curieusement, des fragments plus courts, tels que le PACAP(10-38) et le PACAP(14-38), redeviennent capables de stimuler efficacement l'adénylyle cyclase sur des cellules de

neuroblastomes humains, une préparation pharmacologique caractéristique des récepteurs PAC1 (Vandermeers *et al.*, 1992).

Tableau VII: Comparaison de l'affinité de liaison et de l'activité biologique de fragments du PACAP38 et du PACAP27 dans des essais pharmacologiques ciblant le récepteur PAC1. (Adapté de Robberecht *et al.*, 1992b; Hou *et al.*, 1994, Gourlet *et al.*, 1995; Vandermeers *et al.*, 1992)

Peptide	Affinité relative ^a	Activité relative ^b
PACAP(2-27)	0.03	0.01
PACAP(2-38)	0.14	0.1
PACAP(3-27)	0.0006	*
PACAP(3-38)	0.015	*
PACAP(6-27)	0.002	*
PACAP(6-38)	0.1	*
PACAP(10-27)	0.0004	< 0.0001
PACAP(10-38)	0.008	0.003
PACAP(12-27)	< 0.0001	< 0.0001
PACAP(12-38)	0.002	0.0004
PACAP(14-27)	0.0004	< 0.0001
PACAP(14-38)	0.01	0.003

^a Affinité de liaison relative d'analogues du PACAP exprimée en fonction de l'IC₅₀ obtenue pour le PACAP27 (IC₅₀ de l'analogue/ IC₅₀ du PACAP27 (0.4 nM)).

^b Potentiel d'activation de l'adénylyle cyclase d'analogues du PACAP exprimé en fonction de l'EC₅₀ obtenue pour le PACAP27 (EC₅₀ de l'analogue/ EC₅₀ du PACAP27 (0.3 nM)).

*Antagoniste du récepteur PAC1.

L'ensemble des données du Tableau VII montre que tous les fragments tronqués à l'extrémité N-terminale du PACAP38 présentent une affinité et une puissance plus élevées que leurs homologues respectifs du PACAP27. Cette contribution du segment 28-38 à la liaison au récepteur PAC1 a également été démontrée à l'aide du peptide chimérique VIP(1-27)/PACAP(28-38). Ce dérivé chimérique s'est avéré 100 fois plus puissant que le VIP pour activer le récepteur PAC1 (Gourlet *et al.*, 1996a). De même, les fragments 3-30 et 3-32 présentent une affinité 10 à 15 fois supérieure envers le récepteur PAC1 que le fragment 3-27. Ceci suggère que la séquence de charges positives qui

s'étend des résidus 28 à 32 (Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys) facilite la liaison du PACAP (Gourlet *et al.*, 1995). Le segment C-terminal 28-38 pourrait participer au maintien de l'affinité du PACAP envers le récepteur PAC1 en agissant comme stabilisateur de la structure tridimensionnelle du peptide, en interagissant directement avec le récepteur ou en augmentant les interactions entre le peptide et les lipides membranaires facilitées par son caractère hautement cationique et ses propriétés amphiphiles.

La seconde étape habituellement effectuée afin de caractériser les pharmacophores d'un peptide consiste à identifier l'importance de chaque résidu de la séquence peptidique dans le maintien de l'activité biologique. La stratégie généralement employée comprend le remplacement successivement de chaque acide aminé par une alanine (*Ala-Scan*) et à évaluer l'activité biologique des analogues ainsi générés. Une perte (ou un gain) d'affinité et/ou d'activité renseigne alors sur l'impact de la chaîne latérale du résidu dans la reconnaissance moléculaire avec le récepteur. Nonobstant l'ensemble des actions physiologiques induites par le PACAP et son potentiel thérapeutique, aucun *Ala-Scan* de ce neuropeptide n'a été réalisé à ce jour. Cette absence provient vraisemblablement de la séquence peptidique relativement étendue et des synthèses chimiques difficiles du PACAP, augmentant ainsi considérablement le temps et l'investissement financier pour la réalisation d'un *Ala-Scan*. Néanmoins, certains analogues des deux isoformes du PACAP comprenant des substitutions ciblées de résidus ont été synthétisés et caractérisés pour leur affinité et leur potentiel d'activation du récepteur PAC1. Ces modifications de charge, de chiralité ou d'hydrophobicité ciblant principalement le domaine N-terminal ont permis de dégager de précieux renseignements à propos des requis moléculaires du récepteur PAC1.

En relation avec les résultats des études de délétions préalablement exposés, le PACAP est peu tolérant aux modifications chimiques apportées à la région N-terminale. Par exemple, des variations minimales dans la séquence comme les remplacements des résidus sérine-2 ou acide aspartique-3 par une arginine ou une asparagine, respectivement, entraînent l'apparition d'une activité antagoniste (Tableau VIII; Robberecht *et al.*, 1992b). De même, la substitution de l'histidine en position 1 par un

autre résidu aromatique tel que la phénylalanine, réduit de façon drastique la capacité du PACAP à stimuler l'adénylyle cyclase dans des préparations membranaires d'hippocampe, un tissu riche en récepteur PAC1 (Hou *et al.*, 1994). Le groupement hydroxyle porté par la sérine-2 n'apparaît pas essentiel pour l'activation du récepteur et/ou pour le maintien de la structure tridimensionnelle nécessaire pour une liaison efficace avec le récepteur PAC1 dans la mesure où l'analogue [Ala²]PACAP27 présente une IC₅₀ et une EC₅₀ similaires à celles obtenues pour le peptide natif (Robberecht *et al.*, 1992b). En revanche, l'incorporation d'un résidu volumineux en position 2 comme la phénylalanine ou l'arginine bloque l'activité biologique du PACAP, suggérant que cette position est sensible à l'encombrement stérique. Malgré des résultats divergents entre les deux isoformes du PACAP, la charge négative de l'acide aspartique en position 3 ainsi que son positionnement relatif au squelette peptidique semblent cruciaux pour maintenir une interaction optimale avec le récepteur PAC1 (Robberecht *et al.*, 1992b; Hou *et al.*, 1994). Finalement, l'ensemble des substitutions effectuées au niveau du domaine N-terminal entraîne une perte d'activité et d'affinité plus marquée pour les analogues du PACAP27 que pour leurs homologues respectifs du PACAP38, supportant ainsi l'hypothèse de l'effet facilitateur du domaine 28-38 dans la liaison au récepteur PAC1 (Tableau VII; Robberecht *et al.*, 1992b; Hou *et al.*, 1994).

Tableau VIII: Comparaison de l'affinité de liaison et de l'activité biologique d'analogues du PACAP dans des essais pharmacologiques ciblant le récepteur PAC1. (Adapté de Robberecht *et al.*, 1992b)

Peptide [#]	Affinité relative ^a	Activité relative ^b	Peptide [#]	Affinité relative ^a	Activité relative ^b
PACAP27	1	1	PACAP38	2	1.4
[AcHis ¹]PACAP27	2	1			
[Phe ¹]PACAP27	0.04	0.015			
[Ala ²]PACAP27	2	1.4	[Ala ²]PACAP38	0.25	0.33
[Ala ²]PACAP(2-27)	0.008	0.006			
[AcHis ¹ , Ala ²]PACAP27	1	0.5	[AcHis ¹ , Ala ²]PACAP38	1	0.2
[D-Ala ²]PACAP27	3.3	0.33	[D-Ala ²]PACAP38	1.3	0.33
[Arg ²]PACAP27	0.001	0.0003	[Arg ²]PACAP38	0.02	0.006
[AcHis ¹ , Arg ²]PACAP27	0.001	0.0001	[AcHis ¹ , Arg ²]PACAP38	0.04	0.006
[Phe ²]PACAP27	0.004	*	[Phe ²]PACAP38	0.2	*
[AcHis ¹ , Phe ²]PACAP27	0.02	*	[AcHis ¹ , Phe ²]PACAP38	0.125	*
[Glu ³]PACAP27	0.08	0.03	[Ala ³]PACAP38	0.125	0.07
[Asn ³]PACAP27	0.002	*	[Glu ³]PACAP(2-38)	0.04	*
[Gly ²¹]PACAP27	0.2	0.33			
[Gly ²⁰ , Gly ²¹]PACAP27	0.002	0.01			

^a Affinité de liaison relative d'analogues du PACAP exprimée en fonction de l'IC₅₀ obtenue pour le PACAP27 (IC₅₀ de l'analogue / IC₅₀ du PACAP27 (0.4 nM)).

^b Potentiel d'activation de l'adénylyle cyclase d'analogues du PACAP exprimé en fonction du l'EC₅₀ obtenue pour le PACAP27 (EC₅₀ de l'analogue / EC₅₀ du PACAP27 (0.3 nM)).

*Antagoniste du récepteur PAC1.

[#]Séquence du PACAP38: HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKNK

Au-delà de la simple présence de groupements chimiques portés par des résidus spécifiques, l'orientation spatiale qu'adoptent les chaînes latérales est primordiale pour l'activité biologique d'un peptide. À cet égard, par une approche de spectroscopie RMN, Inooka *et al.* (2001) ont déterminé la conformation du PACAP lorsque celui-ci est lié au récepteur PAC1 (Figure 11). Cette étude, effectuée à l'aide de la forme réduite 1-21 du PACAP, a dévoilé une structure aperiodique stable au niveau du segment N-terminal (résidus 3 à 7) lorsque le neuropeptide est amarré au récepteur. Plus précisément, cet arrangement structural est constitué de deux coudes β successifs; un de type II'

regroupant les résidus acide aspartique-3 à phénylalanine-6 et l'autre de type I composé des résidus glycine-4 à thréonine-7. Ces deux coudes β consécutifs sont suivis, du côté C-terminal, d'une hélice α qui s'étend des résidus 8 à 21. Cette hélice est fortement stabilisée par le microenvironnement du récepteur (Figure 11, Inooka *et al.*, 2001).

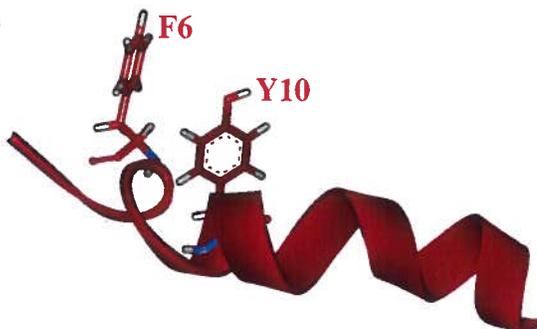


Figure 11: Représentation schématique du fragment PACAP(1-21) lorsque celui-ci est complexé au récepteur PAC1. La chaîne latérale des résidus phénylalanine-6 et tyrosine-10 sont exposés. (PDB ID code: 1GEA)

Plus récemment, la structure du fragment PACAP(6-38) lorsque celui-ci forme un complexe avec le domaine extracellulaire du récepteur PAC1 a été caractérisée par modélisation moléculaire sous contraintes RMN. Dans ces conditions, les résidus tyrosine-10 à arginine-30 adoptent une structure hélicoïdale bien définie comportant un léger repliement au niveau de l'alanine en position 18 (Figure 12; Sun *et al.*, 2007). En outre, les résidus 29 à 34 du PACAP(6-38) semblent en contact direct avec les acides aminés acide glutamique-117, tyrosine-118 et acide glutamique-119 du récepteur PAC1 (Figure 12; Sun *et al.*, 2007). Cette interaction est probablement favorisée par des liaisons ioniques impliquant des résidus basiques du PACAP (Lys^{29} - Arg^{30} - Lys^{32} - Arg^{34}) et les groupements carboxyliques des résidus 117 et 119 du récepteur. Lors de cette étude, Sun *et al.* (2007) ont également évalué l'affinité de liaison envers le domaine N-terminal du récepteur PAC1 de quelques dérivés du fragment PACAP(6-38). Les résultats indiquent que les résidus hydrophobes tyrosine-22, valine-26 et leucine-27 sont essentiels pour permettre une interaction optimale avec le domaine extracellulaire. À l'inverse, le remplacement successif des résidus tyrosine-10 et arginine-14 par une alanine n'a pas conduit à une baisse importante de l'affinité du fragment 6-38. L'inversion de la charge des résidus lysines 20 et 29 induite par la substitution de ces résidus par un acide

glutamique a réduit l'affinité du PACAP(6-38) envers le domaine N-terminal du récepteur PAC1 (Sun *et al.*, 2007). De même, Robberecht *et al.* (1992b) avaient observé une perte importante d'affinité du PACAP38 suite aux remplacements simultanés des résidus lysines 20 et 21 par une glycine (Tableau VII).

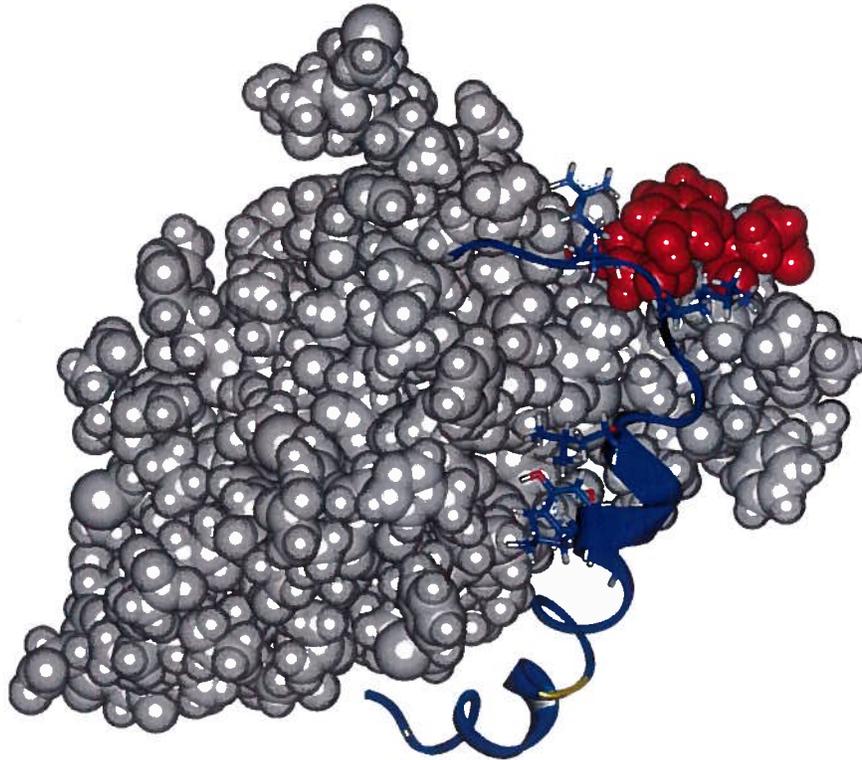


Figure 12: Représentation du complexe formé par le domaine N-terminal du récepteur PAC1 et le fragment PACAP(6-38). Le PACAP(6-38) est représenté en bleu et la chaîne latérale des résidus tyrosine-22, leucine-23, lysine-32 et arginine-34 sont exposés. Les résidus acide glutamique-117, tyrosine-118 et acide glutamique-119 du récepteur PAC1 sont représentés en rouge. (PDB ID code: 2JOD)

4.1.1 Spécificité moléculaire de la liaison PACAP-PAC1

Nonobstant son homologie de séquence élevée avec le PACAP27, le VIP ne peut lier et activer efficacement le récepteur PAC1. Afin de dégager les fondements moléculaires de la spécificité du récepteur PAC1 envers le PACAP, des analogues chimériques comprenant des inter-conversions des résidus distincts entre ces deux peptides ont été développés et évalués pharmacologiquement (Schafer *et al.*, 1999; Onoue *et al.*, 1999; Onoue *et al.*, 2001). Puisque la divergence structurale qui existe entre le

PACAP et le VIP est limitée à deux domaines précis, soit les segments 4-13 et 24-28 (Figure 3), cette sélectivité réside forcément dans le motif structural de ces régions. L'ensemble de ces études a démontré que les résidus glycine-4 et isoleucine-5 semblent principalement à la base de l'activation spécifique du récepteur PAC1 par le PACAP. Par exemple, les analogues [Ala⁴]PACAP27, [Val⁵]PACAP27 et [Ala⁴, Val⁵]PACAP27 affichent une perte importante de leur puissance à induire la formation d'AMPC dans des cellules AR4-2J, une lignée cellulaire provenant d'un carcinome pancréatique de rat et exprimant abondamment les récepteurs PAC1 (Schafer *et al.*, 1999; Buscail *et al.*, 1990). De même, contrairement au VIP, le dérivé [Gly⁴, Ile⁵, Ser⁹]VIP présente un potentiel marqué à induire la formation et la croissance de neurites chez des cellules PC12, phénomène biologique résultant de l'activation du récepteur PAC1 (Onoue *et al.*, 2001). Les résidus sérine-9, sérine-11 et tyrosine-13 pourraient également jouer un rôle clé dans la sélectivité du récepteur PAC1 puisque les analogues [Asn⁹, Thr¹¹, Leu¹³]PACAP27 et [Asn⁹, Thr¹¹, Leu¹³]PACAP38 exhibent une perte d'efficacité à induire la synthèse d'AMPC de 32.6 et 39.2%, respectivement (Schafer *et al.*, 1999). À l'opposé, l'analogue [Asn²⁴, Ser²⁵, Ile²⁶, Asn²⁸]PACAP38 présente une affinité et une capacité de stimulation de l'adénylyle cyclase similaires à celles observées pour le peptide natif, suggérant ainsi que le segment 24-28 du PACAP n'est pas impliqué dans la sélectivité du récepteur PAC1 (Schafer *et al.*, 1999). Finalement, Onoue *et al.* (1999) ont montré que le fragment [Gly⁴, Ile⁵]VIP(1-10), contrairement au VIP, présente une structure tridimensionnelle similaire au fragment PACAP(1-10). Ce résultat témoigne de l'importance de la conformation spatiale du segment N-terminal du PACAP dans la sélectivité du récepteur PAC1.

4.1.2 Études structurales du récepteur PAC1

Les RCPG de la classe B possèdent un large domaine N-terminal caractéristique qui semble principalement responsable de la liaison du peptide au récepteur. En 2004, la première structure sous contraintes RMN du domaine N-terminal d'un RCPG de la famille B a été publiée pour le récepteur CRF-2β (Grace *et al.*, 2004). Cette structure est principalement caractérisée par la présence de deux feuillets β et par l'existence de trois

ponts disulfures qui stabilisent fortement l'ensemble de cette conformation (Grace *et al.*, 2004). En se basant sur cette structure, Laburthe *et al.* (2007) ont développé un modèle structural par homologie du domaine N-terminal du récepteur PAC1. Par cette approche, la structure du domaine N-terminal du récepteur PAC1 est évidemment très similaire à celle préalablement décrite par Grace *et al.* (2004) pour le CRF-2 β . Les trois ponts disulfures, le pont ionique entre les résidus acide aspartique-58 et arginine-116 ainsi que l'interaction hydrophobe entre les groupements aromatiques des tryptophanes aux positions 64 et 123 stabilisent une structure compacte caractérisée par la présence de deux feuillets β (Laburthe *et al.*, 2007).

La conformation du domaine N-terminal du récepteur PAC1 a également été résolue au moyen de la spectroscopie RMN couplée à la modélisation moléculaire (Sun *et al.*, 2007). Les résultats rapportent la présence d'une hélice α à l'extrémité N-terminale suivie de quatre brins β formant deux feuillets β antiparallèles (Figure 13). L'hélice située à l'extrémité est reliée au brin β 2 par un pont disulfure entre les cystéines 34 et 63. Les deux feuillets β sont maintenus à proximité par la présence d'un pont disulfure existant entre les cystéines 54 (brin β 1) et 97 (brin β 4). La présence d'un troisième pont disulfure stabilise l'ensemble de cette structure compacte. De même, une liaison ionique (Asp⁵⁹-Arg⁹⁵) et des interactions hydrophobes entre des résidus aromatiques contribuent à maintenir cette conformation serrée. Cette structure positionne les résidus acide glutamique-117, tyrosine-118 et acide glutamique-119, qui semblent interagir directement avec le PACAP, à proximité de la surface interne du domaine N-terminal, rapprochant ainsi le PACAP des domaines transmembranaires et des boucles extracellulaires du récepteur PAC1.

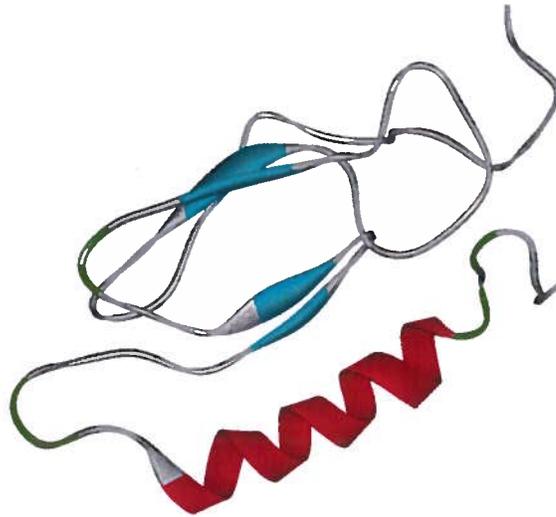


Figure 13: Structure du domaine N-terminal du récepteur PAC1. Les quatre brins β sont représentés en turquoise et l'hélice α en rouge. (PDB ID code: 2JOD)

4.1.3 Modèles d'activation du récepteur PAC1

L'ensemble des analyses structurales et des études de relations structure-activité suggère que le PACAP active le récepteur PAC1 selon le modèle à deux domaines (*two domains model*; Hoare, 2005) préalablement décrit pour les RCPG de la famille B. Tout d'abord, par son caractère basique et hydrophobe, le segment hélicoïdal du PACAP facilite la liaison non-spécifique du PACAP à la membrane cellulaire. En effet, le segment 12-27 contient 5 résidus basiques, de nombreux acides aminés hydrophobes et aucun groupement acide. De plus, comme représenté à la figure 14, l'analyse de cette région hélicoïdale par le diagramme de Shiffer-Edmundson (Schiffer & Edmundson, 1967) indique que cette hélice affiche un caractère partiellement amphiphile, appuyant ainsi l'hypothèse de la liaison non-spécifique du peptide à la membrane cellulaire anionique. Le segment 28-38 est fortement chargé positivement et les résultats des études de relation structure-activité suggèrent également que ce fragment hélicoïdal faciliterait l'interaction du PACAP avec la membrane. Cette interaction initiale du PACAP avec la membrane plasmique renvoie au modèle général d'activation des GPCR. Ce modèle suggère que la conformation bioactive de l'hormone peptidique est induite suite à l'association du

peptide à la membrane cellulaire permettant ensuite la reconnaissance spécifique du ligand par le récepteur (Mierke *et al.*, 2001).

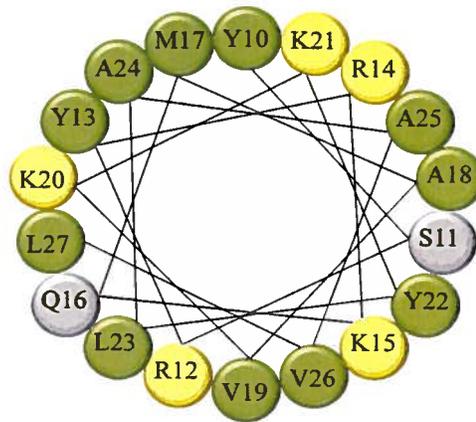


Figure 14: Diagramme de Shiffer-Edmundson du segment 10-27 du PACAP. Les résidus hydrophobes sont représentés en vert, les résidus polaires non-chargés en gris et les résidus basiques en jaune.

Comme schématisé à la figure 15, suite à l'ancrage non-spécifique du peptide à la membrane cellulaire, le PACAP peut diffuser vers le large domaine extracellulaire du récepteur PAC1 et se fixer à celui-ci. Les résultats de Gourlet *et al.* (1995) et de Sun *et al.* (2007) portent à croire que les résidus basiques du segment C-terminal du PACAP pourraient former des liaisons ioniques avec des groupements carboxyliques du domaine N-terminal du récepteur et ainsi favoriser la fixation du peptide au domaine extracellulaire du récepteur PAC1. De même, l'intégrité de la structure hélicoïdale du PACAP apparaît cruciale afin de permettre une interaction optimale entre le peptide et le récepteur. En effet, l'incorporation d'une glycine, résidu connu pour son effet déstabilisateur des hélices, en position 20 ou 21 réduit la capacité du PACAP38 à lier le récepteur PAC1 (Robberecht *et al.*, 1992b). D'autre part, l'orientation de la liaison entre le PACAP(6-38) et le domaine N-terminal du récepteur observée par Sun *et al.* (2007), suggère que le domaine N-terminal du PACAP est orienté vers l'interface membrane-récepteur. En outre, le repliement en position 18 permet au domaine N-terminal du PACAP(6-38) de plonger profondément vers le cœur du récepteur (Sun *et al.*, 2007). Ensuite, la formation du complexe formé du PACAP et du domaine N-terminal du récepteur PAC1 aurait comme effet d'induire un changement conformationnel chez le

récepteur et de permettre ainsi à la portion N-terminale du PACAP d'interagir avec la région juxtamembranaire du récepteur. Le fait que la région N-terminale soit principalement responsable de l'activation du récepteur PAC1 vient supporter ce modèle (Robberecht *et al.*, 1992b, Hou *et al.*, 1994). De plus, l'interaction du segment N-terminal du PACAP avec le récepteur semble favoriser la formation des deux coudes β successifs observés par Inooka *et al.* (2001). Cette conformation bioactive précise pourrait jouer un rôle clé dans l'activation du récepteur PAC1 par le PACAP.

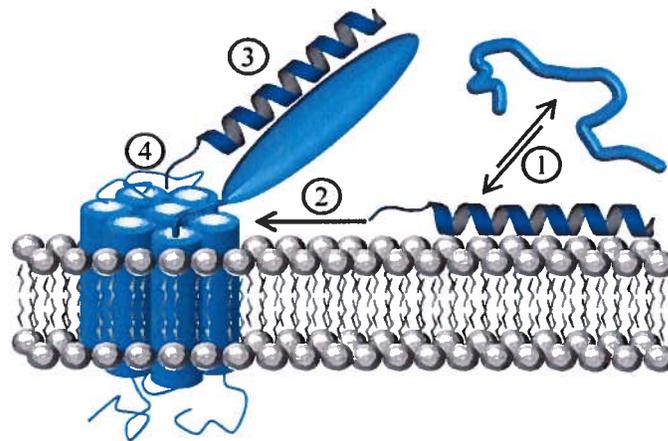


Figure 15: Représentation schématique de l'activation du récepteur PAC1 par le PACAP. (1) Le PACAP s'arrime de façon non-spécifique à la membrane cellulaire, stabilisant son hélice amphiphile chargée positivement. (2) Le PACAP diffuse à la surface de la membrane cellulaire et ses segments central et C-terminal se lient au domaine N-terminal du récepteur PAC1 (3). (4) La région désordonnée N-terminale du PACAP interagit avec le domaine juxtamembranaire du récepteur, adopte une conformation bioactive et induit la transduction du signal.

Un autre mécanisme d'activation des RCPG de la classe B a récemment été proposé en se basant principalement sur des résultats obtenus avec la sécrétine (Beinborn, 2006; Dong *et al.*, 2006b). Ce modèle appelé *hidden agonist within the N-terminal domain* allègue que les ligands endogènes des RCPG de la classe B n'agissent pas en tant qu'agonistes activateurs. À l'opposé, ces peptides, en induisant un changement conformationnel du récepteur, exposeraient un épitope caché qui est présent de façon constitutive dans le domaine N-terminal du récepteur. Par la suite, cet épitope pourrait interagir avec le corps du récepteur et ainsi l'activer. La présence de l'agoniste à l'intérieur même du domaine N-terminal du récepteur constitue la prémisse centrale de ce

modèle. La principale évidence expérimentale à l'origine de cette théorie concerne l'activation du récepteur de la sécrétine par un tripeptide (tryptophane - acide aspartique - asparagine (WDN)) (Dong *et al.*, 2006b). Cette séquence, qui est hautement conservée dans le domaine N-terminal des RCGP de la classe B, n'est pas retrouvée dans la structure primaire de la sécrétine. De même, la substitution dans la séquence du récepteur du résidu tryptophane du segment WDN par une leucine diminue grandement l'efficacité de la sécrétine à activer ce récepteur mutant (Dong *et al.*, 2006b). À l'opposé, le fragment WDN active le récepteur mutant avec une puissance similaire à celle retrouvée pour le récepteur sauvage. De plus, par une approche de marquage par photoaffinité, Dong *et al.* (2006b) ont dévoilé que certains fragments du domaine N-terminal du récepteur contenant la séquence WDN se lient à l'extrémité extracellulaire du segment transmembranaire 6, une région connue pour jouer un rôle clé dans l'activation de nombreux GPCR (Gether, 2000). L'homologie de séquence significative entre le récepteur de la sécrétine et le récepteur PAC1 ainsi que la présence du tripeptide WDN au niveau du domaine N-terminal du récepteur PAC1 suggère que ce modèle pourrait être transposable au récepteur spécifique du PACAP. Toutefois, Sun *et al.* (2007) ont observé que la liaison du PACAP au domaine N-terminal du récepteur PAC1 n'entraîne pas de modifications structurales chez celui-ci, mais bien une stabilisation de sa structure initiale. Malgré certaines données expérimentales exposées pour le récepteur de la sécrétine, ce modèle original est contesté et le modèle à deux domaines constitue encore aujourd'hui le principal modèle théorique d'activation des RCPG de la classe B.

4.1.4 Relations structure-activité du maxadilan

Comme mentionné précédemment, le maxadilan est le seul agoniste sélectif du récepteur PAC1 connu à ce jour et son fragment des(24-42) constitue l'unique antagoniste totalement sélectif du récepteur PAC1. Le maxadilan est composé de 61 acides aminés et présente deux ponts disulfures entre les résidus cystéines 1-5 et 14-51 (Lerner *et al.*, 2007). La prédiction de sa structure secondaire au moyen de l'algorithme de Chou & Fousman suggère la présence de deux régions en hélice- α reliées entre elles par un brin β . Le pont disulfure entre les cystéines 14 et 51 permet de rapprocher les deux

domaines hélicoïdaux (Figure 16). La conformation en hélice α du maxadilan présumée suite à l'analyse par l'algorithme de Chou & Fasman a été confirmée par des analyses de dichroïsme circulaire (Moro *et al.*, 1999). En effet, le spectre DC du maxadilan en milieu aqueux est caractérisé par la présence de deux minima, à 207 et 220 nm. De même, l'analogue des(24-42)maxadilan, dont la majeure portion du segment en brin β a été tronquée, présente également un spectre DC caractéristique d'une structure hélicoïdale, supportant ainsi l'analyse structurale prédictive.

