

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**CONTRÔLE DE LA SIGNALISATION ASSOCIÉE AU RÉCEPTEUR DE
L'UROTENSINE II PAR DÉVELOPPEMENT DE PEPDUCINES ET
ÉTUDE DE SON HÉTÉRODIMÉRISATION AVEC LE RÉCEPTEUR DE
TYPE 1 DE L'ANGIOTENSINE II**

Par
Hassan NASSOUR
M.Sc.

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
Doctorat en Biologie

Avril 2022

Cette thèse intitulée

**CONTRÔLE DE LA SIGNALISATION ASSOCIÉE AU RÉCEPTEUR DE
L'UROSENSINE II PAR DÉVELOPPEMENT DE PEPDUCINES ET
ÉTUDE DE SON HÉTÉRODIMÉRISEMENT AVEC LE RÉCEPTEUR DE
TYPE 1 DE L'ANGIOTENSINE II**

et présentée par

Hassan NASSOUR

a été évaluée par un jury composé de

Présidente du jury et examinatrice interne	Cathy Vaillancourt INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Examineur externe	Guy Rousseau Faculté de Médecine Université de Montréal
Examineur externe	Patrick Giguère Faculté de Pharmacie Université d'Ottawa
Directeur de recherche	David Chatenet INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

À mes parents, Akil Nassour et Rajaa Harb

REMERCIEMENTS

Merci à mes parents, à mon père et ma mère, qui ont sacrifié leur vie pour que je sois où je suis maintenant. Je remercie mes parents d'avoir sacrifié leur vie pour que non seulement je sois un doctorant mais aussi un bon être humain. À chaque soir quand je suis seul, mes larmes n'ont jamais hésitées à tomber pour alléger la douleur de la distance qui nous sépare, pour rapprocher ces distances et me permettre d'avancer dans ma vie ici, à l'étranger. J'ai tout fait pour que vous soyez fiers de moi. J'ai passé à travers tellement de choses simplement pour que je puisse retourner et continuer ma vie proche de vous, d'embrasser vos mains à chaque matin, de prendre mon café avec vous, de m'occuper de vous durant votre vieillesse et pour rattraper le temps que j'ai manqué avec vous, pour le reste de ma vie. Je dis souvent à mes amis que c'est ça mon ambition dans la vie. Vous avez toujours été là pour moi, toujours devant moi pour recevoir tout le mal qui pourrait m'arriver. S'il te plaît, mon père, essaie de combattre ton cancer le plus longtemps possible pour que je puisse réaliser mon ambition et le jour où tu ne seras plus capable, je te donnerai toutes les années qu'ils me restent dans cette vie.

Merci à ma femme, Véronique Tu, qui a passé à travers toutes mes difficultés avec moi. Aussi, sans elle, ce doctorat n'aurait pas pu être réalisé. Merci à ma fille, Razane Nassour, d'apporter tellement d'amour et de joie dans ma vie.

J'aimerais remercier tous ceux qui ont aidé à la réalisation de mon doctorat.

Merci à mon directeur de recherche Pr David Chatenet. David, sans toi, rien de ceci n'aurait pu être possible. Merci pour ta patience et tes conseils autant académiques que personnels.

Merci Myriam Létourneau de toujours avoir été présente et de m'avoir supporté durant tout mon parcours académique.

Merci aux laboratoires que j'ai côtoyés au quotidien, les laboratoires de Pr Yves St-Pierre, Pr Nicolas Doucet et de Pr TERENCE Hébert.

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires (MCV) affectent énormément l'économie des soins de santé au niveau mondial. Malgré des investissements importants dans le développement de nouveaux médicaments, l'établissement de procédures chirurgicales améliorées ou encore un diagnostic plus précoce, l'accès à de nouvelles thérapies innovantes, plus efficaces et avec moins d'effets secondaires est limité par le manque de compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'homéostasie des cellules cardiaques et vasculaires. Bien que les systèmes β -adrénergique et angiotensinergique aient été étudiés avec succès pour des interventions thérapeutiques, de nombreux autres récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) restent encore à exploiter pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Le système urotensinergique, composé d'un RCPG (UT) et de deux ligands peptidiques endogènes (UII; hUII = H-Glu-Thr-Pro-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH, et URP = H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH), est actuellement considéré comme une cible prometteuse pour le traitement de diverses pathologies. Bien que plusieurs études chez les animaux aient démontré l'utilité d'antagonistes d'UT comme agents thérapeutiques potentiels, les essais cliniques chez l'humain ont eu un succès limité pour le moment en raison de la pharmacologie de ce système qui apparaît complexe et majoritairement inconnue. Notamment, en raison de leurs activités biologiques communes mais également divergentes, UII et URP, bien que partageant la même séquence bioactive, sont probablement capables de stabiliser différentes sous-populations de UT générant ainsi des profils signalétiques différents. Par conséquent, une mauvaise signalisation de UT à la suite de son activation par UII et/ou URP pourrait être impliquée dans la pathogenèse et la progression des MCV à l'instar du système angiotensinergique dans l'insuffisance cardiaque aigue. Il apparaît donc important de développer des outils ou de nouvelles approches permettant de contrôler/réguler la signalisation de UT. Dans le cadre de mon projet de recherche, nous avons 1) étudié la possibilité de rediriger la signalisation cellulaire associée à UT en utilisant ses propres boucles intracellulaires et 2) démontrer et caractériser au niveau cellulaire et moléculaire l'interaction de UT avec le récepteur de l'angiotensine II (AngII) de type 1 (AT1) et comment cette interaction module leur signalisation respective.

ABSTRACT

Worldwide, cardiovascular diseases (CVD) have a huge impact on healthcare economics. Despite significant investments in the development of new drugs, the establishment of improved surgical procedures or even earlier diagnosis, access to new innovative therapies, more effective and with fewer side effects is limited by the lack of understanding of the molecular mechanisms regulating cardiac cells homeostasis. Although the β -adrenergic and angiotensinergic systems have been studied with success for therapeutic interventions, several G protein-coupled receptors (GPCRs) have yet to be exploited for the treatment of cardiovascular diseases. The urotensinergic system, composed of a GPCR (UT) and two endogenous peptide ligands (Ull; hUll = H-Glu-Thr-Pro-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH and URP = H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH) is currently considered a promising target for the treatment of various pathologies. Although several studies in animals have demonstrated the utility of UT antagonists as potential therapeutic agents, clinical trials in humans have so far had limited success due to the complex and mostly unknown pharmacology of this system. Due to their common but also divergent biological activities, Ull and URP, although sharing the same bioactive sequence, are probably stabilizing different subpopulations of UT thus generating different signaling profiles. Therefore, inappropriate signaling of UT following its activation by Ull and/or URP could be involved in the pathogenesis and progression of CVD like the angiotensin system in acute heart failure. It therefore appears important to develop tools or new approaches making it possible to control/regulate UT signaling. As part of my research project, we have 1) studied the possibility of redirecting cell signaling associated with UT using its own intracellular loops and 2) demonstrated and characterized at the cellular and molecular level the interaction of UT with the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) and how this interaction modulates their respective signaling.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1 LES RÉCEPTEURS À SEPT DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES (7TMR).....	1
1.1 Généralités et classification des récepteurs à 7TMR :.....	1
1.2 Mécanisme d'activation commun des 7TMRs.....	2
1.2.1 Mécanismes cellulaires associés à l'activation des 7TMRs : Généralités.....	4
1.2.1.1 Voies de transduction dépendantes des protéines G.....	4
1.2.1.2 Les β -arrestines.....	5
1.2.1.3 Rôle des β -arrestines dans la désensibilisation, l'internalisation et le trafic intracellulaire des RCPG.....	8
1.2.1.3.1 Désensibilisation.....	8
1.2.1.3.2 Internalisation et trafic intracellulaire.....	9
1.3 Les RCPGs : des protéines allostériques régulatrices du métabolisme cellulaire.....	9
1.3.1 Mécanismes moléculaires et étapes clés communes impliqués dans l'activation des RCPGs de classe A.....	10
1.3.2 Fonctionnalité sélective et signalisation biaisée.....	11
1.3.2.1 Exemples d'agonistes biaisés.....	14
1.3.2.1.1 TRV027.....	14
1.3.2.1.2 TRV130.....	16
2 LE SYSTÈME UROTENSINERGIQUE ET SON IMPLICATION DANS DIVERSES PATHOLOGIES.....	18
2.1 L'urotensine II (UII) et l' <i>urotensin II-related peptide</i> (URP).....	18
2.2 Activités biologiques.....	20
2.2.1 Modifications de l'UII et de l'URP.....	23
2.3 Le récepteur de l'urotensine II (UT).....	25
2.4 Implications du système urotensinergique dans les pathologies cardiovasculaires.....	27
2.5 Signalisation intracellulaire associée à l'activation d'UT.....	27

2.6 Comment contrer les effets délétères associés à l'activation du système urotensinergique ?	28
3 MODULATION DU SIGNAL ASSOCIÉ AUX RCPG PAR LES PEPDUCINES	30
3.1 Pepducines	30
3.1.1 Découverte et structure des pepducines	30
3.1.1.1 Ciblage des RCPGs du côté intracellulaire	31
3.1.2 Actions diverses des pepducines	33
3.1.2.1 Pepducines agissant comme agonistes allostériques	33
3.1.2.2 Pepducines agissant comme des antagonistes allostériques	34
3.1.3 Mécanisme d'action des pepducines	35
3.1.4 Exemples de développement de pepducines	37
3.1.4.1 ATI-2341: une pepducine de CXCR4 biaisée pour $G\alpha_i$	37
3.1.4.2 ICL3-9 : une pepducine de $\beta 2$ -AR biaisée pour $G\alpha_s$	37
3.2 Avantages des pepducines et utilisation clinique	39
3.2.1 Sélectivité et polypharmacologie	39
4 L'HÉTÉRODIMÉRISATION	42
4.1 Conséquences structurelles et fonctionnelles de l'hétérodimérisation	43
4.2 Exemple d'impacts pharmacologiques associés avec la formation d'hétérodimères : le cas des hétérodimères formés par les récepteurs orexin-1 et cannabinoïdes CB1	44
4.3 <i>Hub concept</i> : Exemple du récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R)	45
4.3.1 Le système rénine-angiotensine	45
4.3.2 Signalisation d'AT1R:	47
4.3.3 Rôle de la transduction du signal liée à AT1R dans la physiopathologie cardiovasculaire	48
4.3.3.1 Rôle des β -arrestines en lien avec AT1R dans les pathologies	49
4.3.4 Signal biaisé d'AT1R:	50
4.3.5 Les partenaires d'AT1R	51
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	53
PREMIER ARTICLE	55
LIPIDATED PEPTIDES DERIVED FROM INTRACELLULAR LOOPS 2 AND 3 OF THE UROTENSIN II RECEPTOR ACT AS BIASED ALLOSTERIC LIGANDS	55
5.1 ABSTRACT	56
5.2 INTRODUCTION	57
5.3 RESULTS	60
5.4 DISCUSSION	66
5.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES	70
5.6 FIGURES	80
5.7 REFERENCES	90

DEUXIÈME ARTICLE.....	96
EVIDENCE FOR HETERODIMERIZATION AND FUNCTIONAL INTERACTION OF THE UROTENSIN II RECEPTOR AND THE ANGIOTENSIN TYPE 1 RECEPTOR.....	96
6.1 ABSTRACT	97
6.2 INTRODUCTION	99
6.3 MATERIALS AND METHODS	100
6.4 RESULTS	105
6.5 DISCUSSION.....	109
6.6 CONCLUSIONS	112
6.7 FIGURES.....	113
6.8 TABLES	118
6.9 REFERENCES	120
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	123
RÔLE DU SYSTÈME UROTENSINERGIQUE DANS LA FIBROSE CARDIAQUE	123
REDIRECTION DE LA SIGNALISATION D’UN RCPG POUR UNE ACTION PLUS PRÉCISE ET DES EFFETS SECONDAIRES DIMINUÉS.....	125
L’OLIGOMÉRISATION DE H₁T AVEC AT₁R FOURNIT UN CADRE POUR LA REDIRECTION ET LA MODULATION DE SIGNAUX SPÉCIFIQUES	130
CONCLUSION GÉNÉRALE	138
BIBLIOGRAPHIE	139

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1. Représentation schématique d'un RCPG ou 7TMR.	2
Figure 2. Mécanisme commun d'activation des RCPG de classe A.	3
Figure 3. Voies de signalisation associées à l'activation d'un RCPG.	5
Figure 4. Réceptosome des arrestines : rôles dans l'internalisation et la signalisation.	7
Figure 5. États conformationnels (haut) et modèle d'agonisme/antagonisme (bas).	13
Figure 6. Représentation de la sélectivité fonctionnelle.	14
Figure 7. Schéma illustrant les résultats signalétiques d'un ligand biaisé pour les arrestines.	15
Figure 8. Schéma illustrant le profil signalétique du TRV130.	17
Figure 9. Séquence d'acide aminés des isoformes humains de l'UII (hUII) et de l'URP.	19
Figure 10. Distribution comparative de l'UII et URP chez l'humain et le rat.	19
Figure 11. Séquence en acides aminés du récepteur humain de l'UII et de l'URP (figure créée via le site web gpcrdb.org).	26
Figure 12. Voies de signalisation associées à hUT après son activation par hUII ou URP.	29
Figure 13. Les pepducines sont des peptides provenant des boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 ou ICL3) d'un RCPG comme le montre la figure tirée de Gabl M. et al., 2016.	31
Figure 14. Effet de la pepducine ATI-2341 dérivée des boucles intracellulaires de CXCR4 sur le recrutement de G _i et β-arrestine 2. (Adapté de (Chaturvedi et al. 2018; Quoyer et al. 2013))	34
Figure 15. Mécanisme d'action proposé afin qu'une pepducine puisse interagir avec un RCPG pour modifier sa signalisation.	35
Figure 16. Mécanismes d'actions potentiels des pepducines.	36
Figure 17. Séquences des différentes pepducines dérivées du β2-AR (Tableau tiré de (Carr et al. 2014)).	38
Figure 18. Représentation schématique de l'activité de la pepducine ICL3-9 sur le récepteur β2-AR. ICL3-9 biaise le signal du récepteur β2-AR vers la voie G _s	39
Figure 19. Voies de signalisation activées par AT1R.	47
Figure 1. Cytotoxic action of hUT-pepducins.	80
Figure 2. 3D structural data of UT-derived pepducins.	81

Figure 3. IP1 production (A and B) and ERK1/2 phosphorylation (C and D) kinetics and concentration dependence following hUT activation.....	82
Figure 4. Effect of hUII, hUT-Pep2, and [Trp1, Leu2]hUT-Pep3 on ERK1/2 phosphorylation in CHO-K1 cells or CHO-K1 cells stably expressing the hUT receptor (CHO-K1-hUT).....	83
Figure 5. ERK1/2 phosphorylation kinetics after hUT receptor activation.	84
Figure 6. Signaling signature of hUT-pepducins following hUT receptor activation.	85
Figure 7. UT-pepducins-mediated transactivation of EGFR following hUT activation.....	86
Figure 8. Effects of hUII and UT-derived pepducins on proliferation of hUT receptor-expressing HEK 293 cell and rat neonatal fibroblasts.	87
Figure 9. Vasocontractile action of hUT-derived pepducins.	88
Figure 10. Effect of hUT-pepducins on hUT-mediated G12 activation.	89
Figure 1. hUT and hAT1R forms heterodimers in HEK 293 cells.	113
Figure 2. FLAsH-BRET-based conformational biosensors.	113
Figure 3. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon hUII or Ang II activation.	114
Figure 4. Impact of hUII and Ang II on hUT-hAT1R-mediated β -arrestin recruitment.....	115
Figure 5. Effect of hUT-hAT1R activation by hUII and AngII on DAG production.	116
Figure 6. ERK1/2 phosphorylation following hUT, hAT1R or hUT-hAT1R activation.....	116
Figure 7. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon URP activation.	117
Figure 20. Représentation du principe de FLAsH-BRET	133

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1. Liste des protéines qui interagissent avec les β -arrestines	8
Tableau 2. Tableau récapitulatif de quelques ligands biaisés des RCPGs	16
Tableau 3. Séquences d'UII et URP dans différentes espèces.	20
Tableau 4. Molécules permettant de discriminer les activités biologiques médiées par hUII et URP	22
Tableau 5 Liste des pepducines rapportées dans la littérature	41
Tableau 6. RCPGs publiés qui forment des complexes /hétérodimères avec AT1R.	52
Table 1. Saturation binding parameters.....	118
Table 2. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon hUII or Ang II activation.	118
Table 3. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon URP activation.....	119

LISTE DES ABRÉVIATIONS

6'-GNT1	6'-Guanidinonaltrindole
7TMR	Récepteur à 7 domaines transmembranaires
ABCA1	<i>ATP binding cassette transporter A1</i>
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AHF	Insuffisance cardiaque aigüe (<i>acute heart failure</i>)
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPH	Amphiphysine
AngII	Angiotensine II
ANP	Peptide auriculaire natriurétique
APOA1	Apolipoprotein A1
ARF	Facteur de ribosylation d'ADP
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNO	<i>ARF nucleotide-binding site opener</i>
ASK-1	<i>Apoptosis signal regulating kinase</i>
AT1R	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
AT2R	Récepteur de l'angiotensine II de type 2
β2-AR	Récepteur β2-adrénergique
βarr	β-arrestines
B2R	Récepteur de type 2 de la bradykinine
c-Src	Proto-oncogene tyrosine-protéine kinase
CAMK	Protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante
CCR	Récepteurs aux chimiokines CC
CXCR4	<i>C-X-C motif chimiokines receptor 4</i>
CML	Cellules musculaires lisses
DAG	Diacylglycérol
ECL	Boucle extracellulaire
EDG3	Récepteur spécifique pour la sphingosine-1 phosphate
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
FP	<i>Prostaglandine F2a</i>
FPR2	<i>Formyl peptide receptor 2</i>
GRK	<i>Kinases spécifiques des RCPGs</i>
H8	<i>Hélice 8</i>
HF	<i>Heart failure</i>
hUT	<i>Isoforme humain du récepteur de l'urotensine II</i>
ICL	<i>Boucle intracellulaire</i>
I κ B α	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide</i>
IP ₃	<i>Inositol-1,4,5 triphosphate</i>
JNK	<i>Kinase c-Jun amino (N)-terminale</i>
KOR	<i>k-opoïd receptor</i>
MAPK	<i>Protéine kinase activée par des agents mitogènes</i>
MC4R	<i>Melanocortin-4 receptor</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 ou E3 ubiquitine ligase</i>
MEK	<i>Ras/Raf mitogen-activated protein kinase</i>
MKK4	<i>Mitogen activated protein kinase kinase 4</i>
MLC	<i>Myosin light chain</i>
MOR	<i>μ-opoïd receptor</i>
MWC	<i>Modèle Monod-Wyman-Changeux</i>
NAPDH	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive fusion protein</i>
NTS1	<i>Récepteur de type 1 de la neurotensine</i>
OIRD	<i>Opoïd induced receptor depression</i>
PAR-1	<i>Protease activated receptor 1</i>
PAR-2	<i>Protease activated receptor 2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate</i>

PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKD	Protéine kinase D
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PTHr	Récepteur de l'hormone parathyroïdienne 1
Raf-1	Proto-oncogène serine/threonine protéine kinase
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RhoK	Rho kinase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROCK	Rho associated protein kinase
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SNC	Système nerveux central
TM	Domaine transmembranaire
TRPC3	<i>Transient receptor potential channel 3</i>
UC	Urocontrin
UCA	Urocontrin A
UII	Urotensine II
URP	<i>Urotensin II-related peptide</i>
UT	Récepteur de l'urotensine II

REVUE DE LITTÉRATURE

1 LES RÉCEPTEURS À SEPT DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES (7TMR)

1.1 Généralités et classification des récepteurs à 7TMR :

Les récepteurs membranaires constituent, dans leur ensemble, un élément crucial de la transmission de l'information entre les milieux extra- et intracellulaires et sont donc, à ce titre, des acteurs clés de la communication cellulaire. En particulier, les récepteurs à sept domaines transmembranaires (7TMRs), également dénommés récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires (Latek et al. 2012). Les membres de cette superfamille sont codés par environ 4% de notre génome et ils contribuent à de nombreux processus physiologiques essentiels chez les mammifères (Latek et al. 2012). Compte tenu de la diversité remarquable de leurs actions biologiques, les 7TMRs représentent la cible la plus courante (jusqu'à 40%) des médicaments actuellement sur le marché (Wise, Gearing, and Rees 2002; Katritch, Cherezov, and Stevens 2013). Cette famille comprend environ 800 récepteurs chez l'humain (Lin 2013), classés phylogénétiquement en cinq sous-familles. La plus large famille de 7TMRs est celle de la *Rhodopsin* qui renferme 388 récepteurs comme les récepteurs du système angiotensinergique et du système adrénergique. Les quatre autres familles restantes sont dénommées *Secretin*, *Adhesion*, *Glutamate* et *Frizzled/Taste*. Ces dernières représentent des cibles intéressantes mais difficiles à exploiter notamment en raison de leur large domaine d'interaction et d'activation ou de la taille de leurs ligands (Krishnan et al. 2016).

Les RCPGs sont activés par une panoplie de signaux comprenant entre autres des hormones, des peptides, des chimiokines, ou encore des nucléotides. Malgré la diversité de leurs ligands et des voies de signalisation qu'ils régulent, tous les RCPGs partagent une structure commune constituée de sept domaines transmembranaires (TM). En 2000, l'élucidation de la première structure cristalline de la rhodopsine bovine complexée par un de ses ligands, *i.e.* le 11-cis rétinol, a ainsi permis de décrire un « modèle structural pour l'ensemble des RCPG », consistant en un réseau de sept TMs liés par six boucles dont trois intracellulaires et trois extracellulaires (Figure 1). Ce n'est cependant qu'en 2007 qu'une seconde structure de RCPG sera décrite lorsque le groupe de Kobilka publiera la structure cristalline du récepteur β 2-adrénergique (β 2-AR) (Cherezov et al. 2007; Rasmussen et al. 2007). À ce jour, plusieurs structures cristallines de RCPGs ont été publiées

incluant entre autres la structure du récepteur D3 de la dopamine (Chien et al. 2010), celles des récepteurs muscariniques M2 (Haga et al. 2012) et M3 (Kruse et al. 2012), du récepteur CXCR4 (Chun, Zhang, and Liu 2012), du récepteur de la nociceptine (Thompson et al. 2012), du récepteur A2A de l'adénosine (Jaakola et al. 2008) et enfin du récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R) (Wingler et al. 2019). Ce dernier est un régulateur très important de l'homéostasie cardiovasculaire et une importante cible pour le traitement de nombreuses maladies (Paul, Poyan Mehr, and Kreutz 2006). L'analyse de ces différentes structures cristallographiques a permis de mettre en évidence des mécanismes moléculaires communs d'activation des récepteurs de la classe A (Wingler et al. 2019).

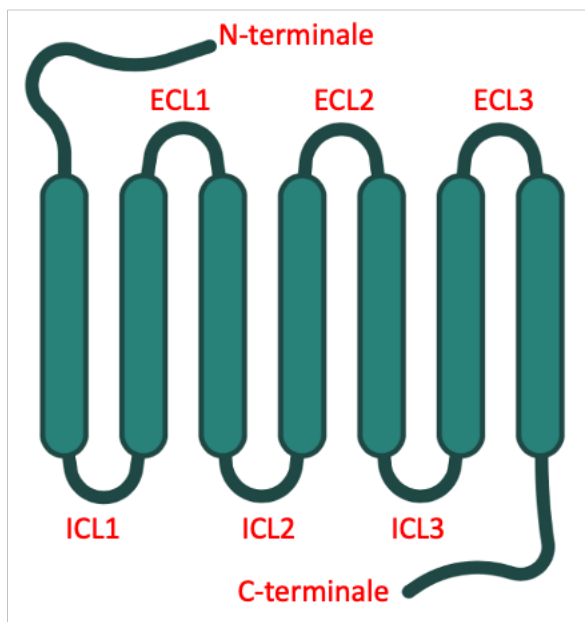


Figure 1. Représentation schématique d'un RCPG ou 7TMR.

Le domaine N-terminale est situé du côté extracellulaire et le C-terminale du côté intracellulaire. Aussi, on trouve trois boucles extracellulaires (ECL1,2 et 3) et trois boucles intracellulaires (ICL1,2 et 3). Ces dernières domaines sont séparées par sept domaines transmembranaires.

1.2 Mécanisme d'activation commun des 7TMRs

L'ensemble des structures cristallines, à commencer par celle du récepteur β 2-AR, a permis de décrire un mode d'activation commun des RCPGs de la famille de la Rhodopsine. À la suite de la liaison de leur ligand, d'importants changements conformationnels s'opèrent au niveau des TM5, TM6 et TM7 afin de faciliter l'insertion de la protéine G (Figure 2). Ces mouvements

s'accompagnent également d'une rotation du TM6 et d'un basculement de ce dernier vers le conduit intérieur (Rasmussen, Choi, et al. 2011; Rasmussen, DeVree, et al. 2011). Ces déplacements coordonnés entraînent ensuite une réorganisation de la pochette de liaison avec notamment la formation de liaisons hydrogènes qui vont provoquer une contraction de la pochette de liaison lors de l'interaction avec le ligand. Un réseau allostérique impliquant divers résidus dans les TM3, TM5, TM6 et TM7 sert ainsi de moyen pour transmettre l'information à l'ensemble du RCPG, et ainsi favoriser la liaison aux effecteurs du côté intracellulaire comme les protéines G, les kinases spécifiques des RCPG (GRK) et les β -arrestines (van der Westhuizen et al. 2015; DeVree et al. 2016). Les détails concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des récepteurs de la famille de la rhodopsine seront décrits plus bas (voir section 1.3).

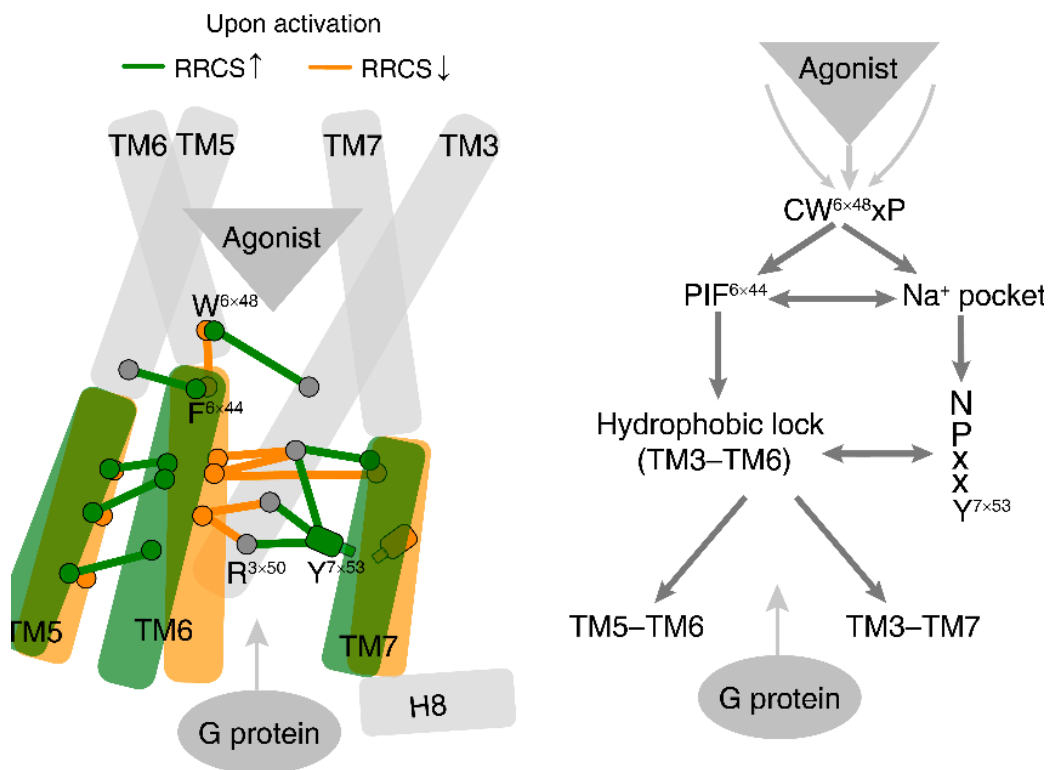


Figure 2. Mécanisme commun d'activation des RCPG de classe A.