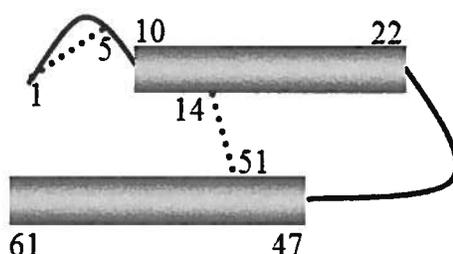


Figure 16: Représentation schématique de la structure du maxadilan obtenue suite à l'analyse prédictive de Chou & Fasman. Les deux fragments hélicoïdaux (10-22 et 47-61) sont schématisés et les ponts disulfures sont représentés en traits pointillés.

Le court domaine N-terminal cyclique du maxadilan n'est pas indispensable pour la liaison et l'activation du récepteur PAC1. Par exemple, le dérivé tronqué des(1-5)maxadilan démontre une affinité envers le récepteur supérieure au peptide natif et une puissance 10 fois inférieure au maxadilan à induire la production d'AMPC dans des cellules PC12 (Moro *et al.*, 1999). À l'opposé, la présence du pont disulfure reliant les deux segments hélicoïdaux est cruciale pour la liaison au récepteur PAC1: les analogues [Ser¹⁴], [Ala⁵¹] et [Ser¹⁴, Ala⁵¹]maxadilan présentant des IC₅₀ supérieures à 100 nM (Moro *et al.*, 1999). Ce lien semble donc déterminant pour maintenir l'intégrité structurale du peptide et ainsi permettre une liaison optimale au récepteur. Par l'introduction de délétions variées, il a été montré que l'enlèvement d'un important segment du brin β , soit les résidus 25 à 41, entraîne une inhibition complète de l'activité biologique du maxadilan sans diminuer son affinité envers le récepteur PAC1 (Moro *et al.*, 1999). Ceci suggère que les résidus responsables de l'activité biologique sont majoritairement situés au cœur du brin β reliant les deux segments hélicoïdaux. Quant aux domaines en hélice α , ils seraient principalement impliqués dans la liaison au

récepteur PAC1. L'analyse de la séquence primaire du maxadilan révèle que celui-ci possède un doublet phénylalanine-thréonine situé au milieu du brin β , en positions 34 et 35. Ce doublet est retrouvé aux positions 6 et 7 chez la majorité des peptides de la superfamille VIP/GRF/Glucagon (Figure 3), suggérant que celui-ci pourrait être crucial dans le maintien de l'activité biologique de ces peptides. Le fragment 25-41 du maxadilan contient aussi 6 thréonines et celles-ci semblent importantes pour l'activation du récepteur PAC1. En effet, des doubles, triples ou quadruples substitutions de ces thréonines par des alanines confèrent une activité antagoniste au maxadilan (Reddy *et al.*, 2006). De même, le remplacement simultané des lysines aux positions 53, 55, 56 et 57 par des alanines bloque la liaison du maxadilan au récepteur PAC1, témoignant ainsi du rôle central du segment C-terminal du maxadilan pour le maintien de son affinité (Reddy *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données suggère que le mode d'activation du récepteur PAC1 par le maxadilan est similaire à celui préalablement décrit pour le PACAP, malgré l'absence d'homologie de séquence significative entre ces deux peptides. À cet égard, la région C-terminale hélicoïdale hautement basique pourrait permettre la liaison du peptide au large domaine extracellulaire du récepteur PAC1. Par la suite, le brin β avec ses nombreux groupements hydroxyliques et carboxyliques, comme retrouvé au niveau de la région N-terminale du PACAP, serait principalement responsable de l'activation du récepteur PAC1.

4.2 Déterminants moléculaires des récepteurs VPAC1 et VPAC2

Des études explorant les effets de délétions variées au niveau de l'extrémité C-terminale du PACAP27 ont dévoilé que les dérivés tronqués du côté C-terminal affichent une affinité supérieure pour le récepteur VPAC1 par rapport au récepteur VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1998; Gourlet *et al.*, 1996c). Par exemple, le dérivé PACAP(1-25) présente une affinité 66 fois plus importante envers le récepteur VPAC1 comparé au récepteur VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1998). De même, les fragments 1-25 et 1-26 du PACAP se comportent comme des agonistes partiels faibles des récepteurs VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1996c). Le fragment 1-25 du VIP démontre également une sélectivité élevée (>100) envers le récepteur VPAC1 (Gourlet *et al.*, 1998). À l'inverse, l'agoniste spécifique du

récepteur VPAC2, l'acétyl-[E⁸,K¹²,Nle¹⁷,A¹⁹,D²⁵,L²⁶,K^{27,28},G^{29,30},T³¹]VIP, ou RO 25-1553, renferme une extrémité C-terminale allongée dont la structure secondaire en hélice α est stabilisée par la présence d'un pont lactame entre les chaînes latérales des résidus lysine-21 et acide aspartique-25 (Bolin *et al.*, 1995). De plus, le prolongement de l'extrémité C-terminale du VIP par une séquence tripeptidique basique (Lys-Arg-Tyr) augmente la sélectivité du VIP pour le récepteur VPAC2 (Yung *et al.*, 2003). Finalement, le segment 28-38 du PACAP contribue au maintien de l'affinité envers le récepteur VPAC2 chez des dérivés du PACAP tronqués à l'extrémité N-terminale. Ce même phénomène n'a pas été observé dans le cas du récepteur VPAC1 (Gourlet *et al.*, 1995). L'ensemble de ces résultats suggère que la structure hélicoïdale chargée positivement retrouvée à l'extrémité C-terminale du PACAP et du VIP semble essentielle pour permettre une interaction efficace avec le récepteur VPAC2. Contrairement au récepteur VPAC2, le récepteur VPAC1 semble tolérant à la réduction et à la déstabilisation de cette hélice.

Pour sa part, la région N-terminale du PACAP apparait cruciale pour permettre une interaction efficace avec le récepteur VPAC1. En effet, la délétion des résidus histidine-1 et sérine-2 chez les deux isoformes du PACAP provoque une perte d'affinité 10 fois plus élevée pour le récepteur VPAC1 que pour le récepteur VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1995). En outre, l'antagoniste du récepteur PAC1 le plus couramment utilisé, soit le PACAP(6-38), possède une affinité 15 fois supérieure envers le récepteur VPAC2 que pour le récepteur VPAC1 (Gourlet *et al.*, 1995). De même, le PACAP(6-38) a été caractérisé comme un agoniste du récepteur VPAC2 présentant une très faible affinité envers le récepteur VPAC1 (Dickenson *et al.*, 1997; Gourlet *et al.*, 1998). Globalement, le récepteur VPAC2 apparait plus tolérant que le récepteur VPAC1 aux modifications effectuées au niveau de la région N-terminale du PACAP. À l'inverse, des délétions successives du domaine N-terminal du VIP ont mené à la caractérisation de fragments C-terminaux démontrant une sélectivité significative envers le récepteur VPAC1 (Gourlet *et al.*, 1998).

Comme mentionné précédemment, la majorité des études de relations structure-activité portant sur les récepteurs VPAC ont été réalisées à l'aide du VIP. Par exemple, contrairement au PACAP, un *Ala-Scan* a été effectué pour le VIP. L'ensemble des 28 analogues ainsi générés ont été testés pour leur capacité à lier et à activer les récepteurs VPAC1 et VPAC2 (Nicole *et al.*, 2000). Notamment, les essais pharmacologiques furent supportés par des études de modélisation moléculaire afin de dégager les variations structurales provenant de la substitution d'un résidu par une alanine et pouvant conduire à une perte indirecte d'activité biologique. Les résultats obtenus par Nicole *et al.* (2000), schématisés à la figure 17, montrent que les pharmacophores du VIP sont hautement similaires pour les deux récepteurs et sont largement distribués sur l'ensemble de la chaîne peptidique. En combinant les résultats des essais biologiques avec les informations tirées de la modélisation moléculaire, les 28 résidus du VIP peuvent être classés en trois groupes distincts : (i) les résidus non-impliqués dans la liaison du VIP, (ii) les résidus impliqués dans la liaison et dans le maintien de la structure secondaire et (iii) les résidus exclusivement impliqués dans la liaison du VIP. Globalement, la substitution des résidus symbolisés par une couleur grise ou jaune à la figure 14 par une alanine a conduit à une perte d'affinité significative. Notamment, le remplacement des résidus thréonine-11 et asparagine-28 par une alanine a conduit à l'identification de deux dérivés du VIP, démontrant une sélectivité importante envers le récepteur VPAC1. De plus, le résidu tyrosine-22 est crucial pour l'activation du récepteur VPAC2 et non pour le maintien d'une interaction optimale avec les deux récepteurs. En combinant ces différentes informations, Nicole *et al.* (2000) ont développé un puissant agoniste sélectif du récepteur VPAC1, soit l'[Ala¹¹, Ala²², Ala²⁸]VIP, présentant une affinité 1000 fois supérieure envers le récepteur VPAC1 par rapport au récepteur VPAC2.

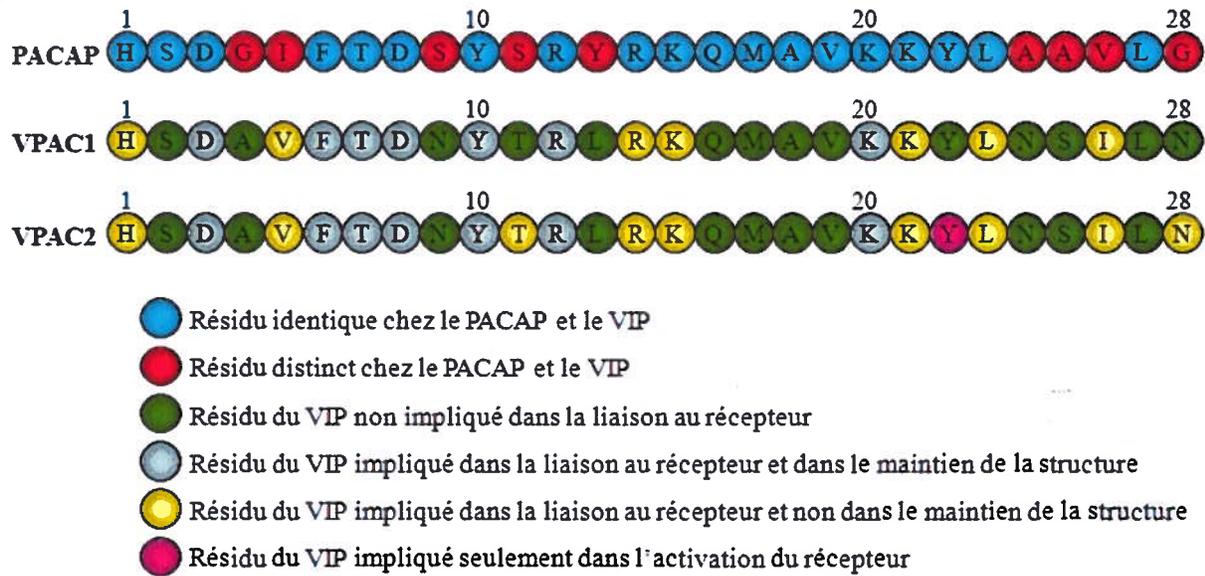


Figure 17: Séquences primaires du PACAP et du VIP présentant les résidus du VIP impliqués dans la liaison aux récepteurs VPAC1 et VPAC2. (Adapté de Nicole *et al.*, 2000)

Préalablement à l'*Ala-Scan* réalisé par Nicole *et al.* (2000), ce type d'approche expérimentale avait été effectué à l'aide d'un super-agoniste du VIP, soit l'acétyl-[Cys¹², Nle¹⁷, Val²⁶, Thr²⁸]VIP (Ro 23-7059) développé à la fin des années 80. Par le biais d'essais pharmacologiques utilisant les muscles lisses de la trachée de cobaye, O'Donnell *et al.* (1991) ont démontré que les principaux pharmacophores du Ro 23-7059 sont les résidus acide aspartique-3, phénylalanine-6, thréonine-7, tyrosine-10, tyrosine-22 et leucine-23. Il importe de mentionner que les deux récepteurs VPAC1 et VPAC2 sont abondamment exprimés dans la trachée de cobaye (Ishihara *et al.*, 1992). Conséquemment, cette étude ne peut discriminer adéquatement les deux types de récepteurs de la classe II. Nonobstant l'homologie de séquence élevée existant entre le VIP et le PACAP, la transposition directe des résultats des études de relations structure-activité obtenus pour le VIP au PACAP se doit d'être effectuée avec précaution et discernement. En effet, des modifications précises appliquées au VIP peuvent avoir des effets opposés lorsque celles-ci sont apposées au PACAP. Par exemple, le récepteur VPAC2 présente une affinité envers le dérivé VIP(1-26) 75 fois supérieure à celle observée pour le fragment 1-26 du PACAP (Goulet *et al.*, 1998).

4.2.1 Études structurales du récepteur VPAC1

Les trois récepteurs du PACAP présentent une forte homologie de séquence ainsi que des caractéristiques moléculaires et structurales similaires. Par exemple, quatre-vingt-trois résidus sont entièrement conservés chez ces récepteurs (Laburthe *et al.*, 1999). Des récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1, seul le récepteur VPAC1 a été abondamment étudié à l'aide de diverses approches expérimentales telles que la mutagenèse dirigée, la construction de récepteurs chimériques, l'étude des complexes ligand-récepteur par le biais du photomarquage ainsi que la modélisation moléculaire. En considérant la forte homologie de séquence existant entre les domaines N-terminaux des récepteurs VPAC1 et PAC1 (Figure 18), le récepteur VPAC1 apparaît comme un modèle valable permettant de mieux comprendre les composantes structurales du récepteur PAC1 impliquées dans la liaison du PACAP.

VPAC1 ⁶³CSKMWDNLT**C**WPATPRGQV**V**VLA**C**PLIFKL**F**SSI**Q**GRN-----**V**SR**S**CTDEGWTHLEPGPYPIA**C**GLDDKAA¹²⁹
PAC1 ⁵³CPGMWDNIT**C**WKFAQVGEM**V**LV**S**CE**V**FR**I**FNP**D**Q**V**WM--**V**GR**N**CTEDGWSEPPF**H**Y**F**DA**C**GFDDYEP¹⁴⁰

Figure 18: Alignement des séquences des domaines N-terminaux des récepteurs VPAC1 et PAC1. Les résidus cruciaux pour la liaison du VIP au récepteur VPAC1 et communs aux deux récepteurs sont représentés en vert. Les résidus conservés chez les deux récepteurs sont représentés en bleu. Les cystéines conservées sont représentées en rouge. (Adapté de Couvineau *et al.*, 1995)

Les études de mutagenèse dirigée effectuées au cours des années 90 ont dévoilé que les résidus acide aspartique-68, tryptophane-73, proline-87, glycine-109 et tryptophane-110 du domaine N-terminal du récepteur VPAC1 sont cruciaux pour la liaison du VIP au récepteur VPAC1 (Couvineau *et al.*, 1995). Ces résidus sont également présents au niveau du récepteur PAC1 (représentés en vert à la Figure 18). Les acides aminés acide glutamique-36, tryptophane-67, proline-115 et lysine-143, tous hautement conservés chez les récepteurs de la classe B, semblent également cruciaux pour la liaison du VIP (Laburthe & Couvineau, 2002). En outre, la présence des six cystéines du domaine N-terminal qui sont totalement conservées chez l'ensemble des RCPG de la classe B, est essentielle pour permettre l'interaction entre le VIP et le récepteur VPAC1 (Gaudin *et al.*, 1995). Ce résultat suggère que l'intégrité de la structure tridimensionnelle

du domaine N-terminal, stabilisée par la présence de trois ponts disulfures, est importante pour la liaison du VIP. De plus, les résidus cruciaux pour la liaison du VIP sont largement dispersés sur l'ensemble de la séquence du domaine N-terminal (Figure 16), suggérant que leur distribution spatiale pourrait jouer un rôle clé dans la liaison du VIP au récepteur. À cet effet, l'équipe du Professeur Laburthe a procédé à la modélisation moléculaire par homologie du domaine N-terminal du récepteur VPAC1 en se basant sur une région de la lipase B démontrant une homologie de séquence significative et dont la structure était disponible (Lins *et al.*, 2001). Ce modèle expose que les résidus acide glutamique-36, tryptophane-67, acide aspartique-68, tryptophane-73 et glycine-109 forment un sillon chargé négativement. Cette cavité fût initialement considérée comme étant la pochette de liaison du VIP (Lins *et al.*, 2001). De même, certains résidus tryptophane, préalablement caractérisés comme étant essentiels pour la liaison du peptide au récepteur, se retrouvent au sommet de ce creux anionique et cet environnement hydrophobe pourrait servir de site d'ancrage initial au VIP (Lins *et al.*, 2001). Toutefois, ce modèle structural présente une lacune puisque nonobstant l'homologie de séquence considérable entre cette portion de la lipase B et le domaine N-terminal de VPAC1, ces deux fragments protéiques font partie de protéines montrant des structures éloignées et des fonctions biologiques distinctes.

Plus récemment, la modélisation du domaine N-terminal du récepteur VPAC1 a été développée en s'appuyant sur la structure sous contraintes RMN du domaine N-terminal du récepteur CRF-2 β , un RCPG de la classe B (Grace *et al.*, 2004). La structure du domaine N-terminal de VPAC1 obtenue à l'aide de ce modèle contient quatre brins β et est stabilisée par la présence de trois ponts disulfures et par une liaison ionique impliquant les résidus acide aspartique-68 et arginine-103 (Tan *et al.*, 2006). Ce pont salin se retrouve entre les groupements aromatiques portés par les chaînes latérales des résidus tryptophanes 73 et 110 et dont les interactions hydrophobes contribuent au maintien de cette conformation. Ces résidus qui stabilisent la structure tridimensionnelle du domaine N-terminal avaient été préalablement caractérisés au moyen de la mutagénèse dirigée comme étant essentiels pour permettre la liaison du VIP au récepteur VPAC1.

Conséquemment, il semble que l'intégrité de la conformation du fragment extracellulaire constitue un élément essentiel pour la liaison du VIP au récepteur VPAC1.

L'ensemble des études de photomarquage a révélé que le VIP se lie exclusivement au domaine N-terminal du récepteur VPAC1. En effet, par le biais d'incorporations ciblées du groupement photoréactif benzophénone aux positions 6, 22 et 28 du VIP, il a été démontré que ces résidus se lient aux fragments 104-108, 109-120 et 121-133 du récepteur VPAC1, respectivement (Tan *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2003; Ceraudo *et al.*, 2008a). Particulièrement, les principaux points de contact physique entre le segment N-terminal du VIP et le récepteur VPAC1, se retrouvent uniquement au niveau du domaine N-terminal extracellulaire (fragment 130-137) et aucun contact direct avec des domaines transmembranaires ou des boucles extracellulaires n'a été observé (Ceraudo *et al.*, 2008b). En combinant le modèle structural par homologie du domaine N-terminal avec les contraintes physiques provenant des études de marquage par photoaffinité, différents modèles d'ancrage (*docking*) furent développés (Tan *et al.*, 2006; Ceraudo *et al.*, 2008a). Globalement, le fragment hélicoïdal du VIP se fixe parallèlement aux brins β antiparallèles positionnant ainsi la région N-terminale du VIP vers l'interface récepteur/membrane (Laburthe *et al.*, 2007). Ce modèle de *docking* converge vers le modèle d'activation des RCPG de la classe B à deux domaines préalablement décrit (Hoare *et al.*, 2005). Toutefois, il semble que la portion N-terminale du VIP n'interagit pas physiquement avec le corps du récepteur VPAC1, comme supposé dans le modèle à deux domaines et observé dans le cas des récepteurs PTH-1 et de la sécrétine (Gensure *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006a).

Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor

Steve Bourgault^{a,b,d}, David Vaudry^{b,d}, Béatrice Botia^{b,d}, Alain Couvineau^c,
Marc Laburthe^c, Hubert Vaudry^b, Alain Fournier^d

^aINRS – Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique
^bLaboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, INSERM U413, Université de Rouen
^cCentre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon, INSERM U773, Faculté de Médecine Xavier Bichat
^dLaboratoire International Associé INSERM-INRS Samuel de Champlain

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Article publié dans la revue *Peptides*, vol. 29, p. 919-932, 2008.

DOI:10.1016/j.peptides.2008.01.022

Résumé de l'article en français

Le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), un neuropeptide composé de 27 ou de 38 acides aminés, montre un potentiel thérapeutique pour le traitement d'états physiopathologiques reliés aux maladies neurodégénératives. Toutefois, son utilisation à des fins thérapeutiques est actuellement limitée par sa faible biodisponibilité et sa dégradation rapide. Conséquemment, des analogues métaboliquement stables du PACAP représentent des outils prometteurs afin d'étudier les rôles physiologiques du PACAP et de valider son utilité dans certaines conditions cliniques. Lors de cette étude, des dérivés du PACAP27 et du PACAP38 ont été rationnellement conçus afin de développer des agonistes du récepteur PAC1 résistants à l'action des peptidases. Les résultats montrent que des modifications introduites au niveau de l'extrémité N-terminale confèrent au peptide une résistance face à l'action de la dipeptidyl peptidase IV, un processus protéolytique majeur impliqué dans la dégradation du PACAP. De plus, l'incubation *in vitro* des deux isoformes du PACAP dans du plasma humain a révélé que le PACAP38 est rapidement métabolisé, avec une demi-vie de moins de 5 minutes, tandis que le PACAP27 est stable dans ces mêmes conditions expérimentales. De ce fait, après avoir identifié les principaux métabolites plasmatiques, le PACAP38 a été modifié aux sites de clivage potentiels par les endopeptidases et les carboxypeptidases. Tous les analogues peptidiques ont été testés pour leur capacité à lier le récepteur PAC1, ainsi que pour leur potentiel à induire la mobilisation calcique et à inhiber la prolifération des cellules PC12 via l'activation du récepteur PAC1. Cette approche a conduit à l'identification de deux composés prometteurs, l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]PACAP38-propylamide et l'acétyl-PACAP27-propylamide qui démontrent une stabilité métabolique améliorée et une activité biologique similaire au peptides natifs. Cette étude présente des données originales concernant le métabolisme du PACAP dans le plasma humain et décrit le développement d'un analogue du PACAP38 métaboliquement stable, l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]PACAP38-propylamide, ce dernier apparaît dans nos paradigmes comme un super-agoniste du récepteur PAC1.

Contribution de l'étudiant

La majorité du travail en laboratoire a été effectuée par Steve Bourgault. Le manuscrit a été rédigé et soumis par Steve Bourgault. Béatrice Botia, lors d'un stage de quatre semaines à l'INRS–Institut Armand-Frappier a participé à la synthèse de deux analogues et a contribué à la réalisation des essais de liaisons compétitives. Alain Couvineau et Marc Laburthe ont participé à ce travail en fournissant la lignée cellulaire CHO transfectée avec le récepteur PAC1, développée dans leur laboratoire. Hubert Vaudry a collaboré à cet article en corrigeant le manuscrit. David Vaudry et Alain Fournier ont supervisé les travaux, émis certaines hypothèses permettant de discuter d'éléments clés du travail et ont corrigé le manuscrit.

Biological and Structural Analysis of Truncated Analogs of PACAP27

Steve Bourgault^{a,b,c}, David Vaudri^{a,c}, Laure Guilhaud^{a,d}, Émilie Raoul^{b,c}, Alain Couvineau^e, Marc Laburthe^e, Isabelle Ségalas-Milazzod^e, Hubert Vaudri^{a,c} and Alain Fournier^{a,c}

^aINRS - Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique

^bLaboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, INSERM U413, Université de Rouen

^cLaboratoire International Associé INSERM-INRS Samuel de Champlain

^dCNRS UMR 6014 COBRA, Université de Rouen

^eCentre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon, INSERM U773, Faculté de Médecine Xavier Bichat

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Article publié dans *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 36, p. 260-269, 2008.

DOI : 10.1007/s12031-008-9081-7

Résumé de l'article en français

L'affinité de liaison envers le récepteur PAC1, l'activité biologique et le contenu en hélice α de nombreux analogues tronqués du PACAP27 ont été évalués. Premièrement, nous avons évalué les paramètres pharmacologiques et structuraux de fragments du PACAP réduits à l'extrémité C-terminale, de PACAP(1-23) à PACAP(1-19). Tous les dérivés tronqués à l'extrémité C-terminale ont montré des spectres de dichroïsme circulaire typiques d'une conformation hélicoïdale. Lors de la réduction progressive du domaine C-terminal, nous avons observé une diminution graduelle de la capacité du PACAP27 à lier et à activer le récepteur PAC1. Par conséquent, cette diminution de l'activité biologique a été principalement attribuée à l'enlèvement de résidus qui interagissent directement avec le récepteur et non à une déstabilisation de la conformation hélicoïdale du domaine C-terminal. Nous avons également analysé les caractéristiques pharmacologiques et conformationnelles d'analogues hybrides du PACAP27 contenant un espaceur aliphatique connectant le domaine N-terminal à la région C-terminale. Cette stratégie a révélé qu'aucun de ces analogues discontinus ne possède une affinité importante envers le récepteur PAC1, malgré que certains de ces dérivés aient présenté des spectres de dichroïsme circulaire typiques d'une structure en hélice α . Les résultats de cette étude suggèrent que de nombreux domaines du PACAP27 sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur PAC1 et que la présence d'une conformation en hélice α ne constitue pas une composante suffisante pour permettre l'activation du récepteur.

Contribution de l'étudiant

La majorité du travail en laboratoire a été effectuée par Steve Bourgault. Le manuscrit a été rédigé et soumis par Steve Bourgault. Émilie Raoult, lors d'un stage de trois semaines à l'INRS–Institut Armand-Frappier, a participé à la synthèse, à la purification et à la caractérisation des analogues hybrides du PACAP27. Laure Guilhaudis a fourni une aide technique lors de l'analyse des peptides par dichroïsme circulaire. Laure Guilhaudis a également participé à la correction de la partie de l'article concernant l'analyse structurale. Alain Couvineau et Marc Laburthe ont participé à ce travail en fournissant la lignée cellulaire CHO transfectée avec le récepteur PAC1, développée dans leur laboratoire. Hubert Vaudry a collaboré à cet article en corrigeant le manuscrit. David Vaudry et Alain Fournier ont supervisé les travaux, émis certaines hypothèses permettant de discuter d'éléments clés du travail et ont corrigé le manuscrit.

Molecular and Conformational Determinants of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) for Activation of the PAC1 Receptor

Steve Bourgault^{a,b,c}, David Vaudri^c, Isabelle Ségalas-Milazzod, Laure Guilhaudis^d,
Alain Couvineau^e, Marc Laburthe^e, Hubert Vaudri^c et Alain Fournier^{a,c}

^aINRS - Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique

^bLaboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, INSERM U413, Université de Rouen

^cLaboratoire International Associé INSERM-INRS Samuel de Champlain

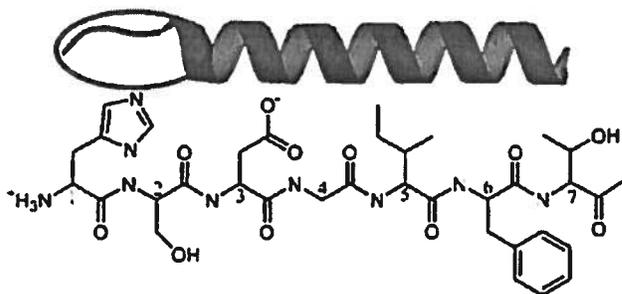
^dCNRS UMR 6014 COBRA, Université de Rouen

^eCentre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon, INSERM U773, Faculté de Médecine Xavier Bichat

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Article publié dans *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 52, p.3308-3316, 2009.

DOI: 10.1021/jm900291j



Résumé de l'article en français

Le récepteur PAC1 est abondamment exprimé au niveau du système nerveux central où il agit sur la survie neuronale. Afin d'identifier les déterminants moléculaires et les composantes conformationnelles responsables de l'activation du récepteur PAC1, une étude de relations structure-activité ciblant le domaine N-terminal de son ligand endogène, le PACAP, a été entreprise. Les résidus Asp³ et Phe⁶ ont été identifiés comme d'importants pharmacophores du récepteur PAC1. Cette étude de relations structure-activité, supportée par des analyses structurales par spectroscopie RMN, suggère que le segment N-terminal du PACAP (résidus 1 à 4) adopte une conformation spécifique similaire à celle retrouvée chez un coude lorsque le PACAP active le récepteur PAC1. De plus, l'intégrité de l'hélice α observée aux positions 5 à 7 apparaît cruciale pour le maintien d'une haute affinité envers le récepteur PAC1. Cette approche a également conduit à l'identification de nouveaux superagonistes, comme le [Bip⁶]PACAP27 et d'un puissant antagoniste, [Sar⁴]PACAP38. La conformation bioactive suggérée par les résultats de cette étude pourrait constituer une base moléculaire adéquate supportant la conception d'agonistes nonpeptidiques du récepteur PAC1.

Contribution de l'étudiant

La majorité du travail en laboratoire a été effectuée par Steve Bourgault. Le manuscrit a été rédigé et soumis par Steve Bourgault. Laure Guilhaudis a procédé aux acquisitions de spectroscopie RMN et a corrigé la portion de l'article concernant la méthodologie des études structurales. Isabelle Ségalas-Milazzo a contribué à la modélisation moléculaire sous contraintes RMN et a participé à la rédaction de la partie de l'article concernant l'analyse structurale. Alain Couvineau et Marc Laburthe ont participé à ce travail en fournissant la lignée cellulaire CHO transfectée avec le récepteur PAC1, développée dans leur laboratoire. Hubert Vaudry a collaboré à cet article en corrigeant le manuscrit. David Vaudry et Alain Fournier ont supervisé les travaux, émis certaines hypothèses permettant de discuter d'éléments clés du travail et ont corrigé le manuscrit.

Supporting Information

Molecular and Conformational Determinants of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) for Activation of the PAC1 Receptor

Steve Bourgault, David Vaudry, Isabelle Ségalas-Milazzo, Laure Guilhaudis, Alain Couvineau, Marc Laburthe, Hubert Vaudry and Alain Fournier

Table of Contents

Table 1. Analytical Data Obtained by MALDI-TOF Spectrometry and by RP-HPLC for PACAP and PACAP Analogs.....	103
Table 2. ¹ H Chemical Shifts of PACAP27 (1 mM) in 10% D ₂ O/H ₂ O in Presence of 100 mM of DPC-d ₃₈ at pH 3.5 and 297 K, with DSS as an Internal ¹ H Chemical Shift Reference.....	105
Table 3. ¹ H Chemical Shifts of [Pro ²]PACAP27 (1 mM) in 10% D ₂ O/H ₂ O in Presence of 100 mM of DPC-d ₃₈ at pH 3.5 and 297 K, with DSS as an Internal ¹ H Chemical Shift Reference.....	106
Table 4. ¹ H Chemical Shifts of [D-Pro ²]PACAP27 (1 mM) in 10% D ₂ O/H ₂ O in Presence of 100 mM of DPC-d ₃₈ at pH 3.5 and 297 K, with DSS as an Internal ¹ H Chemical Shift Reference.....	107
Figure 1. Summary of NOE connectivities observed for PACAP27. The thickness of the lines reflects the intensity of the sequential NOE connectivities that is weak, medium or strong.....	108
Figure 2. Summary of NOE connectivities observed for [Pro ²]PACAP27. The thickness of the lines reflects the intensity of the sequential NOE connectivities that is weak, medium or strong.....	109
Figure 3. Summary of NOE connectivities observed for [D-Pro ²]PACAP27. The thickness of the lines reflects the intensity of the sequential NOE connectivities that is weak, medium or strong.....	110

Table 1. Analytical Data Obtained by MALDI-TOF Spectrometry and by RP-HPLC for PACAP and PACAP Analogs.

no	Compound	Mass		t _{rt} (min)
		Calculate d (Da)	Observed (Da)	
1	PACAP27	3147.6	3147.9	20.33
2	PACAP38	4534.3	4536.2	18.27
3	[Ala ¹]PACAP27	3081.5	3081.6	20.39
4	[Ala ¹]PACAP38	4467.9	4469.1	18.42
5	[Ala ²]PACAP27	3131.6	3132.0	20.30
6	[Ala ²]PACAP38	4518.3	4519.3	18.20
7	[Ala ³]PACAP27	3103.6	3105.4	20.20
8	[Ala ³]PACAP38	4490.3	4492.0	18.15
9	[Ala ⁴]PACAP27	3161.6	3161.6	20.18
10	[Ala ⁴]PACAP38	4548.3	4550.5	18.08
11	[Ala ⁵]PACAP27	3105.6	3106.3	19.81
12	[Ala ⁵]PACAP38	4492.2	4495.1	17.78
13	[Ala ⁶]PACAP27	3076.5	3077.7	19.63
14	[Ala ⁶]PACAP38	4458.2	4459.7	17.62
15	[Ala ⁷]PACAP27	3117.6	3117.8	20.33
16	[Ala ⁷]PACAP38	4504.3	4506.2	18.28
17	[D-His ¹]PACAP27	3147.6	3147.5	20.30
18	[D-His ¹]PACAP38	4534.3	4535.4	18.22
19	[D-Ser ²]PACAP27	3147.6	3147.9	20.33
20	[D-Ser ²]PACAP38	4534.3	4535.8	18.20
21	[D-Asp ³]PACAP27	3147.6	3148.0	20.25
22	[D-Asp ³]PACAP38	4534.3	4535.2	18.18
23	[D-Ile ⁵]PACAP27	3147.6	3148.7	20.52
24	[D-Ile ⁵]PACAP38	4534.3	4536.3	18.42
25	[D-Phe ⁶]PACAP27	3147.6	3148.1	20.58
26	[D-Phe ⁶]PACAP38	4534.3	4534.9	18.45
27	[D-Thr ⁷]PACAP27	3147.6	3147.7	20.05
28	[D-Thr ⁷]PACAP38	4534.3	4537.0	18.00
29	[N-Me-Ser ²]PACAP27	3151.6	3152.7	20.05
30	[N-Me-Ser ²]PACAP38	4549.3	4550.1	17.93
31	[N-Me-Asp ³]PACAP27	3151.6	3152.5	20.02
32	[N-Me-Asp ³]PACAP38	4549.3	4550.4	17.93
33	[Sar ⁴]PACAP27	3151.6	3151.9	20.03
34	[Sar ⁴]PACAP38	4549.3	4552.3	17.90
35	[N-Me-Ile ⁵]PACAP27	3151.6	3152.0	19.75
36	[N-Me-Ile ⁵]PACAP38	4549.3	4551.6	17.55
37	[N-Me-Phe ⁶]PACAP27	3151.6	3151.3	20.07
38	[N-Me-Phe ⁶]PACAP38	4549.3	4551.0	17.52
39	[N-Me-Thr ⁷]PACAP27	3151.6	3152.9	19.83

40	[N-Me-Thr ⁷]PACAP38	4549.3	4553.6	17.52
41	Ac-PACAP27	3189.6	3190.7	20.50
42	Ac-PACAP38	4576.3	4578.3	18.22
43	[His(1-Me) ¹]PACAP27	3151.6	3152.2	20.03
44	[His(1-Me) ¹]PACAP38	4549.3	4550.5	17.97
45	[His(3-Me) ¹]PACAP27	3151.6	3152.8	19.98
46	[His(3-Me) ¹]PACAP38	4549.3	4551.0	17.92
47	[Asn ³]PACAP27	3146.7	3148.0	19.92
48	[Asn ³]PACAP38	4533.3	4536.7	17.85
49	[Glu ³]PACAP27	3161.6	3161.4	19.97
50	[Glu ³]PACAP38	4548.3	4549.9	17.95
51	[Aad ³]PACAP27	3175.6	3177.1	20.00
52	[Aad ³]PACAP38	4562.3	4564.6	17.97
53	[Cha ⁶]PACAP27	3153.6	3155.9	20.50
54	[Cha ⁶]PACAP38	4540.3	4542.4	18.42
55	[Tyr ⁶]PACAP27	3163.6	3164.5	19.55
56	[Tyr ⁶]PACAP38	4550.3	4553.0	17.50
57	[Bip ⁶]PACAP27	3224.6	3224.6	21.27
58	[Bip ⁶]PACAP38	4611.3	4613.6	18.98
59	[Nal ⁶]PACAP27	3197.6	3199.1	20.65
60	[Nal ⁶]PACAP38	4584.3	4585.7	18.47
61	[Pro ²]PACAP27	3157.7	3158.4	20.08
62	[Pro ²]PACAP38	4544.3	4546.2	18.05
63	[Hyp ²]PACAP27	3173.7	3174.9	20.15
64	[Hyp ²]PACAP38	4560.4	4562.0	17.93
65	[D-Pro ²]PACAP27	3157.7	3158.8	20.10
66	[D-Pro ²]PACAP38	4544.3	4545.8	18.03
67	[Aib ²]PACAP27	3146.6	3147.5	20.23
68	[Aib ²]PACAP38	4533.3	4535.3	18.13
69	[Aib ⁴]PACAP27	3175.6	3176.8	20.07
70	[Aib ⁴]PACAP38	4562.3	4564.4	18.02
71	[γ-lactam ^{4,5}]PACAP27	3174.9	3176.1	20.56
72	[γ-lactam ^{4,5}]PACAP38	4561.6	4563.9	18.31
73	[Ind ⁶]PACAP27	3145.6	3147.0	19.57
74	[Ind ⁶]PACAP38	4532.3	4532.2	17.53
75	[Tic ⁶]PACAP27	3157.6	3157.6	19.83
76	[Tic ⁶]PACAP38	4544.4	4545.1	17.82
77	[Tiq ⁶]PACAP27	3145.6	3145.9	19.75
78	[Tiq ⁶]PACAP38	4532.3	4534.1	18.28
79	[Disc ⁶]PACAP27	3157.6	3158.5	19.57
80	[Disc ⁶]PACAP38	4544.4	4547.4	17.55
81	PACAP(6-38)	3980.0	3981.7	17.02

Table 2. ^1H Chemical Shifts of PACAP27 (1 mM) in 10% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ in Presence of 100 mM of DPC- d_{38} at pH 3.5 and 297 K, with DSS as an Internal ^1H Chemical Shift Reference.

<i>Residue</i>	<i>NH</i>	<i>CαH</i>	<i>CβH</i>	<i>Others</i>
His-1		4.37	3.42	C ϵ H : 7.46 C δ H : 8.68
Ser-2	8.99	4.56	3.88	
Asp-3	8.85	4.79	2.90	
Gly-4	8.45	4.00		
Ile-5	8.23	3.98	1.73	C γ H : 1.05 C η H : 0.77 C δ H : 0.60 C δ H : 7.28 C ϵ H : 7.22 C ζ H : 7.22 C η H : 1.24
Phe-6	8.29	4.58	3.24 – 3.09	C δ H : 7.06 C ϵ H : 7.80
Thr-7	8.06	4.15	4.23	
Asp-8	8.53	4.62	2.85	
Ser-9	8.13	4.27	3.90 – 3.82	
Tyr-10	8.31	4.34	3.10 – 3.01	C δ H : 7.06 C ϵ H : 7.80
Ser-11	8.15	4.05	3.99 – 3.92	
Arg-12	7.92	4.00	1.77 – 1.68	C δ H : 3.08 C γ H : 1.45 – 1.36 N ϵ H : 7.3
Tyr-13	7.92	4.38	3.10 – 2.95	C δ H : 7.07 C ϵ H : 6.80 C δ H : 3.10
Arg-14	8.03	3.96	1.72 – 1.57	C γ H : 1.38 – 1.30 N ϵ H : 7.46 C η H : 1.55 – 1.40 C δ H : 1.65 C ζ H : 2.94 N ζ H : 7.68 C η H : 2.40 N ϵ H : 7.35 – 6.87 C γ H : 2.56 – 2.47 C ϵ H : 2.03
Lys-15	7.81	4.18	1.85	C γ H : 1.09 C η H : 0.99
Gln-16	8.06	4.15	2.17	C γ H : 1.65 – 1.38 C δ H : 1.74 C ζ H : 2.91 N ζ H : 7.83
Met-17	8.12	4.27	2.08	C γ H : 1.36 – 1.25 C δ H : 1.61 C ϵ H : 2.88 N ζ H : 7.58 C δ H : 7.05 C ϵ H : 6.78
Ala-18	8.17	4.32	1.49	C η H : 1.49 C δ H : 0.90
Val-19	8.07	3.78	2.25	C γ H : 1.09 C η H : 0.99
Lys-20	8.37	3.86	1.90	C γ H : 1.65 – 1.38 C δ H : 1.74 C ζ H : 2.91 N ζ H : 7.83
Lys-21	7.95	4.01	1.87	C γ H : 1.36 – 1.25 C δ H : 1.61 C ϵ H : 2.88 N ζ H : 7.58 C δ H : 7.05 C ϵ H : 6.78
Tyr-22	7.84	4.31	3.08	C η H : 1.49 C δ H : 0.90
Leu-23	8.30	4.03	1.94	C γ H : 0.97 C η H : 0.94 C η H : 1.57 C δ H : 0.88
Ala-24	8.20	3.97	1.48	
Ala-25	7.53	4.14	1.51	
Val-26	7.63	3.93	2.10	
Leu-27	7.83	4.21	1.79	
CONH $_2$	7.01			

Table 3. ^1H Chemical Shifts of $[\text{Pro}^2]\text{PACAP27}$ (1 mM) in 10% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ in Presence of 100 mM of DPC- d_{38} at pH 3.5 and 297 K, with DSS as an Internal ^1H Chemical Shift Reference.

<i>Residue</i>	<i>NH</i>	<i>CαH</i>	<i>CβH</i>	<i>Others</i>
His-1		4.66	3.44 – 3.38	C ϵ H : 7.52 C δ H : 8.73 C γ H : 2.03 C δ H : 3.85 – 3.48
Pro-2		4.58	2.38 – 1.97	
Asp-3	8.90	4.78	2.91	
Gly-4	8.45	4.00		
Ile-5	8.18	3.99	1.72	C γ H : 1.04 C γ H : 0.77 C δ H : 0.61 C δ H : 7.28 C ϵ H : 7.22 C ϵ H : 7.22 C γ H : 1.23
Phe-6	8.35	4.59	3.24 – 3.09	
Thr-7	8.06	4.16	4.24	
Asp-8	8.51	4.63	2.86	
Ser-9	8.14	4.28	3.88 – 3.80	
Tyr-10	8.30	4.35	3.10 – 3.01	C δ H : 7.06 C ϵ H : 7.80
Ser-11	8.14	4.06	3.99 – 3.92	
Arg-12	7.93	4.00	1.77 – 1.68	C γ H : 1.45 – 1.36 C δ H : 3.08 N ϵ H : 7.30 C δ H : 7.07 C ϵ H : 6.80
Tyr-13	7.92	4.38	3.10 – 2.95	C δ H : 1.38 – 1.30 C δ H : 3.10 N ϵ H : 7.46
Arg-14	8.03	3.96	1.72 – 1.57	C γ H : 1.55 – 1.40 C δ H : 1.65 C ϵ H : 2.94 N ϵ H : 7.68 C γ H : 2.40
Lys-15	7.81	4.18	1.85	N ϵ H : 7.35 – 6.87 C γ H : 2.56 – 2.47 C ϵ H : 2.03
Gln-16	8.06	4.15	2.17	
Met-17	8.12	4.27	2.08	C γ H : 1.09 C γ H : 0.99
Ala-18	8.16	4.33	1.49	C γ H : 1.65 – 1.38 C δ H : 1.74 C ϵ H : 2.91 N ϵ H : 7.83
Val-19	8.07	3.78	2.25	C γ H : 1.36 – 1.25 C δ H : 1.61 C ϵ H : 2.88 N ϵ H : 7.58
Lys-20	8.37	3.86	1.90	C δ H : 7.05 C ϵ H : 6.78 C γ H : 1.49 C δ H : 0.90
Lys-21	7.95	4.01	1.87	
Tyr-22	7.84	4.31	3.08	
Leu-23	8.30	4.03	1.94	
Ala-24	8.20	3.97	1.48	
Ala-25	7.53	4.14	1.51	
Val-26	7.63	3.93	2.10	C γ H : 0.97 C γ H : 0.94 C γ H : 1.57 C δ H : 0.88
Leu-27	7.83	4.21	1.79	
CONH $_2$	7.01			

Table 4. ^1H Chemical Shifts of $[\text{D-Pro}^2]\text{PACAP27}$ (1 mM) in 10% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ in Presence of 100 mM of DPC- d_{38} at pH 3.5 and 297 K, with DSS as an Internal ^1H Chemical Shift Reference.

<i>Residue</i>	<i>NH</i>	<i>CαH</i>	<i>CβH</i>	<i>Others</i>
His-1		4.66	3.37	C ϵ H : 7.48 C δ H : 8.71 C γ H : 2.08 C δ H : 3.87 – 3.48
D-Pro-2		4.50	2.25 – 1.97	
Asp-3	8.98	4.64	2.92 – 2.81	
Gly-4	8.36	4.04 – 3.96		
Ile-5	8.15	3.99	1.72	C γ H : 1.04 C γ H : 0.78 C δ H : 0.59 C δ H : 7.28 C ϵ H : 7.22 C ϵ H : 7.22 C γ H : 1.23
Phe-6	8.25	4.62	3.25 – 3.09	
Thr-7	8.02	4.16	4.25	
Asp-8	8.53	4.63	2.85	
Ser-9	8.12	4.28	3.89 – 3.80	
Tyr-10	8.31	4.36	3.10 – 3.01	C δ H : 7.06 C ϵ H : 7.80
Ser-11	8.15	4.07	3.99 – 3.92	
Arg-12	7.93	4.01	1.77 – 1.68	C γ H : 1.45 – 1.36 C δ H : 3.07 N ϵ H : 7.30 C δ H : 7.07 C ϵ H : 6.80
Tyr-13	7.92	4.39	3.10 – 2.96	
Arg-14	8.02	3.97	1.72 – 1.57	C γ H : 1.38 – 1.30 C δ H : 3.10 N ϵ H : 7.47
Lys-15	7.81	4.19	1.86	C γ H : 1.55 – 1.40 C δ H : 1.66 C ϵ H : 2.95 N ϵ H : 7.68 C γ H : 2.39
Gln-16	8.06	4.14	2.17	N ϵ H : 7.35 – 6.87 C γ H : 2.57 – 2.48 C ϵ H : 2.01
Met-17	8.12	4.27	2.08	
Ala-18	8.16	4.33	1.49	
Val-19	8.07	3.78	2.25	C γ H : 1.09 C γ H : 0.99
Lys-20	8.37	3.86	1.90	C γ H : 1.65 – 1.38 C δ H : 1.74 C ϵ H : 2.91 N ϵ H : 7.83
Lys-21	7.95	4.01	1.87	C γ H : 1.36 – 1.25 C δ H : 1.61 C ϵ H : 2.88 N ϵ H : 7.58 C δ H : 7.05 C ϵ H : 6.78 C γ H : 1.49 C δ H : 0.90
Tyr-22	7.84	4.31	3.08	
Leu-23	8.30	4.03	1.94	
Ala-24	8.20	3.97	1.48	
Ala-25	7.53	4.14	1.51	
Val-26	7.63	3.93	2.10	C ϵ H : 0.97 C γ H : 0.92 C γ H : 1.57 C δ H : 0.88
Leu-27	7.83	4.21	1.78	
CONH $_2$	7.01			

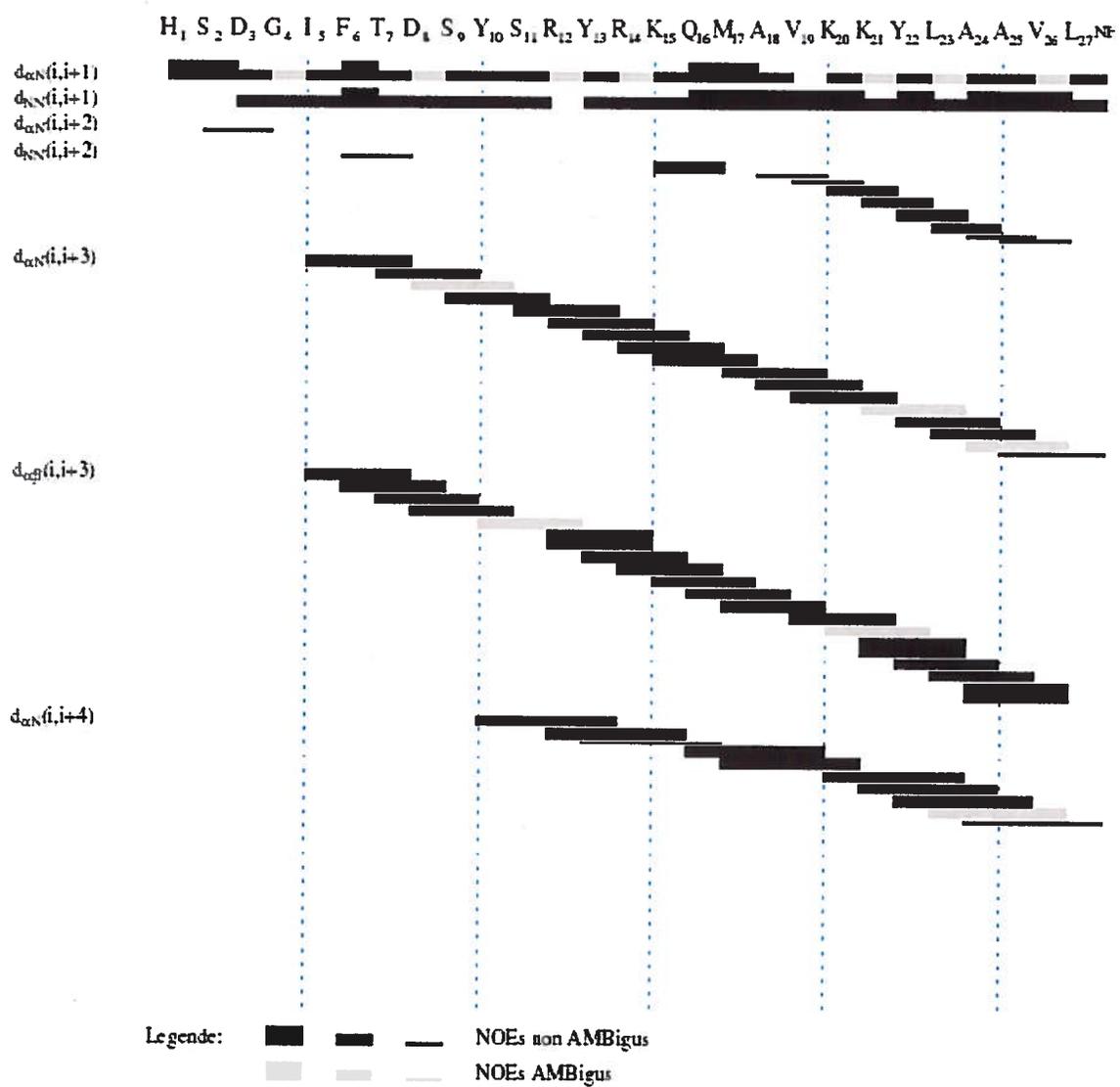


Figure 1. Summary of NOE connectivities observed for PACAP27. The thickness of the lines reflects the intensity of the sequential NOE connectivities that is weak, medium or strong.

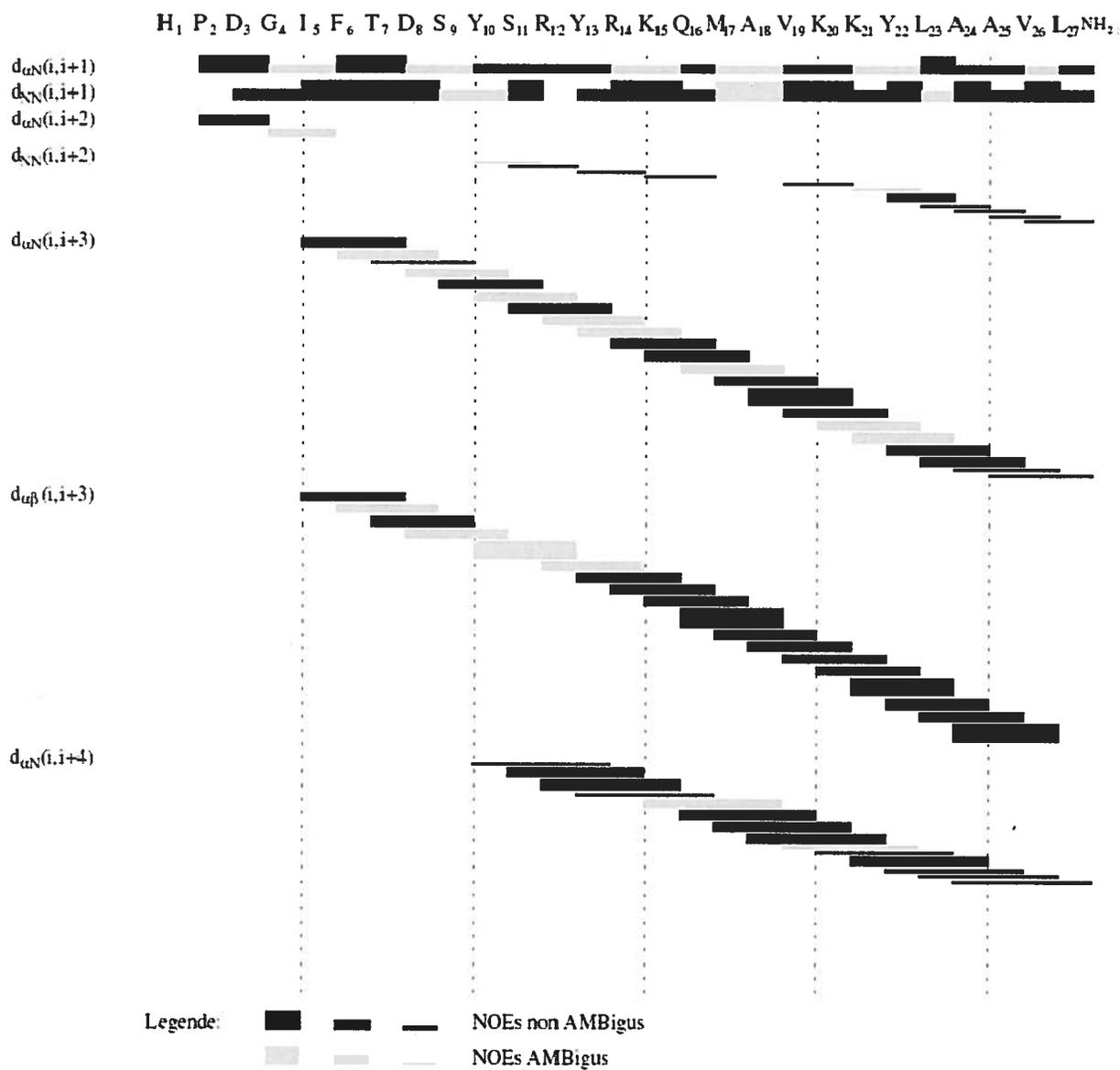


Figure 2. Summary of NOE connectivities observed for [Pro²]PACAP27. The thickness of the lines reflects the intensity of the sequential NOE connectivities that is weak, medium or strong.

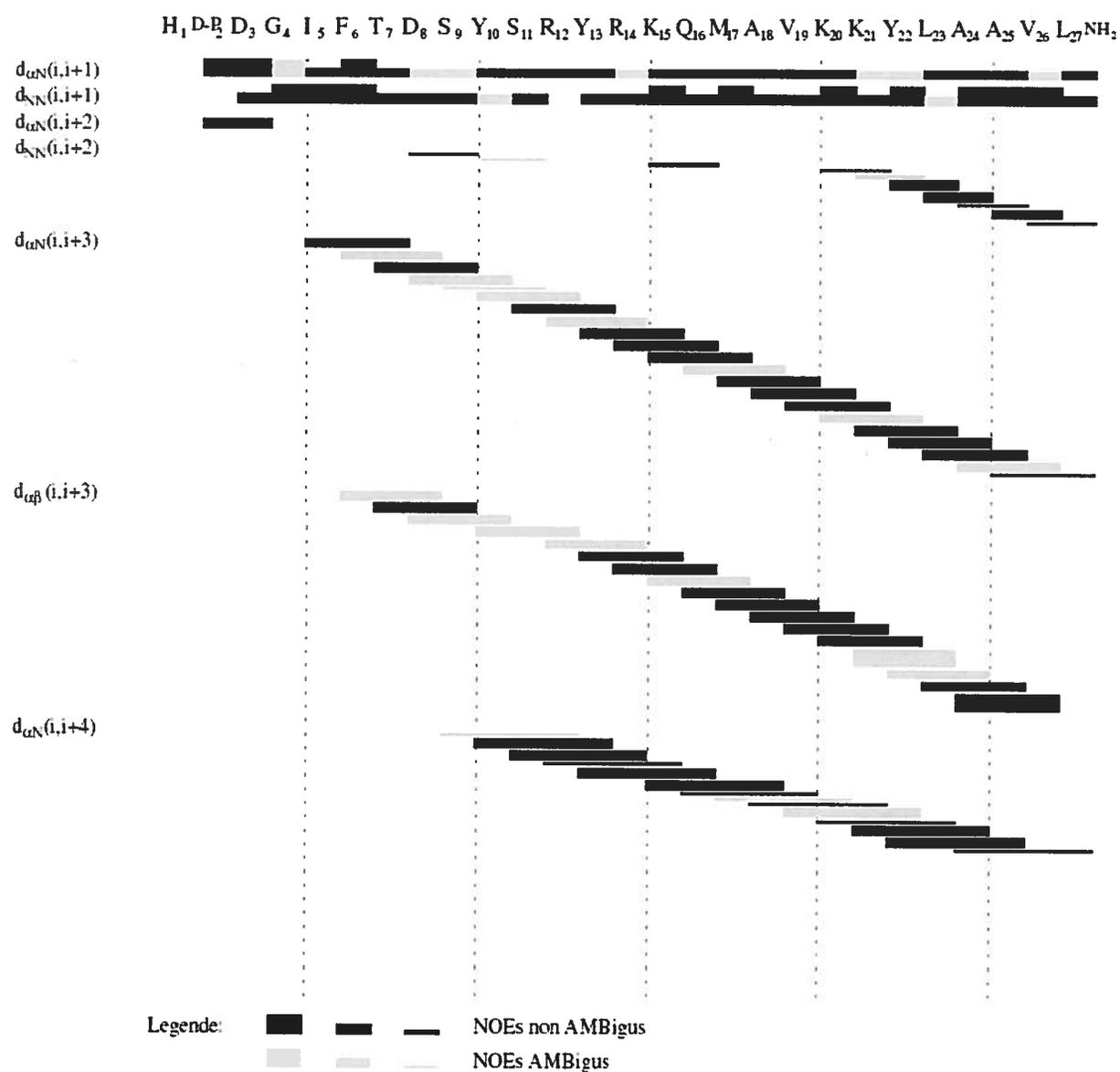


Figure 3. Summary of NOE connectivities observed for [D-Pro²]PACAP27. The thickness of the lines reflects the intensity of the sequential NOE connectivities that is weak, medium or strong.

Depuis la découverte du PACAP à la fin des années 80, de nombreuses fonctions physiologiques pour ce neuropeptide ont été mises en évidence. En particulier, il a été démontré que le PACAP exerce des effets neuroprotecteurs dans divers modèles d'ischémie cérébrale, ce qui suggère que ce peptide dispose d'un potentiel thérapeutique pour le traitement des AVC ischémiques. Le PACAP réduit les dommages neurologiques associés à l'ischémie à la fois à travers son action anti-apoptotique et ses propriétés anti-inflammatoires. Les effets neuroprotecteurs du PACAP sont retrouvés même lorsque le peptide est administré plusieurs heures après l'AVC, ce qui offre une fenêtre thérapeutique intéressante pour diminuer les atteintes neurologiques. Toutefois, la capacité du PACAP à réduire le volume de la zone neuronale infarctée et de favoriser la reprise des comportements moteurs suite à un épisode ischémique n'a été rapportée que chez le rongeur et devra maintenant être confirmée chez le primate. Néanmoins, la distribution des récepteurs du PACAP dans le cerveau et le cervelet de marmoset et de macaque ainsi qu'au niveau du cervelet humain, est similaire à celle retrouvée chez le rat et la souris (Basille *et al.*, 2006; Aubert *et al.*, 2007; Jolivel *et al.*, 2009). Ces récepteurs semblent fonctionnels puisque leur activation entraîne une diminution de l'activité caspase-3 dans des tranches de cerveaux de macaque et protège les neurones de primates de la neurotoxicité induite par l'agent de chimiothérapie cisplatine (Jolivel *et al.*, 2009; Aubert *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent que le PACAP pourrait exercer des effets biologiques dans le SNC du primate semblables à ceux observés chez le rongeur.