Le modèle d'activation commun des GPCR de classe A révèle des changements majeurs lors de l'activation des RCPGs. À gauche : les structures d'état actif et inactif dorment des *clusters* compacts dans l'espace. L'activation du RCPG est mieux décrite par le mouvement vers l'extérieur de TM6 et le mouvement vers l'intérieur de TM7, entraînant un basculement des contacts de TM3 et TM6 à TM7. À droite : Réarrangement des contacts conservés des résidus lors de l'activation. (figure tirée Zhou et al., 2019)

1.2.1 Mécanismes cellulaires associés à l'activation des 7TMRs : Généralités

1.2.1.1 Voies de transduction dépendantes des protéines G

Les 7TMRs sont impliqués dans de très nombreux processus physiologiques. En réponse à la liaison de ligands extracellulaires tels que des hormones, des neurotransmetteurs et des lipides, les 7TMRs adoptent des conformations « actives » spécifiques qui conduisent à l'activation d'une large gamme de réponses intracellulaires. Dans le paradigme classique, ce changement conformationnel favorise l'activation des protéines G hétérotrimériques lesquelles vont se dissocier en $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ afin de stimuler différents effecteurs intracellulaires. Le récepteur activé sera ensuite phosphorylé au niveau de son domaine C-terminal par les kinases couplées aux protéines G (GRK) (Pitcher, Freedman, and Lefkowitz 1998). Ainsi phosphorylés, les 7TMR présentent une très forte affinité pour les β -arrestines qui vont alors arrêter le couplage des protéines G et favoriser l'internalisation du récepteur (Figure 3). Au cours de la dernière décennie, de nouvelles fonctions ont pu être attribuées aux β -arrestines avec notamment un rôle d'adaptateur dans l'endocytose/internalisation des récepteurs ou encore d'échafaudage favorisant le recrutement et l'activation de protéines membranaires et/ou cytoplasmiques (Noma et al. 2007).

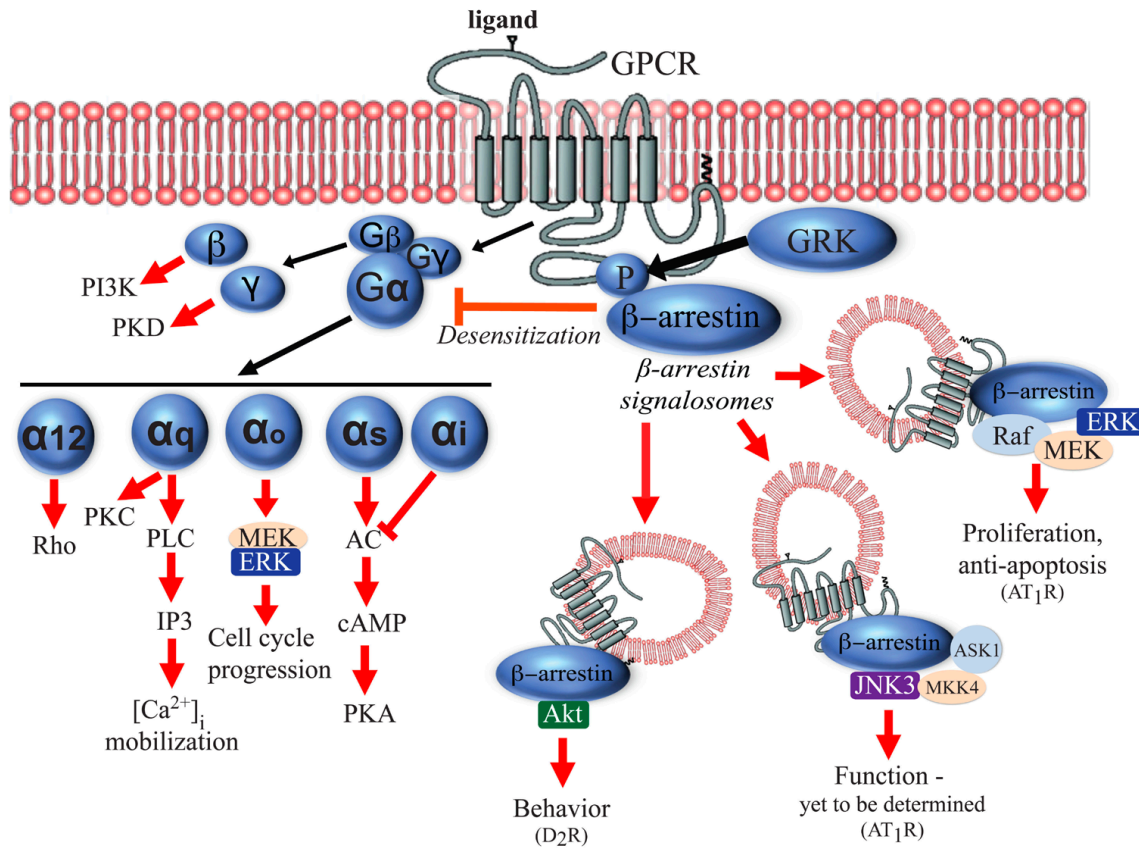


Figure 3. Voies de signalisation associées à l'activation d'un RCPG.

Lors de la liaison d'un agoniste avec son RCPG, les protéines G ($G_{\alpha_{12/13}}$, $G_{\alpha_{q/11}}$, $G_{\alpha_{i/o}}$, G_{α_s} , et $G\beta\gamma$) de même que les β -arrestines sont activées favorisant ainsi une variété de voies de signalisation distinctes en aval. La stimulation de la sous-unité $G\beta$ peut activer la phosphoinositide 3-kinase γ ($PI3K\gamma$) et la sous-unité $G\gamma$ peut activer la protéine kinase D (PKD). $G_{\alpha_{12}}$ peut activer les voies de signalisation liées à Rho kinase et G_{α_q} peut induire la mobilisation du calcium des réserves intracellulaires par l'activation de la phospholipase C (PLC) et de l'inositol triphosphate (IP_3). La signalisation $G_{\alpha_{i/o}}$ active la voie de MEK/ERK pour promouvoir la progression du cycle cellulaire. Les protéines G_{α_s} favorisent l'activation de la protéine kinase A (PKA) induite par l'adénylate cyclase (AC). La phosphorylation des RCPGs par GRK entraîne le recrutement des β -arrestines, qui à leur tour désensibilisent la signalisation des protéines G, régulent le trafic des récepteurs vers les endosomes et activent la signalisation dépendante des β -arrestines. (Figure tirée de Bologna Z et al., 2017).

1.2.1.2 Les β -arrestines

Au cours des dernières années, il fut démontré qu'en marge de leur rôle dans l'arrêt de la signalisation induite par les protéines G et l'internalisation des RCPG, les β -arrestines participaient également à la régulation d'une grande variété de processus cellulaires, notamment la signalisation et la désensibilisation, en se liant à différentes protéines cytoplasmiques (Tableau 1, Figure 4). En

bref, le recrutement des β -arrestines suite à l'activation et la phosphorylation des récepteurs fournit une stratégie générale utilisée par les 7TMR (et peut-être par d'autres types de récepteurs) pour atteindre certains objectifs en agissant comme adaptateurs, protéine d'échafaudages et/ou transducteurs de signaux, reliant ainsi les récepteurs activés à diverses voies de signalisation à l'intérieur de la cellule en influant sur la phosphorylation de nombreuses cibles intracellulaires (Xiao et al. 2007) (Shenoy and Lefkowitz 2003) (Figure 4, Tableau 1). Il a notamment été démontré que les β -arrestines agissaient comme un support physique pour Raf-1, MEK1 et ERK et qu'elles pouvaient séquestrer ERK_{1/2} phosphorylé dans le cytosol restreignant son activité à l'endosome (Luttrell et al. 2001). De plus, les β -arrestines sont capables d'interagir avec différentes kinases incluant ASK1, MKK4 et 7, JNK3 et JNK1/2 (McDonald et al. 2000; Kook et al. 2013) régulant ainsi leur activité ou encore l'activation de p38 (Bruchas et al. 2006). Il a également été observé que la transactivation du récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGFR), à la suite de l'activation d'un RCPG par son ligand, mettait en jeu les β -arrestines *via* leurs interactions avec une métalloprotéase enchassée dans la matrice transmembranaire qui peut cliver le ligand EGF situé à la membrane (Noma et al. 2007). D'autre part, la β -arrestine 2 peut également bloquer la signalisation du *nuclear factor kappa B* (NF κ B) en stabilisant *IkappaB-alpha* (I κ B α), une famille de protéine inhibant NF κ B (Gao et al. 2004). Aussi, la β -arrestine 1 peut, quant à elle, influencer directement les modifications épigénétiques *via* son interaction directe avec les histones ce qui influence la structure de la chromatine (Kang et al. 2005). Comme précédemment mentionné, en marge de son activation par les protéines G, la phosphorylation de ERK_{1/2} peut aussi être déclenchée par les β -arrestines. Dans le modèle présenté à la Figure 4, une première vague de signalisation est déclenchée à la surface de la cellule lors de l'activation initiale du récepteur ce qui aboutit à la phosphorylation de ERK_{1/2} *via* des mécanismes dépendants des protéines G. À la suite de la phosphorylation du domaine C-terminal du récepteur et son interaction subséquente avec les β -arrestines, ces dernières vont interagir avec les clathrines pour former des vésicules endocytiques qui vont alors servir d'échafaudage pour l'activation ERK_{1/2} *via* l'interaction de ce dernier avec des protéines cytoplasmiques tels que c-Src (Noma et al. 2007). On note donc dans la plupart des cas une composante biphasique lors de la phosphorylation de ERK_{1/2}, la phase précoce étant généralement liée à l'activation des protéines G alors que la phase tardive est quant à elle associée à une activation des β -arrestines (Noma et al. 2007). Ce phénomène est plus généralement connu sous le nom de *temporal bias* ou *timed-encoded dynamic GPCR signaling* (Shenoy and Lefkowitz 2003).

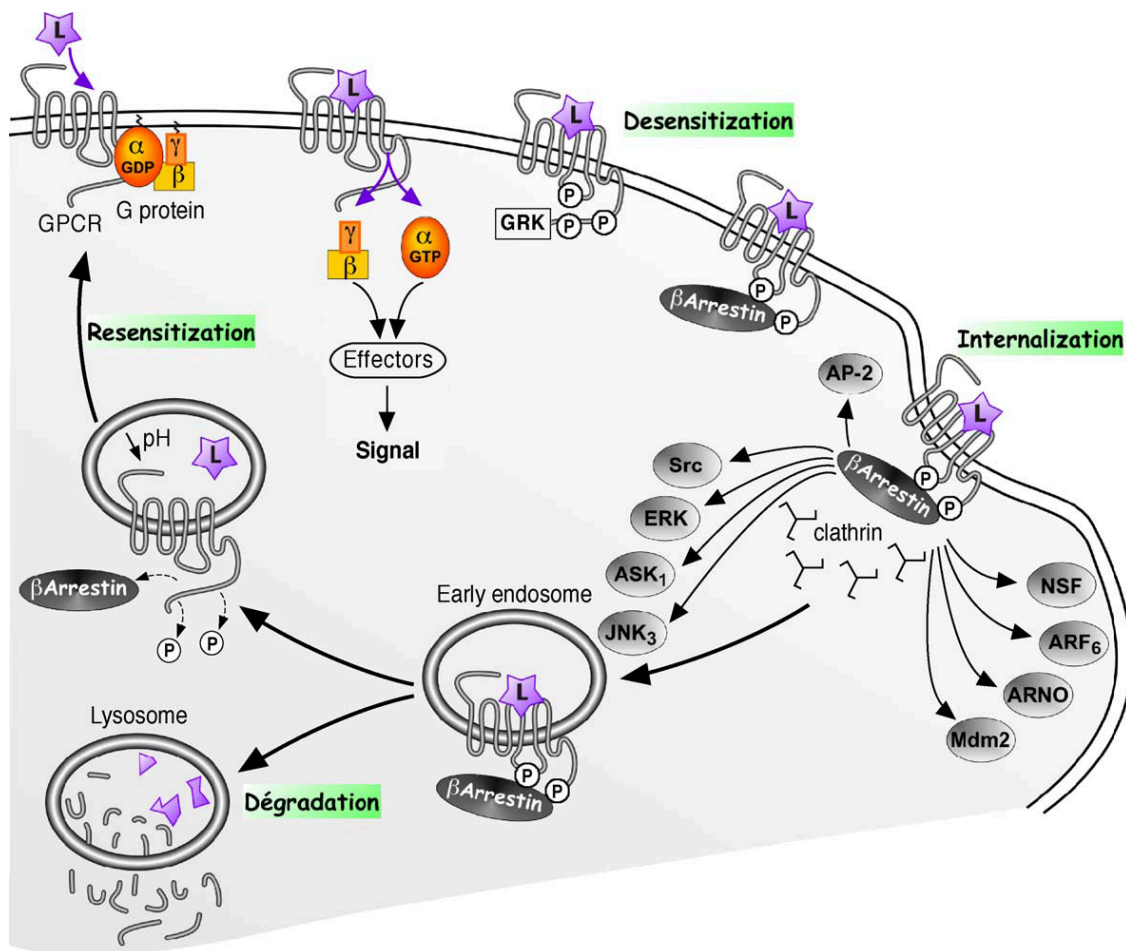


Figure 4. Réceptosome des arrestines : rôles dans l'internalisation et la signalisation.

En plus des protéines G, les arrestines sont capable de signaler indépendamment des protéines comme le montre la figure ci-dessus par activation des différentes protéines tel que NSF, ARF₆, ARNO et Mdm2. (Figure tirée de J. Bockeaert et al., 2004)

Des « mégaplexes » composés d'un RCPG lié à la fois à une β -arrestine et une protéine G ont récemment été découvert. Leurs structures et fonctions ont ensuite été décrites (Thomsen et al. 2016). Ces mégaplexes fournissent un contexte dynamique favorisant une signalisation continue *via* les protéines G une fois internalisés. Ceci est le cas chez les RCPG sensibles aux hormones tel le récepteur **de l'hormone parathyroïdienne 1** (PTH_{1R}) où un mégaplexe, contenant les β -arrestines et les protéines G, a été observé à la suite de l'internalisation du récepteur. Cette observation suggère que les récepteurs chroniquement exposés à leur hormone endogène pourraient profiter de la signalisation endosomale *via* les protéines G pour rester actif malgré une désensibilisation continue du récepteur à la membrane plasmatisque (Reiter et al. 2017).

Tableau 1. Liste des protéines qui interagissent avec les β -arrestines

Protéines de liaisons	Isoformes des β -arrestines	Conséquences fonctionnelles	Références
Clathrine	β -arrestines 1, 2	Endocytose	(Goodman et al. 1996)
RhoA	β -arrestine 1	Formation de fibres de stress dépendantes de l'angiotensine II	(Laporte et al. 1999; Barnes et al. 2005)
ASK1	β -arrestines 1, 2	Activation de JNK3 et p38	(McDonald et al. 2000)
c-Raf-1	β -arrestines 1, 2	Activation de ERK _{1/2}	(Luttrell et al. 2001)
JNK3	β -arrestine 2	Stabilisation du pJNK sur l'endosome	(McDonald et al. 2000)
ERK _{1/2}	β -arrestines 1, 2	Séquestration de pERK sur l'endosome	(Luttrell et al. 2001)
c-Src	β -arrestines 1, 2	Endocytose et activation d'ERK _{1/2}	(Luttrell et al. 1999)

1.2.1.3 Rôle des β -arrestines dans la désensibilisation, l'internalisation et le trafic intracellulaire des RCPG

1.2.1.3.1 Désensibilisation

La désensibilisation de la majorité des RCPGs est contrôlée principalement par les β -arrestines 1 et 2. Deux principales forces motrices contrôlent le recrutement de ces dernières à savoir 1) la modification induite par le ligand dans la conformation du récepteur suite à son activation et 2) la phosphorylation médiée par les GRKs sur la queue C-terminal du récepteur occupé par le ligand (Gurevich and Benovic 1993). Les β -arrestines sont connues pour mettre fin à la liaison des protéines G à un récepteur (DeWire et al. 2007). En effet, le récepteur actif occupé par un agoniste est phosphorylé au niveau de son extrémité C-terminale par les GRKs ce qui induit le recrutement des β -arrestines au niveau du récepteur phosphorylé. Cette interaction conduit à l'inhibition du couplage de la protéine G généralement par encombrement stérique (Reiter and Lefkowitz 2006). Ce processus, nommé « désensibilisation », semble s'appliquer à la plupart des RCPGs (Freedman

and Lefkowitz 1996). Aussi, il a été démontré que les β -arrestines ont la capacité de déplacer les diacylglycérol (DAG) kinases vers le récepteur actif, augmentant ainsi simultanément le taux de dégradation de leur seconds messagers respectifs (Nelson et al. 2007).

1.2.1.3.2 *Internalisation et trafic intracellulaire*

En plus de leur rôle dans la désensibilisation, les β -arrestines jouent un rôle important dans l'internalisation des RCPGs en interagissant avec des éléments clés de la machinerie endocytaire tels que les clathrines (Goodman et al. 1996), l'adaptateur de clathrine AP2 (Laporte et al. 1999), la petite protéine G ARF6 et son facteur d'échange de nucléotides de guanine, *ARF nucleotide-binding site opener* (ARNO) (Claing et al. 2001) ou encore le *N-ethylmaleimide-sensitive factor* (NSF) (protéine de fusion sensible au N-éthylmaleimide) (McDonald et al. 1999). En outre, la *mouse double minute 2* (MDM2), une ubiquitine ligase E3, lie les β -arrestines et permet leur ubiquitination, ce qui est requis pour l'endocytose médiée par les clathrines du récepteur (Shenoy et al. 2001). D'autre part, plusieurs RCPGs entrent dans le cycle endosomal à la suite de leur activation et internalisation. Une fois internalisé, les RCPGs entrent dans un processus de recyclage qui retourne les récepteurs à la surface des cellules ou les envoie vers les lysosomes pour être dégradé (Puthenveedu et al. 2010). Le tri des RCPG dans la voie endosomale est un processus actif, où le tri des récepteurs est régulé par plusieurs facteurs comme les modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation, l'ubiquitination et les interactions avec les sous-unités endosomales (Hanyaloglu and von Zastrow 2008).

1.3 Les RCPGs : des protéines allostériques régulatrices du métabolisme cellulaire

Le concept d'interactions allostériques a initialement été décrit en 1961 (Changeux 1961), mais a réellement pris son essor en 1965 avec le développement du concept de «commutation moléculaire». Ce dernier constitue la fondation du modèle de Monod-Wyman-Changeux (MWC), décrivant notamment des changements conformationnels coopératifs globaux provoqués par l'interaction entre une protéine et son substrat, et non seulement des changements locaux au niveau de la structure quaternaire. Ainsi, l'interaction de ligands structurellement distincts peut engendrer des modifications topologiques distinctes et multiples au niveau de la protéine menant à l'activation de divers signaux intracellulaires *via* le recrutement de différents effecteurs, et par conséquent à des réponses cellulaires différentes.

1.3.1 Mécanismes moléculaires et étapes clés communes impliqués dans l'activation des RCPGs de classe A

Des données récentes obtenues par cristallographie aux rayons X des récepteurs aux chimiokines (CCR) CCR2 (Zheng et al. 2016) et CCR9 (Oswald et al. 2016) ainsi que le récepteur β 2-AR (Liu et al. 2017) ont fourni des informations importantes concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation d'un RCPG suite à la liaison de son ligand et donc du transfert d'informations du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire. Trois régions d'interactions semblent particulièrement impliquées dans le passage d'un RCPG d'un état actif à inactif à savoir la *subpocket* hydrophobe au-dessus de l'hélice 8 (H8), la région de liaison centrale formée du septième domaine transmembranaire (TM7) et de H8 ainsi que la région formée des troisième et sixième domaines transmembranaires (TM3/6) avec le second domaine transmembranaire (TM2) et la première boucle intracellulaire (ICL1) (Zhou et al. 2019). L'analyse structurale réalisée par Zhou *et al.* en 2019 a notamment montré l'existence d'un mécanisme d'activation commun chez les RCPG de classe A impliquant un réseau conservé de motifs structuraux tels que les motifs CWxP, PIF, NPxxY, DRY ainsi qu'une poche de liaison pour les ions sodiums. À la suite de la liaison d'un ligand à son RCPG, un réarrangement conformationnel s'opère et rapproche ces motifs spatialement éloignés, ce qui forme un réseau structurellement lié depuis le côté extracellulaire jusqu'au côté intracellulaire. Ce phénomène se déroule en quatre étapes en commençant du côté extracellulaire lors de la liaison du ligand. Dans un premier temps, l'étape d'initiation du signal impliquant un réarrangement dans les contacts entre les résidus de la poche de liaison et de la poche de sodium conservée. Dans un deuxième temps, les contacts hydrophobes sont rompus dû aux nouveaux liens établis entre les résidus 6.40 et 6.41 et le résidu 3.43 (la numérotation utilisée est celle Ballesteros-Weinstein (Isberg et al. 2015)). Ces trois résidus sont majoritairement hydrophobes et constituent ce que l'on appelle l'*hydrophobic lock*. L'ouverture de ce dernier induit la rotation de la partie cytoplasmique du TM6, rotation essentielle pour l'activation du récepteur. Ainsi, le résidu N^{7.49} établit de nouveaux contacts avec le résidu 3.43, facilitant le mouvement du TM7 vers TM3. Dans un troisième temps, et à la suite des mouvements induits précédemment, le résidu Y^{7.53} établit de nouveaux liens avec les résidus 3.43, 3.46 et R^{3.50}, lesquels établissent des liens avec des résidus dans le TM6. Ce transfert de liens réalisé au niveau du résidu Y^{7.53} renforce la nouvelle structure formée par l'interaction de TM3 avec TM7 et permet l'ouverture formé de TM3/TM6 où TM6 se déplace vers l'extérieur. Finalement, un transfert de contact entre le résidu

R^{3.50} et le résidu 6.37 libère complètement TM3/TM6 et permet donc de déplacer TM6 vers l'extérieur pour permettre la liaison de la protéine G du côté cytoplasmique.

1.3.2 Fonctionnalité sélective et signalisation biaisée

Les données structurales, biophysiques et pharmacologiques obtenues au cours des dernières années ont profondément transformé notre vision des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'activation des RCPGs. Jusqu'à récemment, il était encore convenu qu'un récepteur existait simplement en équilibre entre une conformation inactive et active (Watson et al. 2000). Par conséquent, la force d'un agoniste reflétait directement sa capacité à se lier et déplacer l'équilibre vers la conformation active lorsque lié au récepteur (Figure 5). De plus, la découverte d'agonistes partiels et inverses a révélé l'existence de nouveaux profils pharmacologiques qui, bien que différents de ceux traditionnellement observés pour des agonistes complets et des antagonistes neutres, étaient toujours compatibles avec le modèle susmentionné (Figure 5) (Gether 2000). Cependant, tel qu'observés dans de nombreux exemples, un composé peut générer différentes puissances relatives dans différents essais, ce qui ne supportait pas ce paradigme. Ainsi, Watson C. et al. 2000 ont montré qu'un même récepteur pouvait démontrer des rapports de puissance variables vis-à-vis d'un agoniste dans différentes cellules hôtes (Figure 6) (Watson et al. 2000). Cette constatation, qui n'est pas conforme à l'idée que tous les agonistes produisent une même réponse (c'est-à-dire par un état actif commun du récepteur), démontre ainsi l'importance du contexte cellulaire et remet en question le dogme jusqu'alors en place. Les résultats étaient, en effet, davantage cohérents avec l'idée que ces différents agonistes produisent des populations d'états actifs distincts en fonction du contexte cellulaire en utilisant les protéines G de manières différentielles (Figures 5 et 6) (!!! INVALID CITATION !!! ; Watson et al. 2000). Dans le même temps, la coexistence de multiples configurations actives et inactives des récepteurs a été démontrée par des preuves structurelles et biophysiques écrasantes, notamment concernant les récepteurs β 2-AR et ceux de la **sérotonine 3** (Kobilka 2011). Par exemple, quand β 2-AR lie son agoniste, il forme un complexe actif avec la protéine G_s qui est différent de la conformation active adoptée par β 2-AR lorsqu'il interagit avec la protéine G_i ou les β -arrestines (Malik et al. 2013). Ainsi, le modèle d'activation des RCPGs a considérablement évolué au cours des deux dernières décennies. Bien que de nombreux aspects de la fonction des RCPGs s'expliquent par un simple modèle à deux états, les preuves provenant des études biophysiques et fonctionnelles soutiennent un modèle à plusieurs états

selon lequel les ligands stabilisent un état ou un ensemble d'états conformationnels spécifiques (Deupi and Kobilka 2010). Cette hétérogénéité conformationnelle constitue ainsi un défi de taille pour obtenir des structures de RCPGs activées associées à un effecteur spécifique. Par conséquent, le modèle initial a été révisé afin de pouvoir intégrer cette pluridimensionalité inhérente des RCPGs et notamment la notion selon laquelle différents agonistes stabilisent des sous-ensembles de populations distinctes créant ainsi de subtiles variations dans leur profil signalétique (Figure 6) (Galandrin, Oligny-Longpre, and Bouvier 2007). Ce concept de fonctionnalité sélective ou d'agoniste biaisé laisse ainsi envisager la possibilité de rediriger sélectivement l'activation de certaines voies de signalisation *via* la conception de ligands capables de favoriser/prévenir la stabilisation de certaines sous-populations du récepteur (Kenakin 2003; Reiter et al. 2012). La découverte de ligands biaisés (Tableau 2), agissant au niveau du site orthostérique ou d'un site allotérique du récepteur, est rapidement devenue un domaine de recherche extrêmement actif et d'ores et déjà plusieurs molécules ciblant des RCPGs d'intérêts et favorisant la transduction spécifique et dépendante des protéines G ou des β -arrestines ont été décrites.

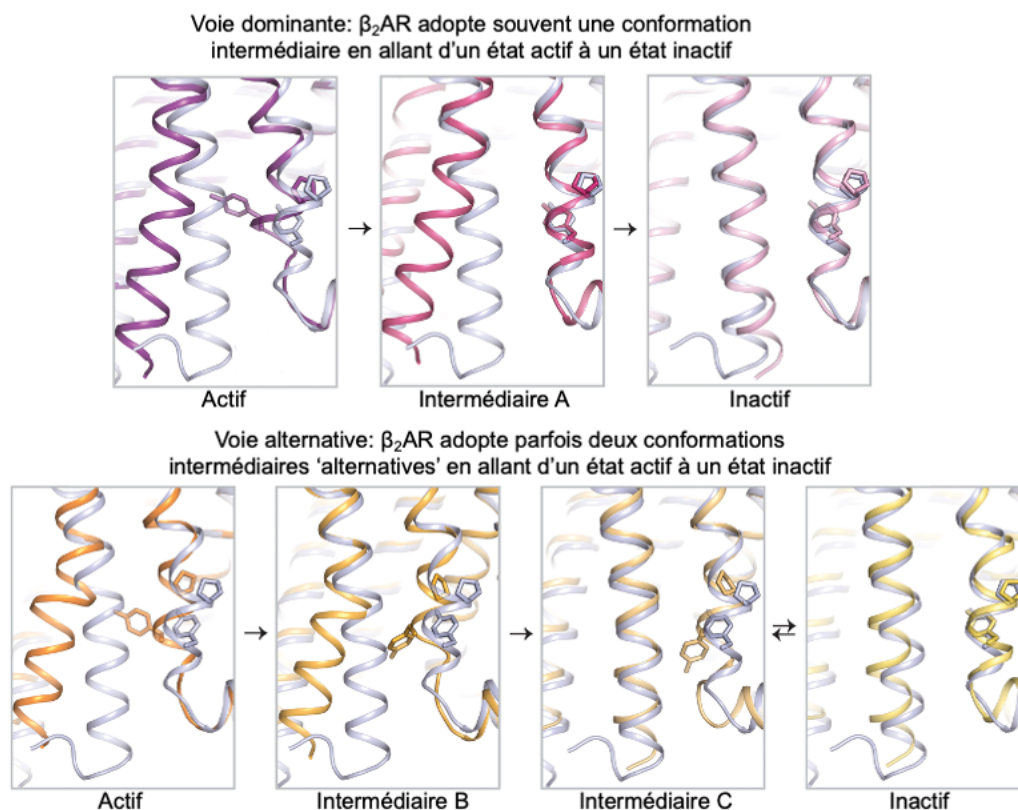


Figure 5. États conformationnels (haut) et modèle d'agonisme/antagonisme (bas).

Dans la représentation du haut se trouvent divers états conformationnels de β_2 -AR. Au cours des simulations de dynamique moléculaire, ce dernier passe d'un état actif à inactif en transitant par un intermédiaire (intermédiaire A) dans lequel le TM6 est toujours déplacé vers l'extérieur par rapport à l'état inactif de la structure cristalline mais TM7 est redressé. Cependant, β_2 -AR peut également emprunter une voie alternative qui transite à travers deux états intermédiaires (B et C) lesquels présentent une conformation de TM7 distincte de celle observée dans les structures cristallines inactives et actives du β_2 -AR (Figure adaptée Naomi R. Latorraca et al. 2016). Dans la figure du bas, différentes activités possibles d'un ligand sont représentées. Les agonistes complets et partiels montrent une efficacité totale et partielle, respectivement, de l'activation de RCPGs. Les agonistes inverses stabilisent la forme inactive des RCPGs, ce qui réduit l'activité intrinsèque du RCPG dessous des niveaux basaux. Dans le modèle classique, les antagonistes sont définis comme des ligands qui inhibent de manière compétitive la liaison/action de l'agoniste, n'altérant pas l'équilibre des RCPGs par eux-mêmes et inhibant ainsi maximalelement le signal jusqu'à des niveaux basaux (Figure tirée de Sato J. et al. 2016)

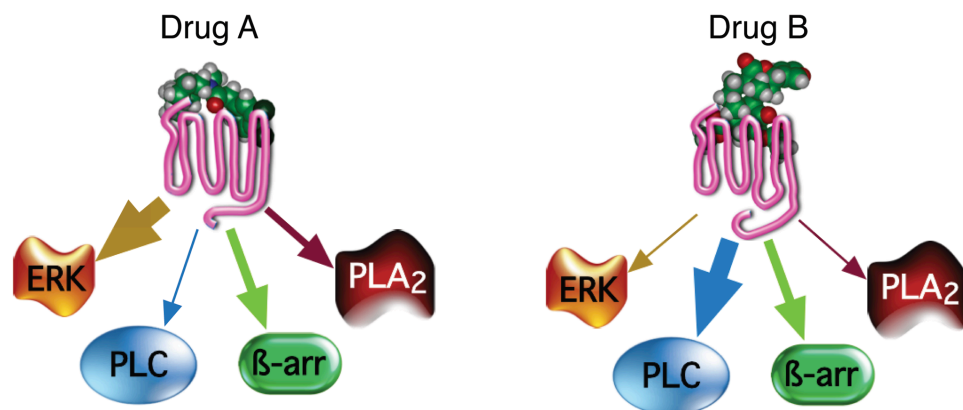


Figure 6. Représentation de la sélectivité fonctionnelle.