Le PACAP, par le biais de son interaction avec les récepteurs VPAC1, VPAC2 et PAC1 induit de nombreux effets biologiques. Par exemple, il a été montré que l'injection *iv* de PACAP chez l'humain augmente significativement le rythme cardiaque (Birk *et al.*, 2007; Dorner *et al.*, 1998). Le PACAP étant un puissant agent vasodilatateur chez l'humain (Warner *et al.*, 1992 ; Dorner *et al.*, 1998), l'effet tachycardique du PACAP pourrait être le reflet d'un mécanisme compensatoire de la vasodilatation initialement induite par le peptide. Le PACAP diminue également la pression partielle de dioxyde de carbone mesurée à la fin de l'expiration chez l'humain (Birk *et al.*, 2007). Cet effet

biologique semble être relié à une augmentation de la ventilation, comme préalablement observée chez le chien (Ishizuka *et al.*, 1992; Runcie *et al.*, 1995). De plus, un rougissement de la peau du visage (*skin flushing*) ainsi qu'une sensation de chaleur ont été rapportés par l'ensemble des volontaires participant à une étude portant sur les effets physiologiques d'une perfusion *iv* de PACAP (Birk *et al.*, 2007). Ces phénomènes physiologiques observés suite à l'injection du PACAP chez l'humain pourraient éventuellement limiter l'utilisation du PACAP comme agent neuroprotecteur lors d'AVC. Néanmoins ces effets indésirables (tachycardie, hypotension, rougissement de la peau et hyperventilation) sont principalement induits par l'activation des récepteurs VPAC. En effet, le VIP, qui ne peut lier le récepteur PAC1, provoque des effets physiologiques similaires suite à son administration par voie *iv* chez l'humain (Morice *et al.*, 1983; Frase *et al.*, 1987; Maxwell *et al.*, 1990). De même, le récepteur PAC1 est principalement localisé dans le SNC et au niveau de l'hypophyse antérieure, contrairement aux récepteurs VPAC qui sont plus largement distribués au niveau périphérique (Shivers *et al.*, 1991; Vaudry *et al.*, 2000b). Considérant que le récepteur PAC1 est majoritairement responsable des effets neuroprotecteurs du PACAP, le développement de dérivés sélectifs du récepteur PAC1 apparaît important afin de réduire les effets secondaires résultant d'une activation non-désirée des récepteurs VPAC.

En outre, la nature moléculaire peptidique du PACAP lui confère des paramètres pharmacocinétiques qui pourraient éventuellement limiter son utilisation comme composé cliniquement efficace. Particulièrement, le PACAP présente une demi-vie dans le sang de moins de 2 minutes chez la souris (Zhu *et al.*, 2003) et de près de 3.5 minutes chez l'humain (Birk *et al.*, 2007). Suite à son injection par voie *iv*, le PACAP est rapidement métabolisé par la DPP IV, qui clive l'extrémité N-terminale du peptide. Cette région étant essentielle à l'activation du récepteur PAC1, le clivage du PACAP38 par cette enzyme entraîne la formation de métabolites, comme les fragments 3-38 et 5-38, qui agissent en tant qu'antagonistes du récepteur PAC1. Cette conversion rapide du peptide bioactif en antagoniste suite à une injection par voie intraveineuse compromet le potentiel thérapeutique du PACAP.

À cet égard, deux avenues furent explorées lors de cette étude afin de développer des agonistes stables du récepteur PAC1. Premièrement, nous avons développé une librairie d'analogues du PACAP comportant des modifications chimiques ciblant les principaux sites potentiels de clivage enzymatique. Deuxièmement, nous avons évalué la possibilité de concevoir des peptides courts et/ou contraints montrant une activité biologique similaire au PACAP natif. Pour ce faire, des études de relations structure-activité ont été entreprises afin d'identifier le segment minimal permettant la liaison du peptide au récepteur PAC1 et de caractériser les déterminants moléculaires et structuraux du domaine N-terminal du PACAP responsables de l'activation du récepteur PAC1.

1. Développement de dérivés stables du PACAP

Par le biais d'une approche rationnelle combinant identification des sites de clivage enzymatique (Figure 19) et modifications chimiques ciblées, une librairie de dérivés stables du PACAP a été développée. Nous avons initialement conçu des analogues résistants à l'inactivation induite par la DPP IV, principale enzyme responsable de la dégradation du PACAP. De cette première librairie, les dérivés possédant un groupement acétyle sur la fonction amine de l'extrémité N-terminale ont montré une résistance totale face à cette enzyme ainsi qu'une puissance similaire au peptide natif. Ensuite, en s'appuyant sur les profils de dégradation générés suite à l'incubation du PACAP dans du plasma humain, nous avons développé une série d'analogues comportant des modifications chimiques précises ciblant les principaux sites de clivage enzymatique dans la séquence peptidique. De cette seconde librairie, les dérivés acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide et acétyl-PACAP27-propylamide ont présenté une résistance complète face à la DPP IV ainsi qu'une stabilité plasmatique prolongée (Chapitre 2). Particulièrement, l'analogue de 38 acides aminés s'est avéré plus puissant que le peptide natif à induire la mobilisation calcique et à inhiber la prolifération des cellules PC12. Par cette approche rationnelle combinant identification des métabolites, modifications chimiques ciblées et caractérisation de l'activation biologique, deux dérivés stables du PACAP ont été identifiés.

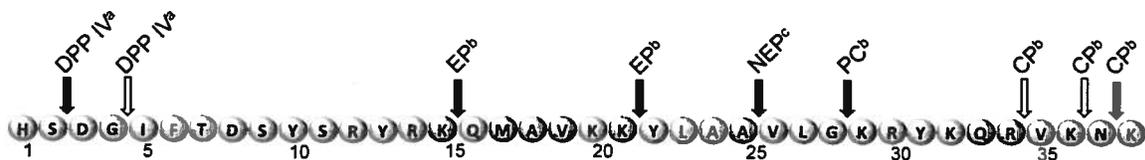


Figure 19: Séquence primaire du PACAP illustrant les principaux sites de clivage enzymatique. (◄) Site de clivage enzymatique primaire. (◄◄) Site de clivage enzymatique secondaire. ^aSite de clivage potentiel pour le PACAP27 et le PACAP38. ^bSite de clivage enzymatique spécifique au PACAP38. ^cSite de clivage enzymatique spécifique au PACAP27. DPP IV, dipeptidyl peptidase IV; EP, endopeptidase plasmatique; NEP, endopeptidase neutre; PC, pro-hormone convertase; CP, carboxypeptidase plasmatique.

Diverses modifications chimiques peuvent être employées afin d'augmenter la stabilité protéolytique des peptides telles que la cyclisation, le changement de chiralité, l'incorporation d'acides aminés non-naturels, la modification des extrémités N- et C-terminales et l'alkylation de l'atome d'azote de la liaison amide. Par exemple, la conformation cyclique ainsi que la présence d'un résidu non-naturel et de sept liens peptidiques N-méthylés confèrent à la cyclosporine A une activité biologique suite à son administration par voie orale (Rozycki *et al.*, 1992). De même, l'altération ou la substitution des atomes du squelette peptidique prévient la dégradation par les protéases. À cet égard, le remplacement de la liaison peptidique (CO-NH) par des liens de type CH₂-SH, CH₂-NH ou CO-CH₂ protège entièrement ce lien de la protéolyse (Adessi & Soto, 2002). En outre, les peptoïdes, dont les chaînes latérales sont rattachées aux corps peptidiques par l'atome d'azote du lien peptidique, et les azapeptides, dont les carbones α sont remplacés par des atomes d'azote, démontrent également une stabilité protéolytique accrue (Adessi & Soto, 2002). Toutefois, les modifications chimiques apportées au corps peptidique modifient habituellement les propriétés biochimiques du peptide et particulièrement sa conformation tridimensionnelle. Conséquemment, le choix des modifications chimiques constitue un compromis délicat entre les effets positifs sur la stabilité du peptide et les effets potentiellement délétères sur la structure, l'activité biologique et la spécificité du peptide.

Au cours de ce projet, deux modifications chimiques furent testées afin de bloquer le clivage du PACAP38 par les endopeptidases plasmatiques. Dans un premier temps,

nous avons remplacé le pont amide reliant les résidus lysine-21 et tyrosine-22 par un lien $\text{CH}_2\text{-NH}$, protégeant ainsi ce site potentiel du clivage enzymatique. Toutefois, l'analogue $[\psi\text{CH}_2\text{-NH}^{21-22}]\text{PACAP38}$ a montré une réduction importante de son affinité envers le récepteur PAC1 (Chapitre 2). Cette diminution d'affinité semble provenir d'une déstabilisation de la conformation du PACAP38. En effet, au moyen d'analyses spectroscopiques de dichroïsme circulaire, nous avons démontré que l'incorporation de la liaison $\text{CH}_2\text{-NH}$ fragilise la structure hélicoïdale du PACAP38 (Figure 20). Ceci suggère que l'atome d'oxygène de la lysine-21 (*i*) pourrait être impliqué dans une liaison hydrogène avec l'atome d'azote du squelette peptidique porté par le résidu alanine-25 (*i* + 4). Ce type de pont hydrogène est connu pour stabiliser les hélices α . De même, la substitution d'un lien amide (CO-NH) par une liaison $\text{CH}_2\text{-NH}$ inhibe la planarité et la rigidité associées aux liaisons peptidiques, conduisant ainsi à une désorganisation de la conformation tridimensionnelle.

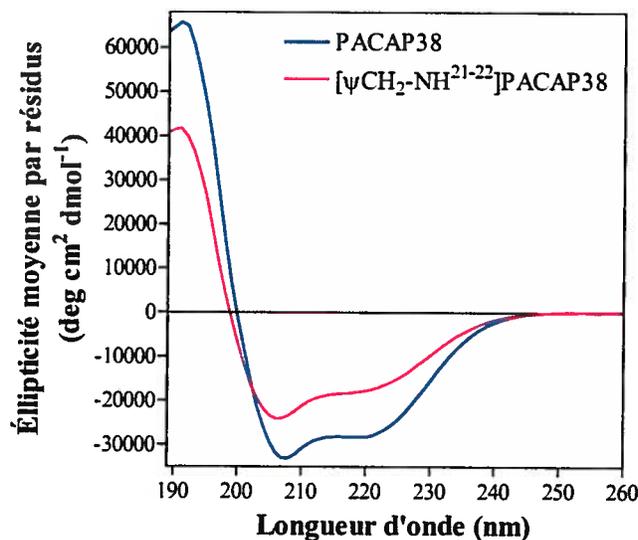


Figure 20: Spectres de dichroïsme circulaire du PACAP38 et du $[\psi\text{CH}_2\text{-NH}^{21-22}]\text{PACAP38}$. Les peptides ont été solubilisés dans une solution de TFE/ H_2O (20 mM NaHPO_4 , pH 7; 30/70, v/v) à une concentration de 0.5 mg/ml.

Dans un second temps, nous avons procédé à la substitution successive des résidus des doublets basiques par une alanine afin de réduire l'affinité des endopeptidases envers ces sites de clivage. Certaines de ces modifications ont considérablement augmenté la stabilité du PACAP dans le plasma humain sans affecter son affinité envers le récepteur

PAC1. Toutefois, celles-ci ne protègent pas complètement le PACAP38 de l'action protéolytique des endopeptidases plasmatiques. En effet, nonobstant l'incorporation ciblée de deux alanines, le dérivé acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide est toujours clivé entre les positions 15-16 et 21-22. De ce fait, d'autres modifications chimiques pourront être ultérieurement explorées afin de protéger totalement ces sites de clivage sans altérer profondément la structure tridimensionnelle et l'activité biologique du PACAP. Par exemple, la substitution des résidus aux positions 15 et 21 par des acides aminés non-naturels, le remplacement des liens amides par des liaisons CO-CH₂ ou l'utilisation de lysine de type aza aux positions 15 et 21 pourraient conduire à l'identification de puissants agonistes du récepteur PAC1 résistants aux endopeptidases plasmatiques.

Toutefois, l'ensemble de ce développement repose essentiellement sur des données *in vitro*. En effet, aucun profil de dégradation *in vivo* du PACAP n'a été initialement généré. De même, l'évaluation de la stabilité métabolique *in vivo* des analogues stables n'a pas été complétée lors de cette étude. À cet égard, nous avons débuté l'évaluation de la stabilité des analogues acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide et acétyl-PACAP27-propylamide suite à leur injection par voie *iv* à des rats et à des souris. Cette approche, s'appuyant sur la spectrométrie de masse, s'est pour le moment avérée infructueuse. En effet, de nombreux problèmes liés à la détection des doses injectées, au blocage de la colonne du système *chipLC-MSMS* ou à une absorptivité irrégulière des composés peptidiques aux colonnes de pré-purification, aux tubes et aux embouts ont été rencontrés. Nous explorons actuellement de nouvelles avenues telles que le recouvrement du matériel par de la BSA, l'utilisation de différents systèmes de purification ou l'emploi de peptides radiomarqués afin d'analyser la stabilité *in vivo* des analogues et d'identifier d'autres sites de clivage potentiel. Néanmoins, afin d'obtenir certaines indications de la stabilité *in vivo* nous avons examiné l'activité biologique de l'analogue acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide dans un modèle de prise alimentaire chez la souris.

1.1 Évaluation de l'activité anorexigène

Comme mentionné précédemment, l'injection *icv* de PACAP réduit la prise alimentaire chez le poulet, le rat et la souris (Tachibana *et al.*, 2003; Chance *et al.*, 1995; Morley *et al.*, 1992). En outre, cet effet est bloqué par l'antagoniste PACAP(6-38) et lorsque le VIP est utilisé aux mêmes doses que le PACAP, celui-ci n'a pas d'effet sur la consommation de nourriture (Mounien *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent que l'activité anorexigène du PACAP découle de l'activation du récepteur PAC1. Nous avons donc exploité l'effet anorexigène du PACAP afin de comparer l'activité biologique *in vivo* de l'analogue stable à celle du peptide natif. Les résultats exposés à la figure 21 montrent que l'injection de 1 µg/kg de PACAP38 au niveau du ventricule droit réduit considérablement la prise alimentaire cumulative chez des souris préalablement privées de nourriture pendant 18 heures. Lorsque l'analogue acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide est utilisé à la même dose, l'effet anorexigène est prolongé. Notamment, la prise alimentaire cumulative 4, 5 et 6 heures suite à l'injection est significativement plus faible pour l'analogue stable (Figure 21). La DPP IV étant exprimée dans l'ensemble du SNC (Mentlein, 1999), l'activité biologique prolongée du dérivé stable pourrait provenir de la protection conférée par le groupement acétyle qui empêche la formation d'antagonistes du récepteur PAC1 (fragments 3-38 et 5-38).

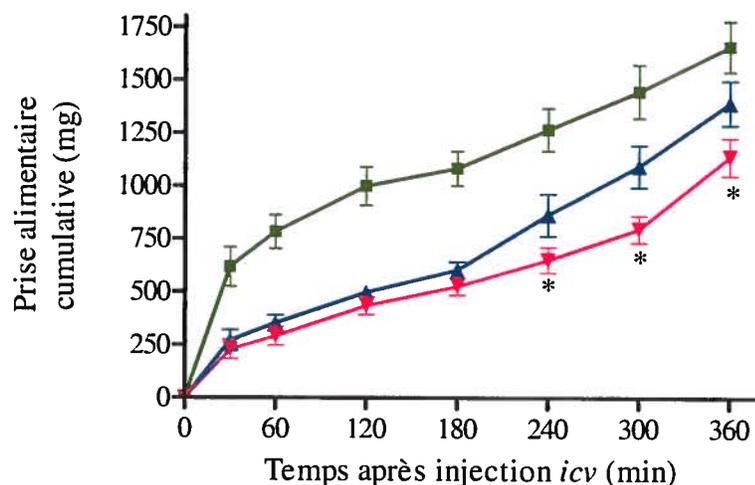


Figure 21: Effet d'un traitement par voie *icv* de PACAP38 et d'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide sur la prise alimentaire cumulative. Les souris privées de nourriture pour une période de 18 heures ont été traitées au PACAP38 (1 µg/kg) (▲), à l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide (1 µg/kg) (▼) ou à une solution saline (0.9% NaCl) (■) par injection *icv*. Dix minutes après l'injection, les souris ont eu accès à la nourriture. La prise alimentaire cumulative a été mesurée sur une période de 6 heures en contrôlant le poids de la nourriture. Chaque valeur consiste en la valeur moyenne pour 10 souris. * $p < 0.05$: vs PACAP

L'activité anorexigène du PACAP et de l'analogue stable suite à leur injection par voie *iv* à des souris affamées a ensuite été comparée. L'administration de 300 µg/kg de PACAP38 par la veine latérale de la queue diminue considérablement la prise alimentaire cumulative (Figure 22). Cependant, l'effet du PACAP sur la prise alimentaire, mesuré par période, n'est significative ($p < 0.05$) qu'au cours des 30 minutes suivant l'injection du peptide (Figure 23). À l'opposé, l'analogue acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide réduit significativement ($p < 0.05$) la prise alimentaire pour l'ensemble des périodes jusqu'à 3 heures post-injection (Figure 23). De fait, les souris traitées avec le dérivé stable présentent une diminution importante de leur consommation de nourriture cumulative en comparaison avec les souris traitées au PACAP38 (Figure 22). Ces résultats indiquent que l'effet anorexigène du PACAP suite à une injection *iv* est considérablement augmenté et prolongé par l'utilisation d'un analogue protégé face à l'action protéolytique des peptidases plasmatiques et de la DPP IV. À cet égard, l'analogue acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide présente une stabilité

plasmatique *in vitro* 5 fois supérieure à celle du peptide natif ainsi qu'une résistance complète face à la dégradation induite par la DPP IV (Chapitre 2).

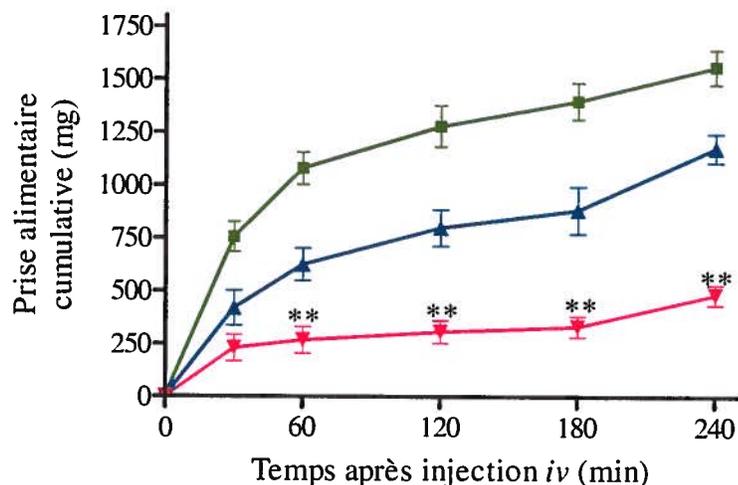


Figure 22: Effet d'un traitement par voie *iv* de PACAP38 et d'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide sur la prise alimentaire cumulative. Les souris privées de nourriture pour une période de 18 heures ont été traitées au PACAP38 (300 µg/kg) (▲), à l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide (300 µg/kg) (▼) ou à une solution saline (0.9% NaCl) (■) par injection *iv*. Dix minutes après l'injection, les souris ont eu accès à la nourriture. La prise alimentaire cumulative a été mesurée sur une période de 4 heures en contrôlant le poids de la nourriture. Chaque valeur consiste en la valeur moyenne pour 10 souris. ***p* < 0.01 : *vs* PACAP

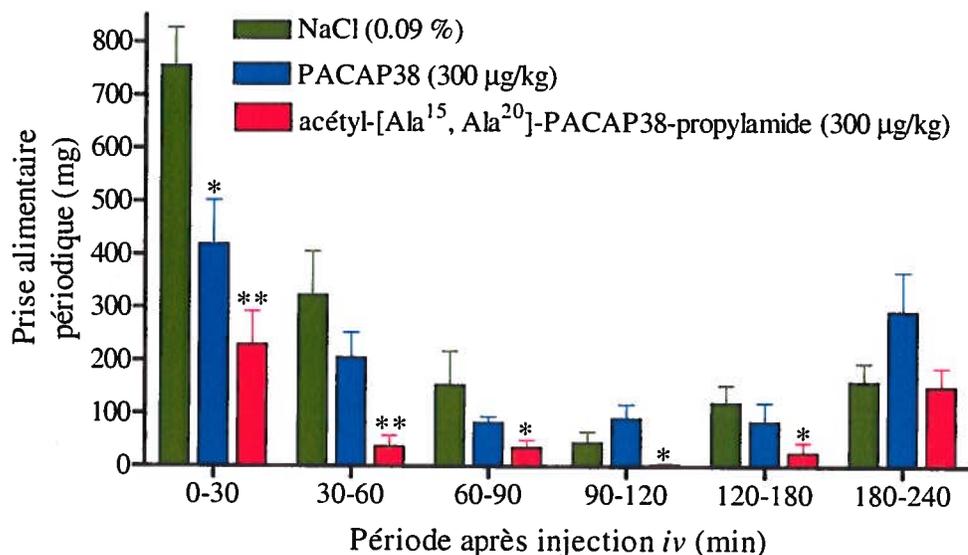


Figure 23: Effet d'un traitement par voie *iv* de PACAP38 et d'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide sur la prise alimentaire périodique. Les prises alimentaires périodiques ont été mesurées toutes les 30 minutes puis 60 minutes sur une période de 4 heures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: vs NaCl

La régulation de l'appétit est un phénomène complexe qui implique une interaction fine et continue entre les systèmes endocrinien, digestif et nerveux (central et périphérique). L'effet anorexigène du PACAP suite à une injection *icv* a été observé chez de nombreux vertébrés et celui-ci semble principalement impliquer le système de la mélanocortine retrouvé au niveau de l'hypothalamus, région du cerveau responsable du contrôle de l'alimentation (Mounien *et al.*, 2008). À l'opposé, aucune étude vérifiant le potentiel du PACAP à inhiber la prise alimentaire chez les mammifères suite à une administration par voie *iv* n'a été publiée à ce jour. Il a toutefois été montré que l'injection *ip* de PACAP réduit la prise alimentaire chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) (Matsuda *et al.*, 2006). Le mécanisme à la base de l'activité anorexigène du PACAP suite à une injection par voie *iv* n'a pas été caractérisé lors de cette étude. Considérant l'ensemble des activités physiologiques du PACAP, l'effet anorexigène pourrait résulter d'une interaction complexe entre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, l'administration de PACAP en périphérie augmente les concentrations sanguines en glucose, pouvant ainsi inhiber l'appétit (Sekiguchi *et al.*, 1994; Ozawa *et al.*, 1999). Le PACAP agit aussi sur l'homéostasie du glucose en influençant les

sécrétions d'insuline et de glucagon par le pancréas et en modifiant les niveaux de glucocorticoïdes sanguins (Winzell & Ahren, 2007). Puisque le PACAP traverse la BHE, l'effet anorexigène observé suite à l'injection *iv* de PACAP pourrait provenir d'une action au niveau central, impliquant entre autres le système hypothalamique de la mélanocortine. Une modification du comportement animal pourrait également influencer la diminution de la prise alimentaire induite par le PACAP. En effet, l'injection de PACAP au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus stimule les comportements de toilettage (*grooming*) et réduit l'activité locomotrice chez le rat (Norrholm *et al.*, 2005). De même, des souris dont le gène codant pour le PACAP ou pour le récepteur PAC1 a été invalidé présentent une augmentation de leur activité locomotrice (Hashimoto *et al.*, 2001; Otto *et al.*, 2001). Ces informations suggèrent donc que l'effet anorexigène observé suite au traitement *iv* des souris avec le PACAP pourrait également découler d'une diminution de l'activité locomotrice.

1.2 Évaluation de l'activité neuroprotectrice

L'activité neuroprotectrice du dérivé acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide a été évaluée dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat provoquée par l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne. L'injection *iv* de cet analogue au niveau de la veine jugulaire immédiatement à la fin de l'occlusion réduit considérablement l'aire de la zone infarctée, représentée en blanc à la figure 24. En effet, la mesure des zones infarctées 24 heures après la fin de l'ischémie montre qu'une dose de 0.02 µg/kg diminue de près de 60% le volume de la zone infarctée (Figure 25A). De même, l'ensemble des résultats des tests moteurs effectués 24 heures après l'ischémie dévoile que ce dérivé facilite la reprise des comportements moteurs suite à l'accident cérébro-ischémique (Figure 25B). Ces résultats témoignent que l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide est capable de traverser la BHE et suggèrent que le transporteur PTS-6 reconnaît cet analogue malgré les modifications chimiques apportées au peptide natif.

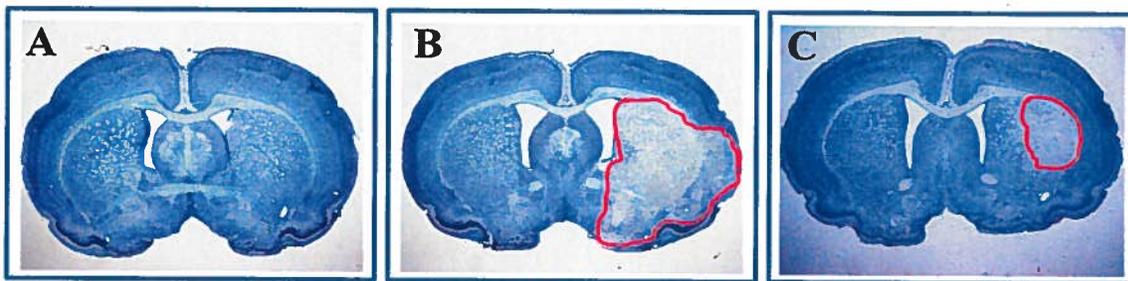


Figure 24: Coupes de cerveau de rats ischémiés. Les rats ayant subi (B, C) ou non (A) une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne pendant 30 minutes ont été traités par voie *iv* à l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide (0.02 µg/kg) (C) ou à une solution saline (A, B). Les cerveaux ont été prélevés 24 heures après la fin de la réperfusion et les tranches ont été colorées à l'aide de thionine. Les zones infarctées (entourées du trait rouge) apparaissent blanchâtres.

En comparant les résultats obtenus en employant une dose de 0.02 µg/kg, l'analogue acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide réduit le volume de la zone infarctée de façon similaire au PACAP38 (Figure 25A). De même, des comportements moteurs semblables chez les rats traités avec l'analogue ou avec le peptide natif ont été observés 24 heures après l'ischémie (Figure 25B). Nonobstant la stabilité métabolique renforcée du composé acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide, il apparaît que celui-ci démontre un potentiel similaire au PACAP natif à protéger les neurones de la mort induite par un accident ischémique transitoire. La dose de 0.02 µg/kg a initialement été choisie pour débiter les essais avec l'analogue stable puisque celle-ci correspondait à la dose minimale de PACAP38 procurant une réduction importante de la zone infarctée. L'utilisation de doses inférieures pourrait ultérieurement permettre d'observer un effet neuroprotecteur supérieur provenant de l'action prolongée de l'analogue stable en comparaison au peptide natif.

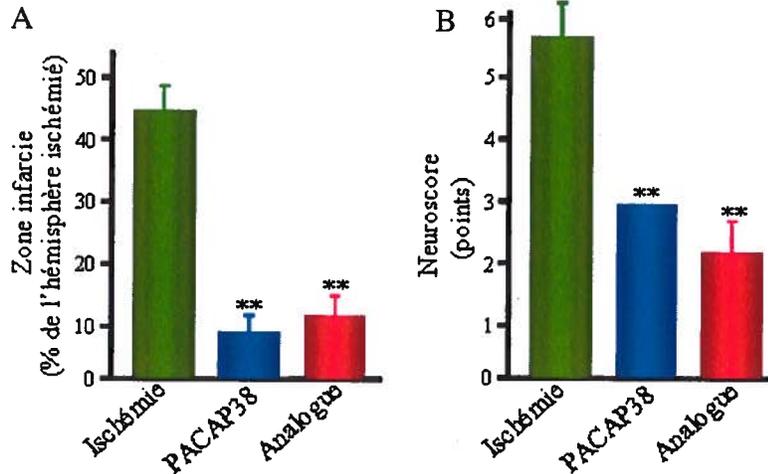


Figure 25: Effets du PACAP et de l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide sur (A) le volume des zones infarctées et (B) sur les fonctions cognitives des animaux ischémiés. Les rats ayant subi une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne pour une période de 30 minutes ont été traités au PACAP38 (0.02 µg/kg) ou à l'acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide (0.02 µg/kg). (A) Le volume des zones infarctées a été mesurées à l'aide du logiciel *ImageJ* suite à la coloration thionine. (B) Les tests de comportement moteur ont été effectués 24 heures après l'ischémie. Le Neuroscore est basé sur une échelle arbitraire s'échelonnant de 0 à 9 points, où 9 étant le maximum des déficits sensori-moteurs. L'unité du neuroscore a été adaptée d'un ensemble de tests moteurs et cognitifs provenant de différentes études (Gerlai *et al.*, 2000; Petullo *et al.*, 1999; Van der Staay *et al.*, 1996). **p < 0.01 : vs NaCl

Il est intéressant de noter que la dose utilisée lors de ces essais est inférieure aux doses habituellement employées afin d'observer une réduction des zones infarctées (Tableau III). À cet égard, une dose de 0.02 µg/kg correspond à une injection totale de 1.3 pmol de PACAP38 chez un rat de 300 g (4.4 pmol/kg). En utilisant le même modèle d'ischémie cérébrale (MCAOt) chez la souris et le rat, Ohtaki *et al.*, (2006) et Reglodi *et al.* (2000) ont injecté par voie *iv* des doses mille fois supérieures en PACAP38 afin d'observer des effets neuroprotecteurs similaires et même inférieurs. La présente différence peut être attribuable à des techniques chirurgicales divergentes, à une planification expérimentale distincte ou à l'utilisation d'embolies de différentes natures. Néanmoins, l'activité neuroprotectrice du PACAP observée lors de cette étude à cette très faible dose soulève des interrogations quant aux mécanismes moléculaires à la base de l'effet protecteur du PACAP. Dans les divers modèles *in vitro*, des concentrations de l'ordre du nM au µM sont généralement employées afin d'inhiber directement l'apoptose

neuronale par le biais de l'activation du récepteur PAC1. Ces concentrations sont donc infiniment plus importantes que la concentration en PACAP présente dans le SNC suite à une injection *iv* de 1.3 pmol de PACAP38 chez le rat. À cet égard, l'action anti-apoptotique directe du PACAP sur les différentes populations neuronales observée *in vitro* ne constitue pas le principal mécanisme de la réduction du volume de la zone infarctée observée lors d'ischémie cérébrale. En effet, le PACAP induit, via l'activation du récepteur PAC-1, la sécrétion d'IL-6 dans le liquide cébrospinal par les astrocytes, favorisant ainsi la survie neuronale lors d'ischémie cérébrale (Chapitre 1; Ohtaki *et al.*, 2006). Particulièrement, il a été montré chez des astrocytes en culture, que le PACAP induit la libération de certaines chémokines à des concentrations de l'ordre du fM avec une courbe concentration-réponse en forme de double cloche (Brenneman *et al.*, 2002). Cette libération est associée au blocage de la neurotoxicité induite par la gp120, une protéine de l'enveloppe du virus d'immunodéficience humaine, avec une courbe concentration-réponse bi-phasique présentant des EC₅₀ de 3×10^{-15} et de 3×10^{-11} M (Brenneman *et al.*, 2002). L'activité neuroprotectrice du PACAP observée à faible dose lors de nos essais d'ischémie cérébrale pourrait donc découler d'un effet bi-phasique du PACAP sur la libération d'IL-6 par les astrocytes. De même, des concentrations femtomolaires en PACAP ont présenté des effets protecteurs au niveau de cellules gliales exposées au LPS (Yang *et al.*, 2006) et de cellules PC12 exposées au prion (Onoue *et al.*, 2002b). L'ensemble de ces données suggère que le PACAP peut favoriser la survie cellulaire à des concentrations beaucoup plus faibles que la constante de dissociation (Kd) du PACAP avec le récepteur PAC1.