La sélectivité fonctionnelle est basée sur l'efficacité différentielle d'une drogue pour réguler l'activité de diverses voies de signalisation couplées à un seul sous-type de récepteur. La sélectivité de la signalisation est illustrée par l'épaisseur des flèches entre le récepteur activé par la drogue et la voie de signalisation cellulaire. Tel qu'indiqué, le profil de sélectivité de la drogue A est ERK > β-arrestine > PLA2 > PLC, tandis que celui pour la drogue B est PLC > β-arrestine > PLA2 > ERK. (Figure tirée de Kelly A et al., 2018 et légende adaptée de la même référence)

1.3.2.1 Exemples d'agonistes biaisés

1.3.2.1.1 TRV027

Le composé [Sar¹, D-Ala⁸]-AngII également connu sous le nom TRV027 ou TRV120027 est un analogue de l'angiotensine II (AngII) qui se lie de façon compétitive aux récepteurs AT1R mais est biaisé pour les β-arrestines (Violin et al. 2010). Par rapport à la molécule native (AngII = H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH), ce dernier a subi de légères modifications physico-chimiques, soit le remplacement de l'acide aspartique par une sarcosine et de la phénylalanine par une alanine de configuration D, qui altèrent son profil signalétique de manière considérable (Violin et al. 2010). Ce composé induit le recrutement des β-arrestines, l'internalisation d'AT1R et l'activation des voies des MAPK en absence de toute activité des protéines G (Kim et al. 2012). Le composé TRV027 a notamment montré une puissance comparable à celle de AngII (17 nM vs 9.7 nM) pour le recrutement des β-arrestines (Ikeda et al. 2015). Ce composé provoque également une augmentation de la contractilité des cardiomyocytes *in vitro* et une diminution de la pression artérielle moyenne chez les rats *in vivo* comparable à celle observée avec le Losartan, un antagoniste d'AT1R (Kim et al. 2012). Cependant, contrairement au Losartan et d'autres antagonistes d'AT1R qui diminuent la performance cardiaque, le TRV027 augmente plutôt ce dernier tout en conservant

le volume cardiaque (Violin et al. 2010). Malheureusement, lors d'essais cliniques en Phase 2b, le TRV027 ne s'est pas avéré efficace pour le traitement de l'insuffisance cardiaque aiguë (AHF) (Felker et al. 2009). En effet, ce composé n'a pas amélioré l'état clinique des personnes souffrant d'AHF, insuffisance dû à une sécrétion prononcée et sélective de catécholamines médiée par la β -arrestine 1 et TRPC3. Des études approfondies de son profil signalétique ont montré que le TRV027, *via* le recrutement des β -arrestines et l'activation de la PLC, forme un complexe qui stimule l'ouverture de canal TRPC3 et donc la sécrétion de catécholamines. En effet, à la suite du traitement avec l'agoniste biaisé β -arrestines d'AT1R (TRV027), AT1R forme un complexe transitoire avec TRPC3. Cette interaction transitoire induit un influx extracellulaire de calcium et par conséquent, une sécrétion chronique de catécholamines. Les catécholamines sont importantes dans les réponses au stress. Des niveaux élevés de catécholamines provoquent une pression artérielle élevée et de l'anxiété (Kashihara et al. 2020)... Malgré tout, le profil pharmacologique du TRV027 suggère que des ligands AT1R biaisés en faveur des β -arrestines pourraient être avantageux pour le traitement de pathologies cardiaques associées au système angiotensinergique (Figure 7) (Monasky et al. 2013).

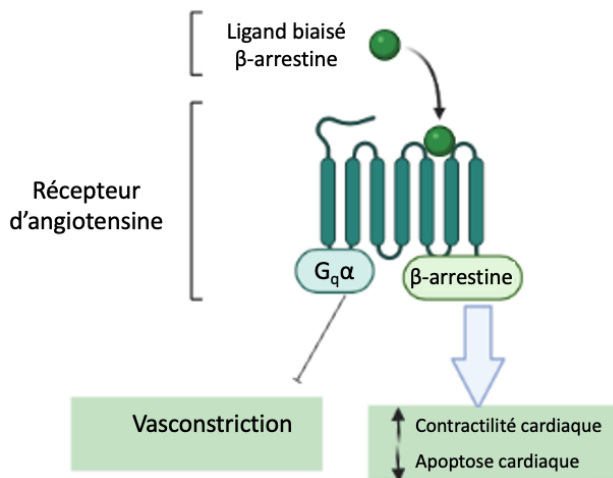


Figure 7. Schéma illustrant les résultats signalétiques d'un ligand biaisé pour les arrestines.

Le couplage $G_q\alpha$ à hAT1R est lié à la vasoconstriction et à la rétention de sodium et des liquides, tandis que le recrutement des β -arrestines (β -arrestine 2) est associé à une augmentation de la contractilité des cardiomyocytes et à une protection contre l'apoptose cardiaque.

Tableau 2. Tableau récapitulatif de quelques ligands biaisés des RCPGs
(Tableau tiré de Bologna Z et al. 2017)

Récepteur	Ligand biaisé	Voies	Aire thérapeutique
AT1R	SII TRV120027	β -arrestines	Rénal et cardiovasculaire
Récepteur de l'apéline	MM07	$G\alpha_i$	Cardiovasculaire
Récepteur de l'arginine-vasopressine V_2	MCF14 MCF18 MCF57	$G\alpha_s$	Rénal
β 1-adrénergique	Carvedilol Alprenolol	β -arrestine	Cardiovasculaire
β 2-adrénergique	Fenoterol Carvedilol	$G\alpha_s$ β -arrestine	Pulmonaire Cardiovasculaire
Dopamine D_1	SKF83959 SFK38393 SKF82957 SKF75670	$G\alpha_q$	Neurologie
Dopamine D_2	UNC9975 UNC9995 MLS1547	β -arrestine 2 $G\alpha_{i/o}$	Neurologie Neurologie
Histamine H_2	Famotidine	$G\alpha_s$	Gastro-intestinal
Histamine H_4	JNJ7777120	β -arrestine 2	Inflammatoire
K-opioïde (KOR)	Isoquinoline 2.1 6'-GNTI RB-64	$G\alpha_{i/o}$	Neurologie
μ -opioïde (MOR)	TRV130 NAP	$G\alpha_{i/o}$ $G\alpha_{i/o}$	Neurologie Neurologie
Sérotonine 5-HT _{2B}	Ergotamin	β -arrestine	Neurologie

1.3.2.1.2 TRV130

Tel que mentionné ci-dessus (Tableau 2), divers ligands biaisés ont été développés pour diverses applications. Le composé TRV130, une molécule ciblant les récepteurs μ opioïdes (MOR) (Bologna et al. 2017), représente un des succès les plus notoires pour ce type de composé. Ce ligand possède une puissance et une efficacité à activer les protéines G comparable à celle de la morphine

(Chen et al. 2013). En revanche, le TRV130 ne stimule pas le recrutement des β -arrestines contrairement à la morphine (Chen et al. 2013) (Figure 8). Il est important de mentionner que les *opioïd-induced respiratory depression* (OIRD) et les complications gastro-intestinales associées à une prise répétée de morphine sont associées à la voie des β -arrestine. L'inefficacité du TRV130 à activer les β -arrestines fait de lui un analgésique efficace avec peu d'effets secondaires. Récemment, ce composé a été approuvé par le FDA et il est maintenant commercialisé sous le nom d'*olicepidine*.

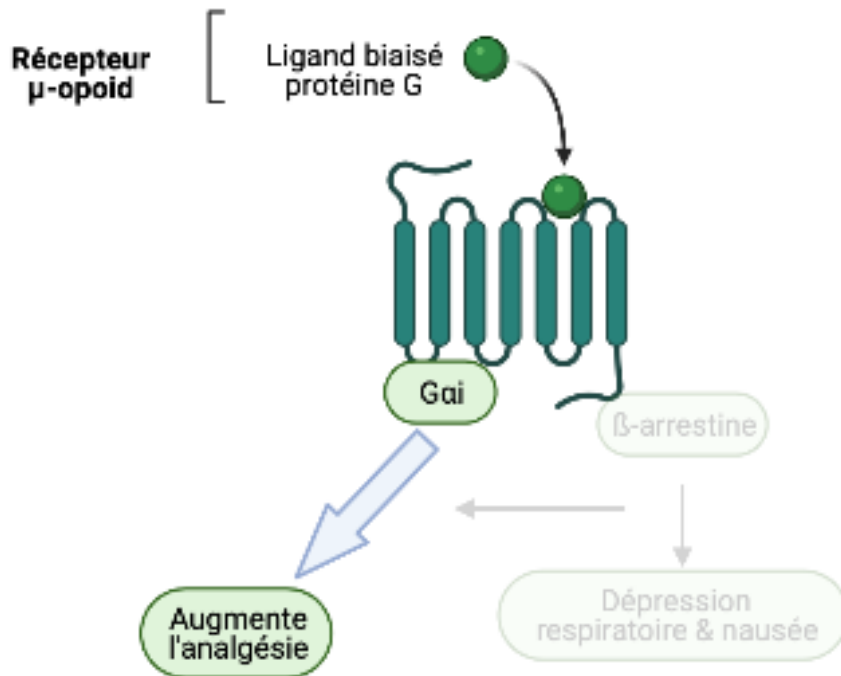


Figure 8. Schéma illustrant le profil signalétique du TRV130.

Le couplage G_i au récepteur μ opioïde est lié à une forte analgésie, tandis que le recrutement des β -arrestine-2 est associé à une dysfonction respiratoire et gastro-intestinale, ainsi qu'à une inhibition de l'effet analgésique.

En conclusion, malgré certaines déceptions et la lenteur des progrès dans le développement de ligands biaisés, principalement en raison d'un manque de compréhension des déterminants physico-chimiques et structuraux qui régissent l'activation de leurs récepteurs apparentés, il est largement espéré qu'un bénéfice thérapeutique sans équivoque sera finalement atteint en biaisant la signalisation d'un RCPG.

2 LE SYSTÈME UROTENSINERGIQUE ET SON IMPLICATION DANS DIVERSES PATHOLOGIES

2.1 L'urotensine II (UII) et l'*urotensin II-related peptide* (URP)

L'urotensine II (UII) est un peptide de 11 acides aminés qui a été isolé pour la première fois chez un poisson de type *Gillichthys mirabilis* sur la base de son activité spasmogénique sur le rectum de truite (Pearson et al. 1980). À la suite de cette découverte initiale, ce peptide a été isolé ou identifié chez de nombreuses autres espèces incluant notamment la grenouille, le rat, la souris, le macaque et bien sûr l'humain. La partie N-terminale de ce peptide diffère d'une espèce à l'autre alors que la partie C-terminale renferme une région cyclique hautement conservée (Tableau 3) (Douglas and Ohlstein 2000).

En 2004, Sugo *et al.* ont isolé un peptide cyclique paralogue, appelé *urotensin II-related peptide* (URP) (Figure 9) (Sugo et al. 2003), dont la séquence est strictement conservée au cours de l'évolution (Tableau 3) (Vaudry et al. 2010). Cet octapeptide cyclique renferme la même séquence intracyclique que l'UII (voir Tableau 3). En revanche, son domaine N-terminal est très différent. En effet, ce dernier n'est composé que d'un seul acide aminé alors que dans les différents isoformes d'UII, il peut être constitué de 4 (chez l'humain) à 10 (chez la souris) acides aminés (Tableau 3). De plus, et en opposition avec l'acide aspartique qui est strictement retrouvé dans tous les isoformes d'UII, le premier acide aminé adjacent au pont disulfure du côté N-terminal de l'URP est de nature hydrophobe (Ala) (Figure 9).

Chez l'humain, l'UII (hUII) et l'URP sont tous les deux exprimés dans le système nerveux central et périphérique ainsi que dans les systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrine (Figure 10). Des spécificités de localisation existent toutefois pour ces deux peptides. Dans le rein et le foie, on trouve l'ARNm des deux peptides (Sugo et al. 2003) alors que le cortex cérébral n'exprime que l'URP et les poumons que l'UII (Sugo et al. 2003). Par ailleurs, des différences inter-espèces au niveau de leur distribution sont également observables. Chez la souris, l'UII et l'URP sont exprimés dans le vagin, ce qui n'est pas le cas chez l'humain (Dubessy et al. 2008).

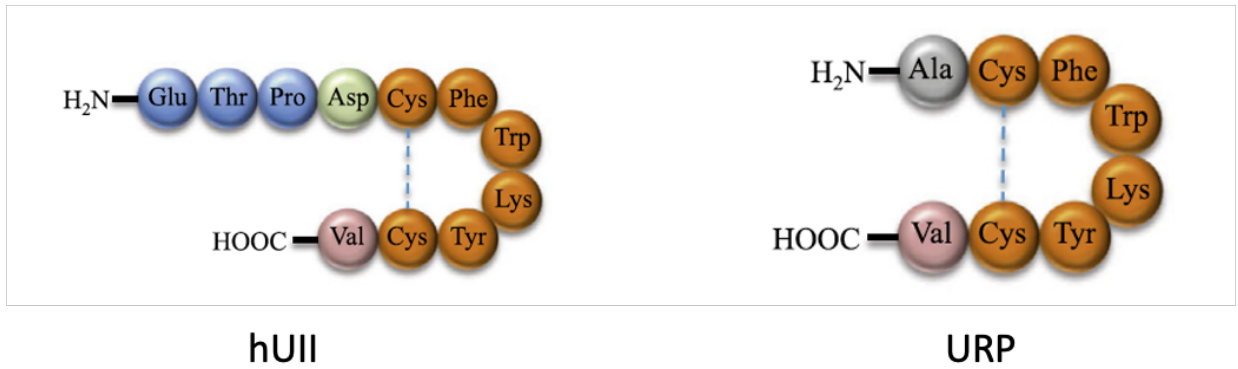


Figure 9. Séquence d'acide aminés des isoformes humains de l'UII (hUII) et de l'URP.

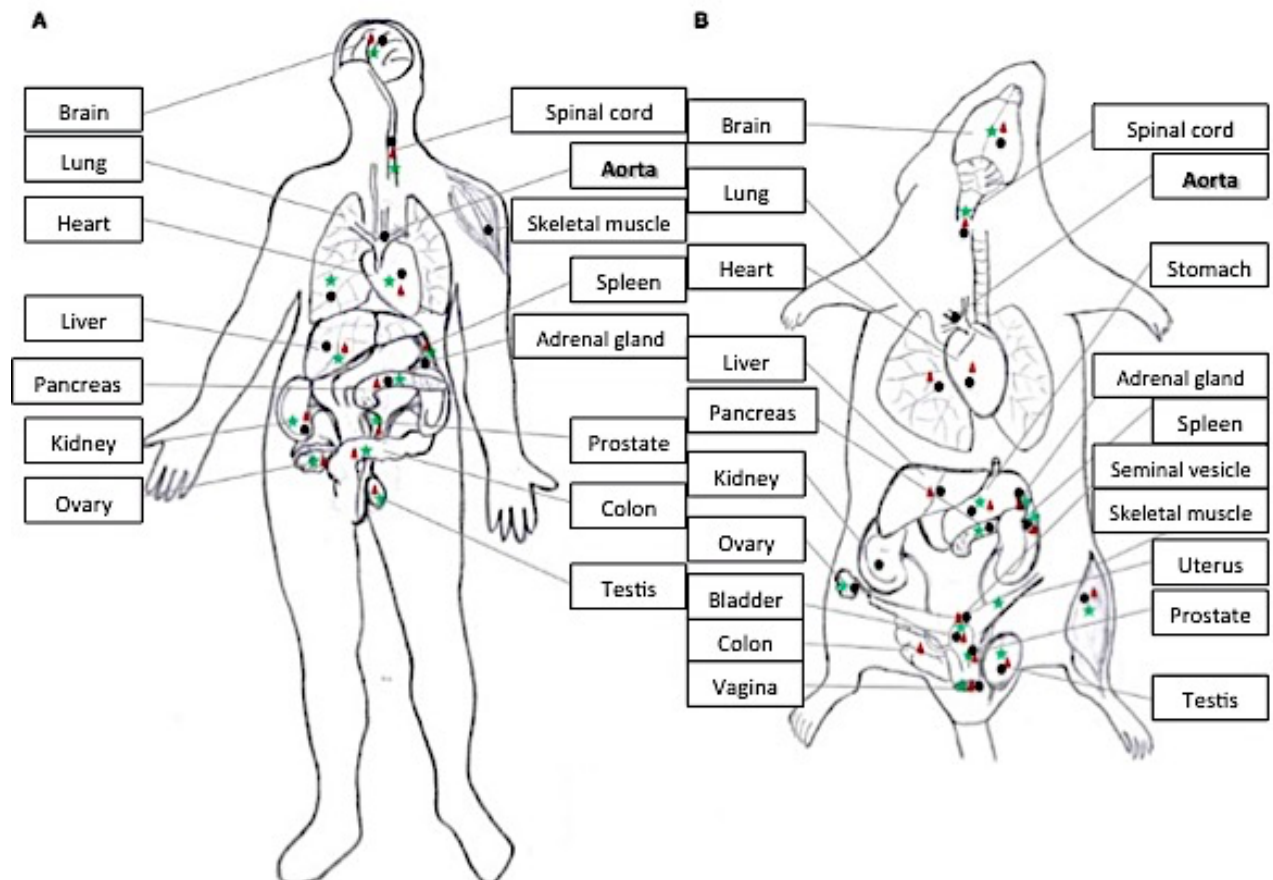


Figure 10. Distribution comparative de l'UII et URP chez l'humain et le rat.
(Figure tirée de Chatenet et al., 2013)

Tableau 3. Séquences d'UII et URP dans différentes espèces.

Peptide	Espèce	Séquence
<i>UII</i>	Humain et singe	H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
	Souris	pGln-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH
	Rat	pGln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH
	Poisson <i>Goby</i>	H-Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
<i>URP</i>	Humain et singe	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
	Souris	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
	Rat	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH

Encadré pointillé : Un pont disulfure est formé entre les deux cystéines chez toutes les espèces.

2.2 Activités biologiques

Les peptides UII et URP exercent un large éventail d'actions biologiques chez les mammifères incluant entre autres la modulation des fonctions rénales, pulmonaires, cardiovasculaires, endocrines mais également cérébrales (Vaudry et al. 2010). En particulier, l'UII est à ce jour décrit comme l'un des plus puissants vasoconstricteurs identifiés (Douglas and Ohlstein 2000). Au niveau cardiovasculaire, ce peptide exerce notamment de puissants effets hémodynamiques (Kemp et al. 2007), des réponses inotropiques et chronotropiques positives (Watson et al. 2003) et des actions osmorégulatrices (Song et al. 2006). Il induit également une accumulation de collagène et de fibronectine (Zhang et al. 2008), module la réponse inflammatoire (Shiraishi et al. 2008), joue un rôle dans l'induction de l'hypertrophie cardiaque et vasculaire (Papadopoulos, Bousette, and Giaid 2008), provoque une effet angiogénique puissant (Guidolin, Albertin, and Ribatti 2010) et inhibe la libération d'insuline induite par le glucose (Silvestre et al. 2004). Étant donné ses nombreuses actions, le système urotensinergique a ainsi été lié à de nombreuses pathophysiologies comprenant entre autres l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, le diabète, ainsi que les maladies rénales et hépatiques (Ross, McKendy, and Giaid 2010). Des études récentes ont suggéré que l'UII et l'URP pourraient exercer des actions physiologiques communes mais également divergentes (Vaudry et al. 2015) avec notamment une action différentielle pour ces deux peptides sur la prolifération cellulaire (Jarry et al. 2010) ou encore des activités distinctes sur la contraction myocardique (Prosser et al. 2008). Des expériences réalisées sur des cellules isolées de cœur de rats

ont également montré que les deux peptides étaient capables de réduire les lésions myocardiques par réduction de la production de créatine kinase qui est un marqueur des lésions myocardiques. Cependant, seule l'UII a pu réduire la production du peptide auriculaire natriurétique (ANP) (Prosser et al. 2008). Plus récemment, une modulation transcriptionnelle différentielle lors de l'activation de noyau de cœur de rats isolés par l'UII ou l'URP a été observée (Doan et al. 2012). Enfin, des rôles pathophysiologiques distincts pour l'UII et l'URP dans l'hypertension ont été suggérés (Hirose et al. 2009). En effet, l'expression de l'ARNm de l'UII et de l'URP est augmentée dans l'oreillette des rats spontanément hypertendus (SHR) par rapport aux rats normaux. Cependant, une régulation spécifique de l'ARNm de l'URP mais pas de l'UII a été observé dans l'aorte et le rein des SHR, ce qui soutient l'idée que ces peptides pourraient agir différemment dans certains systèmes biologiques (Hirose et al. 2009) en induisant des signatures signalétiques intracellulaires différentes. Chez l'humain, ce système, faiblement exprimé dans les valves histologiquement normales, est augmenté dans les cellules interstitielles valvulaires activées, les cellules inflammatoires et dans les zones de calcification matures et actives. Il est intéressant de noter que l'ARNm de l'URP est régulé positivement dans les valves fibrotiques avec une calcification focale par rapport à l'ARNm de hUII [41]. L'UII et l'URP, réduisent significativement l'efflux de cholestérol dépendant de l'apolipoprotéine A1 (APOA1) dans les macrophages de type M2 et l'expression de la protéine *ATP binding cassette transporter A1* (ABCA1) dans les cellules interstitielles de la valve aortique humaine, augmentent la localisation nucléaire de la caténine et favorise la minéralisation cellulaire [41]. Finalement, chez les patients présentant une insuffisance cardiaque aïgue, les concentrations plasmatiques d'URP mesurées sont environ 10 fois plus élevées que celles de hUII.

En résumé, la modulation spécifique des ligands du système urotensinergique semble essentielle pour analyser leurs fonctions biologiques et, en tant que telle, pourrait conduire à une participation différentielle dans l'étiologie de maladies cardiovasculaires spécifiques. En accord avec ces observations, au cours des dernières années plusieurs antagonistes peptiques et non-peptidiques ont été conçu pour discriminer les actions spécifiques de l'UII ou de l'URP (Tableau 4) (Chatenet et al. 2013). Parmi ces molécules qui permettent de discriminer les actions spécifiques des deux peptides, on retrouve le R4a, l'urocontrin (UC) et urocontrin A (UCA) (Tableau 4) (Chatenet et al. 2012; Chatenet et al. 2013).

Tableau 4. Molécules permettant de discriminer les activités biologiques médiées par hUII et URP

	Effet	Tissus étudiés	Références
Urocontrin	Diminue l'efficacité d'hUII sans affecter URP	Aorte (rat)	(Chatenet et al. 2013)
UCA	Diminue l'efficacité d'hUII sans affecter URP	Aorte (rat, singe)	(Chatenet et al. 2012)
r(1-7)	Antagoniste spécifique de l'URP	Aorte (rat)	(Chatenet et al. 2013)
Palosuran	Abolition de la réduction de la pression de perfusion médiée par rUII mais non URP	Aorte (rat)	(Prosser et al. 2008)
R4a	Diminue l'EC ₅₀ d'hUII mais potentialise URP	Aorte (rat)	(Dufour-Gallant, Chatenet, and Lubell 2015)
Triazepinones 20G	Réduit la contraction d'hUII sans affecter celle de l'URP	Aorte (rat)	(Dufour-Gallant, Chatenet, and Lubell 2015)
Triazepinones 23E	Réduit l'efficacité de la contraction de l'URP sans affecter celle de l'hUII	Aorte (rat)	(Dufour-Gallant, Chatenet, and Lubell 2015)
[D-Phe(pI) ³]URP	Réduit E _{max} d'hUII sans affecter URP	Aorte (rat)	(Billard, Hebert, and Chatenet 2018)
(c[Trp-Lys-Tyr-Glyw(triazole)-Gly]; c[Phe-Trp-Lys-Tyr-Glyw(triazole)-Gly])	Inhibe sélectivement l'hUII mais aucun effet sur l'URP	Aorte (rat)	(Strack et al. 2017)

2.2.1 Modifications de l'U^{II} et de l'URP

À la suite de la découverte de l'U^{II} et de l'URP, de nombreuses études de type structure-activité ont été entreprises pour essayer de mieux comprendre les déterminants structuraux et les paramètres physico-chimiques impliqués dans leurs activités biologiques. Il fut ainsi observé que la région intra-cyclique de l'U^{II} et de l'URP (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys), strictement conservée au cours de l'évolution, est considérée comme le siège de l'activité biologique de ces deux peptides puisque la modification des acides aminés qui la compose entraîne une altération de l'activité biologique des deux peptides. Des expériences de liaison ont ainsi montré que la partie située entre les acides aminés 5 et 10 de l'U^{II} était suffisante pour lier le récepteur de l'urotensine II (UT) avec une haute affinité ($pEC_{50} = 8.91 \pm 0.04$) et provoquer une réponse biologique (contraction d'anneaux d'aortes des rats) semblable à celle observée avec l'U^{II} complet (Labarrere et al. 2003). Le remplacement des deux cystéines par des alanines ou des sérines a conduit à des analogues [Ala^{5,10}]hU^{II} et [Ser^{5,10}]hU^{II} totalement dépourvus d'activité biologique démontrant ainsi l'importance cruciale du pont disulfure dans l'interaction de l'U^{II} et de l'URP avec leur récepteur et son activation (Leprince et al. 2008). Démontrant l'importance de la structure secondaire qu'on appelle *beta turns* adoptée par U^{II} dans sa région intracyclique entre les résidus Asp⁴-Phe⁶ et Lys⁸-Cys¹⁰, il fut observé que le remplacement du pont disulfure par des ponts de type lactam de différentes tailles conduisait à des analogues faiblement actifs voir inactifs (Grieco, Carotenuto, Patacchini, et al. 2002). En revanche, la rigidification du pont disulfure dans l'U^{II}₍₄₋₁₁₎ (Grieco, Carotenuto, Campiglia, et al. 2002), *via* le remplacement du résidu Cys⁵ natif par un résidu pénicillamine, se traduit par une augmentation significative de la puissance contractile, faisant de cet analogue le premier super-agoniste du système urotensinergique (Patacchini et al. 2003). L'introduction de cette modification dans l'URP n'a malheureusement pas abouti au même résultat illustrant cette fois-ci, au niveau moléculaire, la fonctionnalité sélective potentielle de ces deux peptides (Chatenet et al. 2004).

Afin de déterminer le rôle de chaque résidu et de leur orientation dans l'activité biologique de l'U^{II} et de l'URP, des mutations ponctuelles de chaque résidu par une alanine ou leur isomère de configuration D ont été effectués. Ces dernières ont ainsi montré que la structure chimique et l'orientation des chaînes latérales de chaque résidu de la région intracyclique jouaient un rôle essentiel dans l'activité biologique des deux peptides (Chatenet et al. 2004). Cependant, bien que ces résultats soient la plupart du temps semblables pour l'U^{II} et l'URP, un D-scan de l'U^{II} et de

l'URP a cependant révélé un apport différent du résidu Trp dans la liaison et l'activation de leur récepteur. En effet, le composé [D-Trp⁴]URP (Chatenet et al. 2006) abolit la réponse contractile évoquée par UII alors que le composé [D-Trp⁷]UII₍₄₋₁₁₎ (Guerrini et al. 2005) se comporte quant à lui comme un agoniste. Ces deux composés, évalués sur un modèle de contraction d'anneaux d'aortes de rat, soulignent encore une fois un modèle d'interaction distinct de l'UII et de l'URP avec leur récepteur et donc la fonctionnalité sélective de ces deux peptides endogènes.

Plusieurs études ont montré que le résidu Phe (position 3 dans l'URP et 6 dans l'UII) est le résidu le plus tolérant de la région cyclique et il se trouve être impliqué aussi bien dans l'interaction que dans l'activation du récepteur (Brkovic et al. 2003). En effet, l'introduction d'un groupement aliphatique à la place du résidu aromatique ne change pas l'effet agoniste, au moins dans l'UII, alors que si on introduit cet acide aminé en forme D, ceci réduit considérablement l'affinité de l'hUII et de l'URP. Il fut ainsi observé que la simple substitution du noyau phényle du résidu Phe⁶ par un cyclohexyle (Cha), dans le composé UII₄₋₁₁, générerait un antagoniste compétitif capable de bloquer la contraction induite par UII. Cependant, la présence de cette même modification dans l'URP, *i.e.* [Cha⁶]URP, n'a aucune activité antagoniste mais se manifeste en étant un faible agoniste. Ces résultats montrent une fois de plus que la même modification sur ces deux peptides pourrait moduler différemment leur comportement signalétique.

Les études réalisées au niveau du résidu lysine dans l'hUII et l'URP ont montré que la nature de sa chaîne latérale est important pour l'activité biologique des deux peptides (Guerrini et al. 2005). En effet, si la chaîne latérale de lysine est remplacée par un autre groupement de nature lipophile tel que la norleucine, norvaline et leucine, l'effet biologique des deux peptides est complètement aboli. Cependant, une substitution de cette chaîne latérale par un autre groupement conservant le même caractère physico-chimique, *i.e.* basique, mène à une modulation de l'efficacité des peptides. Par exemple, le composé [Arg⁸]UII est 50 fois moins actif que l'UII, une réduction du caractère basique étant probablement responsable de la perte d'efficacité observée. Ces résultats montrent que la présence d'une amine aliphatique est essentielle pour l'activité biologique complète des deux peptides (Guerrini et al. 2005). Aussi, la distance entre le groupement d'amine et le carbone alpha à la position 8 a été investigué. En fait, la réduction de la distance entre l'amine aliphatique et le squelette peptidique réduit graduellement l'efficacité et la puissance de l'analogue suggérant ainsi que l'orientation spatiale de ce groupement amine est essentielle pour la liaison et l'activation des deux peptides (Guerrini et al. 2005).

Le résidu Tyr⁶ de l'URP, comme le résidu Tyr⁹ de hUII, revêt une importance primordiale pour la bioactivité des deux peptides. Chatenet *et al.* ont ainsi constaté que le remplacement de ce dernier dans l'URP par la 3-iodo-Tyr⁶ a entraîné une diminution significative de l'affinité de liaison et de l'activité contractile de cet analogue (Labarrere et al. 2003; Chatenet et al. 2004). Par contre, cette même modification dans l'UII₄₋₁₁, qui pour rappel est le fragment minimal équatif de l'UII, a donné lieu à un composé significativement plus puissant que l'UII à induire la contraction d'anneaux d'aortes de rat, suggérant ainsi, au moins pour l'UII, qu'une modification de l'encombrement stérique de la chaîne latérale aromatique ou une augmentation de la densité électronique pourrait expliquer l'amélioration de l'affinité et de l'activité biologique de cet analogue (Labarrere et al. 2003). L'importance de cet acide aminé dans le développement des ligands biaisés a été mis en évidence par notre laboratoire où Billard et al., 2017 ont développé un analogue [Pep⁶] URP qui lie le récepteur avec la même affinité que l'URP mais agit comme un ligand biaisé pour la voie de G₁₂. Donc, les résidus à chaîne latérale de nature aromatique est une piste prometteuse pour développer des ligands biaisés.

2.3 Le récepteur de l'urotensine II (UT)

Peu de temps après l'identification de l'UII humaine en 1999, il a été démontré, par pharmacologie inverse, que le récepteur orphelin *GPR14* précédemment caractérisé chez les rats était en fait le récepteur de l'UII (Figure 11) (Ames et al. 1999). Contrairement à la plupart des neuropeptides qui possèdent généralement plusieurs isoformes d'un récepteur, le *GPR14*, maintenant renommé UT (Alexander 2012), est le seul récepteur à haute affinité pour l'UII/URP jusqu'à présent identifié. Chez l'humain, le récepteur UT (hUT) est constitué de 389 acides aminés et il possède environ 75% d'identité de séquence avec son isoforme de rat (rUT) (Ames et al. 1999). Comme tous les RCPGs de classe A, UT est caractérisé par un court segment N-terminal, un résidu Asp conservé dans le domaine transmembranaire 2 (TM2) est impliqué dans la signalisation d'UT, un motif D/ERY à la jonction entre le troisième domaine transmembranaire (TM3) et la seconde boucle intracellulaire (ICL2), un motif NPY dans le TM7 qui est nécessaire pour l'internalisation du récepteur et 12 sites potentiels de phosphorylation Ser/Thr dans la boucle intracellulaire 3 et la queue cytoplasmique (Figure 11). Les résidus conservés Cys123/Cys199, qui forment probablement un

pont disulfure, sont présents dans la première et la seconde boucle extracellulaire (ECL1 et ECL2), respectivement. Par ailleurs, des études ont montré que rUTR et hUT possèdent un site de palmitoylation situé à leur extrémité C-terminale mais à différentes positions, créant deux motifs H8 structurellement distincts (Castel et al. 2017). Ces différences structurelles entre hUT et rUT pourrait prédire des différences dans les schémas de signalisation, d'internalisation et de désensibilisation tel qu'observé pour les ligands des récepteurs β 3-adrénergiques (Adachi et al. 2019).

Des études de RT-PCR ont montré que l'ARNm du récepteur, tout comme ses deux ligands endogènes, est exprimé dans de nombreux organes et tissus du corps humain dont le cortex, l'hypothalamus, le foie, les glandes adrénergiques, le placenta, le cœur et l'aorte (Sugo et al. 2003). De fait, ce système est exprimé d'une façon remarquable dans les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les myofibroblastes. Cette expression importante dans le système cardiovasculaire suggère que le système urotensinergique a la capacité de jouer un rôle essentiel dans l'homéostasie cardiovasculaire et le développement des maladies cardiaques (Bousette et al. 2004).

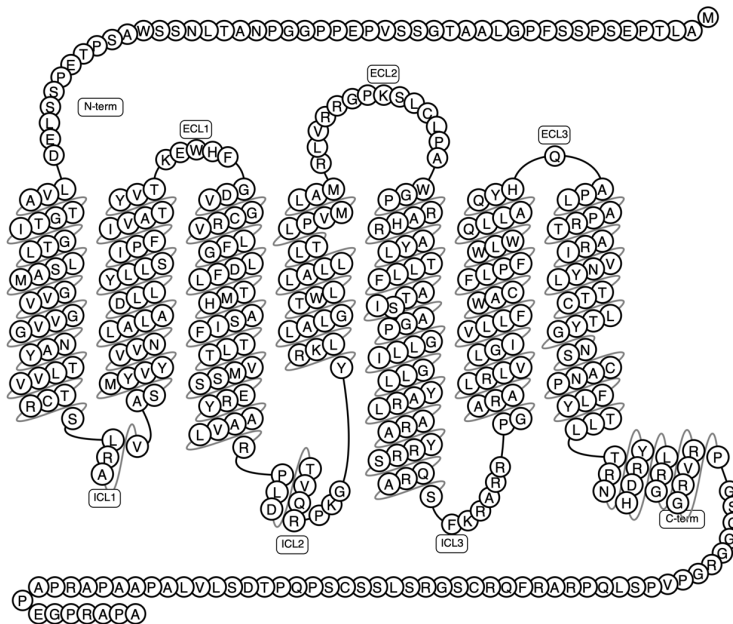


Figure 11. Séquence en acides aminés du récepteur humain de l'UII et de l'URP (figure créée via le site web gpcrdb.org).

2.4 Implications du système urotensinergique dans les pathologies cardiovasculaires

Plusieurs études ont montré que le niveau d'UUI et de son récepteur étaient élevés dans les cardiomyocytes des patients souffrants d'insuffisance cardiaque avancée (Liang et al. 2021). Notamment, l'UUI induit la fibrose cardiaque en produisant de la fibronectine et du collagène dans les fibroblastes cardiaques et provoque l'hypertrophie des cardiomyocytes (Tzanidis et al. 2003; Zou, Nagai, and Yamazaki 2001). L'UUI est également impliqué dans le remodelage cardiaque et l'utilisation d'antagonistes de UT dans des modèles murins a montré le potentiel de ce système pour traiter des maladies comme l'hypertrophie, la fibrose et dans les lésions myocardiques dans l'insuffisance cardiaque (Oh et al. 2015). Plus de détails sur ce sujet sont inclus dans la discussion générale de la thèse.

2.5 Signalisation intracellulaire associée à l'activation d'UT

Le récepteur de l'UUI/URP peut activer plusieurs protéines G, *i.e.* G_q , G_i , $G_{12/13}$, ainsi que les β -arrestines 1 et 2 ou encore le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Brule et al. 2014). Cependant, la voie de signalisation principale impliquée dans la vasoconstriction associée à l'activation de UT implique la PLC *via* la stimulation de la protéine G_q (Figure 12). Cette activation génère alors de l'inositol triphosphate (IP_3) et du diacylglycérol (DAG) (Saetrum Opgaard et al. 2000). L' IP_3 , en se fixant sur son récepteur situé sur la membrane du réticulum endoplasmique, va induire la libération de calcium intracellulaire qui va alors se complexer avec la calmoduline entraînant ainsi la phosphorylation des *myosin light chains* (MLC) et donc la contraction des cellules vasculaires lisses (Saetrum Opgaard et al. 2000). La vasoconstriction peut aussi être médiée par la protéine kinase C (PKC) (activé par DAG et le calcium cytoplasmique) et la voie des Rho/ROCK *via* leur sensibilisation au calcium qui stimule la phosphorylation des MLC (Segain et al. 2007). Le peptide UUI est considéré comme l'un des plus puissants vasoconstricteurs (Russell, Molenaar, and O'Brien 2001). En marge de son action contractile, l'activation de UT, situé sur l'endothélium, par UUI peut provoquer une vasodilatation *via* la stimulation de la synthèse et de la sécrétion du monoxyde d'azote (NO) et de **prostacyclin** (Gray, Jones, and Sharif 2001). L'UUI possède également des effets angiogéniques, hypertrophique et prolifératif qui sont associées aux voies G_q , G_i , $G_{12/13}$. L'angiogenèse est médiée par l'activation d'ERK_{1/2} et de PI3K. L'hypertrophie des cardiomyocytes dépend de la transactivation de l'EGFR lequel active la signalisation d'ERK et de p38/MAPK (Onan

et al. 2004). L'hypertrophie semble aussi être médiée par la PKA et la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante II (CaMKII). CaMKII et PKA assurent un influx de calcium intracellulaire qui est régulé par les pompes phospholamban (PLN) et SERCA (Shi et al. 2016; Xu et al. 2017). PKA participe aussi à la génération de la fibrose au niveau cardiaque en stimulant la synthèse du collagène I et III (Liu et al. 2015). En ce que concerne l'effet mitogène prolifératif d'UII, cette activité dépend de l'activation de la voie de RhoA/ROCK, médiée par les protéines $G_{12/13}$, ERK et de la production de NADPH. En fait, la NADPH génère des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui potentialise l'activité de ERK, PI3K/Akt et des facteurs de remodelage vasculaire (Sauzeau et al. 2001; Djordjevic et al. 2005; Tamura et al. 2003).

Les RCPGs ont toujours été présentés comme étant des récepteurs localisés à la surface cellulaire. Récemment, de nombreux RCPGs nucléaires, y compris UT, récepteurs d'Isoproterenol, d'endothelin-1, alpha-adrénergique, d'acide lysophosphatidique, mGlu5, ont été identifiés au niveau de la membrane nucléaire de différents organes comme le cœur et certains tissus de singes **comme le cœur et l'aorte** (Campden, Audet, and Hebert 2015).

2.6 Comment contrer les effets délétères associés à l'activation du système urotensinergique ?

Tel que mentionné ci-dessus, le système urotensinergique est impliqué dans différents types de pathologies cardiovasculaires. La sélectivité fonctionnelle entre hUII et URP semble être un facteur limitant le développement des antagonistes pour ce système étant donné qu'un antagoniste pourrait bloquer les voies médiées par hUII et non l'URP et vice versa. Pour cette raison, le concept de signal biaisé de ce système vers une voie particulière bénéfique tout en bloquant spécifiquement la voie impliquée dans la pathologie dont les voies impliquées dans la contraction cardiaque (G_{α_q} , $G_{\alpha_{12}}$) et favoriser d'autres voies comme les voies des β -arrestines pourraient être une stratégie qui nous permet de franchir le problème de sélectivité fonctionnelle de l'hUII et l'URP. Esposito G. et al., 2011 ont montré qu'une nouvelle voie de signalisation d'UT médiée par la transactivation de l'EGFR et dépendante de la β -arrestine 1/2, favorisant la survie cellulaire et la cardioprotection. Des niveaux modérés de signalisation Gq stimulent l'hypertrophie adaptative (Milano et al. 1994), tandis que des niveaux élevés d'activation de Gq entraînent une apoptose inadaptée des cardiomyocytes (Adams et al. 2000)

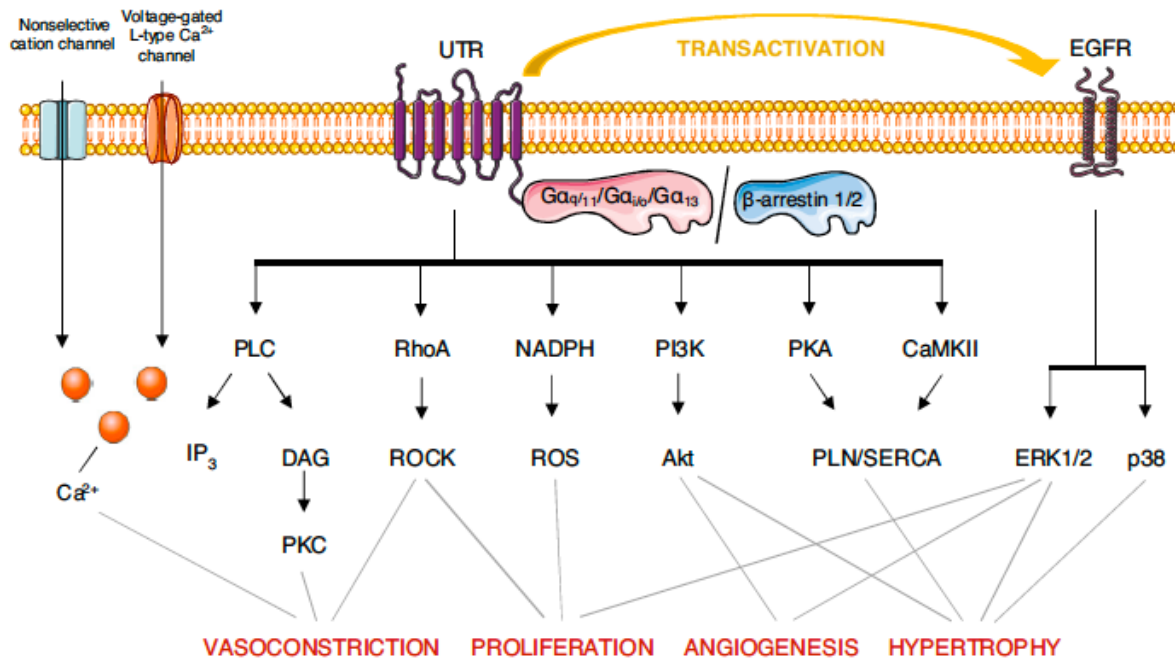


Figure 12. Voies de signalisation associées à hUT après son activation par hUII ou URP.

L'activation de hUT par ses agonistes endogènes se traduit en des fonctions biologiques dans le corps tout dépendamment de la voie activée. On voit que l'activation de la voie G_{q,12,13} aboutit à la vasoconstriction et la transactivation d'EGFR qui aboutit à l'angiogenèse, la vasoconstriction et prolifération... (Figure tirée de Castro JP et al. 2019).

3.1 Pepducines

3.1.1 Découverte et structure des pepducines

Les pepducines ont été développées par Kuliopulos et Covic en 1990 (Covic, Gresser, et al. 2002b). Le but de leur étude était de développer un nouvel outil permettant d'étudier, sans le ligand endogène, la signalisation associée au *protease-activated receptor-1* (PAR-1), un RCPG important dans les maladies cardiovasculaires. En se basant sur les travaux précédents de Strader (Cheung et al. 1991), Neubig (Dalman and Neubig 1991) et Lefkowitz (Luttrell et al. 1993), qui avaient montré que les boucles intracellulaires des RCPGs sont des sites essentiels dans l'interaction avec la machinerie intracellulaire, les auteurs ont imaginé que des peptides dérivés de ces boucles pourraient être utilisés pour moduler la signalisation associée aux RCPGs. En effet, les quatre domaines intracellulaires d'un RCPG interagissent avec les différentes sous-unités de la protéine G (α , β et γ) (Lambright et al. 1996). La liaison d'un ligand à son RCPG induit un réarrangement dans les TM3 et TM6, ce qui mène à la perturbation du *ionic lock* et altère les boucles intracellulaires, surtout ICL2 et ICL3, qui à leur tour activent la protéine G en permettant l'échange du GDP en GTP sur la sous-unité $G\alpha$ (Gether and Kobilka 1998). De façon générale, une pepducine est composée d'un peptide mimant l'une des trois boucles intracellulaires d'un RCPG sur lequel est attaché un groupement hydrophobe (acide palmitoïque, acide lithocholique, ...) (Figure 13) (Covic, Gresser, et al. 2002b). La taille typique des pepducines varie entre 7 et 20 acides aminés, mais certaines peuvent aller jusqu'à 50 acides aminés si le peptide est dérivé de la queue C-terminale du RCPG (Covic, Gresser, et al. 2002b). En général, ICL1 est la plus courte boucle intracellulaire alors que ICL3 et le domaine C-terminal présentent le plus grand degré de variation au niveau de la taille (Mirzadegan et al. 2003; Otaki and Firestein 2001). Bien que plusieurs études de mutagenèse dirigée aient montré que ICL3 est la plus impliquée dans l'interaction entre le récepteur et les protéines G (Kjelsberg et al. 1992), des pepducines mimant les trois boucles intracellulaires et la queue C-terminale ont toutefois montré leur efficacité *in vitro* et *in vivo* ce qui suggère que tous les domaines intracellulaires d'un RCPG sont essentiels dans la transduction du signal et peuvent donc être utilisés pour moduler le signal d'un RCPG (Covic, Gresser, et al. 2002b).

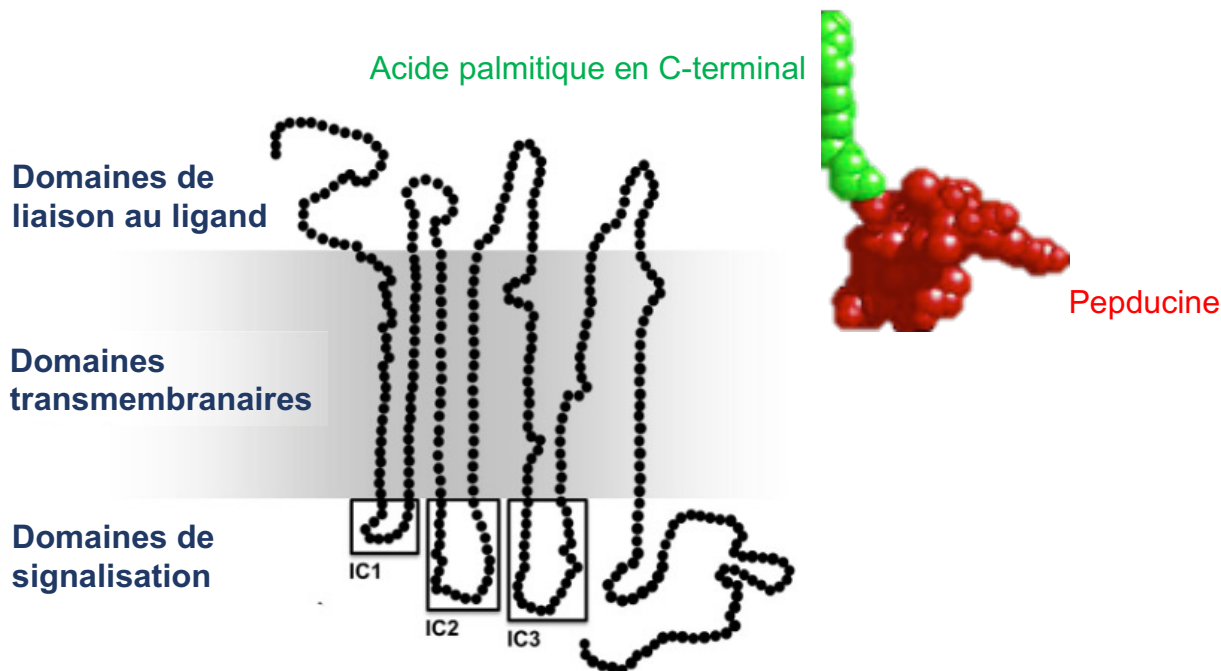


Figure 13. Les pepducines sont des peptides provenant des boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 ou ICL3) d'un RCPG comme le montre la figure tirée de Gabl M. et al., 2016. Dans le cadre de notre étude, un acide palmitique a été ajouté au C-terminal de la pepducine afin de lui permettre de traverser la membrane plasmique et pour lui rendre plus stable.

3.1.1.1 Ciblage des RCPGs du côté intracellulaire

En opposition avec le courant traditionnel visant à développer des molécules capables d'interagir avec le site orthostérique situé au niveau extracellulaire d'un RCPG, plusieurs approches ont été développées dans les dernières années afin de cibler les RCPGs du côté intracellulaire. Parmi ces approches, on retrouve notamment la conception de petites molécules antagonistes capables de se lier sur le récepteur du côté intracellulaire et pour lesquelles des études cristallographiques ont été réalisées pour caractériser leur site d'interaction (Ahn et al. 2017; Liu et al. 2017; Oswald et al. 2016). Un des exemples qui illustre bien ce concept est l'antagoniste sélectif du CCR9 nommé vercirnon. L'activation du CCR9 par son agoniste, la chimiokine CL25, induit le recrutement des leucocytes au niveau de l'intestin. L'antagoniste sélectif vercirnon, en se liant du côté intracellulaire de CCR9, agit comme un antagoniste allostérique en inhibant l'interaction avec la protéine G_s (Chaturvedi et al. 2018). Une autre approche visant à moduler les RCPG en interagissant avec leurs domaines intracellulaires fait appel à des *nanobodies*, des anticorps de camélidés à chaîne unique qui sont différents des anticorps conventionnels qui sont composés de deux chaînes, lourde et légère (Desmyter et al. 2015). Plusieurs nanobodies, se liant à la surface intracellulaire du récepteur β 2-

AR et dénommé *intrabodies*, ont ainsi été générés après avoir immunisé des lamas avec β 2-AR lié à son agoniste (Pardon et al. 2018). Ces *intrabodies*, générés chez les lamas, ont été exprimés dans le cytoplasme des lignées cellulaires et se sont avérés capables de moduler l'activation des voies de signalisation associées au β 2-AR (Staus et al. 2014). Ces résultats ont ainsi ouvert la porte à des traitements ciblés grâce à la capacité de ces *intrabodies* à stabiliser une conformation unique de β 2-AR, soit active ou inactive, et donc permettre de rediriger la signalisation et le trafic intracellulaire de β 2-AR (Staus et al. 2014). La capacité de ces *intrabodies* à notamment inhiber les voies G_s et β -arrestines du β 2-AR pourrait être due à la stabilisation d'une conformation inactive de β 2-AR ou de la compétition entre ces *intrabodies* et les protéines G_s , GRK et β -arrestines vu que leurs sites d'interactions se chevauchent (Rasmussen, DeVree, et al. 2011; Shukla et al. 2014). Ce dernier mécanisme est le plus probable car même les *intrabodies* qui stabilisent β 2-AR dans une conformation active exercent des effets inhibiteurs sur la voie G_s liée au β 2-AR (Staus et al. 2014; Rasmussen, Choi, et al. 2011). Jusqu'à présent, ce mécanisme, non généralisé pour l'ensemble des RCPGs, dévoile néanmoins une nouvelle approche pour cibler les RCPGs du côté intracellulaire. Le seul défi qui reste à surmonter est la livraison de ces *intrabodies* dans les cellules vivantes. À cet effet, plusieurs technologies ont été mises en place comme le développement de liposomes (Chatin et al. 2015) qui, malgré les résultats intéressants générés, ont encore besoin de beaucoup d'optimisation avant d'entrer en phases cliniques. Une autre méthode pour cibler les RCPGs du côté intracellulaire fait appel aux aptamères. Ces derniers sont des oligonucléotides (ADN ou ARN) qui peuvent être adaptés de façon à reconnaître des interfaces spécifiques sur les RCPGs avec une très grande affinité (Nimjee et al. 2017). Cette reconnaissance spécifique des interfaces internes des RCPGs par les aptamères se fait à travers les structures secondaires et tertiaires de ces derniers (Nimjee et al. 2017). Une bibliothèque d'aptamères a été utilisée pour évaluer la capacité de ceux-ci à lier le récepteur β 2-AR du côté cytoplasmique (Kahsai et al. 2016). Plusieurs de ces aptamères ont montré une capacité de liaison au β 2-AR, et stabilisent la liaison de ce récepteur à son agoniste et sa conformation active. De plus, d'autres aptamères de cette bibliothèque ont démontré une capacité à inhiber l'AMPc via G_s (Kahsai et al. 2016). Ces aptamères pourraient probablement inhiber la liaison des β -arrestines au récepteur considérant que le site de liaison de G_s et β -arrestines se chevauchent (Kahsai et al. 2016). Fait intéressant, la même bibliothèque d'aptamères utilisée avec les β 2-AR a été utilisée avec les β -arrestines pour évaluer leur capacité à lier cette protéine (Kotula et al. 2014). Plusieurs de ces aptamères sont capables de lier β -arrestine 2 purifiée et lient sélectivement

β -arrestine 2 et non β -arrestine 1. De plus, plusieurs de ces aptamères ont également montré une capacité à inhiber les interactions entre β -arrestine 2 et ERK1/2. Ceci pourrait donc offrir la possibilité d'altérer la signalisation distale de β -arrestine 2 (Kotula et al. 2014). L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que cibler les régions intracellulaires d'un RCPG représente une avenue intéressante pour moduler l'activité d'un RCPG.

3.1.2 Actions diverses des pepducines

Depuis la première description de cette technologie, de nombreuses pepducines, avec un large éventail d'activité biologique (agoniste et antagoniste), ont été développées pour différents RCPGs de classes A et C (Tressel et al. 2011; Leger et al. 2006; Grenegard et al. 2008; Kaneider et al. 2005; Remsberg et al. 2007). En interagissant avec le RCPG duquel elles sont dérivées, les pepducines mènent à la stabilisation du récepteur dans différents états conformationnels. Ces derniers pourraient être « *on* » ou « *off* » dépendamment de la nature du récepteur et des conformations qu'il adopte. En d'autres mots, en stabilisant un ou des états conformationnels particuliers, ces pepducines pourraient, par exemple, bloquer l'entrée du récepteur dans son état actif ou encore promouvoir son entrée dans un état inactif, les pepducines agissant alors en tant qu'agonistes ou antagonistes allostériques. (Hofmann et al. 2009).

3.1.2.1 Pepducines agissant comme agonistes allostériques

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses pepducines, dérivées de différentes boucles intracellulaires, ont été décrites pour plusieurs RCPGs, incluant PAR1, PAR2, MC4R, CXCR4, EDG3, β 2-AR et FPR2 (Covic, Gresser, et al. 2002b; Tchernychev et al. 2010a; Licht et al. 2003). Ces dernières sont capables d'activer, comme le ligand endogène du récepteur d'intérêt, différentes voies de signalisation dont $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ agissant alors comme des agonistes allostériques. Le récepteur CXCR4 est l'un des RCPGs qui fut le plus étudié dans le contexte du développement des pepducines. Différentes études ont permis d'aboutir à la conception de ATI-2341, une pepducine dérivée de la première boucle intracellulaire de CXCR4, qui s'est avérée capable d'induire la mobilisation du calcium intracellulaire, d'inhiber l'accumulation de l'AMPc et de promouvoir la chimiotaxie de manière équivalente à l'agoniste endogène, CXCL12 (Figure 14) (Tchernychev et al. 2010a). Autre exemple illustrant ce concept, la pepducine F2pal-16, dérivée de la troisième

boucle intracellulaire du récepteur formyl peptide receptor 2, est capable, tout comme l'agoniste endogène N-Formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), d'induire la mobilisation du calcium intracellulaire tout en favorisant la chimiotaxie et la génération du superoxyde dans des monocytes humains (Lee et al. 2010). Récemment, une étude intéressante a montré un effet très encourageant dans le soulagement de la douleur chez souris (Brouillette et al. 2020) d'une pepducine dérivée de la première boucle intracellulaire (ICL1) du récepteur de type 1 de la neurotensine (NTS1) activant partiellement les voies G_q et G_{13} (Brouillette et al. 2020).