D'autre part, cette faible dose pouvant conduire à une réduction de la zone infarctée induite par l'ischémie cérébrale témoigne que le PACAP pourrait être utilisé comme agent thérapeutique chez l'humain de façon sécuritaire. Par exemple, une perfusion de 4 pmol/kg/min de PACAP38 chez l'humain pendant 120 minutes ne modifie pas significativement le taux de glucose sanguin et la pression sanguine (Li *et al.*, 2007). De même, une injection totale de 200 pmol/kg (10 pmol/kg/min pour 20 minutes) ne diminue pas de façon importante le flux sanguin cérébral chez l'humain. Toutefois, à

cette dose qui est près de 50 fois supérieure à celle utilisée lors de notre étude, une accélération significative du rythme cardiaque a été observée (Birk *et al.*, 2007).

2.0 Études des relations structure-activité

Afin de développer des agonistes stables du récepteur PAC1, nous avons également évalué la faisabilité de concevoir des peptides courts et contraints ou même des peptidomimétiques agissant comme agonistes du récepteur PAC1. À cet égard, deux approches sont généralement utilisées afin d'identifier ce type de composés. La première consiste au criblage aléatoire de larges chimiothèques de produits synthétiques ou naturels afin d'identifier des composés pouvant lier et/ou activer un récepteur spécifique. Cette approche est couramment employée par l'industrie et de nombreux antagonistes non-peptidiques ont ainsi été découverts. Par exemple, en criblant leurs chimiothèques, les laboratoires Abbott ont récemment identifié des antagonistes de type non-peptidique du récepteur PAC1 (Beebe *et al.*, 2008). Toutefois, la majorité des composés identifiés par cette méthode agissent comme antagonistes et peu d'agonistes ont ainsi été identifiés (Hruby, 2002). La seconde avenue consiste à la conception rationnelle. Par cette approche, le développement de peptides courts ou de peptidomimétiques est supporté par des informations structurales détaillées et sur une connaissance approfondie des pharmacophores du peptide. La détermination de la conformation tridimensionnelle du peptide est essentielle afin de pouvoir positionner adéquatement les groupements chimiques responsables de l'activité biologique. Particulièrement, il importe que la structure servant d'empreinte à la conception de peptidomimétiques ou de peptides contraints soit celle qu'adopte le peptide lorsque celui-ci active le récepteur, soit la conformation bioactive.

En considérant la structure secondaire du PACAP et l'ensemble des résultats des études de relations structure-activité antérieures, il apparaît que la région hélicoïdale favorise la liaison du peptide tandis que le domaine N-terminal désordonné est principalement responsable de l'activation du récepteur PAC1. Notre approche expérimentale s'appuyait sur cette prémisse. Globalement, notre stratégie consistait à

identifier un court segment de l'hélice α du PACAP qui permet au peptide de conserver une affinité adéquate envers le récepteur PAC1. Parallèlement, une étude des relations structure-activité a été initiée afin de caractériser les pharmacophores et la conformation bioactive du segment N-terminal. À terme, nous envisageons de combiner l'ensemble de ces informations afin de développer des dérivés tronqués du PACAP comprenant le segment minimal de liaison et le domaine N-terminal contraint dans la conformation bioactive du peptide. Le squelette peptidique raccourci ainsi que les contraintes structurales imposées au peptide procureront au PACAP des paramètres pharmacocinétiques améliorés. Ces composés pourront également servir de plate-forme structurale supportant la conception rationnelle de peptidomimétiques agissant comme agonistes sélectifs du récepteur PAC1.

2.1 Études structurales du PACAP27

Afin de supporter l'ensemble des résultats de notre étude de relations structure-activité, nous avons initialement caractérisé la structure secondaire du PACAP27. Même si la structure tridimensionnelle du PACAP27 est actuellement disponible dans la littérature, les résultats émanant de cette étude permettront de comparer la structure du PACAP27 à la conformation de certains analogues et d'avoir à disposition de précieuses informations permettant une meilleure interprétation des résultats découlant des essais pharmacologiques. Tout d'abord, une analyse du PACAP27 par dichroïsme circulaire (DC) a été réalisée. Le principe général du DC repose sur le fait que les peptides sont constitués d'éléments optiquement actifs et produisent un spectre DC qui est caractéristique de leur structure tridimensionnelle. Donc, en fonction de la structure secondaire qu'adopte un peptide en solution, différents spectres DC pourront être obtenus (Figure 26). Par exemple, un peptide ayant une structure majoritairement hélicoïdale, présentera un spectre DC composé de trois sommets caractéristiques à 192 nm, 208 nm et 222 nm comme celui représenté en rouge à la figure 23 (Chen *et al.*, 1974). L'intensité du sommet de ces courbes peut varier en fonction du type d'hélice, du nombre de résidus impliqués dans celle-ci, de l'existence d'autres structures secondaires, de la présence de ponts disulfure ou celle de résidus aromatiques comme le tryptophane (Chen *et al.*, 1974;

Millhausser, 1995 ; Kelly & Price, 2000). De nombreuses méthodes de déconvolution de spectres DC permettant d'estimer la proportion de chaque structure secondaire sont actuellement disponibles. L'ensemble de ces méthodes statistiques repose sur des bases de données de spectres de DC provenant de protéines dont la structure a été résolue au moyen de la cristallographie (Greenfield, 1996).

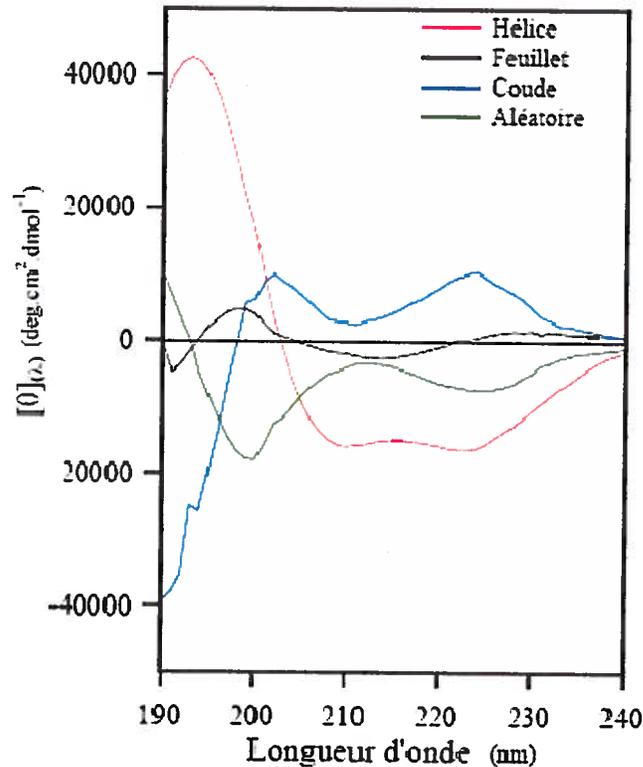


Figure 26: Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des différentes structures secondaires des peptides. (Adapté de Chang *et al.*, 1978)

La conformation du PACAP27 estimée au moyen de la spectroscopie de DC a été évaluée dans quatre milieux différents; (i) H₂O (20 mM NaHPO₄), (ii) 30% TFE/H₂O (20 mM NaHPO₄), (iii) 50% MeOH/H₂O (20 mM NaHPO₄) et (iv) 100 mM DPC/H₂O (20 mM NaHPO₄). Comme observé à la Figure 27, le PACAP27 affiche une structure secondaire principalement aléatoire lorsque celui-ci se retrouve en milieu aqueux. En revanche, la présence de deux minima à 208 et 222 nm suggère qu'en présence de méthanol, de trifluoroéthanol ou de micelles de DPC, le PACAP adopte une structure en hélice α (Figure 27). Ces résultats sont similaires à ceux préalablement obtenus par

Inooka *et al.* (1992) et Wray *et al.* (1993). La déconvolution des différents spectres indique que le contenu en hélice α du PACAP27 est plus faible lorsque le peptide est complexé aux micelles de DPC (43%) que lorsque le PACAP27 est solubilisé dans les différents solvants organiques (58-59%). Ce résultat est surprenant puisque l'hélice α du PACAP27 en environnement micellaire s'étire des positions 5 à 27 (Inooka *et al.*, 2001) tandis que l'hélice α ne débute qu'aux alentours de la position 8 en présence de méthanol ou de trifluoroéthanol (Inooka *et al.*, 1992; Wray *et al.*, 2001; Gonzalez-Muniz *et al.*, 2001). Cette différence pourrait traduire une stabilisation par les micelles de DPC d'une structure secondaire de type coude, entraînant ainsi une diminution du signal caractéristique de la conformation hélicoïdale.

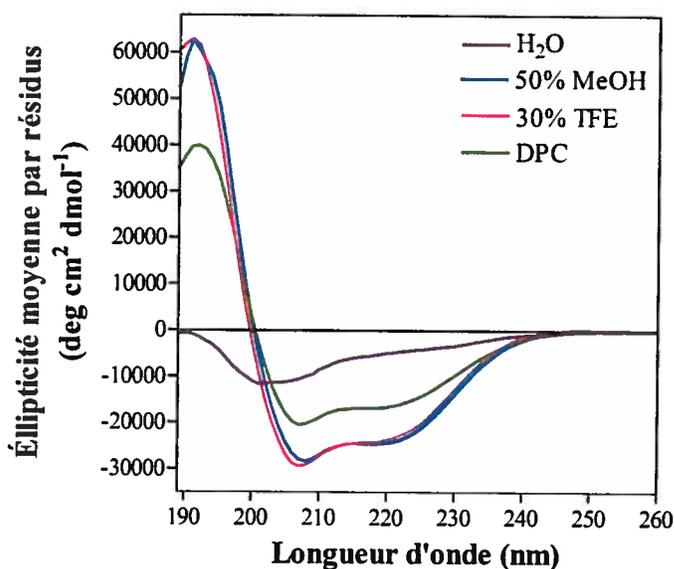


Figure 27: Spectres de dichroïsme circulaire du PACAP27. Le peptide a été solubilisé à une concentration de 0.5 mg/ml dans H₂O (20 mM NaHPO₄), 30% TFE/H₂O (20 mM NaHPO₄), 50% MeOH/H₂O (20 mM NaHPO₄) et 100 mM DPC/H₂O (20 mM NaHPO₄).

L'étude de la structure secondaire du PACAP27 au moyen de la résonance magnétique nucléaire (RMN) a été effectuée en milieu micellaire. Les micelles de DPC ont été sélectionnées comme milieu puisque celles-ci miment adéquatement l'environnement adjacent à la membrane cellulaire. En considérant le mécanisme d'action à l'échelle moléculaire des hormones peptidiques, la structure qu'adopte un peptide lorsque celui-ci est complexé aux micelles de DPC constitue un modèle représentatif de

la structure qui sera reconnue par le récepteur. Suite à l'acquisition des expériences RMN et à l'attribution complète des spectres COSY, TOCSY et NOESY du PACAP27, une analyse des paramètres structuraux (diagramme NOE et déplacements chimiques) a été effectuée afin d'obtenir une représentation globale de la structure secondaire du PACAP27. Premièrement, puisque chaque type de structure secondaire présente des effets NOE spécifiques en nature et en intensité, il est possible en analysant les diagrammes NOE de repérer certains éléments de structure secondaire d'un peptide (Figure 28; Wüthrich, 1986). À cet égard, un effet NOE représente une proximité spatiale de moins de 5 Å entre deux noyaux et est observable sur un spectre NOESY.

	β, β_D	α -Helix	3_{10} -Helix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'	Half-Turn
$d_{\alpha N}(i, i+4)$		—————	—————					
$d_{\alpha \beta}(i, i+3)$		—————	—————					
$d_{\alpha N}(i, i+3)$		—————	—————	—————		—————	—————	
$d_{NN}(i, i+2)$		—————	—————	—————	—————	—————	—————	
$d_{\alpha N}(i, i+2)$			—————	—————	—————	—————	—————	—————
d_{NN}	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————
$d_{\alpha N}$	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————	—————
	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6 7	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4

Figure 28 : Effets NOE caractéristiques des différents types de structures secondaires. (Adapté de Wüthrich, 1986)

Le diagramme des connectivités NOE du PACAP27 suggère que le peptide adopte principalement une structure hélicoïdale lorsqu'il est complexé aux micelles de DPC (Figure 29). En effet, de nombreuses connectivités caractéristiques d'une conformation hélicoïdale, tels que des effets NOE $d_{NN}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ et $d_{\alpha \beta}(i, i+3)$, sont observées pour les résidus isoleucine-5 à leucine-27 (Wüthrich, 1986). Notamment, la présence de connectivités NOE $d_{\alpha N}(i, i+4)$ pour les résidus tyrosine-10 à leucine-27 supporte l'hypothèse que cette structure hélicoïdale soit de type α . De même, la forte intensité des effets NOE $d_{\alpha \beta}(i, i+3)$ témoigne d'une prédominance de l'hélice en configuration α plutôt qu'en configuration 3_{10} . En outre, l'absence de NOE $d_{\alpha N}(i, i+2)$ pour la portion hélicoïdale du PACAP27 suggère également que cette hélice n'est pas de type 3_{10} . Les résidus histidine-1 à glycine-4 de l'extrémité N-terminale sont caractérisés

par un nombre relativement faible de connectivités NOE, faisant ainsi référence à une structure principalement aléatoire. Néanmoins, un effet NOE $d_{\alpha N}(i, i+2)$ entre la sérine-2 et la glycine-4 combiné à des effets $d_{NN}(i, i+1)$ et $d_{\alpha N}(i, i+1)$ spécifiques pourrait traduire la présence d'un coude de type II (Figure 29).

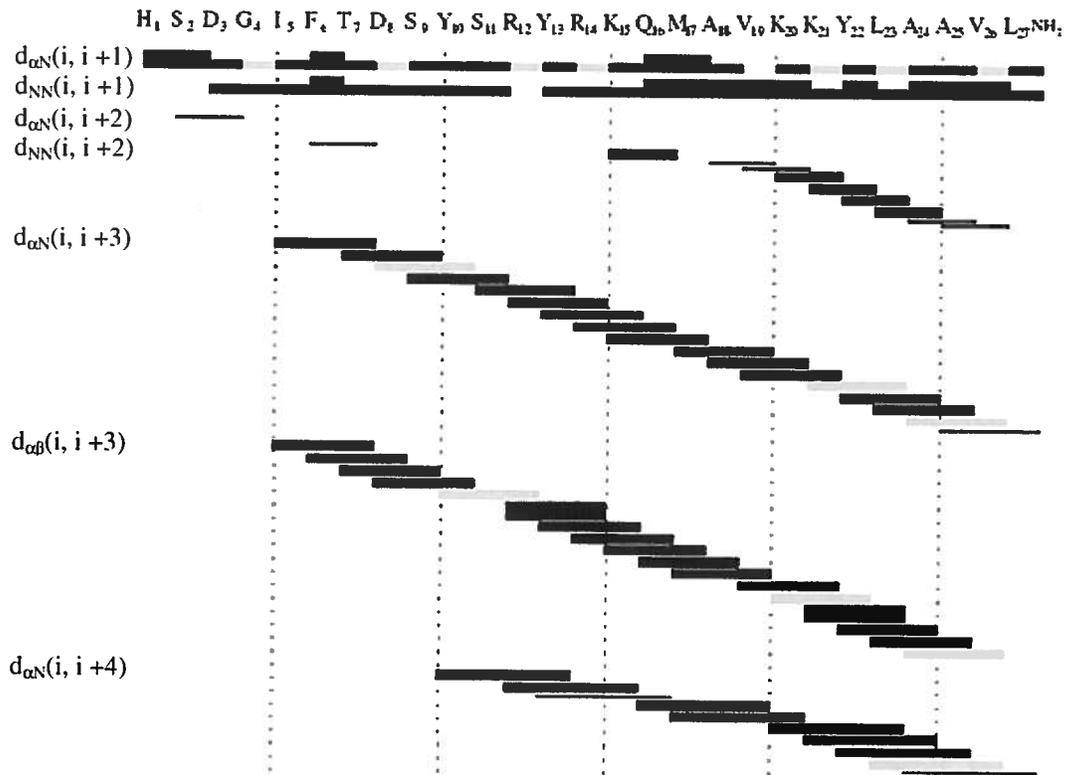


Figure 29: Diagramme des connectivités NOE séquentiels obtenus pour le PACAP27 dans 100 mM DPC/H₂O. Les effets non ambigus (corrélations dipolaires résolues) sont représentés en noir et les effets ambigus (corrélations dipolaires superposées) sont représentés en gris. L'épaisseur des traits caractérise la distance calculée à partir du volume du pic de corrélation dipolaire: un trait épais correspond à une distance courte ($d < 2.5 \text{ \AA}$), un trait moyen à une distance intermédiaire ($2.5 < d < 3.5 \text{ \AA}$) et un trait fin à une distance longue ($d > 3.5 \text{ \AA}$).

Deuxièmement, le déplacement chimique des protons portés par les atomes de carbone du squelette peptidique est influencé par la structure secondaire de la chaîne polypeptidique. De ce fait, à partir d'études statistiques concernant les déplacements chimiques de protons α impliqués dans des structures secondaires connues, une méthode permettant de déduire la structure secondaire des peptides à partir du déplacement chimique des protons α a été développée (Wishart *et al.*, 1992). Cette méthode repose sur

la différence entre le déplacement chimique expérimental pour un proton α porté par un résidu spécifique et la valeur de référence pour le proton α de ce même résidu lorsque cet acide aminé se retrouve en conformation aléatoire. La valeur ainsi obtenue est nommée déplacement chimique secondaire (DCS). Des indices de DCS supérieurs à 0.1 ppm en valeur absolue témoignent d'une structure secondaire stable. Spécifiquement, une valeur négative reflète une structure en hélice tandis qu'une valeur positive réfère à un feuillet β . En revanche, un DCS situé entre -0.1 ppm et 0.1 ppm indique que le résidu portant ce proton α pourrait être impliqué dans une structure aléatoire ou dans un coude β . Les DCS des protons α du PACAP27 en milieu micellaire sont représentés sur la figure 30. Les valeurs négatives de DCS observées pour les résidus sérine-9 à leucine-27 témoignent d'une structure hélicoïdale pour le segment 9-27 du PACAP27. Néanmoins, le DCS obtenu pour le H α de l'alanine-18 suggère une discontinuité de l'hélice au niveau de ce résidu. À cet égard, Sun *et al.* (2007) avaient observé un repliement de la structure secondaire du PACAP(6-38) au niveau de l'alanine-18. En ce qui concerne le domaine N-terminal du PACAP27, les faibles valeurs positives et négatives des DCS présentées à la figure 30 indiquent que les résidus histidine-1 à acide aspartique-8 participent à une structure secondaire principalement aléatoire.

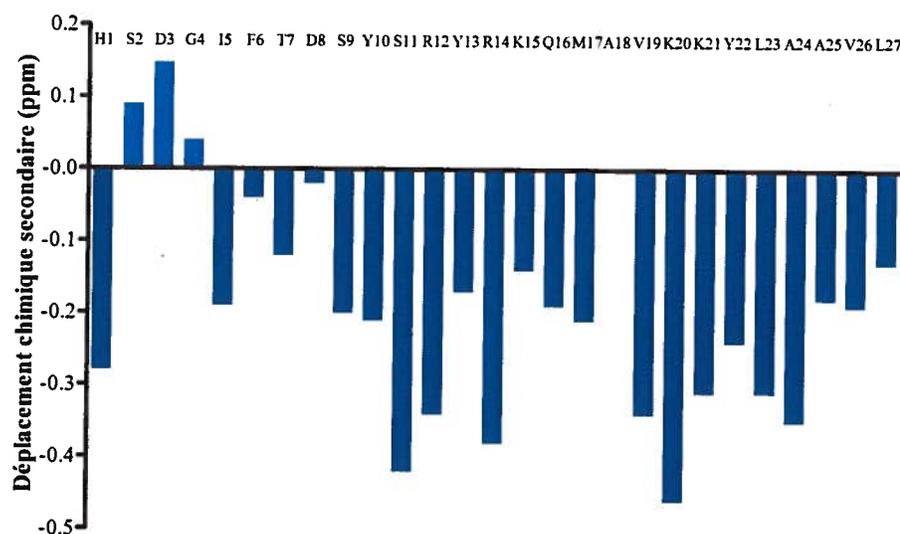


Figure 30: Déplacements chimiques secondaires des protons α du PACAP27. Les DCS ont été obtenus à l'aide des valeurs de référence de l'étude statistique de Wishart *et al.*, 1995.

Les contraintes de distance obtenues suite à l'intégration des corrélations dipolaires attribuées sur le spectre NOESY ont ensuite été incorporées dans les calculs de modélisation moléculaire. Suite au raffinement du jeu de contraintes de distance, un total de 193 contraintes ^1H - ^1H dont 177 non ambiguës et 16 ambiguës a été conservé. Ces contraintes ont été introduites dans un protocole de recuit simulé pour générer 100 structures. La qualité des structures finales ainsi générées a été évaluée selon différents paramètres (violations de contrainte de distance, dispersion des angles ϕ et ψ , respect du diagramme de Ramachandran) ce qui a permis de retenir 92 structures. L'analyse des angles dièdres de ces 92 structures montre une haute convergence des angles ϕ et ψ pour le segment isoleucine-5 à leucine-27, indiquant que le PACAP27 adopte une structure stable au niveau de cette région. Notamment, l'analyse à l'aide du diagramme de Ramachandran démontre que les résidus du segment 5-27 occupent la région énergétiquement favorable caractéristique d'une structure en hélice α . En revanche, les quatre premiers résidus de l'extrémité N-terminale présentent des angles ϕ et ψ dispersés, dévoilant une zone flexible pour cette région. Visuellement, la superposition des atomes de la chaîne principale des 92 structures générées présente une haute convergence du squelette peptidique pour le segment 5-27 (Figure 31). L'ensemble des résultats de notre étude structurale confirme que le PACAP27 en milieu micellaire adopte une structure en hélice α entre les résidus isoleucine-5 et leucine-27, qui est précédée par un domaine N-terminal désordonné (Figure 32). La distribution des charges montre que le PACAP27 affiche un domaine N-terminal ($\text{His}^1\text{-Asp}^8$) chargé négativement suivi d'un corps peptidique présentant un caractère amphiphile et fortement basique.

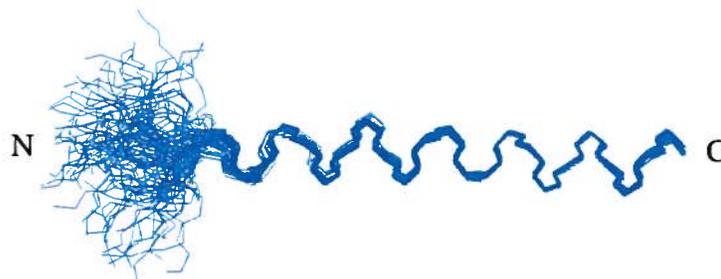


Figure 31 : Superposition des atomes du squelette peptidique des 92 structures finales du PACAP27.

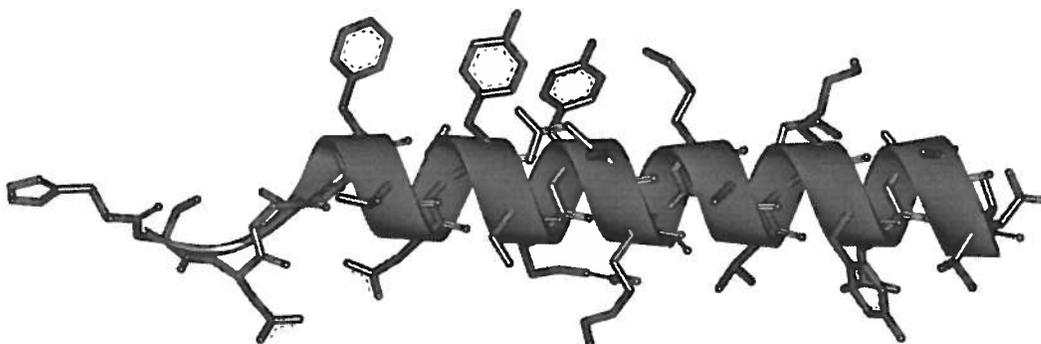


Figure 32: Représentation schématique de la structure secondaire du PACAP27 en milieu micellaire.

2.2 Segment minimal de liaison du PACAP au récepteur PAC1

Une librairie d'analogues du PACAP27 tronqués à l'extrémité C-terminale ou à l'intérieur même de la séquence peptidique a été développée afin d'identifier un fragment raccourci du PACAP capable de lier et d'activer le récepteur PAC1 (Chapitre 3). Les essais pharmacologiques furent supportés par des études spectroscopiques de DC afin de corréler les pertes d'affinité à une éventuelle déstabilisation de la structure hélicoïdale du PACAP. Le DC présente l'avantage d'être facile et rapide d'utilisation, de permettre un traitement rapide des données et de consommer des quantités relativement faibles de peptides. L'ensemble des résultats obtenus suggère que de nombreux domaines du PACAP27 sont cruciaux pour maintenir une affinité acceptable et que la présence d'une conformation hélicoïdale stable n'est pas une composante suffisante pour permettre la liaison du PACAP au récepteur PAC1. À cet égard, les fragments 1-21, 1-20 et 1-19 présentent des spectres DC typiques d'une structure secondaire en hélice α tout en étant incapables de lier le récepteur PAC1 avec une haute affinité (Chapitre 3). De même, nonobstant que les composés (1-8)-Aca-(15-27)PACAP, (1-9)-Aca-(16-27)PACAP et (1-10)-Aca-(17-27)PACAP dévoilent une conformation hélicoïdale, ils sont principalement inactifs. Néanmoins, l'analogue hybride (1-13)-Aca-(20-27)PACAP s'est avéré être un agoniste complet affichant toutefois une IC_{50} d'environ $1 \mu\text{M}$ et ce, malgré des spectres DC caractéristiques d'une structure aléatoire. Ceci suggère que le segment 14-19 (Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val) ne renfermerait aucun pharmacophore essentiel à l'activation du

récepteur PAC1. La réduction d'affinité pourrait provenir d'une déstabilisation de la structure secondaire du PACAP provoquée par l'incorporation de l'espaceur aliphatique.

Afin de vérifier cette hypothèse, différentes avenues pourraient être exploitées. Tout d'abord, la simple suppression de ce segment sans l'incorporation d'une chaîne alkyle, soit l'analogue des(14-19)PACAP27, aurait comme effet de favoriser l'apparition d'une conformation hélicoïdale et de potentiellement augmenter l'affinité du peptide envers le récepteur PAC1. En outre, l'incorporation du domaine 28-38 ou d'une portion de celui-ci à l'extrémité C-terminale du dérivé (1-13)-Aca-(20-27)PACAP faciliterait la formation d'une hélice ainsi que la liaison du peptide au récepteur PAC1. À cet égard, l'incorporation du fragment 28-32 (Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys) à l'extrémité C-terminale du PACAP27 a augmenté l'affinité d'analogues du PACAP27 tronqués à l'extrémité N-terminale (Gourlet *et al.*, 1995). L'adoption d'une structure en hélice α par le court segment 20-27 pourrait être également induite par la formation de ponts lactames reliant les chaînes latérales de résidus i et $i + 4$. L'effet stabilisateur de ponts lactames $i - i + 4$ sur la conformation hélicoïdale est largement reconnu, et a été employé pour de nombreux peptides tels que le GLP-1, le NPY et le CRF (Miranda *et al.*, 2008; Bouvier & Taylor, 1992; Rivier *et al.*, 1998). Finalement, l'incorporation d'espaceurs de différentes natures chimiques favoriserait la formation d'une structure hélicoïdale dans ce dérivé hybride. Par exemple, des polymères de poly-alanine ou de poly-Aib (acide amino-isobutyrique) pourraient remplacer le segment 14-19 afin de stabiliser la structure hélicoïdale. Cette avenue permettrait également de vérifier l'implication réelle des groupements chimiques portés par ce segment dans le maintien de l'affinité de liaison et de l'activité biologique du PACAP27.