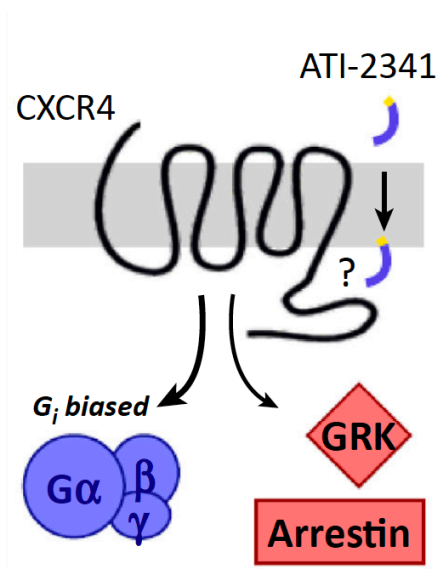


Figure 14. Effet de la pepducine ATI-2341 dérivée des boucles intracellulaires de CXCR4 sur le recrutement de G_i et β -arrestine 2. (Adapté de (Chaturvedi et al. 2018; Quoyer et al. 2013))

3.1.2.2 Pepducines agissant comme des antagonistes allostériques

Par leur capacité à moduler la dynamique et la conformation des RCPGs, les pepducines peuvent également agir comme des antagonistes allostériques en présence du ligand endogène. Il fut ainsi observé que la majorité des pepducines exerçant un effet antagoniste avaient la capacité de bloquer l'activation de certaines protéines G telles que $G\alpha_q$ et $G\alpha_i$. Cependant, toutes les autres voies devraient être évaluées, car elles pourraient révéler de nouveaux effets qui pourraient être très utiles (Sevigny et al. 2011; Kaneider et al. 2005; Remsberg et al. 2007). Il fut notamment démontré que la pepducine P1pal-7, issue de la troisième boucle intracellulaire du récepteur PAR1, inhibe la mobilisation de calcium *via* la voie de $G\alpha_q$ (Covic, Gresser, et al. 2002b) et bloque la migration de cellules tumorales exprimant fortement PAR1 *via* la voie $G\alpha_i$ (Covic, Gresser, et al. 2002b). Cette

pepducine n'a toutefois aucun effet sur les mêmes cellules exprimant de faibles quantités de PAR1 (Agarwal et al. 2008). Jusqu'à présent, peu d'études ont évalué l'influence des pepducines sur l'effet induit par un ligand endogène au niveau extracellulaire.

3.1.3 Mécanisme d'action des pepducines

Les pepducines constituent une toute nouvelle approche pour moduler la signalisation des RCPGs. Les études ont montré que ces dernières entrent dans la cellule en incorporant leur queue lipidique (acide palmitique ou autres) dans la partie extracellulaire de la membrane plasmique puis en traversant ainsi la bicouche lipidique afin d'établir un équilibre entre la partie interne et externe de la membrane lipidique (Figure 15). Ce processus est connu sous le nom d'insertion et inversion. Il est estimé que les pepducines traversent rapidement la membrane plasmique (Covic, Gresser, et al. 2002b; Wielders et al. 2007). Une fois dans la cellule, la queue lipidique s'ancre à la face interne de la membrane plasmique et positionne la pepducine de façon à pouvoir interagir avec la partie cytoplasmique du RCPG. La majorité des pepducines ont été testées seules sans le ligand endogène du récepteur dont elles sont dérivées.

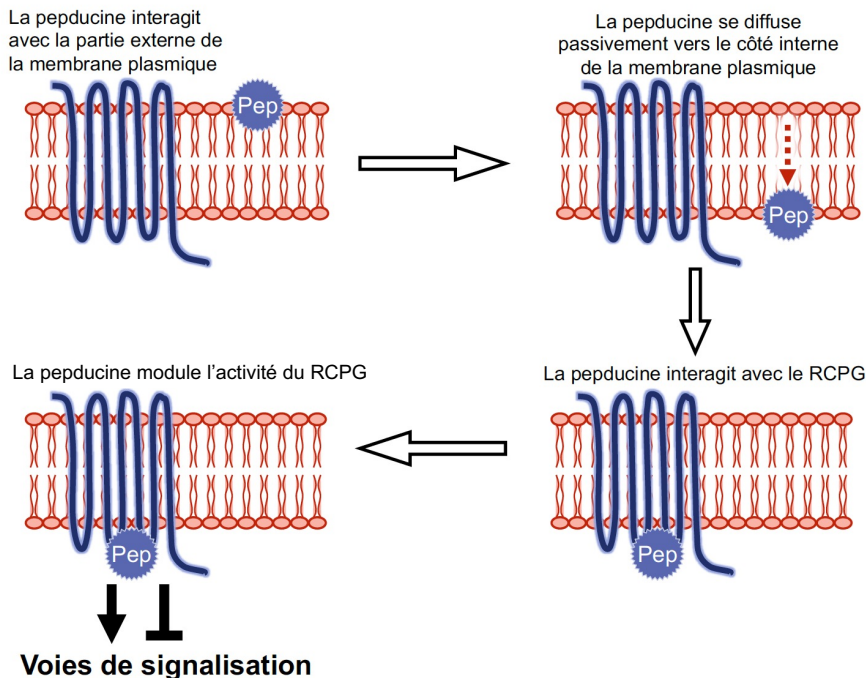


Figure 15. Mécanisme d'action proposé afin qu'une pepducine puisse interagir avec un RCPG pour modifier sa signalisation.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action des pepducines (Figure 16) (Janz et al. 2011). Dans le premier mécanisme, les pepducines agissent comme des antagonistes en rentrant en compétition avec leur segment homologue du récepteur afin de prévenir l'interaction des protéines signalétiques avec le récepteur. Le deuxième mécanisme qui a été proposé consiste en une interaction entre la pepducine et sa région complémentaire au niveau du récepteur (boucle intracellulaire ou domaine transmembranaire) qui va donc stabiliser une conformation active ou inactive du récepteur (Covic, Gresser, et al. 2002a). Le troisième mécanisme suggère que les pepducines affectent la stabilité des homo-hétérodimères formés par le récepteur duquel elles dérivent. Dans ce cas, les pepducines vont perturber les interactions entre les boucles intracellulaires des RCPGs qui participent à la formation des complexes. Par exemple, une pepducine dérivée de la troisième boucle intracellulaire du récepteur PAR4 inhibe la signalisation de PAR1 en déstabilisant l'hétérodimère PAR1/PAR4 (Leger et al. 2006).

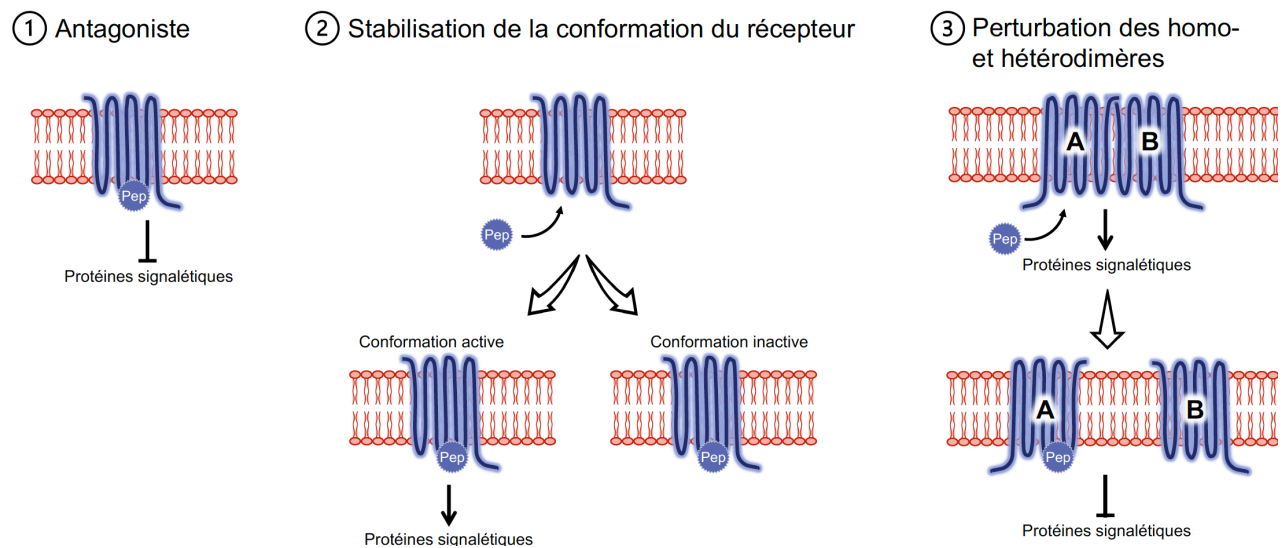


Figure 16. Mécanismes d'actions potentiels des pepducines.

Les pepducines peuvent agir en tant qu'antagonistes (1), stabilisateurs de la conformation du récepteur (2) ou perturbateurs des complexes d'homo- et/ou hétérodimères (3).

3.1.4 Exemples de développement de pepducines

3.1.4.1 ATI-2341: une pepducine de CXCR4 biaisée pour $G\alpha_i$

Le récepteur CXCR4, activé par des chimiokines, est exprimé dans divers tissus incluant les cellules hématopoïétiques et les lymphocytes (Chaturvedi et al. 2018). En marge de ses rôles dans l'embryogenèse et la motilité cellulaire, ce récepteur est connu pour son rôle dans plusieurs maladies tel que le cancer où il promeut le développement de métastases ou encore l'infection au virus d'immunodéficience humaine en contrôlant l'entrée du virus dans les cellules (Busillo and Benovic 2007). ATI-2341 est une pepducine dérivée de l'ICL1 du CXCR4. Cette dernière favorise la mobilisation de différentes cellules telles que les neutrophiles chez des lignées cellulaires provenant de souris et de singes (Tchernychev et al. 2010a). Fait intéressant, la caractérisation de la signature signalétique de ATI-2341 à la suite de l'activation CXCR4 a montré que ce composé était biaisé pour la voie $G\alpha_i$ (Figure 14). Une analyse BRET a ainsi permis de conclure que cette pepducine serait plus efficace que l'agoniste SDF1- α pour recruter $G\alpha_i$ par rapport aux β -arrestines, agissant donc comme un agoniste allostérique biaisé.

3.1.4.2 ICL3-9 : une pepducine de β 2-AR biaisée pour $G\alpha_s$

Le récepteur β 2-AR est un des récepteurs les plus ciblés et étudiés pour son implication dans différentes pathophysiologies dont les maladies cardiovasculaires et les maladies qui touchent les voies aériennes (Chaturvedi et al. 2018). L'asthme est une maladie qui consiste en une inflammation et une hypercontractibilité des muscles lisses des voies aériennes menant à l'obstruction des voies aériennes (Bel 2013). Les agonistes du β 2-AR sont couramment utilisés dans le traitement de l'asthme (Nelson et al. 2006). En stimulant la production de l'AMPc *via* le recrutement de la protéine $G\alpha_s$, ces agonistes favorisent le relâchement des muscles lisses des voies aériennes (Kotlikoff and Kamm 1996). Malgré leur efficacité, l'utilisation à long terme de ces molécules peut engendrer des effets néfastes pour la santé (Nelson et al. 2006). Puisque le rôle délétère des β -arrestines est bien connu dans cette pathologie, des agonistes biaisés pour la voie $G\alpha_s$ ont été considérés pour leur potentiel thérapeutique. Il a été rapporté que les pepducines provenant des trois boucles intracellulaires de β 2-AR étaient biaisées pour la voie de $G\alpha_s$ (Carr et al. 2014). De ces pepducines, ICL3-9 et ICL3-8, issues de la troisième boucle intracellulaire de β 2-AR (Figure 17),

ont montré un biais important pour $G\alpha_s$ et une absence de recrutement des β -arrestines, impliquées dans l'internalisation du récepteur, ou des GRK, impliquées dans la phosphorylation et donc la désensibilisation du récepteur (Figure 18). Ces deux processus, tel que mentionné ci-dessus, sont impliqués dans les effets indésirables observés à long terme suite à l'utilisation des agonistes β -adrénergiques. Évaluées sur des **cellules primaires dans un modèle d'asthme**, ces pepducines favorisent la production d'AMPc suite à l'activation de β_2 -AR mais contrairement aux agonistes classiques tels que l'isopropanol et le sulbatamol, ces dernières n'entraînent aucun recrutement des β -arrestines (Carr and Benovic 2016). Ces pepducines pourraient donc être un bon outil pour comprendre le rôle des β -arrestines dans différentes maladies associées à ce système (DeWire and Violin 2011). D'autres pepducines, provenant de la première boucle de β_2 -AR, ont également montré un comportement biaisé pour les β -arrestines (Carr et al. 2014).

Amino acid sequences from the β_2 AR used for pepducin synthesis

Number	Sequence (ICL1)	Sequence (ICL2)	Sequence (ICL3)
1	LVITAI A KFERLQTVTNY	VIAVD R YFAITS	FVYSRVFQ E AKRQLQKIDKSEGRF
2	LVITAI A KFERLQTVTN	VIAVD R YFAITSPFKY	VYSRVFQ E AKRQLQKIDKSEGRF
3	LVITAI A KFERLQ T	VIAVD R YFAITSPFKYQ S LL	YSRVFQ E AKRQLQKIDKSEGRF
4	VITAI A KFERLQTVTN	VIAVD R YFAITSPFKYQ S LLTKNK	RVFQ E AKRQLQKIDKSEGRF
5	ITAI A KFERLQTVTNYF	VIAVD R YFAITSPFKYQ S LLTKNKARV I	FQ E AKRQLQKIDKSEGRFH
6	ITAI A KFERLQTVTNY	D R YFAITSPFKYQ S LLTKNKARV I	AKRQLQKIDKSEGRFHVQN
7	ITAI A KFERLQTVTN	AITSPFKYQ S LLTKNKARV I	AKRQLQKIDKSEGRFHV
8	ITAI A KFERLQTVTNYFIT	PFKYQ S LLTKNKARV I	LQKIDKSEGRFHV
9	TAI A KFERLQTVTNYFIT	KYQ S LLTKNKARV I	GRFHVQNLSQVEQDGR T -----IG I
10	TAI A KFERLQTVTNYFI	SLLTKNKARV I	FHVQNLSQVEQDGR T -----IG
11	TAI A KFERLQTVTNYF		FHVQNLSQVEQDGR T -----I
12	TAI A KFERLQTVTNY		GHGLRRSSKFCLKEHKALK TIGI
13	AI A KFERLQTVTN		RTGHGLRRSSKFCLKEHKALK TIG
14	IA K FERLQTVTNYFI		DGR T GHGLRRSSKFCLKEHKALK T
15	IA K FERLQTVTN		EQDGR T GHGLRRSSKFCLKEHKAL
16	IA K FERLQTVT		QVEQDGR T GHGLRRSSKFCLKEHK
17	AK F ERLQTVTNYFI		
18	AK F ERLQTVTNYFIT		
19	LVITAI A KFERLQTV		
20	LVITAI A KFERLQTVT		
21	VITAI A KFERLQTVTNYF		
22	ITAI A KFERLQTVTNYFI		
23	LVITAI A KFERLQTVTNYF		
24	VITAI A KFERLQTVTNYFI		
25	LVITAI A KFERLQTVTNYFI		

Figure 17. Séquences des différentes pepducines dérivées du β_2 -AR (Tableau tiré de (Carr et al. 2014)).

Les résidus en rouge sont situés dans les domaines transmembranaires et les résidus en noir sont situés dans les boucles intracellulaires. La ligne pointillée indique les acides aminés sautés de la séquence β_2 -AR. Toutes les pepducines ont été synthétisées avec un palmitate N-terminal et un amide C-terminal.

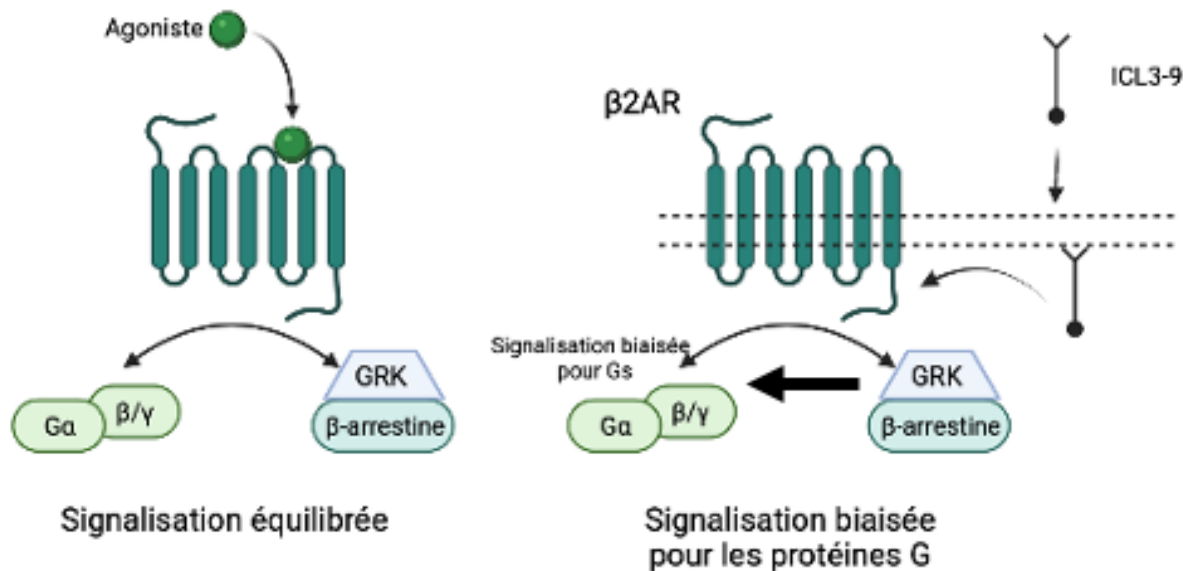


Figure 18. Représentation schématique de l'activité de la pepducine ICL3-9 sur le récepteur β 2-AR. ICL3-9 biaise le signal du récepteur β 2-AR vers la voie Gs.

3.2 Avantages des pepducines et utilisation clinique

3.2.1 Sélectivité et polypharmacologie

En raison de l'homologie de séquences parfois retrouvées au niveau des boucles intracellulaires de différents sous-types d'un même récepteur, il est possible, comme dans le cas des récepteurs aux chimiokines (CCR), que les pepducines développées se lient sur plusieurs récepteurs et produisent des effets similaires. Cependant, il semble que certaines pepducines, en raison de leur homologie de séquence avec des récepteurs distincts, puissent également moduler la fonction de ces derniers. À titre d'exemple, il a été démontré que la pepducine P4pal-10, dérivée de la boucle 3 du récepteur PAR4, peut inhiber l'activation de $G\alpha_q$ à la suite de l'activation de β 2-AR ou CXCR4 sans affecter la stimulation de $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$, respectivement (Carr et al. 2016). Cependant, malgré de fortes homologies de séquences, des antagonistes allostériques intracellulaires 100 fois plus sélectifs pour CXCR2 par rapport à CXCR1 ont pu être développés (Nicholls et al. 2008). En résumé, bien que dérivée des boucles intracellulaires d'un seul RCPG, les pepducines peuvent ou non être sélectives.

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses pepducines ont été développées pour une grande variété des RCPGs (Tableau 5), certaines étant même testées *in vivo*. Par exemple, une pepducine dérivée de l'ICL3 de PAR4 est capable de bloquer *in vivo* la fonction de PAR4,

prolongeant ainsi le temps de saignement chez les souris en empêchant l'activation plaquettaire (Kuliopulos and Covic 2003). Cette pepducine est également capable de protéger contre l'activation plaquettaire systémique et la thrombose (Kuliopulos and Covic 2003). Une autre pepducine (P1pal-7), basée sur la séquence de la première boucle est capable d'inhiber la migration cellulaire dans les lignées cellulaires de cancer du poumon et bloque majoritairement l'angiogenèse observée dans le cancer de l'ovaire (Agarwal et al. 2008), et le cancer du sein (Boire et al. 2005). Cette pepducine, également appelée PZ-128, est un inhibiteur efficace de l'activation de ERK_{1/2} médiée par l'activation de PAR1 et de la croissance tumorale chez les souris (Boire et al. 2005; Schneditz et al. 2019), favorisant ainsi l'apoptose dans les xénogreffes de tumeurs mammaires et inhibant les métastases pulmonaires (Yang et al. 2009). Le PZ-128 a également été étudié comme traitement des maladies cardiovasculaires et du cancer (Covic and Kuliopulos 2018).

Tableau 5 Liste des peptiducines rapportées dans la littérature

Pepducine	Boucle	Cible	Rôle	Références
PZ128 (P1PAL-7)	ICL3	PAR1	Inhibe l'agrégation plaquettaire, les métastases et l'angiogenèse. Efficace dans le traitement du syndrome coronarien aigu	(Gurbel et al. 2016; Cisowski et al. 2011; Zhang et al. 2012; Schneditz et al. 2019; Agarwal et al. 2008; Boire et al. 2005; Covic and Kuliopulos 2018)
P1PAL-12	ICL3	PAR1	Inhibe l'agrégation plaquettaire et la fibrose plaquettaire	(Lin et al. 2014)
P1PAL-12S	ICL3	PAR1	Efficace dans le traitement des fuites vasculaires et de la coagulation intravasculaire	(Kaneider et al. 2007)
P2PAL-18S	ICL3	PAR2	Réduit l'inflammation aiguë	(Sevigny et al. 2011; Michael et al. 2013)
P4PAL-10	ICL3	PAR4 PAR1 FPR2 FFAR2	Inhibe l'agrégation et le dépôt plaquettaire	(Covic, Misra, et al. 2002; Holdfeldt et al. 2020; Carr et al. 2016)
P4PAL-I1	ICL1	PAR4	Inhibe l'agrégation plaquettaire	(Leger et al. 2006)
X1/2PAL-I3	ICL3	CXCR1 CXCR2	Inhibe l'agrégation plaquettaire; Effet positif dans le traitement des patients atteints d'un cancer avancé de la prostate	(Kaneider et al. 2005; Armstrong et al. 2020)
X4PAL-I3	ICL3	CXCR4	Inhibe la réponse des neutrophiles vers SDF-1 α	(Kaneider et al. 2005; Kuliopulos and Covic 2003)
ATI-2341	ICL1	CXCR4	Module la libération de cellules progénitrices de granulocytes/macrophages de la moelle osseuse	(Tchernychev et al. 2010b; Quoyer et al. 2013)

KRX-7	ICL2	S1P3	Induit la vasorelaxation et la prolifération des fibroblastes	(O'Callaghan et al. 2012)
F2PAL-10	ICL3	FRP2	Active les neutrophiles	(Gabl et al. 2014)
F2PAL-16	ICL3	FRP2	Active les neutrophiles	(Winther et al. 2014)
F2PAL-12	ICL3	FRP2	Inhibe les neutrophiles	(Winther et al. 2014)
PP-001	ICL1	NTS1	Stratégies prometteuses dans le soulagement de la douleur.	(Brouillette et al. 2020)

4 L'HÉTÉRODIMÉRISATION

Les RCPGs sont principalement connus pour leur action en tant que monomères. Cependant, au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont démontré que les RCPGs peuvent également exister sous la forme d'oligomère, *i.e.* homodimère et hétérodimère (Bouvier 2001). Contrairement aux homodimères qui sont constitués de deux protomères identiques, les hétérodimères sont pour leur part formés de deux RCPGs distincts, le plus souvent de même classe. La liaison d'une molécule sur le premier protomère va induire un transfert d'information au second protomère *via* des changements conformationnels qui va affecter la liaison ou l'activation du second protomère. Ce phénomène est également connu sous le nom d'allostérie latérale, c'est-à-dire chaque site de liaison de l'hétérodimère module allostériquement l'autre site orthostérique (Bouvier 2001). La majorité des études passées se sont concentrées sur le développement de modulateurs allostériques afin de réguler la liaison et/ou l'activation d'un récepteur suite à son interaction avec son ligand au niveau du site orthostérique du monomère (Ballesteros and Ransom 2006). Cependant, en lien avec le concept d'hétérodimérisation, il est possible d'envisager que la liaison d'un ligand au site orthostérique puisse affecter la liaison et l'activation d'un second ligand sur le second protomère dans le contexte d'un hétérodimère avec un autre récepteur. En s'associant, les deux protomères formant l'hétérodimère créent une nouvelle entité fonctionnelle capable de réguler de manière subtile la signalisation intracellulaire. Par ailleurs, la régiospécificité associée à ces complexes protéiques semblent suggérer un rôle important dans des fonctions biologiques précises (Farran 2017). Par exemple, l'hétérodimère formé par les récepteurs *delta* et *kappa* des opioïdes (DOR et KOR, respectivement) est principalement présent dans les neurones spinaux (Waldhoer et al. 2005).

4.1 Conséquences structurelles et fonctionnelles de l'hétérodimérisation

La co-expression de deux RCPGs menant à leur hétérodimérisation résulte en une nouvelle entité pharmacologique qui peut conserver les sites orthostériques de chacun des protomères (contact par dimérisation) ou former une nouvelle poche de liaison (*domain swapping*) (Waldhoer et al. 2005). Ce concept a été largement étudié avec les récepteurs d'opioïdes. Le modèle de *domain swapping* a été présenté dans une étude montrant que le ligand 6'-GNTI active le signal seulement dans les cellules qui co-expriment les récepteurs DOR et KOR (Waldhoer et al. 2005). Ainsi, la formation d'une nouvelle pochette de liaison ouvre la porte au développement de nouvelles thérapies où cette nouvelle pochette de liaison générée à la suite de l'hétérodimérisation pourrait être ciblée de manière très sélective. Cependant, la formation d'un hétérodimère peut ne pas amener à la formation d'une nouvelle pochette de liaison (Bouvier 2001). Dans ce cas-ci, la particularité provient de la modulation des voies de signalisation associées à chaque protomère voire dans certains cas l'apparition d'une voie spécifiquement associée à l'hétérodimère (Bouvier 2001). Par exemple, la co-expression des deux récepteurs de la dopamine (D1 et D2) entraîne l'activation de la protéine $G\alpha_q$, voie qui n'est pas activée lorsque l'on exprime séparément les deux récepteurs (Rashid et al. 2007). La formation d'un hétérodimère pourrait ainsi promouvoir le recrutement sélectif de certains effecteurs intracellulaires.

L'internalisation des RCPGs permet de maintenir un certain équilibre au niveau du nombre de RCPGs présents au niveau de la membrane. Cette balance peut être affectée à la suite de la formation d'un hétérodimère comparativement à chaque monomère pris séparément. Un des RCPGs qui forment beaucoup d'hétérodimères est AT1R. La formation d'homodimères et d'hétérodimères d'AT1R affecte notamment son internalisation. En ce qui est de ses homodimères, plusieurs études ont suggéré que leur formation augmenterait l'efficacité du ligand AngII ce qui contribuerait à la progression de la maladie d'athérosclérose (AbdAlla et al. 2004). Peu d'études ont comparé l'internalisation d'AT1R seul vs quand il est sous forme dimérique, alors que plusieurs études ont investigué l'internalisation des hétérodimères formés d'AT1R et d'autres RCPGs. Des études ont montré que quand un RCPG difficilement internalisable forme un hétérodimère avec un RCPG facilement internalisable, ils auront un effet opposé l'un sur l'autre au niveau de l'internalisation (Wnorowski and Jozwiak 2014). Par exemple, une étude a montré que le récepteur bradykinine B2 forme un hétérodimère avec AT1R et que la fréquence d'internalisation est élevée si on le compare à la fréquence d'internalisation de bradykinine B2 seul. Cependant, la fréquence d'internalisation

de l'hétérodimère est diminuée si on le compare à la fréquence d'internalisation d'hAT1R (Quitterer and AbdAlla 2014). Aussi, dans cette dernière étude, les souris transgéniques dépourvues de l'hétérodimère du récepteur hAT1R–B2 en raison de la suppression ciblée du gène B2R ont montré une réponse vasopressive par hAT1R significativement réduite par rapport aux souris *wild-type* exprimant les deux récepteurs. D'autres hétérodimères avec hAT1R sont ceux formés entre hAT1R et hAT2R. La stimulation d'hAT1R par ANGII induit la phosphorylation de ERK via PKC et l'internalisation d'AT1R, alors qu'hAT2R en l'absence d'AT1R n'internalise pas même après stimulation par son propre agoniste. Cependant, en présence des deux récepteurs, la stimulation par ANGII d'hAT1R induit la phosphorylation de hAT2R au niveau C-terminale d'AT2R *via* PKC, ce qui amène à l'internalisation concomitante des récepteurs. Ce processus est nécessaire pour l'inhibition médiée par hAT2R de la phosphorylation de ERK par hAT1R. Ces modulations de signal pourraient affecter la signalisation d'hAT1R, y compris les actions vasoconstrictrices induites par AT1R (Inuzuka et al. 2016).

4.2 Exemple d'impacts pharmacologiques associés avec la formation d'hétérodimères : le cas des hétérodimères formés par les récepteurs orexin-1 et cannabinoïdes CB1

En 2006, un nouveau médicament pour le traitement de l'obésité est apparu sur le marché (Padwal and Majumdar 2007). Ce ligand, SR141716A, est un antagoniste/agoniste inverse du récepteur CB1, lequel est impliqué dans la suppression de l'appétit. Malheureusement, ce médicament a été retiré du marché à cause de ses effets secondaires incluant entre autres la dépression et l'anxiété (Bouaboula et al. 1997). Les effets connus sur l'appétit des agonistes des récepteurs CB1 étaient considérés comme suffisants pour justifier l'intérêt de ce récepteur dans le traitement de l'obésité (Padwal and Majumdar 2007). Cependant, ce récepteur est souvent co-exprimé dans le cerveau avec le récepteur de l'orexin-1, lui aussi impliqué dans le comportement alimentaire. Il fut ainsi démontré que lorsque ces deux RCPGs sont co-exprimés dans des cellules CHO, la puissance de l'agoniste orexine A à induire la phosphorylation d'ERK_{1/2} était 100 fois plus élevée que dans les cellules qui exprimaient uniquement le récepteur orexin-1 (Hilairret et al. 2003). De plus, le traitement des cellules co-exprimant les deux récepteurs avec SR141716A, un antagoniste CB1, entraîne une réduction de la puissance de l'orexine A à des niveaux semblables à ceux observés dans les cellules n'exprimant que le récepteur orexine-1 (Hilairret et al. 2003).