D'autre part, la poursuite de la réduction séquentielle du squelette peptidique du PACAP à partir de l'extrémité C-terminale pourrait conduire à l'identification d'analogues tronqués biologiquement actifs. Par exemple, il serait envisageable que certains des fragments 1-18 à 1-10 puissent agir comme agonistes du récepteur PAC1. À cet égard, il a été montré que les fragments 1-11 à 1-14 de l'hormone parathyroïdienne (PTH), un peptide de 84 résidus, agissent comme de faibles agonistes complets, tandis

que des fragments plus longs se sont avérés inactifs (Tregear *et al.*, 1973; Rosenblatt *et al.*, 1980; Luck *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2000). De plus, des modifications structurales et chimiques appliquées à ces fragments ont permis d'augmenter leur puissance (Shimizu *et al.*, 2001; Tsomaia *et al.*, 2004). Considérant les similitudes structurales entre les récepteurs PTH1 et PAC1 ainsi que l'homologie de séquence et de conformation observée entre le PACAP et le PTH(1-34), l'identification de courts segments N-terminaux du PACAP agissant comme agonistes apparaît plausible. À cet effet, le dérivé (1-13)-Aca-(20-27)PACAP est un agoniste complet du récepteur PAC1 bien que celui-ci affiche une structure secondaire principalement aléatoire.

2.3 Déterminants moléculaires et conformationnels du domaine N-terminal

Le domaine N-terminal du PACAP est essentiel à l'activation du récepteur PAC1. Par exemple, le retrait des deux premiers résidus de l'extrémité N-terminale abolit l'activité biologique du PACAP (Robberecht *et al.*, 1992b). Des modifications chimiques minimales appliquées à ce domaine ont également un effet hautement délétère sur la puissance du peptide (Robberecht *et al.*, 1992b, Hou *et al.*, 1994). Le modèle d'activation *two-domain* des RCPG de la classe B suggère que ce domaine interagit avec la région du récepteur PAC1 située près de la membrane cellulaire et que cette interaction favorise un changement conformationnel du récepteur conduisant à son activation (Hoare, 2005). Dans ce contexte, une meilleure compréhension de la conformation bioactive du domaine N-terminal du PACAP pourrait faciliter la conception rationnelle d'analogues et ultérieurement d'agonistes non-peptidiques sélectifs du récepteur PAC1.

Notre étude de relations structure-activité ciblant le domaine N-terminal a montré que la présence de différents groupements chimiques, ainsi que l'adoption d'une conformation précise sont des éléments essentiels permettant l'activation du récepteur PAC1 par le PACAP (Chapitre 4). Les résidus acide aspartique et phénylalanine aux positions 3 et 6, respectivement, sont les principaux pharmacophores de la région N-terminale du PACAP. En outre, tel que suggéré par les faibles affinités observées pour les analogues contraints au niveau du segment 5-7, la flexibilité et l'intégrité de la

conformation hélicoïdale apparaissent cruciales pour permettre la liaison du PACAP au récepteur PAC1. De même, l'inversion successive de la chiralité des résidus 5 à 7 a conduit à une perte importante d'affinité. À cet égard, l'incorporation d'acides aminés de configuration D est reconnue pour déstabiliser les conformations hélicoïdales (Hruby, 2002). Il a été dévoilé que la structure du fragment PACAP(1-21), lorsque celui-ci est lié au récepteur PAC1, présente une hélice α qui s'étend des résidus 8 à 21 et qui est précédée d'une conformation inhabituelle constituée de deux coudes β successifs; un de type II' regroupant les résidus acide aspartique-3 à phénylalanine-6 et l'autre de type I qui s'étend de glycine-4 à thréonine-7 (Inooka *et al.*, 2001). Toutefois, les résultats de notre étude de relations structure-activité suggèrent que l'induction de cette conformation par le biais de modifications chimiques spécifiques réduit de façon importante l'affinité du PACAP envers son récepteur PAC1. Par exemple, la substitution des résidus glycine-4 et isoleucine-5 par un dipeptide γ -lactame (Gly-Val) a conduit à une perte importante d'affinité, bien que cette structure soit reconnue pour induire la formation d'un coude β II' lorsqu'elle est insérée aux positions $i + 1$ et $i + 2$ d'un coude (Freidinger, 2003). Ceci suggère que la structure unique observée par Inooka *et al.* (2001) pourrait provenir d'un changement conformationnel survenant suite à la liaison du PACAP au récepteur PAC1. Ainsi, le fragment 5-7 du PACAP doit arborer une conformation hélicoïdale afin de favoriser l'ancrage initial du peptide au récepteur PAC1. En ce sens, une structure hélicoïdale a été observée lorsque le PACAP est lié aux micelles de DPC, un milieu qui mime l'environnement adjacent à la membrane cellulaire (Figure 32). En considérant que le PACAP ne présente pas une structure organisée en milieu aqueux (Inooka *et al.*, 1992), la formation de l'hélice α semble être induite par l'environnement lipidique de la membrane plasmique. Cette conformation hélicoïdale combinée à la présence de groupements chimiques particuliers permettrait la reconnaissance spécifique du PACAP par le récepteur PAC1. L'ancrage du peptide au domaine N-terminal du récepteur induirait ensuite un changement conformationnel du segment 3-7 du PACAP, comme décrit par Inooka *et al.* (2001), entraînant ainsi la transduction du signal intracellulaire. Cette cascade d'évènements à l'échelle moléculaire s'inscrit dans la philosophie des différents modèles d'activation des GPCR et en particulier, des GPCR de la classe B (Mierke *et al.*, 2001 ; Hoare, 2005).

La structure du segment 3-7 décrite par Inooka *et al.* (2001) constituée de deux coudes β successifs s'apparente à la conformation observée pour une hélice de type 3_{10} (Tyndall *et al.*, 2005). Particulièrement, ce type d'hélice est caractérisé par la présence de liaisons hydrogènes entre le groupement CO d'un résidu i et le groupement NH d'un résidu $i + 3$, tel qu'observé pour la majorité des coudes β (Hutchinson & Thornton, 1994). Notre étude structurale a montré que les résidus phénylalanine-6 et thréonine-7 du PACAP27 présentent d'intenses connectivités NOE $d_{\alpha N}$ et d_{NN} (Figure 29). L'intensité élevée de ces connectivités fait référence à des distances caractéristiques d'une hélice 3_{10} au niveau de ces résidus (Wüthrich, 1986). De même, aucun effet NOE $d_{\alpha N}(i, i + 4)$, corrélation dipolaire caractéristique d'une hélice α , n'a été observé pour la région 5-9 du PACAP27 (Figure 29). De plus, les résidus du segment 5-8 ont montré des angles ϕ et ψ proches des angles caractéristiques d'une hélice 3_{10} , même si ceux-ci se retrouvent dans la zone énergétiquement favorable à la formation d'une hélice- α sur le diagramme de Ramachandran. Donc, bien qu'une hélice α pour les résidus 5 à 8 ait été décrite lorsque le PACAP27 est lié aux micelles de DPC, on ne peut totalement exclure la présence d'une hélice 3_{10} au niveau de ce segment.

La structure décrite par Inooka *et al.* (2001) est également semblable à un motif de type *helix N-capping* qui est généralement observée à l'extrémité N-terminale d'une conformation hélicoïdale et qui stabilise les hélices α dans les protéines (Aurora & Rose, 1998; Neumann *et al.*, 2008). Notamment, cette structure, qui semble être retrouvée chez l'ensemble des ligands peptidiques des RCPG de la classe B, a récemment été proposée comme étant un élément clé de l'activation des RCPG de la famille B (Neumann *et al.*, 2008). L'ensemble de ces informations suggère que la structure préalablement décrite par Inooka *et al.* (2001) pour le segment 3-7 pourrait être similaire à une conformation hélicoïdale. À cet égard, aucune donnée (angles, distances, connectivités NOE) justifiant la caractérisation de cette conformation très inhabituelle et unique n'est présentée par les auteurs (Inooka *et al.*, 2001).

La caractérisation pharmacologique de certains analogues modifiés aux positions 1 à 4 témoigne que ce segment adopte une conformation bioactive précise. En effet,

comme schématisé à la figure 33, notre étude de relations structure-activité suggère que les résidus histidine-1 à glycine-4 doivent former une structure compacte semblable à celle observée pour un coude Asx-Pro afin d'activer le récepteur PAC1 (Chapitre 4). Notamment, la présence de deux ponts hydrogènes au niveau du domaine N-terminal pourrait constituer une composante structurale essentielle de la conformation bioactive du PACAP (Figure 33). Par exemple, l'incorporation d'un groupement méthyle sur l'atome d'azote de la glycine-4 du PACAP inhibe son activité biologique. À cet égard, la méthylation de l'atome d'azote du résidu en position $i + 3$ d'un coude β prévient le pont hydrogène reliant le C-O du résidu en position i et le N-H du résidu en position $i + 3$, bloquant ainsi la stabilisation du coude. De même, l'atome d'azote en position 3 du groupement imidazole de l'histidine-1 pourrait être impliqué dans un pont hydrogène facilitant la formation de la conformation bioactive du domaine N-terminal, tel qu'observé pour de nombreux coudes ayant une histidine en position i (Hutchinson & Thornton, 1994). À cet égard, il a montré qu'une séquence histidine-proline (positions i et $i + 1$) induit la formation d'un coude compact caractérisé par la présence de deux ponts hydrogènes, comme représenté pour le PACAP à la figure 33 (Blank *et al.*, 2000). Particulièrement, les caractéristiques structurales de ce coude étaient similaires à celles observées pour un coude Asx-Pro. Le fait que les analogues contraints [Pro²]PACAP agissent comme de puissants agonistes soutient l'hypothèse de la présence d'un coude de type Asx-Pro au niveau de la conformation bioactive du domaine N-terminal. En outre, la structure cristallographique du court peptide observée par Blank *et al.* (2000) dévoile que le groupement imidazole de l'histidine se retrouve au cœur de cette structure compacte. À cet effet, le remplacement de l'histidine par une phénylalanine a conduit à une perte importante de la puissance du PACAP, suggérant ainsi que le domaine N-terminal est peu tolérant à l'encombrement stérique au niveau de la chaîne latérale du résidu en position 1 (Robberecht *et al.*, 1992b).

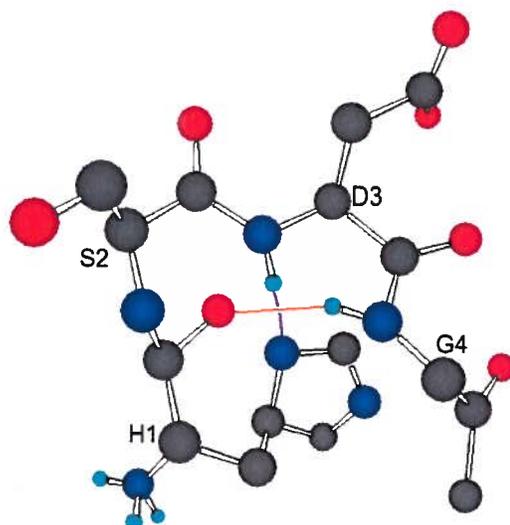


Figure 33: Représentation schématique de la conformation bioactive du segment 1-4 du PACAP suggérée par notre étude de relations structure-activité. Le pont hydrogène reliant C-O(His¹) et N-H(Gly⁴) est identifié par la ligne orange. Le pont hydrogène impliquant δ_1 N(His¹) et N-H(Asp³) est indiqué par le trait mauve. Les atomes de carbone, d'azote, d'oxygène et d'hydrogène sont représentés en gris, rouge, bleu et turquoise, respectivement.

Toutefois, l'analyse structurale de l'agoniste contraint, [Pro²]PACAP27, n'a pu confirmer une telle structure même si des connectivités NOE et des angles ϕ et ψ caractéristiques d'une conformation en coude β ont été observés (Chapitre 4). L'absence de certaines connectivités NOE résultant de la présence d'une proline en position $i + 1$ et du fait que le résidu i , histidine-1, soit également le premier résidu de la séquence peptidique a empêché la stabilisation des structures générées par modélisation moléculaire. L'ajout d'un résidu à l'extrémité N-terminale de [Pro²]PACAP27 pourrait être ultérieurement exploré afin d'observer un coude impliquant les résidus His-Pro-Asp-Gly. En effet, l'addition d'un acide aminé en bout de chaîne permettra d'obtenir des connectivités NOE supplémentaires et ainsi augmenter le nombre de contraintes utilisées pour les calculs de modélisation moléculaire. De même, cette modification aura comme effet de stabiliser une certaine structure tridimensionnelle du domaine N-terminal. Néanmoins, il importe que cette modification n'induisse pas une perte d'activité significative ainsi qu'une déstabilisation importante de la conformation bioactive. Par exemple, une alanine pourrait être incorporée puisque ce résidu présente un faible poids

moléculaire, aucune charge, une hydrophobicité modérée et qu'il n'induit pas de changement conformationnel important.

Lors de cette étude de relations structure-activité, un puissant antagoniste du récepteur PAC1 a été identifié, soit l'analogue [Sar⁴]PACAP38. Particulièrement, celui-ci s'est avéré plus puissant que le PACAP(6-38), antagoniste couramment utilisé, pour inhiber la mobilisation calcique induite par le PACAP38 dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur PAC1. Afin de valider le potentiel du composé [Sar⁴]PACAP38 comme outil pharmacologique, l'affinité de ce composé envers les récepteurs VPAC1 et VPAC2 ainsi que sa puissance doivent maintenant être déterminées. Nos résultats préliminaires indiquent que cet analogue présente une faible affinité envers le récepteur VPAC1 ($IC_{50} = 1370$ nM) et que celui-ci lie le récepteur VPAC2 avec une affinité supérieure ($IC_{50} = 155$ nM). À cet égard, une IC_{50} de 97 nM avait été observée lors des tests de liaisons compétitives impliquant le récepteur PAC1. Ce résultat est en accord avec les études de relations structure-activité antérieures qui exposaient que le récepteur VPAC1 est sensible aux modifications ciblant le domaine N-terminal, contrairement au récepteur VPAC2, qui lui est plus tolérant à la réduction du segment N-terminal du PACAP (Gourlet *et al.*, 1995). L'activité biologique de [Sar⁴]PACAP38 dans des préparations pharmacologiques des récepteurs VPAC1 et VPAC2 n'a pas été évaluée. Néanmoins, les essais biologiques impliquant les récepteurs de type II sont actuellement en cours de développement au sein de notre équipe.

Afin de poursuivre la caractérisation des déterminants moléculaires et conformationnels nécessaires à l'activation du récepteur PAC1 et d'évaluer les hypothèses émises concernant la conformation bioactive du domaine N-terminal, diverses modifications chimiques pourront être ultérieurement explorées. Par exemple, l'histidine pourrait être remplacée par une asparagine afin de favoriser la formation d'un pont hydrogène impliquant la chaîne latérale du résidu en position 1 et le corps peptidique, comme schématisé à la figure 33. En effet, tout comme l'histidine, la chaîne latérale de l'asparagine est reconnue pour former un pont hydrogène avec le squelette peptidique lorsque ce résidu est localisé en position *i* d'un coude (Hutchinson & Thornton, 1994).

Notamment, le développement d'analogues [Asn¹, Pro²]PACAP permettra d'évaluer la présence d'un coude de type Asx-Pro au niveau de la conformation bioactive du domaine N-terminal. De même, des substitutions de l'histidine en position 1 par une librairie d'acides aminés comportant diverses chaînes latérales (cyclopentylalanine, furylalanine, thiazolylalanine, thiénylalanine) permettraient de clarifier l'implication du noyau imidazole dans l'activation du récepteur PAC1 et pourraient conduire à l'identification de puissants agonistes. En considérant l'effet stabilisateur de l'incorporation d'une proline C- α -méthylée en position $i + 1$ sur une conformation en coude β , la sérine en position 2 pourrait être remplacée par une α -MePro afin d'obtenir des informations additionnelles sur la conformation bioactive (Baeza *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 1992).

D'autres modifications structurales induisant la formation d'un coude β , comme la substitution des résidus sérine-2 et acide aspartique-3 par divers mimes de coude β dipeptidiques, la cyclisation du corps peptidique entre ces deux résidus (γ -lactame) ou l'incorporation d'un groupement méthyle sur le C α de l'acide aspartique-3 pourront être employées. Toutefois, à la lumière des résultats pharmacologiques obtenus avec les analogues modifiés à la position 3, une attention particulière devra être portée à la fonction carboxylique et à son positionnement relatif au squelette peptidique. À cet égard, une analyse approfondie portant sur la chaîne latérale du résidu en position 3 à l'aide de diverses substitutions (Dab, Dap, Gla, HoSer, HoSer(H₂PO₃), Abu, Sta) devra être également entreprise afin de mieux comprendre l'implication de ce résidu clé dans l'activation du récepteur PAC1. Cette approche pourrait également conduire à une meilleure interprétation des résultats divergents obtenus à l'aide des analogues du PACAP27 et du PACAP38 modifiés à la position 3 (Chapitre 4). D'autre part, l'incorporation des résidus biphénylalanine (Bip) ou naphtylalanine (Nal) en position 6 a conduit à un accroissement de la puissance du PACAP. Ces résultats suggèrent que l'activation du récepteur PAC1 peut être modulée par l'augmentation du caractère hydrophobe de ce résidu. De ce fait, le développement d'une librairie d'analogues modifiés en position 6 avec des résidus comportant des chaînes latérales hydrophobes diverses pourrait conduire à l'identification de superagonistes du récepteur PAC1. À cet égard, la réaction de Suzuki-Miyaura, développée pour la synthèse peptidique en phase

solide au sein de notre équipe, faciliterait la réalisation de cette chimiothèque (Doan *et al.*, 2008) puisque celle-ci permet l'incorporation d'une importante diversité de composés à la position *para* de la chaîne latérale d'une phénylalanine.

Chapitre 6: Conclusion

Le projet de recherche présenté dans cette thèse a montré que la stabilité métabolique du PACAP peut être renforcée à l'aide de modifications chimiques ciblées tout en préservant l'activité biologique du peptide. Pour ce faire, nous avons initialement déterminé les principaux métabolites générés suite à l'incubation du PACAP dans du plasma humain ou dans une préparation enrichie en DPP IV. En considérant les principaux sites de clivage enzymatique ainsi identifiés, une librairie d'analogues a été rationnellement développée. De cette chimiothèque, le dérivé acétyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]-PACAP38-propylamide s'est avéré un superagoniste du récepteur PAC1 tout en démontrant une stabilité métabolique accrue. La capacité de ce peptide stabilisé à diminuer la neurodégénérescence est actuellement étudiée dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat. Nos résultats préliminaires indiquent que ce dérivé diminue significativement le volume de la zone infarctée et facilite la reprise des comportements moteurs suite à un accident ischémique transitoire chez le rat.

Une importante étude de relations structure-activité a également été entreprise afin d'acquérir de précieuses informations pouvant conduire au développement rationnel de peptides courts et/ou contraints. Tout d'abord, nous avons montré que de nombreux résidus du PACAP semblent être impliqués dans la liaison au récepteur PAC1 et que la présence d'une conformation hélicoïdale au niveau du domaine C-terminal ne constitue pas une composante suffisante permettant l'ancrage du peptide au récepteur. Nous avons néanmoins identifié un dérivé hybride, (1-13)-Aca-(20-27)PACAP, qui agit comme un faible agoniste complet du récepteur PAC1. Ce composé pourrait être ultérieurement modifié afin de lui procurer une affinité améliorée. De plus, nos résultats laissent présager que le fragment 1-13 du PACAP pourrait servir de plate-forme moléculaire supportant la conception d'analogues raccourcis agissant comme agonistes du récepteur PAC1.

D'autre part, nous avons identifié un puissant antagoniste du récepteur PAC1, [Sar⁴]PACAP38, ainsi que certains superagonistes, comme les dérivés [Bip⁶]PACAP27, [Nal⁶]PACAP27 et [Ala⁷]PACAP38. Particulièrement, notre étude de relations structure-

activité ciblant le domaine N-terminal du PACAP a révélé que l'intégrité de l'hélice α observée pour le segment 5-7 est cruciale pour la liaison du peptide au récepteur. En outre, nos résultats suggèrent que les résidus histidine-1 à glycine-4 doivent adopter une conformation précise similaire à celle observée pour un coude Asx-Pro afin que le PACAP puisse activer potentiellement le récepteur PAC1. L'introduction de contraintes conformationnelles devra être poursuivie afin de valider cette hypothèse. L'identification de la conformation bioactive du domaine N-terminal pourrait éventuellement soutenir la conception rationnelle de peptides courts et contraints, de dérivés sélectifs du récepteur PAC1 ou même d'agonistes non-peptidiques.

À cet effet, de nombreux GPCR de la classe B sont pharmacologiquement attractifs pour le traitement de diverses physiopathologies. Toutefois, ceux-ci sont actuellement considérés comme des cibles thérapeutiques difficiles puisque l'identification de ligands non-peptidiques a été infructueuse jusqu'à présent. En fait, la quasi totalité de ces ligands sont des antagonistes bien que des agonistes soient majoritairement requis pour les diverses applications cliniques. L'absence de puissants agonistes non-peptidiques des GPCR de la classe B malgré leur fort potentiel thérapeutique et commercial suggère que ces récepteurs pourraient ne pas être activés par de petites molécules organiques (< 700 Da). En considérant le corps peptidique étendu, le nombre important de groupements chimiques ainsi que le haut poids moléculaire des ligands endogènes des RCPG de la classe B, il est possible que la barrière énergétique permettant d'atteindre l'état actif du récepteur soit impossible à franchir à l'aide de petits ligands organiques. Néanmoins, le fait que des peptides relativement courts peuvent activer les récepteurs PTH-1 et calcitonine et que le domaine N-terminal des ligands endogènes des RCPG de la classe B soit essentiellement responsable de l'activation laisse entrevoir la possibilité d'identifier des agonistes non-peptidiques. Une meilleure compréhension de la conformation bioactive de ces ligands peptidiques, particulièrement au niveau du domaine N-terminal, semble être la clé pour rationaliser et optimiser l'identification d'agonistes non-peptidiques des RCPG de la classe B.

Nonobstant le large spectre des effets physiologiques du PACAP et son potentiel thérapeutique comme agent neuroprotecteur, peu d'études de relations structure-activité portant sur ce neuropeptide étaient disponibles dans la littérature. Le manque d'informations découlant de ce nombre restreint d'études compromettait tout particulièrement le développement de puissants agonistes sélectifs du récepteur PAC1 affichant des paramètres pharmacologiques et pharmacocinétiques améliorés. Mon projet de thèse a donc été entrepris dans ce contexte. Les résultats de ce projet de recherche contribueront certainement à l'avancement des connaissances concernant le mécanisme d'action du PACAP à l'échelle moléculaire. Notamment, au moyen de modifications chimiques ciblées nous avons proposé un modèle novateur de la conformation bioactive du domaine N-terminal du PACAP. En outre, notre étude de relations structure-activité combinant de nombreuses approches rationnelles (*Ala-scan*, *D-scan*, *N-methyl-scan*, substitutions, RMN) constituera très certainement une référence pour l'identification des déterminants moléculaires et conformationnels des ligands peptidiques des RCPG de la classe B. De même, notre démarche expérimentale employée pour développer des analogues stables, en s'appuyant sur l'identification des sites de clivage enzymatique, constitue une approche originale pouvant être utilisée pour divers peptides biologiquement actifs. Dans son ensemble, ce projet de thèse aura permis de faire progresser significativement la compréhension de la pharmacologie moléculaire du PACAP à la base de ses activités biologiques. Les outils pharmacologiques et les renseignements cruciaux émanant de ce projet de recherche pourront faciliter l'évaluation du potentiel thérapeutique d'agonistes du récepteur PAC1 dans le traitement des dommages neurologiques rencontrés lors d'AVC ischémiques. Considérant la forte prévalence des AVC en occident, l'exploration de nouvelles avenues thérapeutiques pouvant réduire le haut niveau de morbidité et d'invalidité associé à cette physiopathologie constitue un important enjeu humain et socio-économique.

Références

- Abad C., Martinez C., Leceta J., Juarranz M.G., Delgado M., Gomariz R.P. 2002. Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide expression in the immune system. Neuroimmunomodulation, vol. 10, p.177-186.
- Adamik A. & Telegdy G. 2005. Effects of pituitary adenylate cyclase polypeptide (PACAP) on extinction of active avoidance learning in rats: involvement of neurotransmitters. Regulatory Peptides, vol.127, p. 55-62.
- Adessi C. & Soto C. 2002. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. Current Medicinal Chemistry, vol. 9, p. 963-978.
- Aino H., Hashimoto H., Ogawa N., Nishino A., Yamamoto K., Nogi H., Nagata S., Baba A. 1995. Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. Gene, vol. 164, p. 301-304.
- Alana I., Hewage C.M., Malthouse J.P., Parker J.C., Gault V.A., O'Harte F.P. 2004. NMR structure of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide fragment, GIP(1-30)amide. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 325, p.281-286.,
- Allais A., Burel D., Isaac E.R., Gray S.L., Basille M., Ravni A., Sherwood N.M., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2007. Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. European Journal of Neuroscience, vol. 25, p. 2604-2618.
- Arimura A., Li M., Batuman V. 2006. Treatment of renal failure associated with multiple myeloma and other diseases by PACAP-38. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1070, p. 1-4.
- Arimura A., Shioda S. 1995. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. Frontiers in Neuroendocrinology, vol. 16, p. 53-88.
- Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Miyata A., Mizuno K., Coy D.H., Kitada C. 1991. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. Endocrinology, vol. 129, p. 2787-2789.
- Aubert N., Basille M., Falluel-Morel A., Vaudry D., Bucharles C., Jolivel V., Fisch C., De Jouffrey S., Le Bigot J.F., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2007. Molecular, cellular, and functional characterizations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in the cerebellum of New and Old World monkeys. Journal of Comparative Neurology, vol. 504, p. 427-439.

Aubert N., Falluel-Morel A., Vaudry D., Xifro X., Rodriguez-Alvarez J., Fisch C., de Jouffrey S., Lebigot J.F., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2006. PACAP and C2-ceramide generate different AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. Journal of Neurochemistry, vol. 99, p. 1237-1250.

Aubert N., Vaudry D., Falluel-Morel A., Desfeux A., Fisch C., Ancian P., de Jouffrey S., Le Bigot J.F., Couvineau A., Laburthe M., Fournier A., Laudénbach V., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2008. PACAP prevents toxicity induced by cisplatin in rat and primate neurons but not in proliferating ovary cells: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. Neurobiology of Disease, vol. 32, p. 66-80.

Aurora R., Rose G.D. 1998. Helix capping. Protein Science, vol. 7, p. 21-38.

Baeza J.L., Gerona-Navarro G., Pérez de Vega M.J., García-López M.T., Gonzalez-Muñiz R., Martín-Martínez M. 2008. Azetidide-derived amino acids versus proline derivatives. alternative trends in reverse turn induction. Journal of Organic Chemistry, vol. 73, p. 1704-1715.

Baeza J.L., Gerona-Navarro G., Pérez de Vega M.J., García-López M.T., Gonzalez-Muñiz R., Martín-Martínez M. 2008. Azetidide-derived amino acids versus proline derivatives. alternative trends in reverse turn induction. Journal of Organic Chemistry, vol. 73, p. 1704-1715

Banks W.A., Goulet M., Rusche J.R., Niehoff M.L., Boismenu R. 2002. Differential transport of a secretin analog across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers of the mouse. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 302, p. 1062-1069.

Banks W.A. & Kastin A.J. 1985. Permeability of the blood-brain barrier to neuropeptides: the case for penetration. Psychoneuroendocrinology, vol. 10, p. 385-399.

Banks W.A., Kastin A.J., Arimura A. 1998. Effect of spinal cord injury on the permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to the neurotrophin PACAP. Experimental Neurology, vol. 151, p. 116-123.

Banks W.A., Kastin A.J., Komaki G., Arimura A. 1993. Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 267, p. 690-696.

Banks W.A., Uchida D., Arimura A., Somogyvari-Vigh A., Shioda S. 1996. Transport of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide across the blood-brain barrier and the prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 805, p. 270-279.

- Basille M., Cartier D., Vaudry D., Lihrmann I., Fournier A., Freger P., Gallo-Payet N., Vaudry H., Gonzalez B. 2006. Localization and characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the human cerebellum during development. Journal of Comparative Neurology, vol. 496, p. 468-478.
- Basille M., Gonzalez B.J., Fournier A., Vaudry H. 1994. Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the rat cerebellum: a quantitative autoradiographic study. Brain Research - Developmental Brain Research, vol. 82, p. 81-89.
- Basille M., Gonzalez B.J., Leroux P., Jeandel L., Fournier A., Vaudry H. 1993. Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. Neuroscience, vol. 57, p. 329-338.
- Basille M., Vaudry D., Coulouarn Y., Jegou S., Lihrmann I., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B. 2000. Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development. Journal of Comparative Neurology, vol. 425, p. 495-509.
- Beebe X., Darczak D., Davis-Taber R.A., Uchic M.E., Scott V.E., Jarvis M.F., Stewart AO. 2008. Discovery and SAR of hydrazide antagonists of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor type 1 (PAC1-R). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 18, p. 2162-2166.
- Beinborn M. 2006. Class B GPCRs: a hidden agonist within? Molecular Pharmacology, vol. 70, p. 1-4.
- Benchoua A., Guégan C., Couriaud C., Hosseini H., Sampaio N., Morin D., Onténiente B. 2001. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. Journal of Neuroscience, vol. 21, p. 7127-7134.
- Bhave S.V. & Hoffman P.L. 2004. Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. Journal of Neurochemistry, vol. 88, p. 359-369.
- Birk S., Sitarz J.T., Petersen K.A., Oturai P.S., Kruuse C., Fahrenkrug J., Olesen J. 2007. The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers. Regulatory Peptides, vol. 140, p. 185-191.
- Blank J.T., Guerin D.J., Miller S.J. 2000. A His-Pro-Aib peptide that exhibits an Asx-Pro-turn-like structure. Organic Letters, vol. 2, p. 1247-1249.