Contrairement à l'augmentation de la phosphorylation des voies des MAPK par l'orexine A, la production d'inositol phosphate n'est pas modifiée en présence ou en absence de CB1 lorsque les récepteurs sont co-exprimés (Hilairt et al. 2003). En absence de CB1, le récepteur orexin-1 est majoritairement présent à la surface. En revanche, lorsque CB1 est également exprimé, les résultats ont montré que la moitié des récepteurs orexin-1 se retrouve avec le CB1 dans les endosomes. Le traitement de l'hétérodimère avec des antagonistes, SR141716A de CB1 ou SB-674042 d'orexin-1, redistribue les deux récepteurs vers la membrane plasmique (Hilairt et al. 2003). Présentement, la majorité des recherches essayent de développer de nouvelles molécules qui ciblent CB1 au niveau périphérique car ils préservent leur effet bénéfique plutôt que dans SNC. C'est le cas de l'antagoniste TM38837 de CB1 où le ciblage de ce récepteur dans le SNC a montré des effets psychopathologiques. De nouvelles molécules, comme l'agoniste ART27.13 qui permet un gain de poids dans certains cancers et les antagonistes INV-101 et TM38837 qui sont impliqués dans le contrôle du métabolisme du corps, sont présentement en phase I et II clinique. Finalement, l'existence de tels complexes soulève la possibilité d'interactions synergiques entre différents agonistes/antagonistes ciblant deux protomères distincts d'un hétérodimère qui pourraient aboutir à des interactions médicamenteuses provoquant des effets secondaires ou l'inhibition de l'effet souhaité dans un contexte clinique.

4.3 *Hub concept* : Exemple du récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R)

4.3.1 Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine connu sous l'abréviation RAS (*renin-angiotensin system*) est un système hormonal impliqué dans la régulation du volume sanguin et l'homéostasie de la pression artérielle. Ce dernier est ainsi d'une importance cruciale dans la régulation physiologique du système cardiovasculaire et dans la pathogenèse de diverses maladies cardiovasculaires et rénales. De manière générale, RAS agit en activant une cascade d'enzymes catalytiques censées cliver des pro-hormones circulant dans le sang afin de générer un octapeptide connu sous le nom AngII. L'activité de ce système est ainsi contrôlée par des cellules spécialisées granuleuses juxtaglomérulaires au niveau du foie qui ont la capacité à synthétiser, stocker et sécréter la rénine, une enzyme impliquée dans la régulation de la pression artérielle (Persson 2003; Schnermann and Briggs 2013). Certains stimuli, comme la réduction de débit sanguin rénal dû à l'insuffisance

cardiaque ou l'hypotension, augmentent la sécrétion de rénine ce qui va provoquer une chute de la concentration de sodium et de chlorure ainsi qu'une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique qui mène quant à lui à une augmentation de la stimulation du système β 1-adrénergique (Schweda et al. 2007). Suite à sa sécrétion, la rénine clive la pro-hormone angiotensinogène en un décapeptide (AngI) qui va être ensuite clivé une fois de plus par une autre enzyme, l'enzyme de conversion d'angiotensine (ACE; fortement exprimé dans l'endothélium des poumons), pour générer AngII (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH) (Sparks et al. 2014). Ce dernier est associé à de nombreux processus physiologiques *via* son interaction avec le récepteur AT1R et la stimulation de nombreuses voies de signalisation (Figure 19) (Sparks et al. 2014). L'AngII stimule entre autres la vasoconstriction, l'activité du système nerveux sympathique, la sécrétion d'aldostérone, la rétention de sodium et la pression artérielle systémique (Bader 2010). D'autre part, il est bien connu qu'une dérégulation de RAS est généralement associée à des problèmes d'hypertension, d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou encore de maladie rénale chronique (Hussain and Awan 2018; Hamrahian and Falkner 2017). À la lumière de cette dérégulation, l'inhibition pharmacologique d'ACE ou de AT1R a été établie comme une stratégie très prometteuse pour traiter ces pathologies. Dans ce contexte, des antagonistes de AT1R tels que le candesartan, le losartan et le valsartan ont été développés afin de bloquer sélectivement l'action d'AngII. Un nouveau concept qui était proposé pour les GRK et en conséquence pour les RCPGs en tant que des *hub signaling*. Puisqu'il existe des centaines de RCPGs et seulement cinq GRKs, chaque GRK doit être capable de phosphoryler de nombreux récepteurs différents, devenant ainsi d'importants centres de signalisation. Ces centres de signalisations pourraient aussi être concentrer lorsqu'un RCPG s'associe avec un autre RCPG pour former ce qu'on appelle un *hub signaling*. HAT1R est un des RCPGs qui est connu de former le plus des complexes avec d'autres RCPGs au niveau cardiaque comme le montre le tableau 6. La formation des hétérodimères concentrera plus les protéines de signalisation au niveau de l'hétérodimère, donnant ainsi naissance à une nouvelle signalisation.

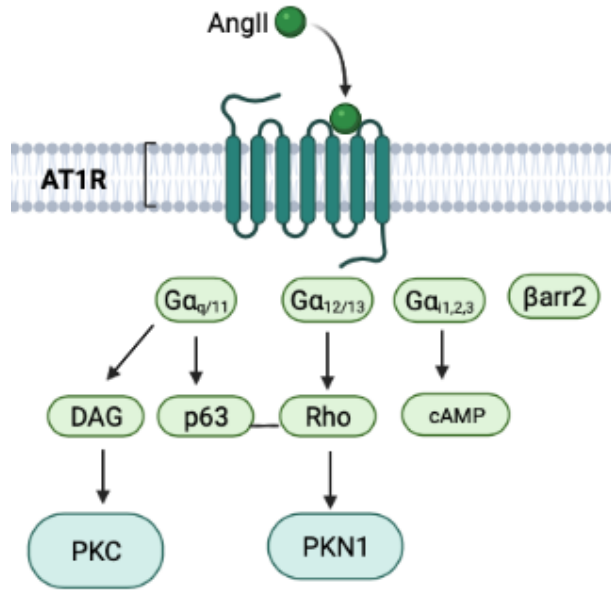


Figure 19. Voies de signalisation activées par AT1R.

La stimulation d'AT1R par AngII active différentes voies de signalisation dont plusieurs voies associées aux protéines G et β 2-arrestines.

4.3.2 Signalisation d'AT1R:

À la suite de la liaison de AngII sur AT1R, un large spectre de seconds messagers, incluant les protéines G, des tyrosines kinases cytoplasmique, les β -arrestines et des facteurs de croissance sont activés (Figure 19). Au cours des dernières années, les voies associées à l'activation des protéines G ont été liées à la grande majorité des effets cellulaires générés suite à l'activation d'AT1R (Hunyady and Catt 2006). La stimulation de AT1R par AngII est ainsi capable de stimuler $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ et $G\alpha_{12/13}$ (Sauliere et al. 2012). La protéine $G\alpha_q$ produit ensuite de l' IP_3 et du DAG, en activant le PLC. Ces derniers mènent à une élévation de la concentration intracellulaire de calcium, qui en synergie avec DAG, va mener à l'activation de PKC (Hunyady and Catt 2006). La signalisation associée à l'activation de $G\alpha_{11/q}$ est responsable de la majorité des effets physiologiques du système angiotensinergique au niveau des différents organes dont les reins et le cœur (Karnik et al. 2015). Enfin, l'activation des protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_{12/13}$ mène à l'inhibition de l'AC ainsi qu'à l'activation de la phospholipase D et des RhoGTPases/kinases. À la suite de cette première vague d'activation par les protéines G, AT1R subit une série de phosphorylation au niveau de sa queue C-terminale par diverses GRKs ou PKCs afin de désensibiliser, *via* le recrutement des β -arrestines et l'internalisation de AT1R, le système. Notamment, la phosphorylation en C-terminal d'AT1R par

GRK2/3 ou GRK5/6 génère un « code barre » spécifique à AT1R (Kim et al. 2005; Zimmerman et al. 2012). Ce « code barre » de phosphorylation affecte la conformation des β -arrestines recrutées suite à l'activation d'AT1R. Cette capacité des β -arrestines à reconnaître différents patrons de phosphorylation démontre leur plasticité conformationnelle, une capacité qui n'est pas retrouvée chez d'autres protéines (Peterson and Luttrell 2017). De façon intéressante, le domaine C-terminal d'AT1R contient des séquences consensus qui sont des sites potentiels de phosphorylation par la PKC (Hunyady et al. 1994). En effet, il a été montré que l'activation de la PKC avec du phorbol-ester entraîne un recrutement de la β -arrestine 2 au niveau de AT1R en absence d'une activation par son ligand endogène. Ce mécanisme est aussi connu sous le nom de désensibilisation hétérologue.

4.3.3 Rôle de la transduction du signal liée à AT1R dans la physiopathologie cardiovasculaire

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont démontré le rôle des protéines G associées à l'activation de AT1R dans la pathogenèse de diverses maladies cardiovasculaires et rénales. Cependant, en marge de ces dernières, d'autres voies indépendantes des protéines G ont également été liées à l'activation de AT1R telles que la production de ROS, l'activation des tyrosines kinases ou encore la transactivation du récepteur EGFR (Kawai et al. 2017). Au travers de nombreuses études, il a été clairement démontré que la régulation de la pression artérielle était associée à la stimulation de la protéine $G\alpha_{q/11}$ par AT1R. L'activation de cette protéine G active la PLC- β ce qui provoque la génération de seconds messagers, *i.e.* IP₃ et DAG, et l'activation de PKC (Figure 18) (Oriji and Keiser 1997). Les IP₃ vont alors induire le relâchement du calcium stocké dans la mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique des cellules vasculaires lisses (VSMC, *vascular smooth muscle cells*) provoquant ainsi, après liaison du calcium sur la calmoduline, l'activation de la *myosin light chain kinase* (MLCK). La phosphorylation de MLC par la MLCK entraîne alors la vasoconstriction (Kuo and Ehrlich 2015). En condition pathologique, l'activation prolongée d'AT1R joue ainsi un rôle important dans l'hypertension artérielle. En plus de coupler $G\alpha_{q/11}$, AT1R peut aussi activer $G\alpha_{12/13}$ qui stimule à son tour la voie des Rho kinases (Figure 18) (Ushio-Fukai et al. 1998; Carbone et al. 2015). En plus de la voie $G\alpha_{q/11}$ impliquant le calcium, l'inhibition de l'activité du *myosin light chain phosphatase* (MLCP) par Rho à la suite de l'activation de AT1R et de $G\alpha_{12/13}$ contribue à la contraction et la contractilité des VSMC (Wang et al. 2009). Enfin, $G\alpha_{i/o}$

est également activée suite à la liaison de AngII sur AT1R dans quelques tissus tel que le foie et les reins (de Gasparo et al. 2000).

D'autres effecteurs, tels que les NADPH oxydases (NOX1, NOX2) vasculaires, sont associés à des effets pathologiques d'AT1R *via* la génération de ROS (Zafari et al. 1998; Griendling, Sorescu, and Ushio-Fukai 2000). L'activation de ces oxydases par AngII génère du superoxyde d'oxygène (Griendling, Sorescu, and Ushio-Fukai 2000) qui est ensuite converti en peroxyde d'oxygène favorisant ainsi l'apparition d'un stress oxydatif qui va endommager les cellules vasculaires. Par ailleurs, le relâchement du calcium dans le cytoplasme à la suite de l'activation de AT1R peut directement stimuler une autre NADPH oxydase (NOX5) provoquant une fois de plus un stress oxydatif (Dikalov and Nazarewicz 2013). Par conséquent, la production de ROS *via* l'activation de AT1R module le niveau du stress oxydatif amenant ainsi au dysfonctionnement mitochondrial (De Cavanagh et al. 2005) et à l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales par la voie des caspases (Dimmeler and Zeiher 2000). De plus, à travers l'activation de PKC par AT1R, la protéine Src peut être activée, cette dernière amplifiant le signal associé à l'activité oxydase de NADPH (Touyz, Yao, and Schiffrin 2003). Pour finir, une autre protéine signalétique qui est affecté par AngII à la suite du stress oxydatif est le facteur de transcription NFkB. Ce facteur de transcription, activé par des niveaux élevés du stress oxydatif, active l'expression de plusieurs gènes dont les molécules d'adhésion vasculaires et intracellulaire (VCAM-1 et ICAM-1) (Pueyo et al. 2000; Pastore et al. 1999). Ces molécules d'adhésion permettent le recrutement des monocytes de la circulation sanguine vers l'endothélium, une étape clé dans le développement de l'athérogenèse. De plus, l'interaction d'AngII avec AT1R stimule la sécrétion de cytokines, tel que le TNF- α , par les cellules endothéliales attirant ainsi les leucocytes pour induire une réponse inflammatoire et favorisant l'apoptose des vaisseaux sanguins en activant des voies apoptotiques extrinsèques (Li et al. 1999).

4.3.3.1 Rôle des β -arrestines en lien avec AT1R dans les pathologies

Dans le cœur, les ligands qui activent certains RCPGs dont l'AT1R, β 2R et UT exercent des effets cardioprotecteurs *via* l'activation des β -arrestines (Kim et al. 2012; Noma et al. 2007; Esposito et al. 2011). Wang Y. et al. 2017 ont montré que les β -arrestines 2 sont surexprimées dans le cas de la reperfusion ischémique et le stress oxydatif et participe donc à la pathogenèse de la mort des

cardiomyocytes et des lésions myocardiques (Wang et al. 2017). De plus, la surexpression de β -arrestine 2 est assez pour déclencher la mort cellulaire des myocytes (Wang et al. 2017). La surexpression de la β -arrestine 2 favorise les lésions myocardiques dues la réperfusion ischémique dans un modèle de souris transgéniques (Wang et al. 2017). Finalement, ils ont été démontrés que la délétion de β -arrestine 2 protège le cœur contre les lésions induites par l'ischémie/reperfusion (Wang et al. 2017). En conséquent, les β -arrestines peuvent médier plusieurs effets d'AT1R comme l'hypertrophie cardiaque et la prolifération des cardiomyocytes (Zhai et al. 2005; Aplin et al. 2007a, 2007b).

4.3.4 Signal biaisé d'AT1R:

Différentes études ont suggéré l'existence de plusieurs conformations pour le récepteur AT1R. De ces conformations, on trouve des conformations qui couplent AT1R à ses voies de signalisation, d'autres conformations engagent AT1R dans la phosphorylation ou l'internalisation (Thomas et al. 2000). La transition du récepteur AT1R entre ces différentes conformations peut être induite ou stabilisée par des interactions spécifiques entre certaines chaînes latérales de l'AngII et AT1R conférant ainsi une liaison de haute affinité et une capacité de signalisation via IP₃ (Feng et al. 1995). Cela a mené les chercheurs à se poser la question suivante : est-ce que l'établissement de points de contacts spécifiques entre AngII et AT1R induit ou stabilise des états conformationnels spécifiques qui dictent le comportement du récepteur tel que son internalisation, sa phosphorylation et l'activation de MAPK? Ainsi, au cours de la dernière décennie, plusieurs ligands biaisés pour les β -arrestines ont été développés pour AT1R (Holloway et al. 2002). Il fut ainsi observé que la modification du résidu en position 8 par des groupements non-aromatiques engendrait des analogues (TRV120027 et TRV120023) incapables d'activer efficacement les protéines G. Ces ligands biaisés, en plus d'activer sélectivement les β -arrestines, affectent également le trafic intracellulaire d'AT1R en modulant l'affinité de liaison des β -arrestines pour AT1R et donc la vitesse d'internalisation de ce dernier (Bian et al. 2018). Ceci pourrait être en partie dû au fait que ces ligands biaisés activant les β -arrestines sont incapable d'activer G α_q et donc incapable d'activer la PLC β en raison d'un manque d'hydrolyse de PtdIns(4,5)P₂ dans la membrane plasmique (Szakadati et al. 2015). Malheureusement, ces ligands biaisés n'ont pas pu traverser la phase II clinique. Effectivement, malgré leurs effets bénéfiques dans le traitement sur la performance cardiaque (Kim et al. 2012),

l'utilisation de ces ligands semblent malgré tout être liée à une surproduction d'aldostérone *via* un mécanisme dépendant des β -arrestines suite à l'activation de AT1R (Lympopoulos et al. 2009).

4.3.5 Les partenaires d'AT1R

Il est maintenant bien établi que le récepteur AT1R est capable de former des hétérodimères avec d'autres RCPGs impliqués dans le contrôle de la fonction cardiovasculaire (Tableau 6). Plusieurs de ces hétérodimères sont incapables d'activer les protéines G et/ou les β -arrestines. À ce jour, plusieurs études ont montré que l'homodimérisation exerce un effet allostérique négatif à AT1R en inhibant la liaison des protéines G à l'homodimère (Karip et al. 2007; Szalai et al. 2012). Par ailleurs, des exigences structurelles ont été proposées pour la formation d'homodimère d'AT1R. En effet, des résultats ont montré l'importance des acides aminés hydrophobes qui se trouvent dans les domaines transmembranaires d'AT1R dans l'assemblage homodimérique d'AT1R (Young et al. 2017). De même, l'hétérodimère formé par AT1R et le récepteur α_2 c-adrénergique, où ce dernier est couplé principalement à la protéine $G_{\alpha_{i/o}}$ et où AT1R est couplé à la protéine G_{α_q} , a montré l'apparition d'une nouvelle voie activée à la suite de l'hétérodimérisation, soit la voie de G_{α_s} /AMPc (Bellot et al. 2015). De plus, l'hétérodimérisation d'AT1R avec β_2 -AR a montré que les protomères de l'hétérodimères se trans-inhibent d'une façon réciproque, un antagoniste d'AT1R ou de β_2 -AR pouvant inhiber la signalisation de l'hétérodimère (Barki-Harrington, Luttrell, and Rockman 2003). La liaison des β -arrestines à cet hétérodimère est aussi influencée (Toth et al. 2017). Notamment, la liaison d'un agoniste β_2 -AR favorise le recrutement des β -arrestines alors que l'activation de AT1R par un agoniste ne modifie pas leur recrutement (Toth et al. 2017).

Tableau 6. RCPGs publiés qui forment des complexes /hétérodimères avec AT1R.

Récepteurs formant un complexe avec AT1R	Références
Adiponectine	(Zha et al. 2017)
α 2c-adrenergique	(Bellot et al. 2015)
Apelin	(Siddiquee et al. 2013)
β 2-AR	(Barki-Harrington, Luttrell, and Rockman 2003)
Bradykinine β ₂	(AbdAlla, Lothar, and Qwitterer 2000)
CB1 cannabinoïde	(Rozenfeld et al. 2011)
Chimiokines (C-C motif)	(Ayoub et al. 2015)
Prostaglandine F ₂ α	(Goupil et al. 2015)
Purinergique P2Y ₆	(Nishimura et al. 2016)

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les maladies cardiovasculaires (MCV) affectent énormément l'économie des soins de santé au niveau mondial. Malgré des investissements importants dans le développement de nouveaux médicaments, l'établissement de procédures chirurgicales améliorées ou encore un diagnostic plus précoce, l'accès à de nouvelles thérapies innovantes, plus efficaces et avec moins d'effets secondaires est limité par le manque de compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'homéostasie des cellules cardiaques. Bien que les systèmes β -adrénergique et angiotensinergique aient été étudiés avec succès pour des interventions thérapeutiques, de nombreux autres récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) restent encore à exploiter pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Le système urotensinergique, composé d'un RCPG (UT) et de deux ligands peptidiques endogènes (UII; hUII = H-Glu-Thr-Pro-Asp-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH et URP, H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH), est actuellement considéré comme une cible prometteuse pour le traitement de diverses pathologies. Bien que plusieurs études chez les animaux aient démontré l'utilité d'antagonistes d'UT comme agents thérapeutiques potentiels, les essais cliniques chez l'humain ont eu un succès limité pour le moment en raison de la pharmacologie de ce système complexe et majoritairement inconnue. Notamment, en raison de leurs activités biologiques communes mais également divergentes, UII et URP, bien que partageant la même séquence bioactive, sont probablement capables de stabiliser différentes sous-populations UT générant ainsi des profils signalétiques différents. Par conséquent, une mauvaise signalisation d'UT à la suite de son activation par UII et/ou URP pourrait être impliquée dans la pathogenèse et la progression des MCV à l'instar du système angiotensinergique dans l'insuffisance cardiaque aigue. Il apparaît donc important de développer des outils ou nouvelles approches permettant de contrôler/réguler la signalisation de UT. Dans le cadre de mon projet de recherche, nous avons émis comme première hypothèse que des ligands dérivés des boucles intracellulaires de UT pourraient, en stabilisant le récepteur dans un état conformationnel bien particulier, biaiser son signal et ainsi offrir une nouvelle façon de moduler son activité biologique. Notre seconde hypothèse repose sur la capacité d'UT à former un hétérodimère avec AT1R ce qui pourrait permettre de rediriger sa signalisation de manière indirecte en agissant sur AT1R. Pour répondre à ces deux hypothèses, nous avons 1) synthétisé deux peptides dérivés des boucles intracellulaires 2 et 3 de UT et étudié leurs capacités à activer/bloquer les voies de signalisation et certaines fonctions biologiques associées

avec l'activation de UT et 2) démontré et caractérisé au niveau cellulaire et moléculaire l'interaction de UT avec le récepteur AT1R de l'angiotensine et comment cette interaction module leur signalisation respective. L'objectif de notre recherche est de mieux comprendre la pharmacologie cellulaire et moléculaire du système urotensinergique et d'intégrer ces résultats à la conception de ligands améliorés, conçus pour offrir un bénéfice clinique. Par ailleurs, le récepteur AT1R étant une cible déjà éprouvée en clinique et pour lequel une recherche intense est effectuée autour de la conception de ligands biaisés, nos travaux pourraient également offrir une avenue innovante pour biaiser le signal de ce récepteur à des fins thérapeutiques en utilisant des ligands ciblant UT.

PREMIER ARTICLE

5

LIPIDATED PEPTIDES DERIVED FROM INTRACELLULAR LOOPS 2 AND 3 OF THE UROTENSIN II RECEPTOR ACT AS BIASED ALLOSTERIC LIGANDS

Les peptides lipidés dérivés des boucles intracellulaires 2 et 3 du récepteur de l'urotensine II agissent comme des ligands allostériques biaisés

Auteurs :

Hassan Nassour^{1,†}, Tuan Anh Hoang^{1,†}, Ryan D. Martin², Juliana C. C. Dallagnol^{1,2,3}, Étienne Billard^{1,2}, Myriam Létourneau¹, Ettore Novellino⁴, Alfonso Carotenuto⁴, Bruce G. Allen³, Jason C. Tanny², Alain Fournier¹, Terence E. Hébert², and David Chatenet¹

Affiliations professionnelles :

- ¹ Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, Québec, Canada
- ² Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, Canada
- ³ Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal Heart Institute, Montréal, Québec, Canada
- ⁴ Department of Pharmacy, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

Contributions : Dans cet article, j'ai réalisé toutes les expériences de BRET, les expériences sur les aortes, la totalité des expériences de western blot impliquant l'inhibiteur YM, les expériences de microscopie confocale et les analyses de prolifération en collaboration avec le laboratoire de Terry Hébert.

Titre de la revue ou de l'ouvrage Journal of Biological Chemistry Septembre 2021

doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101057

5.1 ABSTRACT

Over the last decade, the urotensineric system has garnered significant attention as a promising new target for the treatment of various cardiovascular diseases as well as cancer. Significant investment toward development of clinically relevant UT ligands for therapeutic intervention has been made, but with little or no success to date. The human UT (hUTR) system therefore remains to be therapeutically exploited. The discovery of allosteric sites that facilitate modulation of receptor activity will increase the searchable chemical space against this disease-relevant target. Pepducins and other lipidated peptides have been used as both mechanistic probes and potential therapeutics. Therefore, pepducins derived from the human urotensin II receptor might represent unique tools to generate signaling bias and study UT signaling networks. Two hUTR-derived pepducins, derived from the second and the third intracellular loop of the receptor, respectively, have been synthesized and pharmacologically characterized. Our results demonstrated that hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 acted as biased ago-allosteric modulators, triggered ERK_{1/2} phosphorylation and to a lesser extent, IP₁ production, stimulated cell proliferation yet were devoid of contractile activity. Interestingly, both hUT-derived pepducins were able to modulate hUII- and URP-mediated contraction albeit to different extents. These new derivatives represent unique tools to reveal the intricacies of hUTR signaling and a novel avenue to design allosteric ligands selectively targeting UT signaling potentially useful for the treatment of hUTR-associated diseases.

5.2 INTRODUCTION

In humans, the urotensinergetic system, composed of a class 1A G protein-coupled receptor (GPCR, hUTR), and two endogenous peptide ligands, urotensin II (UII; hUII = H-Glu-Thr-Pro-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH) and urotensin II-related peptide (URP, H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH), continues to represent a promising target for the treatment of several pathologies (Vaudry et al. 2015; Nassour, Iddir, and Chatenet 2019). Notably, multiple studies in animal models have suggested that UT antagonists may represent potential therapeutic agents for treating atherosclerosis (Watson et al. 2013; You et al. 2012; Zhao et al. 2014; Zhao et al. 2013), pulmonary arterial hypertension (Lee et al. 2016; Pehlivan et al. 2014; Wang et al. 2019), metabolic syndrome (You et al. 2012), and heart failure (Bousette, Hu, et al. 2006; Bousette, Pottinger, et al. 2006; Oh et al. 2017). However, in spite of such promise, clinical studies of UT candidate antagonists have had limited success due to a lack of efficacy in humans (Billard et al. 2018; Kim et al. 2010; Vaudry et al. 2015; Nassour, Iddir, and Chatenet 2019). Our current knowledge remains insufficient to clearly assess therapeutic potential and accordingly, a deeper understanding of UT pharmacology is critically needed to accelerate development of UT ligands exhibiting efficacy in humans.

While the two endogenous ligands share a common bioactive core, the distinct N-terminal domain of UII isoforms appears to be involved in specific topological changes associated with UT activation (Brancaccio et al. 2015; Merlino et al. 2019; Nassour, Iddir, and Chatenet 2019; Chatenet et al. 2013). Contingent on their interactions with UT, UII and URP probably induce distinct UT conformational changes that lead to divergent signaling profiles with both common and distinct biological activities (Chatenet et al. 2012; Doan et al. 2012; Jarry et al. 2010; Nassour, Iddir, and Chatenet 2019; Prosser et al. 2008; Chatenet et al. 2013). Recent years have witnessed the emergence of useful molecules, with probe-dependent actions, that could shed light on the respective roles and importance of UII and URP under normal and pathological conditions (Billard, Hebert, and Chatenet 2018; Billard et al. 2018; Billard et al. 2017; Chatenet et al. 2013; Chatenet et al. 2012; Douchez et al. 2017; Dufour-Gallant, Chatenet, and Lubell 2015; Merlino et al. 2016; Strack et al. 2017).

Promoting specific GPCR signaling events with biased agonists or allosteric modulators is a potentially innovative way to treat numerous conditions including cardiovascular disease, diabetes as well as neuropsychiatric/ neurodegenerative disorders (Kenakin 2012). Hence, this notion has

been introduced into various drug discovery programs through theoretical predictions based on known signaling components of cells and from studies in knockout animals (reviewed in (Kenakin 2011)). However, there are numerous instances where it is still not yet possible to predict what type of signaling bias represents a superior therapeutic approach. In these cases, empirical testing of exemplar molecules in animal models is a way forward. Such tools are currently unavailable in the context of the urotensinergic system.

Pepducins are lipidated cell-penetrating peptides composed of a lipid moiety attached to a peptide corresponding to an amino acid segment from one of the cytoplasmic loops of a GPCR of interest (reviewed in (Chaturvedi et al. 2018; Dimond et al. 2011)). Following establishment of an equilibrium between the inner and outer leaflets of the lipid bilayer, pepducins interact with their cognate GPCR leading to stabilization of a restricted subset of its inactive and active conformational states (Carlson, McMurry, and Hunt 2012; Covic, Gresser, et al. 2002b; Covic, Misra, et al. 2002). Hence, such compounds can function as allosteric agonists or positive/negative allosteric modulators, making them useful for the study of GPCR signaling, as reported for protease-activated receptors (Covic, Gresser, et al. 2002b; Covic, Misra, et al. 2002), chemokine receptors (Kaneider et al. 2005; Quoyer et al. 2013), and β -adrenergic receptors (Carr et al. 2014), as well as for the potential treatment of various diseases including inflammatory diseases, cardiovascular pathologies, and cancer (Tressel et al. 2011).

Here, we describe the design and pharmacological characterization of two pepducins derived from the second (hUT-Pep2) and third ([Trp¹, Leu²]hUT-Pep3) intracellular loops of hUT. Our results demonstrate that both hUT-derived pepducins, while non cytotoxic, mediate ERK_{1/2} phosphorylation and IP₁ accumulation. Using BRET-based biosensors, we observed that [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 induced G_q, G_i, G₁₃, β -arrestin 1, β -arrestin 2 activation, and epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation while UT-Pep2 only activated G_i, G₁₃, β -arrestin-2 and EGFR transactivation. Interestingly, while only [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 was able to induce proliferation in HEK 293-hUT cells, both pepducins were able to cause proliferation of neonatal rat cardiac fibroblasts. Further, while both hUT-derived pepducins were unable to induce rat aortic ring contraction on their own, they could modulate hUII- and URP-mediated contraction to different extents. These new molecular tools represent unique UT-targeted ligands that can be used to interrogate the involvement of specific pathways in hUT-associated diseases and to develop

pharmacological agents with fewer side effects and a unique and more precise action for the treatment of various pathologies.

5.3 RESULTS

Design and toxicity testing of hUT-derived pepducins

Pepducins are composed of a synthetic peptide, mimicking an intracellular GPCR loop, to which a hydrophobic moiety, most commonly the fully saturated C₁₆ fatty acid palmitate, is conjugated at their N-termini (O'Callaghan, Kuliopulos, and Covic 2012). Based on a predicted structure for hUT (Brancaccio et al. 2015; Kim et al. 2010), pepducins derived from the sequence of hUT intracellular loops 2 and 3 (Table 1) were synthesized using solid phase peptide synthesis. hUT-Pep2 is identical to the ICL2 sequence found in hUT. The second pepducin ([Trp¹, Leu²]hUT-Pep3) comprises the hUT ICL3 sequence; however, the first two N-terminal amino acids were replaced by the corresponding residues from rat UT ICL3 (-Arg-Arg- in hUT and -Trp-Leu- in rUT). This modification was necessary since the pepducin derived from hUT ICL3, comprising 7 positively charged residues, was highly cytotoxic from 10⁻⁷M, which prevented further use (Figure 1A). Nonetheless, hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, up to 10⁻⁵ M, did not significantly affect HEK 293 cell viability (Figure 1A). However, at 10⁻⁴M, both derivatives were as cytotoxic as unmodified hUT-Pep3 at 10⁻⁷M. Since these derivatives translocate to the inner leaflet of the plasma membrane, we tested the possibility that they promoted LDH release into the culture media. As shown in Figure 1B, none of these compounds, tested at the highest concentration that did not lead to cell death, triggered LDH release. Altogether, our results demonstrated that both pepducins did not reduce cell viability at the concentrations used. Similar results were obtained in a second stably transfected CHO-hUT cell line (data not shown).

hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 conserve a structure similar to as seen in the full-length receptor

Conformational analysis of hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 was performed using solution NMR in DPC micelle suspensions, a solvent system commonly used in NMR and CD studies to mimic the zwitterionic membrane environment (Saviello et al. 2010). Figures of the NOESY spectra of hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 are shown in the supporting information (Figure S1 and S2). hUT-Pep2 yielded well-resolved NMR spectra and measured NMR parameters indicated a folded structure (Tables S1 and S2). Medium-range Nuclear Overhauser effects (NOEs, Table S2) between H α (i) and HN(i+2) pointed to β -turn structures confirmed by other diagnostic parameters, such as amide temperature coefficients and ³J_{HN-HA} coupling constants. The palmitate

moiety turned out to be mostly unstructured, as could be inferred by the degeneracy of the proton chemical shifts of almost all the methylene groups. However, the amide bond connecting palmitate and peptide is in *trans* configuration as suggested by the intense NOE contact between the C α protons of the palmitate and NH of Arg¹. Actually, 135 NOEs (Table S2) were used in the structure calculation of hUT-Pep2, which corresponds to 11.2 NOEs per residue, a ratio similar to what is found in structured protein (Doreleijers, Rullmann, and Kaptein 1998). Among those, 22 medium range NOEs in line with folded (β -turn) peptides were observed. Restrained MD calculations provided the well-defined structures shown in Figure 2A. Starting from the N-terminus, two type I β -turns along residues 1-4 and 3-6, and three distorted (type IV) β -turns along residues 4-7, 5-8 and 6-9 can be observed in the simulated structures of hUT-Pep2. Interestingly, the obtained structure can be easily overlapped with the corresponding ICL2 segment of a hUT model recently generated (Figure 2B) (Brancaccio et al. 2015). hUT-Pep2 therefore preserves the conformational propensities of the corresponding ICL2 segment when embedded in the wild type receptor. Unfortunately, NMR spectra of [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, despite complete assignment of all the proton resonances (Table S3), showed many broad and overlapping signals particularly in the amide proton region that prevented measure of many NMR parameters (³J_{HN-HA} coupling constants and most of the NOEs), and therefore NMR-based calculation of its 3D structure. However, retrievable NMR parameters from the spectra (a few NOEs, up-field shifts of the H α resonances, and amide temperature coefficients, Tables S3 and S4) suggest a high tendency of [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 to fold into a helix. Using circular dichroism (CD) analyses, we were able to observe that [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, under any condition tested, was able to assume folded structural motifs (Figure 2C). In 0.1 mg.mL⁻¹ SDS solution (red) it appeared to assume a β -sheet conformation (lower peak at 216 nm), while in TFE solutions it appeared to fold as an α -helix (dark green, TFE 80%, lower peaks at 205 and 216 nm). In 0.5 mg.mL⁻¹ DPC solution, it appeared to assume a less structured α -helix conformation, which correlates with our NMR data, while in water a non-structured shape (random coil) was adopted. Worth noting, a pepducin derived from the ICL3 of PAR1 studied in DPC solutions, also showed a stable helical conformation (Zhang et al. 2015). Together, these results suggest that both pepducins likely adopt conformations closely related to those found within the wild type receptor.

hUT-derived pepducins generate IP₁ production

hUT-mediated production of the inositol 1,4,5-trisphosphate metabolite inositol monophosphate (IP₁) was quantified in CHO-hUT cells using the IP-One terbium immunoassay. In agreement with previously reported data (Brule et al. 2014), we observed that hUII induced a time-dependent increase in IP₁ that reached a plateau after 40 min (Figure 3A). Concentration-response curves, constructed after 40 min incubation, revealed that hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 induced IP₁ production in CHO cells stably expressing hUT (Figure 3B) but not untransfected CHO-K1 cells after a similar period of incubation (Figure S3). Compared to hUII (pEC₅₀ = 12.54 ± 0.06; E_{max} = 97 ± 1), hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 appeared to be less potent (pEC₅₀ < 6) with reduced efficacy (around 35% for hUT-Pep2 and 60% for [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 at 10⁻⁵M, respectively) at promoting IP₁ production (Figure 3B), acting as weak allosteric agonists.

hUT-derived pepducins trigger ERK_{1/2} phosphorylation through different mechanisms

Kinetic measures, using the CHO-hUT cell line (Chatenet et al. 2013), revealed that both hUT-derived pepducins induced ERK_{1/2} phosphorylation. Used at 10⁻⁶ M, hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 exerted their maximal effect at 5 min, similar to hUII (Figure 3C). While a second peak was noticeable for [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 at 60 min, a similar pattern was not observed for hUT-Pep2 (Figure 3C). We next generated concentration-response curves for each pepducin and hUII (Figure 3D). Compared to hUII (pEC₅₀ = 9.69 ± 0.06 and E_{max} = 102 ± 2), hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 were both less potent (pEC₅₀ = 7.26 ± 0.14 and 6.70 ± 0.06, respectively) and less efficacious (E_{max} = 34 ± 2% and 56 ± 2%, respectively) at triggering ERK_{1/2} phosphorylation (Figure 3D), behaving as weak partial allosteric agonists.

As shown in Figure 4A, in the absence of the receptor, neither hUII nor hUT-derived pepducins were able to induce ERK_{1/2} phosphorylation, therefore demonstrating their specificity for hUT. Following pre-treatment of CHO-hUT cells with PTX (a G_{i/o} protein inhibitor), U73122 (a broad range PLC inhibitor), or AG1478 (a specific EGFR inhibitor), ERK_{1/2} phosphorylation was evaluated at 5 min as described above. While PTX and U73122 completely prevented [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3-mediated ERK_{1/2} phosphorylation, hUT-Pep2 action was only partially affected by the PLC inhibitor, further supporting potentially distinct mechanisms of action (Figure 4B and 4C). Inhibition of EGFR transactivation with AG1478 significantly reduced the ability of both hUT-derived pepducins to induce ERK_{1/2} phosphorylation (Figure 4D).

Further evaluation of their signaling signatures with BRET-based biosensors prompted us to use a HEK 293 cell line stably expressing hUTm since these biosensors were already optimized for a use with a HEK 293 background (Lukasheva et al. 2020).

Consistent with our previous results, kinetic experiments performed this time in HEK 293 cells stably expressing hUT using western blot, once again revealed a biphasic ERK_{1/2} activation following hUII treatment with a maximum activation after 5 min (Figure 5A). Differences observed in the pattern but not the kinetics of activation of hUII between assays here and those performed in CHO-UT cells is probably attributable to distinct cellular contexts and expression level of hUT. In this assay, hUT-Pep2 (10⁻⁵ M) also reached its maximal effect after 5 min while [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 needed 10 min to reach an efficacy similar to that observed with hUII (10⁻⁷ M) (Figure 5B and 5C). Pre-treatment with YM254890, a selective inhibitor of G_q signaling, almost completely abolished the ability of hUII to increase ERK_{1/2} phosphorylation while having a modest, but significant, inhibitory effect on the actions of hUT-Pep2 (at 5 min, **P* < 0.05) and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (at 5 and 10 min, **P* < 0.05) (Figure 5A-C). Similarly, while a small but significant reduction of ERK_{1/2} phosphorylation was observed with [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 in the presence of YM254890, this activation is maintained and did not decrease over the studied period of time (Figure 5C). Finally, similar to what was observed in CHO-hUT cells using western blotting, the use of a BRET-based ERK1/2 biosensor revealed that hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 triggered ERK_{1/2} phosphorylation with lower potency and efficacy than hUII (Figure S4). Surprisingly, when added together, the combination of both pepducins did not promote a significant phosphorylation of ERK_{1/2} at any given concentration (Figure S5). By binding to different region of the intracellular surface of hUT at the same time, these derivatives may destabilize the receptor and prevent its activation. Together, these results support a different mode of action related to the regulation of ERK_{1/2} activity by hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3.

Signaling signatures of hUT-derived pepducins

We next investigated the propensity of each pepducin to induce G_q, G₁₂, G_i, G₁₃ activation or promote conformational changes in β-arrestin 1 and β-arrestin 2 using BRET-based biosensors. As depicted in Figure 6A-D and Table 2, hUT-derived pepducins can promote activation of G_q, G_i and G₁₃ but were almost completely unable to activate G₁₂. Notably, on one hand, [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 stimulated G_q activation with a similar potency (pEC₅₀ = 8.34 ± 0.33) but a lower efficacy

($E_{\max} = 29 \pm 4\%$, $***P < 0.001$) than hUII ($pEC_{50} = 8.19 \pm 0.12$; $E_{\max} = 109 \pm 5\%$) acting as a partial allosteric agonist of this pathway (Figure 6A; Table 2). On the other hand, hUT-Pep2 behaved as a weak partial allosteric agonist ($pEC_{50} = 7.31 \pm 0.55$) of this pathway reaching approximately 9% of the hUII maximum response (Figure 6A; Table 2). Interestingly, like hUII, both hUT-derived pepducins acted as full agonists for the activation of G_i and G_{13} (Figure 6C and D; Table 2). Notably, while both pepducins promoted G_i in a similar manner than hUII (Figure 6C; Table 2), these derivatives appear to be less potent ($pEC_{50} = 6.33 \pm 0.12$ and $pEC_{50} = 6.51 \pm 0.11$, respectively; $**P < 0.01$) but more efficient ($E_{\max} = 154 \pm 10\%$ and $E_{\max} = 185 \pm 11\%$, respectively; $**P < 0.01$) than hUII ($pEC_{50} = 7.73 \pm 0.13$ and $E_{\max} = 106 \pm 5\%$) at triggering G_{13} (Figure 6D; Table 2).

We next evaluated the propensity of hUT-derived pepducins to drive conformational changes in β -arrestin 1 and 2. For β -arrestin 1, [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, which is almost equipotent ($pEC_{50} = 8.08 \pm 0.27$; $**P < 0.01$) compared to hUII ($pEC_{50} = 8.66 \pm 0.13$) but only reached around 18% of its maximum response (Figure 6E; Table 2), acting as a weak partial allosteric agonist for this signaling pathway while hUT-Pep2 appears inactive. For β -arrestin 2, [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, once again acted as a weak partial allosteric agonist, triggering activation of this pathway with low potency ($pEC_{50} = 7.74 \pm 0.32$; $***P < 0.001$) and efficacy ($E_{\max} = 19 \pm 3$; $***P < 0.001$) compared to hUII ($pEC_{50} = 9.33 \pm 0.14$; $E_{\max} = 100 \pm 3\%$) (Figure 6F; Table 2). hUT-Pep2 behaved as a very weak partial allosteric agonist reaching, at 10^{-6} M, around 15% of the maximal response evoked by hUII. Together, these results demonstrate that both pepducins can trigger hUT activation albeit to different extents.

hUT-derived pepducins promote EGFR transactivation through G_q activation

We next investigated whether hUT stimulation by hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 could mediate EGFR transactivation. Untransfected HEK 293 cells and cells overexpressing wild type hUT were transfected with EGFR-GFP and stimulated with either hUII, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10^{-6} M). In the absence of stimulation, EGFR showed a uniform membrane distribution in HEK 293 cells stably transfected or not with hUT (Figure 7A and 7B). In contrast, treatment with hUII resulted in EGFR internalization as characterized by a marked redistribution into cellular aggregates compared to untreated HEK 293 cells (Figure 7B and 7E). However, limited EGFR internalization can be observed in untransfected HEK 293 cells, (Figure S6), perhaps due to the presence of low levels of hUT in this cell line as previously suggested (Doan et al. 2012).

Treatment with hUT-derived pepducins in HEK 293-hUT cells resulted in significant internalization of EGFR-GFP as demonstrated by the punctate distribution of fluorescence (Figure 7H and 7K). Finally, we observed that pre-treatment of the cells with the specific G_q inhibitor YM254890 almost completely abolished hUII- as well as UT-derived pepducin-associated EGFR transactivation (Figure 7F, 7I, and 7L). Little to no effects of any of the ligands were seen in mock-transfected cells (Figure 7D, 7G, and 7J). Together, these results revealed that both pepducins can promote EGFR transactivation to different extents, and that this activation is abrogated following G_q inhibition.

hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 induce rat cardiac neonatal fibroblast proliferation

Several studies have demonstrated the mitogenic properties of UII, URP and related analogs in various cultured cells (Vaudry et al. 2015), including rat fibroblasts (He et al. 2004; Zhang et al. 2008), and astrocytes (Jarry et al. 2010), as well as HEK 293-hUT cells (Brule et al. 2014). Here, using HEK 293-hUT cells and two different methods, *i.e.* MTT assays and flow cytometry, we observed that hUII and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 but not hUT-Pep2 were able to induce HEK 293-hUT cell proliferation (Figure 8A and 8C). Again, in the absence of the receptor, the above-described effect was completely abrogated (Figure 8B). Interestingly, using high content imaging, we observed that both hUT-derived pepducins produced a proliferative action in rat neonatal cardiac fibroblasts similar to what was observed with hUII (Figure 8D). These observations showed that hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 can act as allosteric agonists promoting cell proliferation and that this action is cell-context dependent for hUT-Pep2.

hUT-derived pepducins can block hUII- and URP-mediated contraction

Since its discovery, UII and its paralog peptide URP have been considered potent vasoconstrictors (Vaudry et al. 2015). As shown in Figure 9A, neither of the hUT-derived pepducins were able to stimulate contraction reaching only between 5 to 15% of the force induced by hUII or URP in rat aortic ring preparations (Table 3). Used as potential allosteric modulators, hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 suppressed the maximum contractile response to hUII and URP (Figure 9B and 9C; Table 4). For instance, pre-treatment with [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 at 10⁻⁶ M, produced significant suppression of maximum contractile responses to hUII ($E_{\max} = 35 \pm 6\%$; $***P < 0.001$) and URP ($E_{\max} = 16 \pm 2\%$; $***P < 0.001$) (Table 4). Similarly, hUT-Pep2 at the

same concentration, promoted a significant but small reduction of the maximum contractile response to hUII ($E_{\max} = 86 \pm 3\%$; $*P < 0.05$) and URP ($E_{\max} = 76 \pm 8\%$; $**P < 0.01$). Interestingly, hUT-Pep2 induced a significant rightward shift in the concentration-response curve of hUII but not URP, suggesting a probe-dependent action. These data demonstrate that hUT-Pep2 but most importantly [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 can negatively modulate hUII- and URP-mediated contraction. Aortic ring contraction mediated by hUT activation generally involves intracellular calcium mobilization following G_q activation (Brule et al. 2014) and the stimulation of the small GTPase RhoA following G_{12/13} activation (Sauzeau et al. 2001). Since both pepducins promoted G_q and G₁₃ activation but not G₁₂ stimulation, we investigated their propensity to block hUII and/or URP-mediated G₁₂ activation. As shown in Figure 10, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 pre-treatment (10⁻⁵M) completely abolished hUII- and URP-associated G₁₂ stimulation, which could possibly explain, at least in part, the decrease in efficacy observed in our aortic ring contraction assay.

5.4 DISCUSSION

By selectively engaging only a subset of potential intracellular partners, allosteric agonists or biased ligands may offer an unparalleled means to understand and control GPCR-mediated signaling (Luttrell, Maudsley, and Bohn 2015). Over the years, the pepducin concept has yielded numerous allosteric agonists and antagonists for several GPCRs, some of them reaching clinical trials (Gurbel et al. 2016; Armstrong et al. 2020; Kuliopulos et al. 2020). By stabilizing or disrupting molecular interactions that change the energy landscape of a GPCR, pepducins have the potential to affect the conformational ensemble in ways that affect signaling (Carr and Benovic 2016). In the present study, we tested the ability of pepducins, derived from the sequence of intracellular loops 2 and 3 of hUT, to act as functionally-selective modulators. Using various BRET-based biosensors, we demonstrated that hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 showed a clear bias toward the activation of G_i and G₁₃, compared to G_q or G₁₂ activation as well as β -arrestin conformational changes. Most notably, these lipidated peptides, which assumed a 3-dimensional structure similar to those adopted in the full-length receptor and did not show any cytotoxic effects, were both able to act as allosteric biased agonists by promoting hUT-related signaling. Compared to hUII, hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 were able to stimulate, with lower potency and

efficacy compared to hUII, ERK_{1/2} phosphorylation through different mechanisms. hUT-Pep2-induced ERK_{1/2} phosphorylation was partially reduced following treatment of cells with inhibitors of PLC, G_q and EGFR, but unaffected by PTX treatment while the actions of hUII were substantially reduced, or even suppressed, under similar conditions. Therefore, G_i activation does not appear to mediate the effects of hUT-Pep2 on ERK_{1/2} phosphorylation, which likely instead involves G_q, G₁₃, β -arrestin2 as well as EGFR transactivation. However, G₁₃, which is potently stimulated by hUT-Pep2 following hUT activation, can promote ERK_{1/2} activation and inositol production through PLC ϵ , Ras and RhoA GTPases (Buch et al. 2008; Goldsmith and Dhanasekaran 2007; Hains et al. 2006; Mariggio et al. 2006). Hence, the weak inhibitory effect of U73122, YM254890, and AG1478 on ERK_{1/2} phosphorylation mediated by hUT-Pep2 suggest that this effect is likely mediated by G₁₃. Conversely, the drastic reduction in [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3-induced ERK_{1/2} phosphorylation following inhibition of G_i or PLC suggested, at first, a possible involvement of G_i and G_q in ERK_{1/2} phosphorylation associated with hUT activation by [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3. As previously reported, inhibition of phospholipase C by U73122 can also block receptor-mediated activation of G_i proteins (Fan et al. 1998; Wu, Pei, and Fan 1998). GPCRs are known to activate PLC, either *via* GTP-liganded α subunits of the G_q class of G proteins or by G $\beta\gamma$ dimers liberated from G_i proteins (Belcheva and Coscia 2002). Thus, the complete inhibition of [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3-mediated ERK_{1/2} phosphorylation by either PTX or U73122 suggests a direct connection between the two that might involve G $\beta\gamma$ subunits of G_i. In support of this hypothesis, it was demonstrated that dually coupled GPCRs require cooperation of G_i- and G_q-mediated pathways for efficient stimulation of the ERK_{1/2} cascade (Blaukat et al. 2000). However, selective G_q inhibition with YM254890 resulted in only a small, but significant, reduction in the early phase of ERK_{1/2} phosphorylation with a late phase that was both enhanced and sustained (Figure 5C). Discrepancies between this result and the one observed using U73122 (Figure 4C), a broad PLC inhibitor that can also block phospholipase A2 (Handlogten et al. 2001), can be explained by the propensity of G₁₃ to trigger ERK_{1/2} phosphorylation *via* PLC α and PLA2, both actions being inhibited by U73122 (Hains et al. 2006; Mariggio et al. 2006). Finally, to explain the effect observed with [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 following YM254890 treatment, it is possible that a switch from G_q to G₁₃ or G_i took place amplifying G_i and/or G₁₃-mediated action. A similar switch has been recently demonstrated to explain the variation in insulin secretion of different incretins (Oduori et al. 2020). Indeed, it was shown that inhibiting the K_{ATP} channel caused a switch from G_s

to G_q in an important pathway regulating insulin secretion, which determined the relative insulinotropic effectiveness of incretins (Oduori et al. 2020).

Several studies have suggested that EGFR transactivation plays a critical role in the hypertrophic response evoked by UT in rat cardiomyocytes (Esposito et al. 2011). Interestingly, such activation was prevented by knockdown of β -arrestins (Esposito et al. 2011). However, as demonstrated, the absence of G protein activation prevents β -arrestin signaling (Grundmann et al. 2018). To dissect the mechanism of hUII, hUT-Pep2, and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3-induced EGFR translocation, we transfected HEK 293-hUT cells with GFP-EGFR and monitored internalization by confocal microscopy. When stimulated with hUII or hUT-derived pepducins, GFP-EGFR was redistributed from the plasma membrane into endocytic vesicles. Pre-treatment with YM254890 considerably reduced hUII-, hUT-Pep2- and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3-induced EGFR internalization, indicating a requirement for G_q in their respective responses. Based on previous publications (Esposito et al. 2011), it seems that, at least for hUII, EGFR internalization requires both G_q and β -arrestins. For both pepducins, some punctae can still be seen despite YM254890 pre-treatment. Based on their propensity to activate G_{13} and the fact that G_{13} activation can also promote EGFR transactivation as demonstrated for thyrotropin and lysophosphatidic acid receptors (Buch et al. 2008; Gohla, Harhammer, and Schultz 1998), we cannot exclude that EGFR transactivation is, at least to some extent, mediated by hUT-pepducin-associated G_{13} stimulation.

Following characterization of their signaling signatures in HEK 293-hUT cells, we next investigated the propensity of hUII-, hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 to promote cell proliferation in both heterologous and native cell lines and their effects on aortic ring contraction. As previously reported, downstream signaling linked to the mitogenic HEK 293-hUT responses obtained following UII treatment involved ERK_{1/2} activation and the RhoA/Rho kinase pathway (Brule et al. 2014). In the present work, we noted that hUII and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, but not hUT-Pep2, were able to stimulate HEK 293-hUT cell proliferation. Since both hUT-derived pepducins were unable to trigger G_{12} activation, differences in the capacity of hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 to exert mitogenic actions could arise, at least in part, from their significantly different efficacy to stimulate ERK_{1/2} phosphorylation, with [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 acting as a weak full agonist while hUT-Pep2 behaved as a partial agonist (Figure S4). As previously demonstrated, hUII can induce development of cardiac remodeling by promoting fibroblast mitogenesis (He et al. 2004). Interestingly, and similar to what was observed with hUII, both hUT-derived pepducins

promoted proliferation of rat neonatal cardiac fibroblasts. Such differences in the mitogenic action of hUT-derived pepducins on HEK 293-hUT cells and cardiac fibroblasts might be inferred from their different cellular contexts, or differences between receptor isoforms. Indeed, it is now widely accepted that GPCRs can adopt multiple conformations upon ligand binding and that structurally distinct ligands can stabilize functionally distinct conformations (Kobilka and Deupi 2007). However, parameters that influence the mechanisms and the timescales by which ligands induce/stabilize specific conformations will most likely differ depending on cellular context because of disparities in associated signaling proteins and the composition of the lipid bilayer (Devost et al. 2017; Granier and Kobilka 2012). Also, despite a similar tissue distribution, structural differences between rat and human UT isoforms (only 75% sequence similarity while rat and mouse UT share more than 95% homology) as well as distinct patterns of putative phosphorylation and palmitoylation sites probably lead to differences in signaling, internalization and desensitization patterns (Nassour, Iddir, and Chatenet 2019). Such differences could therefore also explain the distinct biological activities observed with hUT-Pep2 in HEK 293-hUT cells and rat neonatal fibroblasts. Finally, both endogenous ligands of the urotensinergic system are known as potent vasoconstrictors (Vaudry et al. 2015). In the present study, neither hUT-derived pepducin exhibited significant contractile action in rat aortic ring preparations. Since aortic ring contraction is in part mediated by intracellular calcium mobilization following activation of G_q (Billard, Hebert, and Chatenet 2018; Billard et al. 2017; Brule et al. 2014) and by the stimulation of the small GTPase RhoA following G_{12}/G_{13} activation (Sauzeau et al. 2001), the weak contractile potency of hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 could be explained by their inability to trigger sustained G_{12} and/or G_q activation. This is perhaps not surprising as receptor expression is low. We therefore hypothesized that these pepducins, which mostly act as weak agonists in receptor overexpressing cells, could behave as modulators of hUII and URP in an endogenous context. We therefore tested whether agonist-stimulated aortic ring contraction was inhibited by either hUT-Pep2 and/or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3. Interestingly, both pepducins were able to reduce hUII- and URP-mediated contraction to different extents, an effect that could be attributed to their ability to antagonize hUII- and URP-mediated G_{12} activation. Understanding how hUT-pepducins exert their action at the molecular level will need further study. However, and as proposed for other reported pepducins, pepducins acting as negative modulators, could 1) compete with their homologous peptide segments, buffering/hindering the interaction of signaling partners and/or components of signaling

cascade or 2) interact with complementary regions of the peptide segment, *i.e.* intracellular loops or transmembrane domains, therefore destabilizing (antagonism) receptor conformations and dynamics ultimately modulating associated signaling (Covic, Gresser, et al. 2002b).

CONCLUSIONS

Taken together, our results demonstrate that hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, derived from the intracellular loops 2 and 3, respectively, of hUT can act as biased allosteric agonists/antagonists, engaging/preventing different signaling pathways following UT activation. Given that pepducins are believed to act intracellularly by binding directly to targeted GPCRs on the inner face of the membrane (Carr and Benovic 2016; Tsuji et al. 2013), it is not surprising to observe that different subsets of downstream effectors than those promoted by the binding of hUII are engaged. Interestingly, while hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 can trigger cell proliferation, this effect appears to be dependent on cellular context. The precise mechanisms of action by which hUT-derived pepducins can promote G_q/G_i activation, EGFR transactivation and fibroblast proliferation are still unknown and will need further investigation. These new molecular tools could represent innovative UT-targeted modulators with unique pharmacological profiles.

5.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell lines and reagents

HEK 293 cells were purchased from ATCC while the stably transfected HEK 293-hUT cell line was generated in our laboratory (Billard et al. 2017). Cell culture reagents were obtained from Invitrogen while antibodies used to evaluate ERK_{1/2} phosphorylation, *i.e.* a rabbit polyclonal antibody against phospho-p44/42 MAPK and an anti-total MAP kinase antibody, were purchased from Cell Signaling Technology. β -Actin antibody was obtained from Abcam (Cambridge, UK). The IP-One ELISA assay kit from CisBio Bioassays. The fluorenylmethyloxycarbamate- (Fmoc-) protected amino-acids, Rink amide AM resin (with Nle), N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) and ethyl cyanohydroxyiminoacetate (Oxyma) were purchased from Chem-Impex (Wood Dale, IL, USA). Trifluoroacetic acid (TFA), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), diethyl ether, N,N-dimethylformamide (DMF), piperidine, dichloromethane (DCM), and cell mask were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada). YM254890 was purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada). All other chemicals, including 99.9% ²H₂O, were from Sigma-Aldrich

(Mississauga, ON, Canada). 98% DPC-d₃₈ was obtained from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA), and [(2,2,3,3-tetradeuterio-3-(trimethylsilyl)]propionic acid (TSP) from MSD Isotopes (Montreal, QC, Canada).