- Blankenfeldt W., Nokihara K., Naruse S., Lessel U., Schomburg D., Wray V. 1996. NMR spectroscopic evidence that helodermin, unlike other members of the secretin/VIP family of peptides, is substantially structured in water. Biochemistry, vol. 35, p. 5955-5962.
- Bockaert J., Pin J.P. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. EMBO Journal, vol. 18, p.1723-1729.
- Bolin D.R., Michalewsky J., Wasserman M.A., O'Donnell M. 1995. Design and development of a vasoactive intestinal peptide analog as a novel therapeutic for bronchial asthma. Biopolymers, vol. 37, p. 57-66.
- Bouvier M., Taylor J.W. 1992. Probing the functional conformation of neuropeptide Y through the design and study of cyclic analogues. Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 1145-1155.
- Brandt I., Lambeir A.M., Maes M.B., Scharpé S., De Meester I. 2006. Peptide substrates of dipeptidyl peptidases. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 575, p. 3-18.
- Braun W., Wider G., Lee K.H., Wüthrich K. 1983. Conformation of glucagon in a lipid-water interphase by 1H nuclear magnetic resonance. Journal of Molecular Biology, vol. 169, p. 921-948.
- Bredow S., Kacsóh B., Obál F., Fang J., Krueger J.M. 1994. Increase of prolactin mRNA in the rat hypothalamus after intracerebroventricular injection of VIP or PACAP. Brain Research, vol. 660, p. 301-308.
- Brenneman D.E. 2007. Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Peptides, vol. 28, p. 1720-1726.
- Brenneman D.E., Hauser J.M., Spong C., Phillips T.M. 2002. Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. Neuropeptides, vol. 36, p. 271-280.
- Buscail L., Gourlet P., Cauvin A., De Neef P., Gossen D., Arimura A., Miyata A., Coy D.H., Robberecht P., Christophe J. 1990. Presence of highly selective receptors for PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) in membranes from the rat pancreatic acinar cell line AR 4-2J. FEBS Letters, vol. 262, p. 77-81.
- Cameron D.B., Galas L., Jiang Y., Raoult E., Vaudry D., Komuro H. 2007. Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Neuroscience, vol. 146, p. 697-712.

- Cauvin A., Robberecht P., De Neef P., Gourlet P., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Christophe J. 1991. Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord. Regulatory Peptides, vol. 35, p. 161-173.
- Cauvin A., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A., Coussaert E., de Neef P., Robberecht P., Christophe J. 1990. Rat PHI, PHI-GLY and PHV (1-42) stimulate adenylate cyclase in six rat tissue and cell membranes. Peptides, vol. 11, p. 1009-1014.
- Cecconi S., Rossi G., Barberi M., Scaldaferrì L., Canipari R. 2004. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on mouse preantral follicle development in vitro. Endocrinology, vol. 145, p. 2071-2079.
- Ceraudo E., Murail S., Tan Y.V., Lacapère J.J., Neumann J.M., Couvineau A., Laburthe M. 2008a. The vasoactive intestinal peptide (VIP) alpha-Helix up to C terminus interacts with the N-terminal ectodomain of the human VIP/Pituitary adenylate cyclase-activating peptide 1 receptor: photoaffinity, molecular modeling, and dynamics. Molecular Endocrinology, vol. 22, p. 147-155.
- Ceraudo E., Tan Y.V., Nicole P., Couvineau A., Laburthe M. 2008b. The N-Terminal Parts of VIP and Antagonist PG97-269 Physically Interact with Different Regions of the Human VPAC1 Receptor. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 36, p. 245-248.
- Chance W.T., Thompson H., Thomas I., Fischer J.E. 1995. Anorectic and neurochemical effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in rats. Peptides, vol. 16, p.1511-1516.
- Chang C.T., Wu C.S., Yang J.T. 1978. Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta-turns. Analytical Biochemistry, vol. 91, p. 13-31.
- Chartrel N., Tonon M.C., Vaudry H., Conlon J.M. 1991. Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. Endocrinology, vol. 129, p. 3367-3371.
- Chatterjee T.K., Sharma R.V., Fisher R.A. 1996. Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 32226-32232.
- Chen W., Inui T., Hachiya T., Ochi Y., Nakajima Y., Kajita Y. 1993. Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 194, p. 923-929.
- Chen Y., Samal B., Hamelink C.R., Xiang C.C., Chen Y., Chen M., Vaudry D., Brownstein M.J., Hallenbeck J.M., Eiden L.E. 2006. Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. Regulatory Peptides, vol. 137, p. 4-19.

- Chen W.H. & Tzeng SF. 2005. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cell death in the spinal cord with traumatic injury. Neuroscience Letters, vol. 384, p. 117-121.
- Chen Y.H., Yang J.T., Chau K.H. 1974. Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. Biochemistry, vol. 13, p. 3350-3359.
- Colwell C.S., Michel S., Itri J., Rodriguez W., Tam J., Lelièvre V., Hu Z., Waschek J.A. 2004. Selective deficits in the circadian light response in mice lacking PACAP. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, vol. 287, p. 1194-1201.
- Conroy D.M., St-Pierre S., Sirois P. 1995. Relaxant effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on epithelium-intact and -denuded guinea-pig trachea: a comparison with vasoactive intestinal peptide (VIP). Neuropeptides, vol. 29, p. 121-127.
- Counis R., Laverrière J.N., Garrel-Lazayres G., Cohen-Tannoudji J., Larivière S., Bleux C., Magre S. 2007. What is the role of PACAP in gonadotrope function? Peptides, vol. 28, p. 1797-1804
- Couvineau A., Gaudin P., Maoret J.J., Rouyer-Fessard C., Nicole P., Laburthe M. 1995. Highly conserved aspartate 68, tryptophane 73 and glycine 109 in the N-terminal extracellular domain of the human VIP receptor are essential for its ability to bind VIP. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 206, p. 246-252.
- Couvineau A., Rouyer-Fessard C., Maoret J.J., Gaudin P., Nicole P., Laburthe M. 1996. Vasoactive intestinal peptide (VIP)1 receptor. Three nonadjacent amino acids are responsible for species selectivity with respect to recognition of peptide histidine isoleucineamide. Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 12795-12800.
- Culler M.D., Kenjo T., Obara N., Arimura A. 1984. Stimulation of pituitary cAMP accumulation by human pancreatic GH-releasing factor-(1-44). American Journal of Physiology, vol. 247, p. 609-615.
- Culler M.D., Paschall C.S. 1991. Pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (PACAP) potentiates the gonadotropin-releasing activity of luteinizing hormonereleasing hormone. Endocrinology, vol. 129, p. 2260-2262.
- Cummings K.J., Pendlebury J.D., Sherwood N.M., Wilson R.J. 2004. Sudden neonatal death in PACAP-deficient mice is associated with reduced respiratory chemoresponse and susceptibility to apnoea. Journal of Physiology, vol. 555, p. 15-26.
- Daniel P.B. & Habener J.F. 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression regulated by a testis-specific promoter in germ cells during spermatogenesis. Endocrinology, vol. 141, p. 1218-1227.

Daniel P.B., Kieffer T.J., Leech C.A., Habener J.F. 2001. Novel alternatively spliced exon in the extracellular ligand-binding domain of the pituitary adenylylase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) selectively increases ligand affinity and alters signal transduction coupling during spermatogenesis. Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 12938-12944.

Dautzenberg F.M., Mevenkamp G., Wille S., Hauger R.L. 1999. N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. Journal of Neuroendocrinology, vol. 11, p. 941-949.

DeHaven W.I. & Cuevas J. 2004. VPAC receptor modulation of neuroexcitability in intracardiac neurons: dependence on intracellular calcium mobilization and synergistic enhancement by PAC1 receptor activation. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 40609-40621.

Dejda A., Jolivel V., Bourgault S., Seaborn T., Fournier A., Vaudry H., Vaudry D. 2008. Inhibitory Effect of PACAP on Caspase Activity in Neuronal Apoptosis: A Better Understanding Towards Therapeutic Applications in Neurodegenerative Diseases. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 36, p. 26-37.

Delgado M., Leceta J., Gomariz R.P. 2003. PACAP receptors signaling. Pituitary Adenylylase-Activating Polypeptide. Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 305-322.

Delgado M., Pozo D., Martinez C., Leceta J., Calvo J.R., Ganea D., Gomariz R.P. 1999. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylylase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. Journal of Immunology, vol. 162, p. 2358-2367.

Dickinson T., Fleetwood-Walker S.M., Mitchell R., Lutz E.M. 1997. Evidence for roles of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylylase activating polypeptide (PACAP) receptors in modulating the responses of rat dorsal horn neurons to sensory inputs. Neuropeptides, vol. 31, p. 175-185.

Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends in Neuroscience, vol. 22, p. 391-397.

Dirnagl U., Simon R.P., Hallenbeck J.M. 2003. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. Trends in Neuroscience, vol. 26, p. 248-254.

Doan N.D., Bourgault S., Létourneau M., Fournier A. 2008. Effectiveness of the suzuki-miyaura cross-coupling reaction for solid-phase peptide modification. Journal of Combinatorial Chemistry, vol. 10, p. 44-51.

Dogrukol-Ak D., Kumar V.B., Ryerse J.S., Farr S.A., Verma S., Nonaka N., Nakamachi T., Ohtaki H., Niehoff M.L., Edwards J.C., Shioda S., Morley J.E., Banks W.A. 2009 Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, vol. 29, p. 411-422.

Dogrukol-Ak D., Tore F., Tuncel N. 2002. Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. Current Pharmaceutical Design, vol. 10, p. 1325-1340.

Dohi K., Mizushima H., Nakajo S., Ohtaki H., Matsunaga S., Aruga T., Shioda S. 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. Regulatory Peptides, vol. 109, p. 83-88.

Dong M., Li Z., Pinon D.I., Lybrand T.P., Miller L.J. 2004. Spatial approximation between the amino terminus of a peptide agonist and the top of the sixth transmembrane segment of the secretin receptor. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 2894-2903.

Dong M., Hosohata K., Pinon D.I., Muthukumaraswamy N., Miller L.J. 2006a. Differential spatial approximation between secretin and its receptor residues in active and inactive conformations demonstrated by photoaffinity labeling. Molecular Endocrinology, vol. 20, p. 1688-1698.

Dong M., Pinon D.I., Asmann Y.W., Miller L.J. 2006b. Possible endogenous agonist mechanism for the activation of secretin family G protein-coupled receptors. Molecular Pharmacology, vol. 70, p. 206-213.

Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M. 2008. Stroke. Lancet, vol. 371, p. 1612-1623.

Dorner G.T., Wolzt M., Eichler H.G., Schmetterer L. 1998. Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1-27 on ocular, cerebral and skin blood flow in humans. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, vol. 358, p. 657-662.

Dow R.C., Bennie J., Fink G. 1994. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophysial portal blood in the normal male and female rat. Journal of Endocrinology, vol. 142, p. 1-4.

El-Gehani F., Tena-Sempere M., Huhtaniemi I. 2000. Evidence that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. Biology of Reproduction, vol. 63, p. 1482-1489.

- El Zein N., Badran B., Sariban E. 2008. The neuropeptide pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates Ca²⁺ and pro-inflammatory functions in human monocytes through the G protein-coupled receptors VPAC-1 and formyl peptide receptor-like 1. Cell Calcium, vol. 43, p. 270-284.
- Falluel-Morel A., Aubert N., Vaudry D., Basille M., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2004. Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. Journal of Neurochemistry, vol. 91, p. 1231-1243.
- Farkas O., Tamas A., Zsombok A., Reglodi D., Pal J., Buki A., Lengvari I., Povlishock J.T., Doczi T. 2004. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. Regulatory Peptides, vol. 123, p. 69-75.
- Ferrer I., Planas A.M. 2003. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, vol. 62, p. 329-339.
- Fournier A., Saunders J.K., St-Pierre S. 1984. Synthesis, conformational studies and biological activities of VIP and related fragments. Peptides, vol. 5, p. 169-177.
- Forster C., Clark H.B., Ross M.E., Iadecola C. 1999. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. Acta Neuropathology, vol. 97, p. 215-220.
- Frase L.L., Gaffney F.A., Lane L.D., Buckey J.C., Said S.I., Blomqvist C.G., Krejs G.J. 1987. Cardiovascular effects of vasoactive intestinal peptide in healthy subjects. American Journal of Cardiology, vol. 60, p. 1356-1361.
- Fredriksson R., Lagerström M.C., Lundin L.G., Schiöth H.B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Molecular Pharmacology, vol. 63, p. 1256-1272.
- Friedlander R.M. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. New England Journal of Medicine, vol. 348, p. 1365-1375.
- Freidinger R.M. 2003. Design and synthesis of novel bioactive peptides and peptidomimetics. Journal of Medicinal Chemistry, vol. 46, p. 5553-5566.
- Fry D.C., Madison V.S., Bolin D.R., Greeley D.N., Toome V., Wegrzynski B.B. 1989. Solution structure of an analogue of vasoactive intestinal peptide as determined by two-dimensional NMR and circular dichroism spectroscopies and constrained molecular dynamics. Biochemistry, vol. 28, p. 2399-2409.
- Fukuhara C., Inouye S.I., Matsumoto Y., Tsujimoto G., Aoki K., Masuo Y. 1998. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide rhythm in the rat pineal gland. Neuroscience Letters, vol. 241, p. 115-118.

- Gaudin P., Couvineau A., Maoret J.J., Rouyer-Fessard C., Laburthe M. 1995. Mutational analysis of cysteine residues within the extracellular domains of the human vasoactive intestinal peptide (VIP) 1 receptor identifies seven mutants that are defective in VIP binding. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 211, p. 901-908.
- Gensure R.C., Shimizu N., Tsang J., Gardella T.J. 2003. Identification of a contact site for residue 19 of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein analogs in transmembrane domain two of the type 1 PTH receptor. Molecular Endocrinology, vol. 17, p. 2647-2658.
- Gerlai R., Thibodeaux H., Palmer J.T., Van Lookeren Campagne M., Van Bruggen N. 2000. Transient focal cerebral ischemia induces sensorimotor deficits in mice. Behavioral Brain Research, vol. 108, p.63-71.
- Gether U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. Endocrinology Reviews, vol. 21, p. 90-113.
- Ghatei M.A., Takahashi K., Suzuki Y., Gardiner J., Jones P.M., Bloom S.R. 1993. Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. Journal of Endocrinology, vol. 136, p.159-166.
- Gillard E.R., León-Olea M., Mucio-Ramírez S., Coburn C.G., Sánchez-Islas E., de Leon A., Mussenden H., Bauce L.G., Pittman Q.J., Currás-Collazo M.C. 2006. A novel role for endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the magnocellular neuroendocrine system. Endocrinology, vol. 147, p. 791-803.
- Glad H., Ainsworth M.A., Svendsen P., Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O.B. 2003. Effect of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on pancreatic, hepatic and duodenal mucosal bicarbonate secretion in the pig. Digestion, vol. 67, p. 56-66.
- Gonzalez B.J., Basille M., Vaudry D., Fournier A., Vaudry H. 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. Neuroscience, vol. 78, p. 419-430.
- Gonzalez-Muniz R., Martin-Martinez M., Granata C., de Oliveira E., Santiveri C.M., Gonzalez C., Frechilla D., Herranz R., Garcia-Lopez M.T., Del Rio J., Angeles Jimenez M., Andreu D. 2001. Conformationally restricted PACAP27 analogues incorporating type II/II' IBTM beta-turn mimetics. Synthesis, NMR structure determination, and binding affinity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 9, p. 3173-3183.
- Gottschall P.E., Tatsuno I., Arimura A. 1994. Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Brain Research, vol. 637, p. 197-203.

Gottschall P.E., Tatsuno I., Miyata A., Arimura A. 1990. Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Endocrinology, vol. 127, p. 272-277.

Gourlet P., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M., Robberecht P. 1997a. In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. Peptides, vol. 18, p. 1555-1560.

Gourlet P., Vandermeers A., Robberecht P., Deschodt-Lanckman M. 1997b. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) degradation by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.11. Biochemical Pharmacology, vol. 54, p. 509-515.

Gourlet P., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., De Neef P., Robberecht P. 1996a. Addition of the (28-38) peptide sequence of PACAP to the VIP sequence modifies peptide selectivity and efficacy. International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 48, p. 391-396.

Gourlet P., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., De Neef P., Waelbroeck M., Robberecht P. 1996b. Effect of introduction of an arginine16 in VIP, PACAP and secretin on ligand affinity for the receptors. Biochimica and Biophysica Acta, vol. 1314, p. 267-273.

Gourlet P., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Rathe J., De Neef P., Robberecht P. 1995. Fragments of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide discriminate between type I and II recombinant receptors. European Journal of Pharmacology, vol. 287, p. 7-11.

Gourlet P., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Rathe J., De Neef P., Robberecht P. 1996c. C-terminally shortened pituitary adenylate cyclase-activating peptides (PACAP) discriminate PACAP I, PACAP II-VIP1 and PACAP II-VIP2 recombinant receptors. Regulatory Peptides, vol. 62, p. 125-130.

Gourlet P., Vandermeers A., Van Rampelbergh J., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M., Robberecht P. 1998. Analogues of VIP, helodermin, and PACAP discriminate between rat and human VIP1 and VIP2 receptors. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 865, p. 247-252.

Gourlet P., Vandermeers A., Vertongen P., Rathe J., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M., Robberecht P. 1997c. Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. Peptides, vol. 18, p.1539-1545.

Gourlet P., Woussen-Colle M.C., Robberecht P., de Neef P., Cauvin A., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A., Christophe J. 1991. Structural requirements for the binding of the pituitary adenylate-cyclase-activating peptide to receptors and adenylate-cyclase activation in pancreatic and neuronal membranes. European Journal of Biochemistry, vol. 195, p. 535-541.

Grace C.R., Perrin M.H., DiGruccio M.R., Miller C.L., Rivier J.E., Vale W.W., Riek R. 2004. NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 101, p. 12836-12841.

Gräs S., Host E., Fahrenkrug J. 2005. Role of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the cyclic recruitment of immature follicles in the rat ovary. Regulatory Peptides, vol. 128, p. 69-74.

Gray S.L., Cummings K.J., Jirik F.R., Sherwood N.M. 2001. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. Molecular Endocrinology, vol. 15, p. 1739-1747.

Gray S.L., Yamaguchi N., Vencová P., Sherwood N.M. 2002. Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Endocrinology, vol. 143, p. 3946-3954.

Greenfield N.J. 1996. Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. Analytical Biochemistry, vol. 235, p. 1-10.

Grinevich V., Fournier A., Pelletier G. 1997. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. Brain Research, vol. 773, p. 190-196.

Gronenborn A.M., Bovermann G., Clore G.M. 1987. A ¹H-NMR study of the solution conformation of secretin. Resonance assignment and secondary structure. FEBS Letter, vol. 215, p. 88-94.

Hahm S.H., Hsu C.M., Eiden L.E. 1998. PACAP activates calcium influx-dependent and -independent pathways to couple met-enkephalin secretion and biosynthesis in chromaffin cells. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 11, p. 43-56.

Hamelink C., Tjurmina O., Damadzic R., Young W.S., Weihe E., Lee H.W., Eiden L.E. 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 99, p. 461-466.

Hannibal J. & Fahrenkrug J. 1995. Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene by rat spermatogenic cells. Regulatory Peptides, vol. 55, p. 111-115.

Hannibal J., Jamen F., Nielsen H.S., Journot L., Brabet P., Fahrenkrug J. 2001. Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression in mice lacking the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor. Journal of Neuroscience, vol. 21, p. 4883-4890.

Harakall S.A., Brandenburg C.A., Gilmartin G.A., May V., Braas K.M. 1998. Induction of multiple pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) transcripts through alternative cleavage and polyadenylation of proPACAP precursor mRNA. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 865, p. 367-374.

Harmar A.J. 2001. Family-B G-protein-coupled receptors. Genome Biology, vol. 2.

Harmar A.J., Arimura A., Gozes I., Journot L., Laburthe M., Pisegna J.R., Rawlings S.R., Robberecht P., Said S.I., Sreedharan S.P., Wank S.A., Waschek J.A. 1998. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Pharmacological Reviews, vol. 50, p. 265-270.

Harmar A.J., Sheward W.J., Morrison C.F., Waser B., Gugger M., Reubi J.C. 2004. Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. Endocrinology, vol. 145, p. 1203-1210.

Hart G.R., Gowing H., Burrin J.M. 1992. Effects of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, on pituitary hormone release in rats. J Endocrinology, vol. 134, p. 33-41.

Hashimoto H., Nogi H., Mori K., Ohishi H., Shigemoto R., Yamamoto K., Matsuda T., Mizuno N., Nagata S., Baba A. 1996. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. Journal of Comparative Neurology, vol. 371, p. 567-577.

Hashimoto H., Shintani N., Baba A. 2006. New insights into the central PACAPergic system from the phenotypes in PACAP- and PACAP receptor-knockout mice. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1070, p. 75-89.

Hashimoto H., Shintani N., Nishino A., Okabe M., Ikawa M., Matsuyama S., Itoh K., Yamamoto K., Tomimoto S., Fujita T., Hagihara N., Mori W., Koyama Y., Matsuda T., Nagata S., Baba A. 2000. Mice with markedly reduced PACAP (PAC(1)) receptor expression by targeted deletion of the signal peptide. Journal of Neurochemistry, vol. 75, p. 1810-1817.

- Hashimoto H., Shintani N., Tanaka K., Mori W., Hirose M., Matsuda T., Sakaue M., Miyazaki J., Niwa H., Tashiro F., Yamamoto K., Koga K., Tomimoto S., Kunugi A., Suetake S., Baba A. 2001. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 98, p. 13355-13360.
- Heindel J.J., Powell C.J., Paschall C.S., Arimura A., Culler M.D. 1992. A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating peptide, modulates Sertoli cell function in vitro. Biology of Reproduction, vol. 47, p. 800-806.
- Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature, vol. 407, p. 770-776.
- Hoare S.R. 2005. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. Drug Discovery Today, vol. 10, p. 417-427.
- Hopsu-Havu V.K., Glenner G.G. 1966. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. Histochemie, vol. 7, p. 197-201.
- Hosoya M., Kimura C., Ogi K., Ohkubo S., Miyamoto Y., Kugoh H., Shimizu M., Onda H., Oshimura M., Arimura A. 1992. Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. Biochemica and Biophysica Acta, vol. 1129, p. 199-206.
- Hosoya M., Onda H., Ogi K., Masuda Y., Miyamoto Y., Ohtaki T., Okazaki H., Arimura A., Fujino M. 1993. Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 194, p.133-143.
- Hou X., Vandermeers A., Gourlet P., Vandermeers-Piret M.C., Robberecht P. 1994. Structural requirements for the occupancy of rat brain PACAP receptors and adenylate cyclase activation. Neuropharmacology, vol. 33, p.1189-1195.
- Hruby V.J. 2002. Designing peptide receptor agonists and antagonists. Nature Reviews Drug Discovery, vol. 1, p. 847-858.
- Hurley J.D., Gardiner J.V., Jones P.M., Bloom S.R. 1995. Cloning and molecular characterization of complementary deoxyribonucleic acid corresponding to a novel form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide messenger ribonucleic acid in the rat testis. Endocrinology, vol. 136, p. 550-557.
- Hutchinson E.G., Thornton J.M. 1994. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. Protein Science, vol. 3, p. 2207-2216.

- Iadecola C., Salkowski C.A., Zhang F., Aber T., Nagayama M., Vogel S.N., Ross M.E. 1999. The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury. Journal of Experimental Medicine, vol. 189, p. 719-727.
- Inooka H., Endo S., Kitada C., Mizuta E., Fujino M. 1992. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by ¹H NMR and CD spectroscopies and distance geometry in 25% methanol solution. International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 40, p.456-464.
- Inooka H., Ohtaki T., Kitahara O., Ikegami T., Endo S., Kitada C., Ogi K., Onda H., Fujino M., Shirakawa M. 2001. Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. Nature Structural Biology, vol. 8, p.161-165.
- Isaac E.R. & Sherwood N.M. 2008. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 280, p. 13-19.
- Ishizuka Y., Kashimoto K., Mochizuki T., Sato K., Ohshima K., Yanaihara N. 1992. Cardiovascular and respiratory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. Regulatory Peptides, vol. 40, p. 29-39.
- Jamen F., Persson K., Bertrand G., Rodriguez-Henche N., Puech R., Bockaert J., Ahrén B., Brabet P. 2000. PAC1 receptor-deficient mice display impaired insulinotropic response to glucose and reduced glucose tolerance. Journal of Clinical Investigation, vol. 105, p. 1307-1315.
- Jiang X., Jing H., Ganea D. 2002. VIP and PACAP down-regulate CXCL10 (IP-10) and up-regulate CCL22 (MDC) in spleen cells. Journal of Neuroimmunology, vol. 133, p. 81-94.
- Jolivel V., Basille M., Aubert N., de Jouffrey S., Ancian P., Le Bigot J.F., Noack P., Massonneau M., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J., Vaudry D. 2009. Distribution and Functional Characterization of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptors in the Brain of Non-Human Primates. Neuroscience, sous presse.
- Jongsma H., Pettersson L.M., Zhang Y.Z., Reimer M.K., Kanje M., Waldenström A., Sundler F., Danielsen N. 2001. Markedly reduced chronic nociceptive response in mice lacking the PAC1 receptor. Neuroreport, vol. 12, p. 2215-2219.
- Joo K.M., Chung Y.H., Kim M.K., Nam R.H., Lee B.L., Lee K.H. Cha C.I. 2004. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. Journal of Comparative Neurology, vol. 476, p. 388-413.

Kang S.J., Wang S., Hara H., Peterson E.P., Namura S., Amin-Hanjani S., Huang Z., Srinivasan A., Tomaselli K.J., Thornberry N.A., Moskowitz M.A., Yuan J. 2000. Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. Journal of Cell Biology, vol. 149, p. 613-622.

Kastin A.J., Akerstrom V., Pan W. 2002. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 18, p. 7-14.

Kelly S.M. & Price N.C. 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. Current Protein and Peptide Science, vol. 1, p. 349-384.

Kolakowski L.F. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. Receptors Channels, vol. 2, p. 1-7.

Kong L.Y., Maderdrut J.L., Jeohn G.H., Hong J.S. 1999. Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Neuroscience, vol. 91, p. 493-500.

Köves K., Kántor O., Molnár J., Heinzlmann A., Szabó E., Szabó F., Nemeskéri A., Horváth J., Arimura A. 2003. The role of PACAP in gonadotropic hormone secretion at hypothalamic and pituitary levels. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 20, p. 141-152.

Kühn-Wache K, Hoffmann T., Manhart S., Brandt W., Demuth H.U. 2003. The specificity of DP IV for natural substrates is peptide structure determined. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 524, p. 57-63.

Labrie F., Borgeat P., Drouin J., Beaulieu M., Lagacé L., Ferland L., Raymond V. 1979. Mechanism of action of hypothalamic hormones in the adenohipophysis. Annual Review of Physiology, vol. 41, p. 555-569.

Labrie F., Veilleux R., Lefevre G., Coy D.H., Sueiras-Diaz J., Schally A.V. 1982. Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs. Science, vol. 216, p. 1007-1008.

Laburthe M., Couvineau A., Gaudin P., Maoret J.J., Rouyer-Fessard C., Nicole P. 1996. Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 805, p. 94-109.

Laburthe M. & Couvineau A. 2002. Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. Regulatory Peptides, vol. 108, p.165-173.

- Laburthe M., Couvineau A., Tan V. 2007. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. Peptides, vol. 28, p. 1631-1639.
- Lambeir A.M., Durinx C., Proost P., Van Damme J., Scharpe S., De Meester I. 2001. Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. FEBS Letters, vol. 507, p. 327-330.
- Lang B., Song B., Davidson W., MacKenzie A., Smith N., McCaig C.D., Harmar A.J., Shen S. 2006. Expression of the human PAC1 receptor leads to dose-dependent hydrocephalus-related abnormalities in mice. Journal of Clinical Investigation, vol. 116, p. 1924-1934.
- Lee M., Lelievre V., Zhao P., Torres M., Rodriguez W., Byun J.Y., Doshi S., Ioffe Y., Gupta G., de los Monteros A.E., de Vellis J., Waschek J. 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. Journal of Neuroscience, vol. 21, p. 3849-3859.
- Lee J., Park H.J., Choi H.S., Kwon H.B., Arimura A., Lee B.J., Choi W.S., Chun S.Y. 1999. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. Endocrinology, vol. 140, p. 818-826.
- Lee N.M. & Smith A.P. 1980. A protein-lipid model of the opiate receptor. Life Sciences, vol. 26, p. 1459-1464.
- Lerner E.A., Iuga A.O., Reddy V.B. 2007. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. Peptides, vol. 28, p. 1651-1654.
- Li M. & Arimura A. 2003. Neuropeptides of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide/growth hormone-releasing hormone/secretin family in testis. Endocrine, vol. 20, p. 201-214.
- Li S., Grinevich V., Fournier A., Pelletier G. 1996. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on gonadotropin-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat brain. Brain Research - Molecular Brain Research, vol. 41, p.157-162.
- Li M., Maderdrut J.L., Lertora J.J., Batuman V. 2007. Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. Peptides, vol. 28, p. 1891-1895.
- Lindén A., Yoshihara S., Chan B., Nadel J.A. 1995. Inhibition of bronchoconstriction by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP 1-27) in guinea-pigs in vivo. British Journal of Pharmacology, vol. 115, p. 913-916.

- Lins L., Couvineau A., Rouyer-Fessard C., Nicole P., Maoret J.J., Benhamed M., Brasseur R., Thomas A., Laburthe M. 2001. The human VPAC1 receptor: three-dimensional model and mutagenesis of the N-terminal domain. Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 10153-10160.
- Loddick S.A., Turnbull A.V., Rothwell N.J. 1998. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. Journal of Cerebral and Blood Flow Metabolism, vol. 18, p. 176-179.
- Luck M.D., Carter P.H., Gardella T.J. 1999. The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors. Molecular Endocrinology, vol. 13, p. 670-680.
- Lutz E.M., Ronaldson E., Shaw P., Johnson M.S., Holland P.J., Mitchell R. 2006. Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. Molecular and Cellular Neuroscience, vol. 31, p. 193-209.
- Lutz-Bucher B., Monnier D., Koch B. 1996. Evidence for the presence of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neurohypophysis that are positively coupled to cyclic AMP formation and neurohypophyseal hormone secretion. Neuroendocrinology, vol. 64, p. 153-161.
- Mabuchi T., Shintani N., Matsumura S., Okuda-Ashitaka E., Hashimoto H., Muratani T., Minami T., Baba A., Ito S. 2004. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. Journal of Neuroscience, vol. 24, p. 7283-7291.
- Martin R.A., Cleary D.L., Guido D.M., Zurcher-Neely H.A., Kubiak T.M. 1993. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) from pig kidney cleaves analogs of bovine growth hormone-releasing factor (bGRF) modified at position 2 with Ser, Thr or Val. Extended DPP-IV substrate specificity? Biochimica Biophysica Acta, vol. 1164, p. 252-260.
- Martinez C., Abad C., Delgado M., Arranz A., Juarranz M.G., Rodriguez-Henche N., Brabet P., Leceta J., Gomariz R.P. 2002. Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 99, p. 1053-1058.
- Masuo Y., Ohtaki T., Masuda Y., Tsuda M., Fujino M. 1992. Binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. Brain Research, vol. 575, p. 113-123.

- Matsuda K., Maruyama K., Nakamachi T., Miura T., Shioda S. 2006. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on food intake and locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1070, p. 417-421.
- Matsuda K., Takei Y., Katoh J., Shioda S., Arimura A., Uchiyama M. 1997. Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*. Peptides, vol. 18, p. 723-727.
- Maxwell D.L., Fuller R.W., Dixon C.M., Cuss F.M., Barnes P.J. 1990. Ventilatory effects of substance P, vasoactive intestinal peptide, and nitroprusside in humans. Journal of Applied Physiology, vol. 68, p. 295-301.
- McRory J.E., Parker R.L., Sherwood N.M. 1997. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. DNA and Cell Biology, vol. 16, p. 95-102.
- Mei Y.A., Vaudry D., Basille M., Castel H., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2004. PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. European Journal of Neuroscience, vol. 19, p. 1446-1458.
- Mentlein R. 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) - role in the inactivation of regulatory peptides. Regulatory Peptides, vol. 85, p. 9-24.
- Mergenthaler P., Dirnagl U., Meisel A. 2004. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. Metabolism Brain Diseases, vol. 19, p. 151-167.
- Mierke D.F., Giragossian C. 2001. Peptide hormone binding to G-protein-coupled receptors: structural characterization via NMR techniques. Medicinal Research Reviews, vol. 21, p. 450-471.
- Millhauser G.L. 1995. Views of helical peptides: a proposal for the position of 3(10)-helix along the thermodynamic folding pathway. Biochemistry, vol. 34, p. 3873-3877.
- Miranda L.P., Winters K.A., Gegg C.V., Patel A., Aral J., Long J., Zhang J., Diamond S., Guido M., Stanislaus S., Ma M., Li H., Rose M.J., Poppe L., Véniant M.M. 2008. Design and synthesis of conformationally constrained glucagon-like peptide-1 derivatives with increased plasma stability and prolonged in vivo activity. Journal of Medicinal Chemistry, vol. 51, p. 2758-2765.
- Miyata A. 2003. PACAP receptors signaling. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 277-288.

- Miyata A., Arimura A., Dahl R.R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M.D., Coy D.H. 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 164, p. 567-574.
- Miyata A., Jiang L., Dahl R.D., Kitada C., Kubo K., Fujino M., Minamino N., Arimura A. 1990. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). Biochemical and Biophysical Research Communication, vol. 170, p. 643-648.
- Mizushima H., Banks W.A., Dohi K., Shioda S., Matsumoto H., Matsumoto K. 1999. The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-brain and blood-spinal cord barrier to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Peptides, vol. 20, p. 1337-1340.
- Moreno D., Gourlet P., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M., Robberecht P. 2000. Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC(2) receptor. Peptides, vol. 21, p. 1543-1549.
- Morice A., Unwin R.J., Sever P.S. 1983. Vasoactive intestinal peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. Lancet, vol. 2, p. 1225-1227.
- Morley J.E., Horowitz M., Morley P.M., Flood J.F. 1992. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. Peptides, vol. 13, p. 1133-1135.
- Moro O. & Lerner E.A. 1997. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 966-970.
- Moro O., Wakita K., Ohnuma M., Denda S., Lerner E.A., Tajima M. 1999. Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type 1 receptor-specific antagonist. Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 23103-23110.
- Morrow J.A., Lutz E.M., West K.M., Fink G., Harmar A.J. 1993. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). FEBS Letters, vol. 329, p. 99-105.
- Mounien L., Do Rego J.C., Bizet P., Boutelet I., Gourcerol G., Fournier A., Brabet P., Costentin J., Vaudry H., Jégou S. 2008. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Inhibits Food Intake in Mice Through Activation of the Hypothalamic Melanocortin System. Neuropsychopharmacology, vol. 34, p. 424-435.

Mungan Z., Arimura A., Ertan A., Rossowski W.J., Coy D.H. 1992. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide relaxes rat gastrointestinal smooth muscle. Scandinavian Journal of Gastroenterology, vol. 27, p. 375-380.

Murase T., Kondo K., Otake K., Oiso Y. 1993. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates arginine vasopressin release in conscious rats. Neuroendocrinology, vol. 57, p. 1092-1096.

Nakamachi T., Ohtaki H., Yofu S., Dohi K., Watanabe J., Hayashi D., Matsuno R., Nonaka N., Itabashi K., Shioda S. 2008. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) co-localizes with activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brains. Regulatory Peptides, vol. 145, p. 88-95.

Nicole P., Lins L., Rouyer-Fessard C., Drouot C., Fulcrand P., Thomas A., Couvineau A., Martinez J., Brasseur R., Laburthe M. 2000. Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 24003-24012.

Neumann J.M., Couvineau A., Murail S., Lacapère J.J., Jamin N., Laburthe M. 2008. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? Trends in Biochemical Sciences, vol., 33, p. 314-319.

Nogawa S., Zhang F., Ross M.E., Iadecola C. 1997. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. Journal of Neuroscience, vol. 17, p. 2746-2755.

Nonaka N., Banks W.A., Mizushima H., Shioda S., Morley J.E. 2002. Regional differences in PACAP transport across the blood-brain barrier in mice: a possible influence of strain, amyloid beta protein, and age. Peptides, vol. 23, p. 2197-2202.

Nonaka N., Shioda S., Banks W.A. 2005. Effect of lipopolysaccharide on the transport of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier. Experimental Neurology, vol. 191, p.137-144.

Norrholm S.D., Das M., Légrádi G. 2005. Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). Regulatory Peptides, vol. 128, p. 33-41.

O'Donnell M., Garippa R.J., O'Neill N.C., Bolin D.R. Cottrell J.M. 1991. Structure-activity studies of vasoactive intestinal polypeptide. Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 6389-6392.

O'Donnell M., Garippa R.J., Rinaldi N., Selig W.M., Simko B., Renzetti L., Tannu S.A., Wasserman M.A., Welton A., Bolin D.R. 1994. Ro 25-1553: a novel, long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part I: In vitro and in vivo bronchodilator studies. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 270, p. 1282-1288.

Ogi K., Kimura C., Onda H., Arimura A., Fujino M. 1990. Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 173, p. 1271-1279.

Ohkubo S., Kimura C., Ogi K., Okazaki K., Hosoya M., Onda H., Miyata A., Arimura A., Fujino M. 1992. Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. DNA and Cell Biology, vol. 11, p. 21-30.

Ohno F., Watanabe J., Sekihara H., Hirabayashi T., Arata S., Kikuyama S., Shioda S., Nakaya K., Nakajo S. 2005. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. Regulatory Peptides, vol. 126, p.115-122.

Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Aizawa Y., Takaki A., Hodoyama K., Yofu S., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Kopf M., Iwakura Y., Matsuda K., Arimura A., Shioda S. 2006. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 103, p. 7488-7493.

Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Shioda S. 2008. Role of PACAP in Ischemic Neural Death. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 36, p. 16-25.

Okazaki K., Itoh Y., Ogi K., Ohkubo S., Onda H. 1995. Characterization of murine PACAP mRNA. Peptides, vol. 16, p.1295-1299.

Okazaki K., Kimura C., Kosaka T., Watanabe T., Ohkubo S., Ogi K., Kitada C., Onda H., Fujino M. 1992. Expression of human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. FEBS Letters, vol. 298, p. 49-56.

O'Neill L.A., Kaltschmidt C. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. Trends in Neuroscience, vol. 20, p. 252-258.

Onoue S., Endo K., Ohshima K., Yajima T., Kashimoto K. 2002a. The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. Peptides, vol. 23, p. 1471-1478.

- Onoue S., Nagano Y., Tatsuno I., Uchida D., Kashimoto K. 1999. Receptor-binding specificity depending on N-terminal structure of VIP/PACAP. Biomedical Research, vol. 20, p. 219-231.
- Onoue S., Ohshima K., Endo K., Yajima T., Kashimoto K. 2002b. PACAP protects neuronal PC12 cells from the cytotoxicity of human prion protein fragment 106-126. FEBS Letters, vol. 522, p. 65-70.
- Onoue S., Waki Y., Nagano Y., Satoh S., Kashimoto K. 2001. The neuromodulatory effects of VIP/PACAP on PC-12 cells are associated with their N-terminal structures. Peptides, vol. 22, p. 867-872.
- Otto C., Hein L., Brede M., Jahns R., Engelhardt .S., Gröne H.J., Schütz G. 2004. Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. Circulation, vol. 110, p. 3245-3251.
- Otto C., Kovalchuk Y., Wolfer D.P., Gass P., Martin M., Zuschratter W., Gröne H.J., Kellendonk C., Tronche F., Maldonado R., Lipp H.P., Konnerth A., Schütz G. 2001. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. Journal of Neuroscience, vol. 21, p. 5520-5527.
- Ozawa M., Aono M., Mizuta K., Moriga M., Okuma M. 1997. Central administration of PACAP stimulates gastric secretion mediated through the vagal pathway in anesthetized rats. Digestive Diseases and Sciences, vol. 42, p. 2552-2559.
- Ozawa M., Aono M., Moriga M. 1999. Central effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on gastric motility and emptying in rats. Digestive Diseases and Sciences, vol. 44, p. 735-743.
- Parker D.B., Coe I.R., Dixon G.H., Sherwood N.M. 1993. Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. European Journal of Biochemistry, vol. 215, p. 439-448.
- Perrin D., Soling H.D., Wuttke W., Jarry H. 1993. The stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on LH release from rat pituitary cells in vitro does not involve calcium mobilization. Experimental Clinical Endocrinology, vol. 101, p. 290-296.
- Petullo D., Masonic K., Lincoln C., Wibberley L., Teliska M., Yao D.L. 1999. Model development and behavioral assessment of focal cerebral ischemia in rats. Life Science, vol. 64, p. 1099-1108.
- Pilzer I. & Gozes I. 2006. VIP provides cellular protection through a specific splice variant of the PACAP receptor: a new neuroprotection target. Peptides, vol. 27, p. 2867-2876.

- Piqueras L., Taché Y., Martínez V. 2004. Peripheral PACAP inhibits gastric acid secretion through somatostatin release in mice. British Journal of Pharmacology, vol. 142, p. 67-78.
- Planas A.M., Soriano M.A., Berruezo M., Justicia C., Estrada A., Pitarch S., Ferrer I. 1996. Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. European Journal of Neurosciences, vol. 8, p. 2612-2618.
- Rabuffetti M., Sciorati C., Tarozzo G., Clementi E., Manfredi A.A., Beltramo M. 2000. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. Journal of Neurosciences, vol. 20, p. 4398-4404.
- Rácz B., Gallyas F., Kiss P., Tóth G., Hegyi O., Gasz B., Borsiczky B., Ferencz A., Roth E., Tamás A., Lengvári I., Lubics A., Reglodi D. 2006. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. Regulatory Peptides, vol. 137, p. 20-26.
- Rangon C.M., Goursaud S., Medja F., Lelièvre V., Mounien L., Husson I., Brabet P., Jégou S., Janet T., Gressens P. 2005. VPAC2 receptors mediate vasoactive intestinal peptide-induced neuroprotection against neonatal excitotoxic brain lesions in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 314, p. 745-752.
- Ransjö M., Lie A., Mukohyama H., Lundberg P., Lerner U.H. 2000. Microisolated mouse osteoclasts express VIP-1 and PACAP receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 274, p. 400-404.
- Reddy V.B., Iuga A.O., Kouna K., Lerner E.A. 2006. Functional analysis of recombinant mutants of maxadilan with a PAC1 receptor-expressing melanophore cell line. Journal of Biological Chemistry, vol. 281, p. 16197-16201.
- Reglodi D., Borzsei R., Bagoly T., Boronkai A., Racz B., Tamas A., Kiss P., Horvath G., Brubel R., Nemeth J., Toth G., Helyes Z. 2008. Agonistic Behavior of PACAP6-38 on Sensory Nerve Terminals and Cytotrophoblast Cells. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 36, p. 270-278.
- Reglodi D., Fabian Z., Tamas A., Lubics A., Szeberenyi J., Alexy T., Toth K., Marton Z., Borsiczky B., Roth E., Szalontay L., Lengvari I. 2004a. Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. Regulatory Peptides, vol. 123, p. 51-59.

- Reglodi D., Somogyvari-Vigh A., Vigh S., Maderdrut J.L., Arimura A. 2000. Neuroprotective effects of PACAP38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 921, p. 119-128.
- Reglodi D., Tamas A., Lubics A., Szalontay L., Lengvari I. 2004b. Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. Regulatory Peptides, vol. 123, p. 85-94.
- René F., Monnier D., Gaiddon C., Félix J.M., Loeffler J.P. 1996. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide transduces through cAMP/PKA and PKC pathways and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in mouse melanotropes. Neuroendocrinology, vol. 64, p. 2-13.
- Rivier J., Lahrichi S.L., Gulyas J., Erchegeyi J., Koerber S.C., Craig A.G., Corrigan A., Rivier C., Vale W. 1998. Minimal-size, constrained corticotropin-releasing factor agonists with i-(i+3) Glu-Lys and Lys-Glu bridges. Journal of Medicinal Chemistry, vol. 41, p. 2614-2620.
- Robberecht P., Gourlet P., De Neef P., Woussen-Colle M.C., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A., Christophe J. 1992a. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. European Journal of Biochemistry, vol. 207, p. 239-246.
- Robberecht P., Gourlet P., De Neef P., Woussen-Colle M.C., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A., Christophe J. 1992b. Receptor occupancy and adenylate cyclase activation in AR 4-2J rat pancreatic acinar cell membranes by analogs of pituitary adenylate cyclase-activating peptides amino-terminally shortened or modified at position 1, 2, 3, 20, or 21. Molecular Pharmacology, vol. 42, p. 347-355.
- Roques B.P., Noble F., Daugé V., Fournié-Zaluski M.C., Beaumont A. 1993. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. Pharmacological Reviews, vol. 45, p. 87-146.
- Rosenblatt M., Segre G.V., Tyler G.A., Shepard G.L., Nussbaum S.R., Potts J.T. 1980. Identification of a receptor-binding region in parathyroid hormone. Endocrinology, vol. 107, p. 545-550.
- Rózycki J., Rolka K., Więczorek Z., Zimecki M., Kupryszewski G. 1992. New cyclosporin A analogue: synthesis and immunosuppressive activity. Molecular Immunology, vol. 29, p. 1043-1047.
- Runcie M.J., Ulman L.G., Potter E.K. 1995. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cardiovascular and respiratory responses in anaesthetised dogs. Regulatory Peptides, vol. 60, p. 193-200.

- Ruscher K., Isaev N., Trendelenburg G., Weih M., Iurato L., Meisel A., Dirnagl U. 1998. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. Neuroscience Letters, vol. 254, p. 117-120.
- Sacchetti B., Lorenzini C.A., Baldi E., Bucherelli C., Roberto M., Tassoni G., Brunelli M. 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat. Neurobiology of Learning and Memory, vol. 76, p.1-6.
- Said S.I. & Mutt V. 1970. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. Science, vol. 169, p. 1217-1218.
- Sayasith K., Brown K.A., Sirois J. 2007. Gonadotropin-dependent regulation of bovine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in ovarian follicles prior to ovulation. Reproduction, vol. 133, p. 441-453.
- Schafer H., Zheng J., Morys-Wortmann C., Fölsch U.R., Schmidt W.E. 1999. Structural motifs of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) defining PAC1-receptor selectivity. Regulatory Peptides, vol. 79, p. 83-92.
- Schiffer M. & Edmundson AB. 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. Biophysical Journal, vol. 7, p. 121-35.
- Schmidt W.E., Seebeck J., Höcker M., Schwarzhoff R., Schäfer H., Fornefeld H., Morys-Wortmann C., Fölsch U.R., Creutzfeldt W. 1993. PACAP and VIP stimulate enzyme secretion in rat pancreatic acini via interaction with VIP/PACAP-2 receptors: additive augmentation of CCK/carbachol-induced enzyme release. Pancreas, vol. 8, p. 476-487.
- Sekiguchi Y., Kasai K., Hasegawa K., Suzuki Y., Shimoda S. 1994. Glycogenolytic activity of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in vivo and in vitro. Life Sciences, vol. 55, p. 1219-1228.
- Sheward W.J., Lutz E.M., Copp A.J., Harmor A.J. 1998. Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA during development of the mouse embryo. Brain Research - Developmental Brain Research, vol. 109, p. 245-253.
- Shimizu M., Carter P.H., Khatri A., Potts J.T., Gardella T.J. 2001. Enhanced activity in parathyroid hormone-(1-14) and -(1-11): novel peptides for probing ligand-receptor interactions. Endocrinology, vol. 142, p. 3068-3074.
- Shimizu M., Potts J.T., Gardella T.J. 2000. Minimization of parathyroid hormone. Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor. Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 21836-21843.

Shintani N., Suetake S., Hashimoto H., Koga K., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Tomimoto S., Matsuda T., Baba A. 2005. Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. Regulatory Peptides, vol. 126, p. 123-128.

Shintani N., Mori W., Hashimoto H., Imai M., Tanaka K., Tomimoto S., Hirose M., Kawaguchi C., Baba A. 2002. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. Regulatory Peptides, vol. 109, p. 45-48.

Shioda S., Legradi G., Leung W.C., Nakajo S., Nakaya K., Arimura A. 1994. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. Endocrinology, vol. 135, p. 818-825.

Shioda S., Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Watanabe J., Nakajo S., Arata S., Kitamura S., Okuda H., Takenoya F., Kitamura Y. 2006. Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1070, p. 550-560.

Shioda S., Ozawa H., Dohi K., Mizushima H., Matsumoto K., Nakajo S., Takaki A., Zhou C.J., Nakai Y., Arimura A. 1998. PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 865, p. 111-117.

Shioda S., Shuto Y., Somogyvari-Vigh A., Legradi G., Onda H., Coy D.H., Nakajo S., Arimura A. 1997. Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. Neuroscience Research, vol. 28, p. 345-354.

Shioda S., Yada T., Muroya S., Uramura S., Nakajo S., Ohtaki H., Hori T., Shimoda Y., Funahashi H. 2000. Functional significance of colocalization of PACAP and catecholamine in nerve terminals. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 921, p. 211-217.

Shioda S., Zhou C.J., Ohtaki H. 2003. PACAP receptors signaling. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 95-124.

Shivers B.D., Görös T.J., Gottschall P.E., Arimura A. 1991. Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. Endocrinology, vol. 128, p. 3055-3065.

Simonneaux V., Ouichou A., Pévet P. 1993. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. Brain Research, vol. 603, p. 148-152.

- Somogyvari-Vigh A., Pan W., Reglodi D., Kastin A.J., Arimura A. 2000. Effect of middle cerebral artery occlusion on the passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier in the rat. Regulatory Peptides, vol. 91, p. 89-95.
- Steenstrup B.R., Alm P., Hannibal J., Jørgensen J.C., Palle C., Junge J., Christensen H.B., Ottesen B., Fahrenkrug J. 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: occurrence and relaxant effect in female genital tract. American Journal of Physiology, vol. 269, p. 108-117.
- Spengler D., Waeber C., Pantaloni C., Holsboer F., Bockaert J., Seeburg P.H., Journot L. 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. Nature, vol. 365, p.170-175.
- Sughrue M.E., Mehra A., Connolly E.S., D'Ambrosio A.L. 2004. Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. Inflammation Research, vol. 53, p. 497-508.
- Suk K., Park J.H., Lee W.H. 2004. Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. Brain Research, vol. 1026, p. 151-156.
- Sun C., Song D., Davis-Taber R.A., Barrett L.W., Scott V.E., Richardson P.L., Pereda-Lopez A., Uchic M.E., Solomon L.R., Lake M.R., Walter K.A., Hajduk P.J., Olejniczak E.T. 2007. Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 104, p. 7875-7880.
- Suzuki N., Harada M., Hosoya M., Fujino M. 1994. Enhanced production of pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide by 1, N6-dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells, IMR-32. European Journal of Biochemistry, vol. 223, p.147-153.
- Svoboda M., Tastenoy M., Van Rampelbergh J., Goossens J.F., De Neef P., Waelbroeck M., Robberecht P. 1994. Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 205, p. 1617-1624.
- Szakaly P., Kiss P., Lubics A., Magyarlaki T., Tamas A., Racz B., Lengvari I., Toth G., Reglodi D. 2008. Effects of PACAP on Survival and Renal Morphology in Rats Subjected to Renal Ischemia/Reperfusion. Journal of Molecular Neuroscience, vol. 36, p. 89-96.

- Sze K.H., Zhou H., Yang Y., He M., Jiang Y., Wong A.O. 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. Endocrinology, vol. 148, p. 5042-5059.
- Tabuchi A., Koizumi M., Tsuda M. 2001. Novel splice variants of PACAP gene in mouse cerebellar granule cells. Neuroreport, vol. 12, p. 1181-1186.
- Tachibana T., Saito S., Tomonaga S., Takagi T., Saito E.S., Boswell T., Furuse M. 2003. Intracerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits feeding in chicks. Neuroscience Letters, vol. 339, p. 203-206.
- Tam J.K., Lee L.T., Chow B.K. 2007. PACAP-related peptide (PRP): molecular evolution and potential functions. Peptides, vol. 28, p. 1920-1929.
- Tamada Y., Tanaka M., Ichitani Y., Okamura H., Yanaihara N., Iyata Y. 1994. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactive neuronal elements in rat hypothalamus and median eminence with special reference to morphological background of its effect on anterior pituitary-light and electron microscopic immunocytochemistry. Neuroscience Letters, vol. 180, p. 105-108.
- Tamas A., Lubics A., Lengvári I., Reglódi D. 2006. Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1070, p. 570-574.
- Tamas A., Reglodi D., Szanto Z., Borsiczky B., Nemeth J., Lengvari I. 2002. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. Neuroendocrinology Letters, vol. 23, p. 249-254.
- Tams J.W., Johnsen A.H., Fahrenkrug J. 1999. Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 1-38-binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. Biochemical Journal, vol. 341, p. 271-276.
- Tams J.W., Jorgensen R.M., Holm A., Fahrenkrug J. 2000. Creation of a selective antagonist and agonist of the rat VPAC(1) receptor using a combinatorial approach with vasoactive intestinal peptide 6-23 as template. Molecular Pharmacology, vol. 58, p.1035-1041.
- Tan Y.V., Couvineau A., Laburthe M. 2004. Diffuse pharmacophoric domains of vasoactive intestinal peptide (VIP) and further insights into the interaction of VIP with the N-terminal ectodomain of human VPAC1 receptor by photoaffinity labeling with [Bpa6]-VIP. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 38889-38894.

Tan Y.V., Couvineau A., Murail S., Ceraudo E., Neumann J.M., Lacapère J.J., Laburthe M. 2006. Peptide agonist docking in the N-terminal ectodomain of a class II G protein-coupled receptor, the VPAC1 receptor. Photoaffinity, NMR, and molecular modeling. Journal of Biological Chemistry, vol. 281, p. 2792-2798.

Tan Y.V., Couvineau A., Van Rampelbergh J., Laburthe M. 2003. Photoaffinity labeling demonstrates physical contact between vasoactive intestinal peptide and the N-terminal ectodomain of the human VPAC1 receptor. Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p.36531-36536.

Tatsuno I., Gottschall P.E., Köves K., Arimura A. 1990. Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. Biochemical Biophysical Research Communications, vol. 168, p.1027-1033.

Theriault Y., Boulanger Y., Saunders J.K. 1988. Secondary structure of the human growth hormone releasing factor (GRF 1-29) by two-dimensional ¹H-nmr spectroscopy. Biopolymers, vol. 27, p. 1897-1904.

Thornton K. & Gorenstein D.G. 1994. Structure of glucagon-like peptide (7-36) amide in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR. Biochemistry, vol. 33, p. 3532-3539.

Tregear G.W., Van Rietschoten J., Greene E., Keutmann H.T., Niall H.D., Reit B., Parsons J.A., Potts J.T. 1973. Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of synthetic peptide required for biological activity. Endocrinology, vol. 93, p. 1349-1353.

Tsomaia N., Pellegrini M., Hyde K., Gardella T.J., Mierke D.F. 2004. Toward parathyroid hormone minimization: conformational studies of cyclic PTH(1-14) analogues. Biochemistry, vol. 43, p. 690-699.

Tyndall J.D., Pfeiffer B., Abbenante G., Fairlie D.P. 2005. Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. Chemical Reviews, vol. 105, p. 793-826.

Uchida D., Arimura A., Somogyvari-Vigh A., Shioda S., Banks W.A. 1996. Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. Brain Research, vol. 736, p. 280-286.

Uchida D., Tatsuno I., Tanaka T., Hirai A., Saito Y., Moro O., Tajima M. 1998. Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type 1 receptor. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 865, p. 253-258.

Usdin T.B., Bonner T.I., Mezey E. 1994. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. Endocrinology, vol. 135, p. 2662-2680.

Ushiyama M., Ikeda R., Sugawara H., Yoshida M., Mori K., Kangawa K., Inoue K., Yamada K., Miyata A. 2007. Differential intracellular signaling through PAC1 isoforms as a result of alternative splicing in the first extracellular domain and the third intracellular loop. Molecular Pharmacology, vol. 72, p.103-111.

Van der Staay F.J., Augstein K.H., Horvath E. 1996. Sensorimotor impairments in rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the left middle cerebral artery: strain differences and effects of the occlusion site. Brain Research, 735, 271-284.

Vandermeers A., Vandenborre S., Hou X., de Neef P., Robberecht P., Vandermeers-Piret M.C., Christophe J. 1992. Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. European Journal of Biochemistry, vol. 208, p. 815-819.

Vaudry D., Falluel-Morel A., Basille M., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2003. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. Journal of Neuroscience Research, vol. 72, p. 303-316.

Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Fournier A., Vaudry H. 1999. Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 96, p. 9415-9420.

Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H. 2000a. The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/ CPP32. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 97, p. 13390-13395.

Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H. 2000b. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. Pharmacological Reviews, vol. 52, p. 269-324.

Vaudry D., Pamantung T.F., Basille M., Rousselle C., Fournier A., Vaudry H., Beauvillain J.C., Gonzalez B.J. 2002a. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. European Journal of Neuroscience, vol. 15, p. 1451-1460.

Vaudry D., Rousselle C., Basille M., Falluel-Morel A., Pamantung T.F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J. 2002b. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., vol. 99, p. 6398-6403.

Vertongen P., Schiffmann S.N., Gourlet P., Robberecht P. 1997. Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain. Peptides, vol. 18, p. 1547-1554.

Vertongen P., Velkeniers B., Hooghe-Peters E., Robberecht P. 1995. Differential alternative splicing of PACAP receptor in pituitary cell subpopulations. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 113, p. 131-135.

Vigh S., Arimura A., Gottschall P.E., Kitada C., Somogyvári-Vigh A., Childs G.V. 1993. Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. Peptides, vol. 14, p. 59-65.

Wagner U., Bredenbröcker D., Storm B., Tackenberg B., Fehmann H.C., von Wichert P. 1998. Effects of VIP and related peptides on airway mucus secretion from isolated rat trachea. Peptides, vol. 19, p. 241-245.

Wang G., Qi C., Fan G.H., Zhou H.Y., Chen S.D. 2005. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. FEBS Letters, vol. 579, p. 4005-4011.

Warren J.B., Cockcroft J.R., Larkin S.W., Kajekar R., Macrae A., Ghatei M.A., Bloom S.R. 1992. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator in humans. Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 20, p. 83-87.

Waschek J.A., Casillas R.A., Nguyen T.B., DiCicco-Bloom E.M., Carpenter E.M., Rodriguez W.I. 1998. Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, vol. 95, p. 9602-9607.

Welsh J.H., Zerbe O., von Philipsborn W., Robinson J.A. 1992. Beta-turns induced in bradykinin by (S)-alpha-methylproline. FEBS Letters, vol. 297, p. 216-220.

Winzell M.S. & Ahrén B. 2007. Role of VIP and PACAP in islet function. Peptides, vol. 28, p. 1805-1813.

Wishart D.S., Bigam C.G., Yao J., Abildgaard F., Dyson, H.J. Oldfield E., Markley J.L., Sykes, B.D. 1995. ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. Journal of Biomolecular NMR, vol. 6, p. 135-140.

Wishart D.S., Sykes B.D., Richards F.M. 1992. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. Biochemistry, vol. 31, p. 1647-1651.

Wray V., Kakoschke C., Nokihara K., Naruse S. 1993. Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry, vol. 32, p. 5832-5841.

Wüthrich K. 1986. NMR of proteins and nucleic acids. New York: Wiley.

Xia M., Sreedharan S.P., Bolin D.R., Gaufo G.O., Goetzl E.J. 1997. Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 281, p. 629-633.

Yamashita T., Sawamoto K., Suzuki S., Suzuki N., Adachi K., Kawase T., Mihara M., Ohsugi Y., Abe K., Okano H. 2005. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. Journal of Neurochemistry, vol. 94, p. 459-468.

Yang S., Yang J., Yang Z., Chen P., Fraser A., Zhang W., Pang H., Gao X., Wilson B., Hong J.S., Block M.L. 2006. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 319, p. 595-603.

Yung S.L., Dela Cruz F., Hamren S., Zhu J., Tsutsumi M., Bloom J.W., Caudle M., Rocznik S., Todd T., Lemoine L., MacDougall M., Shanafelt A.B., Pan C.Q. 2003. Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 10273-10281.

Zhou C.J., Shioda S., Shibamura M., Nakajo S., Funahashi H., Nakai Y., Arimura A., Kikuyama S. 1999. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors during development: expression in the rat embryo at primitive streak stage. Neuroscience, vol. 93, p. 375-391.

Zhu L., Tamvakopoulos C., Xie D., Dragovic J., Shen X., Fenyk-Melody J.E., Schmidt K., Bagchi A., Griffin P.R., Thornberry N.A., Sinha Roy R. 2003. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 22418-22423.

Zhu Y., Yang G.Y., Ahlemeyer B., Pang L., Che X.M., Culmsee C., Klumpp S., Krieglstein J. 2002. Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. Journal of Neuroscience, vol. 22, p. 3898-3909.