Synthesis of hUT-derived pepducins

hUT-derived pepducins were synthesized manually using a standard solid phase peptide synthesis approach with Fmoc chemistry. Coupling efficiency was monitored with the qualitative ninhydrin test and a 3-equivalent excess of the protected amino acids, based on the original substitution of the resin (0.50 mmol.g⁻¹), was used in most cases. Coupling of protected amino acids were mediated by DIC (1.5 eq) and Oxyma (1.5 eq) in DCM for 1 h. Fmoc removal was achieved with 20% piperidine in DMF for 20 min. All peptides were cleaved from the resin support with simultaneous side chain deprotection by treatment with TFA containing 1,2-ethanedithiol (2.5%), water (2.5%) and triisopropylsilane (1%) for 1.5 h at room temperature. The diethyl ether-precipitated crude peptides were solubilized in 70% acetic acid (1 mg/mL) and lyophilized prior to purification. Each crude peptide was purified using a preparative reversed-phase HPLC (RP-HPLC) protocol using a linear gradient from eluent A to B with 1% B per 2 min increments (Eluent A = H₂O, 0.1% TFA, Eluent B = 80% CH₃CN/20% H₂O, 0.1% TFA). Homogeneity of purified fractions was assessed by RP-HPLC (eluent system: A = H₂O (0.1% TFA) and B = 100% CH₃CN with a gradient slope of 1% B/min, at flow rate of 1 mL/min on a Vydac C₁₈ column) and MALDI-TOF mass spectrometry in linear mode using α -cyanohydroxycinnamic acid as matrix. Fractions presenting both the correct mass, as evaluated by MALDI-TOF mass spectrometry, and a purity higher than 98%, as confirmed by analytical RP-HPLC, were pooled, lyophilized and stored as a powder until use (Table 1). The synthesis of human urotensin II (hUII) was carried out as reported earlier (Chatenet et al. 2013; Chatenet et al. 2012)

Nuclear magnetic resonance

Samples for NMR spectroscopy were prepared by dissolving the appropriate amount of peptide in 0.54 mL of ¹H₂O (pH 5.5), 0.06 ml of ²H₂O to obtain a final DPC-d₃₈ concentration of 2 mM and 200 mM. NMR spectra were recorded on a Varian INOVA 700 MHz spectrometer equipped with a z-gradient 5 mm triple-resonance probe head. All spectra were recorded at a temperature of 25°C and were calibrated relative to TSP (0.00 ppm) as internal standard. One-dimensional (1D) NMR spectra were recorded in the Fourier mode with quadrature detection. The water signal was suppressed by gradient echo (Hwang and Shaka 1995). Two dimensional (2D) DQF-COSY

(Marion and Wuthrich 1983; Piantini, Sorensen, and Ernst 1982), TOCSY (Braunschweiler and Ernst 1983), and NOESY (Jenner et al. 1979) spectra were recorded in the phase-sensitive mode as described (States, Haberkorn, and Ruben 1982). Data block sizes were 2048 addresses in t_2 and 512 equidistant t_1 values. Before Fourier transformation, the time domain data matrices were multiplied by shifted \sin^2 functions in both dimensions. A mixing time of 70 ms was used for the TOCSY experiments. NOESY experiments were run with mixing time of 100 ms. The qualitative and quantitative analyses of DQF-COSY, TOCSY, and NOESY spectra, were obtained using the interactive program package XEASY (Bartels et al. 1995). Complete ^1H NMR chemical shift assignments were effectively achieved for hUT-Pep2 and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 according to the Wüthrich procedure (Wüthrich 1986) *via* the usual systematic application of DQF-COSY, TOCSY, and NOESY experiments with the support of the XEASY software package (Supporting Information, Tables S1 and S3). $^3J_{\alpha\text{N}}$ coupling constants were measured by 1D proton and DQF-COSY spectra. Temperature coefficients of the amide proton chemical shifts were calculated from 1D ^1H NMR and 2D TOCSY experiments performed at different temperatures in the range 25-40°C by means of linear regression. Observed NOEs are reported in Tables S2 and S4 (Supporting Information).

Structure Determination

The NOE-based distance restraints were obtained from NOESY spectrum of hUT-Pep2 collected with a 100 ms mixing time. The NOE cross peaks were integrated with the XEASY program and were converted into upper distance bounds using the CALIBA program incorporated into the DYANA program package (Table S2) (Guntert, Mumenthaler, and Wuthrich 1997). Since palmitate moiety is mostly unstructured, it was replaced by an acetyl group in the model used for structure calculation. An error-tolerant target function (tf-type=3) was used to account for the peptide intrinsic flexibility. From the produced 100 conformations, 10 structures were chosen, whose interproton distances best fitted NOE derived distances, and then refined through successive steps of restrained and unrestrained energy minimization using the Discover algorithm (Accelrys, San Diego, CA) and the consistent valence force field (CVFF) (Maple, Dinur, and Hagler 1988). Molecular graphics images were produced using the UCSF Chimera package (Pettersen et al. 2004).

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) analyses were performed in a JASCO J-815 (JAPAN Spectroscopy & Chromatography Technology) spectropolarimeter coupled to a temperature controller Peltier. Samples were dissolved at 0.2 mg.mL⁻¹ in either water, 0.5 mg.mL⁻¹ DPC (dodecylphosphocholine), 0.1 mg.mL⁻¹ SDS (sodium dodecyl sulfate) or TFE (2,2,2-trifluoroethanol) aqueous solutions at concentrations of 20%, 50% and 80%. The CD spectra were recorded in the measured range of 200–250 nm using a scan speed of 50 nm.min⁻¹, and the baseline was corrected by subtraction of the solvent spectrum. The temperature was set to 20°C.

Cell culture

CHO-K1, HEK 293 as well as CHO and HEK 293 cells stably transfected with the human urotensin II receptor isoform (CHO-hUT and HEK 293-hUT, respectively) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% of heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 units.mL⁻¹ of penicillin, 100 µg.mL⁻¹ of streptomycin and 2 mM of L-glutamine. Cells were maintained as a monolayer at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air and passaged by trypsinization once cells reached 70-80% confluence.

Cell viability

HEK 293 cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/well in 96 well-plates and cultured at 37°C for 24 h. Cells were then incubated in serum free media with hUT-derived pepducins at various concentrations (10⁻⁸M-10⁻⁴M). Viability was assessed with a MTS kit (CellTiter 96[®] AQueous, Promega, Madison, WI, USA) and a microplate reader (MTX^{TC} Revelation, Dynex Tech., VA, USA) in order to determine the optical density related to the conversion of MTS into purple-colored water-soluble formazan. Positive control (cells treated with 10% DMSO) and negative control (non-treated cells) were included in each experiment. Results were expressed as the percentage of control (non-treated cells). The presence of lactate dehydrogenase (LDH), released in the culture medium from dead cells, was also determined using a commercial LDH kit (BioVision, Milpitas, CA, USA). Positive control (cells treated with lysis buffer) and negative control (non-treated cells) were included in each experiment. Results were expressed as the percentage of the maximum LDH release following cell lysis.

Western blotting

CHO cells stably expressing hUT (CHO-hUT; gift from Drs H. Vaudry et C. Dubessy, University of Rouen, France) were grown in 12-well plates to 70-80% confluence and starved for 6 h in a

serum-free medium. For kinetic experiments, cells were incubated for different time periods (0, 5, 10, 15, 20, 40, 60, and 90 min) with a fixed concentration of hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁶ M), hUII (10⁻⁷ M), or PBS alone (basal control condition). To establish concentration-response curves, cells, seeded as previously described, were stimulated for 5 min with various concentrations of hUII or hUT-derived pepducins (10⁻¹⁴-10⁻⁵ M). When applicable, CHO-hUT cells were incubated with either pertussis toxin (PTX, 200 ng.mL⁻¹) for 24 h, a specific EGFR inhibitor (AG1478; 5 μM) for 30 min or a PLC inhibitor (U73122; 1 μM) for 60 min prior their stimulation with hUII (10⁻⁷ M) or hUT-derived pepducins (10⁻⁶ M). Similar kinetic experiments were also performed in HEK 293-hUT cells in the presence or absence of a specific G_q inhibitor. Briefly, HEK 293-hUT cells, grown in 12-well plates to 70-80% confluence, were starved for 6 h in a serum-free medium. Cells were treated with YM254890 (100 nM) for 1 h and then incubated for different time periods (0, 5, 10, 15, and 20 min) with a fixed concentration of hUII, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁵ M). Cells were then rinsed twice with ice-cold PBS and homogenized in 0.5 mL of lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerolphosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg.mL⁻¹ leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) at 4°C. Insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min. The extract was treated with Laemmli sample buffer and heated for 5 min at 95°C. Aliquots were assayed for protein concentration (BioRad) and an equal amount of total protein was subjected to 12% SDS-PAGE, followed by transfer to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked and then probed with primary antibody (phospho-p44/42 MAPK) at the optimal dilution (1/2000) with gentle agitation overnight at 4°C. After washing with TTBS, membranes were then incubated with secondary antibody, conjugated with horseradish peroxidase (anti-rabbit HRP) diluted in TBST containing 5% skim milk (w/v) for 1 h at room temperature. Immunoreactive species were visualized by enhanced chemiluminescence using X-ray film and Thermo Scientific™ SuperSignal™ chemiluminescent substrates according to the manufacturer's instructions. Films were digitized and the intensity of the immunoreactive bands determined using Quantity One software from Bio-Rad. To confirm equal protein loading in individual lanes, the membrane was stripped and reprobbed with antibody against total ERK_{1/2} (diluted 1:5000).

Bioluminescence resonance energy transfer experiments

HEK 293-hUT cells were grown in DMEM culture media supplemented with 10% foetal bovine serum, HEPES, sodium pyruvate and G418 (200 μg.mL⁻¹). Passages were performed when cells

reached 80% of confluency. Cells were initially plated in 96-well plates at a density of 10,000 cells/well. The following day, the medium is replaced with DMEM culture media supplemented with 2.5% foetal bovine serum (FBS), and 12 h later, cells were transiently transfected with 25 ng/well of a G_q-polycistronic, 25 ng/well of a G₁₂-polycistronic BRET sensor, 25 ng/well of a G₁₃-polycistronic BRET sensor, 2.5 ng/well pIRESB RLucII-ERK-NLS-GFP BRET sensor, 2.5 ng β-arrestin 1-polycistronic BRET sensor, or 2.5 ng β-arrestin 2-polycistronic BRET sensor using Lipofectamine[®]2000 at a ratio of 3 to 1 (Lipofectamine/plasmid DNA) in serum-free Opti-MEM (Breton et al. 2010; Lukasheva et al. 2020). Sixteen hours post-transfection, medium was replaced with DMEM supplemented with 10% FBS, HEPES, sodium pyruvate and G418 (200 μg.mL⁻¹) and cell growth was resumed for another 16 h. Cells were washed with 150 μL PBS solution supplemented with 0.1% of glucose, and then incubated with 80 μL of this solution for 2 h. Then, to evaluate G_q and G₁₂ activation, 10 μL of a 1/20 dilution (diluted before use) of coelenterazine 400A (stock at 1 mM in ethanol) in Krebs's buffer and 10 μL of the 10x appropriate concentration of peptide were added, and the luminescence was evaluated with an Infinite[®] M1000 PRO. For β-arrestin 1 and 2 pathways, hUII, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 at various concentrations was first incubated for 15 min at RT prior adding coelenterazine (10 μL of a 1/20 dilution). To test the antagonist behavior of hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, cells were pre-incubated with one pepducin at 10⁻⁵M for 15 min to reach equilibrium, prior to the addition of increasing concentrations of hUII or URP (10⁻¹²M-10⁻⁵M). Readings were performed after 5 min using an Infinite M1000 PRO. Filters were set at 410 nm and 515 nm for detecting the *Renilla* luciferase II (RlucII, donor) and green fluorescent protein 10 (GFP10, acceptor) light emission, respectively. BRET ratio was determined by calculating the ratio of the light emitted by GFP10 over the light emitted by the RlucII. BRET signals were normalized to that of hUII (10⁻⁶ M).

IP₁ assay

This assay, performed with the IP-One terbium immunoassay kits from Cisbio, was used according to the manufacturer recommendation and as previously described (Brule et al. 2014). Briefly, CHO-hUT cells were grown in 10-cm dishes for 24 h. The cells were then starved without serum. The next day, cells were washed once with PBS and collected in PBS containing 20 mM EDTA. For the assay, 80,000 cells per well (96-well plate) were used. Cells were treated for various time (10, 20, 40, and 60 min) at 37°C with hUII or treated with increasing concentrations of hUII, hUT-Pep2

or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 for 40 min at 37°C. IP₁-d₂ and anti-IP₁-cryptate were added for an additional 2 h at room temperature. Plates were read on a Flexstation 3 microplate reader.

EGFR transactivation

HEK 293 and HEK 293-hUT cells, transiently transfected with cDNA encoding fluorescently labeled EGFR (EGFR-GFP) (2 µg), were plated onto 35-mm glass-bottomed culture dishes (MatTek Corp, Ashland, MA). Following stimulation, cells were washed once with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. To study the involvement of G_q in EGFR internalization, cells were treated with YM254890 (100 nM) for 1h prior peptide treatments. EGFR internalization following hUII, hUT-Pep2, or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 stimulation (10⁻⁶ M) was visualized by green fluorescence using a single sequential line of excitation on a Zeiss LSM 780 Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Microimaging). EGFR-GFP internalization was visualized using a combination of excitation (488 nm) and emission filters (499 and 520 nm).

Proliferation assays

HEK 293-hUT cell proliferation was evaluated by flow cytometry using propidium iodide DNA staining. Cells, grown in 6-well plates to 80% confluency, were starved for 6 h in a serum-free medium and then treated with hUII, hUT-Pep2, or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁶ M) for 30 minutes at RT. Next, cells were detached, fixed with cold 70% ethanol and then stored at -20°C for at least 2 h. Cells were centrifuged at 200 rpm for 10 min at 4°C and washed at least once with cold PBS. Cells were then resuspended in Triton X-100 (0.1%) supplemented with propidium iodide (500 µg.mL⁻¹), and 200 µg.mL⁻¹ of DNase-free RNase A in PBS. Data, expressed as the mean ± SEM of at least three independent experiments, were acquired on a FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and results were analyzed with the FlowJo v10 software. The proliferation index is defined as the total number of divisions divided by the number of cells that went into division.

Rat aortic ring contraction

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles-River, Saint-Constant, Qc, Canada) weighing 250–300 g were housed in cages under controlled illumination (12:12 h light-dark cycle), humidity, and temperature (21-23°C) and had free access to tap water and rat chow. All experimental procedures were performed in accordance with regulations and ethical guidelines from the Canadian Council for the Care of Laboratory Animals and received approvals of the institutional animal care and use committee of the *Institut National de la Recherche Scientifique - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie*. As previously described,(Chatenet et al. 2013; Chatenet et al. 2012) the thoracic

aorta was cleared of surrounding tissue and then excised from the aortic arch to the diaphragm. Conjunctive tissues were next removed from the thoracic aorta and the vessels were divided into 5 rings of 4 mm. The endothelium of each aortic ring was removed by gently rubbing the vessel intimal surface. Aortic rings were then placed in a 5 mL organ bath filled with oxygenated normal Krebs-Henselheit buffer. Eighty microliters of a 2.5 M potassium chloride solution (40 mM final concentration) were used to evaluate maximal contractile responses of each vessel. In one bath, hUII (10^{-6} M) was applied as a control, and the tissue-response was expressed as the ratio with the KCl-induced contraction. Cumulative concentration-response curves to synthetic peptides were obtained by increasing the concentration of each peptide in the remaining organ chambers (10^{-11} to 10^{-5} M). The amplitude of the contraction induced by each concentration of peptide was expressed as a percentage of the KCl-induced contraction divided by the tissue-response induced by hUII. Antagonist activity of hUT-derived pepducins was evaluated by exposing first the aortic ring to hUT-Pep2, or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10^{-5} M) for 30 min, to ensure that the peptide reached equilibrium and that no agonist effect is observed, and then adding cumulative concentration of hUII or URP (10^{-12} - 10^{-6} M). The median effective concentrations (EC_{50}) are expressed as the mean \pm S.E.M., and the *n* values, representing the total number of animals from which the vessels were isolated, varied from 5-8 animals.

Rat cardiac neonatal fibroblast proliferation

Neonatal cardiac rat fibroblasts, endogenously expressing UT (Zhang et al. 2007), were obtained from 1-3 days old Sprague-Dawley pups as previously reported (Colombo et al. 2003). Briefly, hearts obtained from neonatal rats were enzyme-digested and after centrifugation, cells were pre-plated to separate cardiomyocytes from fibroblasts. As reported, the adherent nonmyocyte fractions correspond predominantly to fibroblasts while the supernatants largely contain the cardiomyocytes. After several washes, attached fibroblasts were trypsinized and then cultured at 37°C in 96-well plate (6,000 cells per well) in low glucose-DMEM supplemented with 7% FBS, 100 units/mL of penicillin, and 100 μ g/mL of streptomycin. After 48 h, cells were washed twice with low glucose-DMEM, and starved for 12 h in this medium. Cells were then treated for 24 h with hUII, hUT-Pep2, or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 at a concentration of 10^{-6} M. Prior to staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at RT, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min, and then blocked with 10% horse serum in PBS for 1 h at RT. Cells are incubated with primary anti-smooth muscle β -actin antibody (1/500) in 10% horse serum/PBS overnight at 4°C and later

with secondary anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1/1000) for 1 h at RT. Cell staining was performed using cell mask (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in PBS for 30 min at room temperature and with Hoechst dye in PBS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 min. Analysis was performed on an Opera Phoenix High Content Imaging System with a 20x water objective.

Data availability

The ensemble of hUT-Pep2 NMR-derived structures has been deposited in the Protein Data Bank (PDB) with the following code: 6HVK. All remaining data are contained within the article.

Statistical analysis

All experiments were performed at least in triplicate. Data, expressed as mean \pm S.E.M, were analyzed with the Prism Software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Sigmoidal concentration-response curves fitted with variable slope were used to determine EC_{50} . Statistical comparisons were analyzed by the Student's t-test, and differences were considered significant where $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ or $***P < 0.001$

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Heart and Stroke Foundation of Canada (G-15-0008938) and the Canadian Institutes of Health Research (PJT-159687) to T.E.H. and J.C.T, a grant from the Canadian Institutes of Health Research to D.C. (MOP-142184) and a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2015-04848) to D.C. R.D.M. was supported by studentships from the McGill-CIHR Drug Development Training Program and the McGill Faculty of Medicine and Health Sciences. H.N. was supported by a fellowship from the *Fonds de Recherche en Santé du Québec*. J.C.C.D was supported by the Barbara & Edward Victor award granted by McGill Faculty of Medicine. T.E.H holds the Canadian Pacific Chair in Biotechnology.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

FOOTNOTES

We thank the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Heart and Stroke Canada for funding.

Abbreviations. 7TMR, 7-transmembrane receptor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; BOP, (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate; CHO cells, Chinese hamster ovary cells; DCM, dichloromethane; DIEA, N,N-diisopropylethylamine; DMF, dimethylformamide; DPC, dodecylphosphocholine; DQF-COSY, double quantum filtered correlated spectroscopy; Fmoc, fluorenylmethyloxycarbamate; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK 293 cells, human embryonic kidney 293 cells; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; NMR, nuclear magnetic resonance; NOESY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy; RP-HPLC, reverse phase-high performance liquid chromatography; TOCSY, total correlated spectroscopy; TSP, 3-(trimethylsilyl)propionic acid; UII, urotensin II; URP, urotensin II-related peptide; UT, urotensin II receptor.

5.6 FIGURES

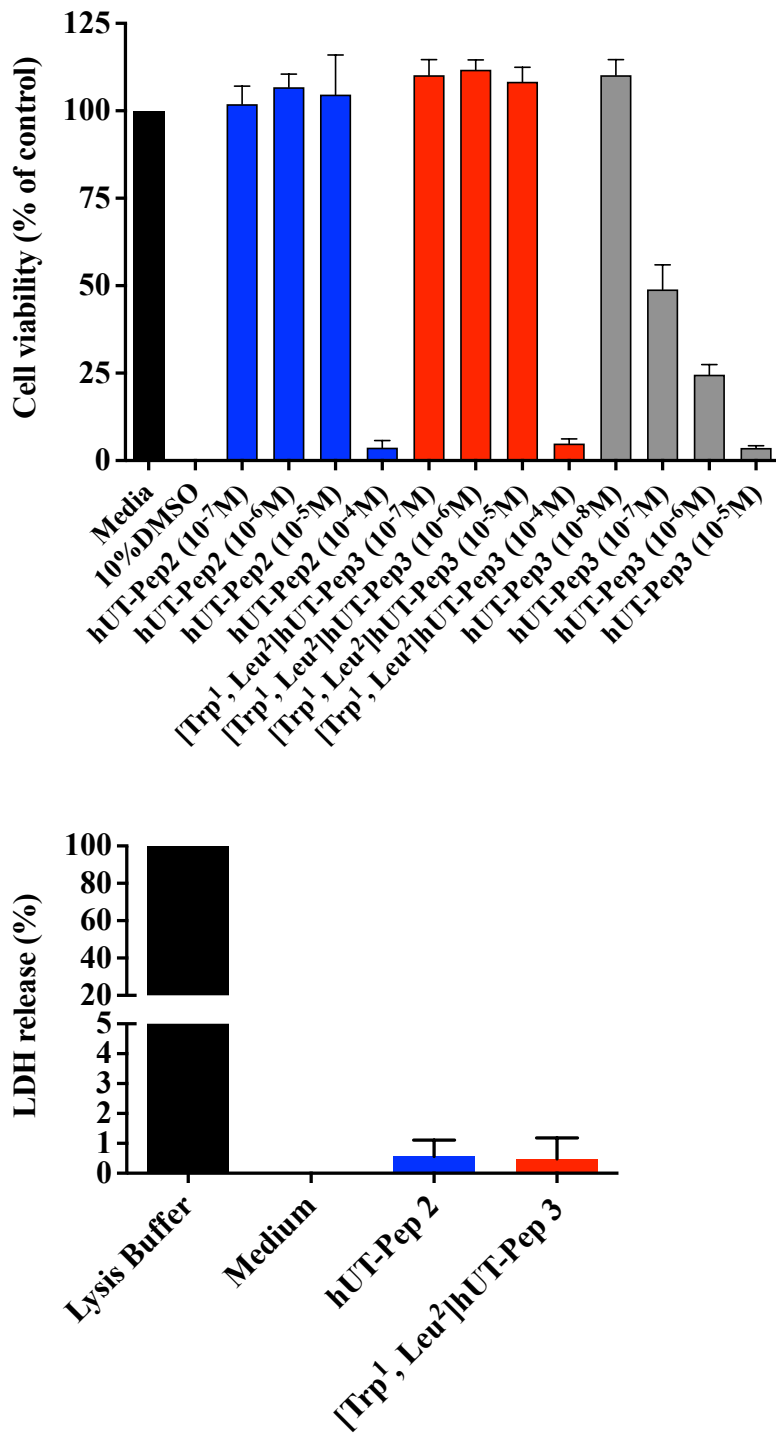


Figure 1. Cytotoxic action of hUT-pepducins.

Toxicity of hUT-derived pepducins was evaluated using (A) MTT or (B) LDH assays in HEK 293-hUT cells.

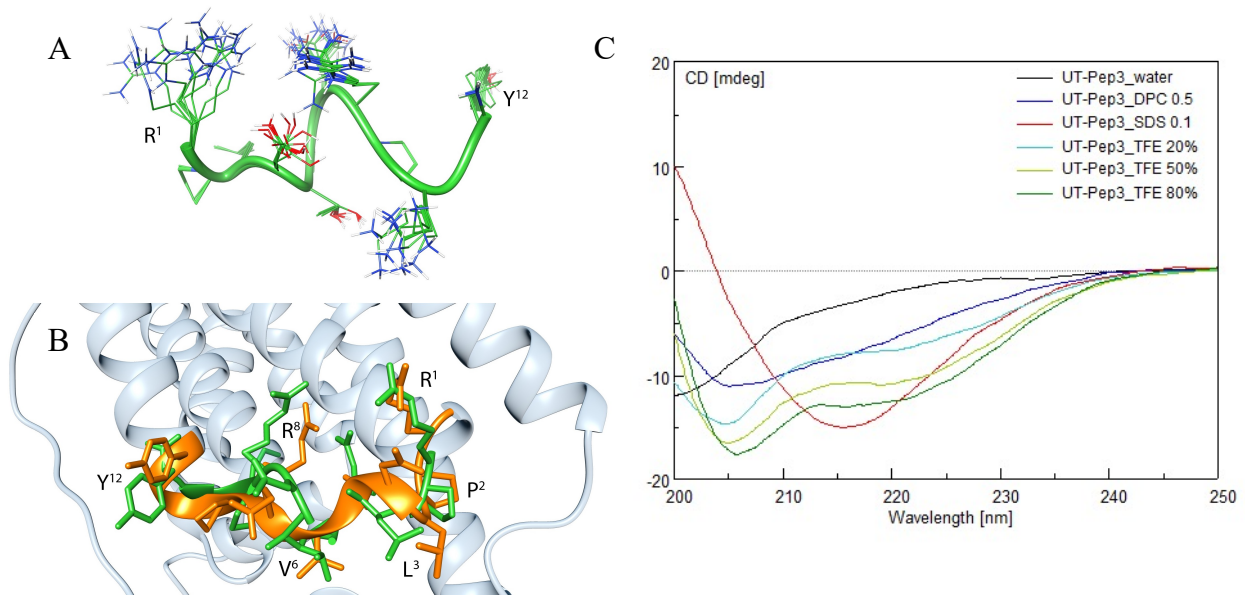


Figure 2. 3D structural data of UT-derived pepducins.

(A) Modeled structure of the hUT-Pep2. Ensemble of the 10 lowest energy conformers of hUT-Pep2. Structures were superimposed using the backbone heavy atoms. Side chain heavy atoms are shown with different colours (carbon, green; nitrogen, blue; oxygen, red). Many hydrogen atoms and the lipid chains are not shown for clarity. Backbone structure is represented as green ribbon. (B) Superposition of hUT-Pep2 structure (representing the NMR lowest energy conformer, green) and the second intracellular loop of a hUT model (orange). (C) Circular dichroism of [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 in various solvents.

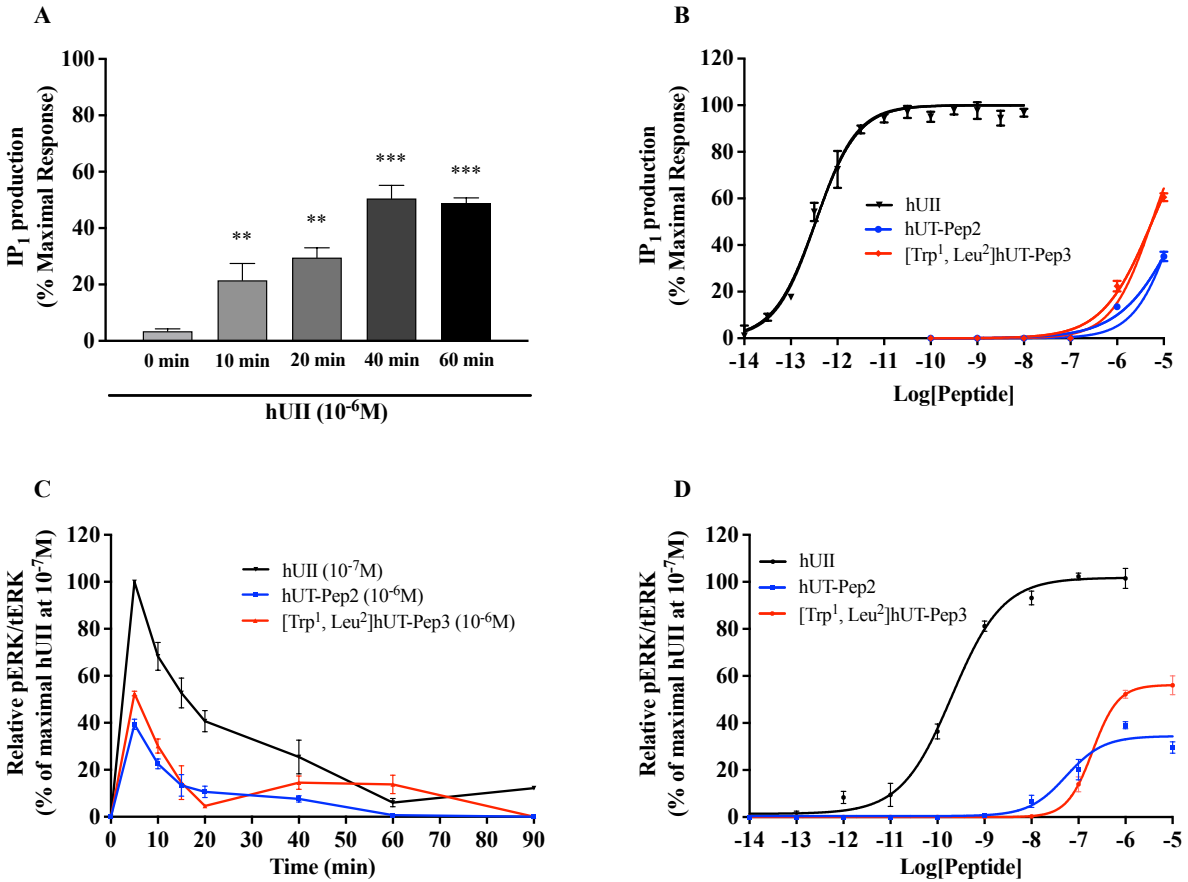


Figure 3. IP₁ production (A and B) and ERK1/2 phosphorylation (C and D) kinetics and concentration dependence following hUT activation.

IP₁ production was evaluated using the IP-One terbium immunoassay kits while ERK_{1/2} phosphorylation was measured by western blot in CHO-K1 cells stably expressing hUT. The data are normalized to the hUII maximum effect. Each curve represents the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in triplicate.

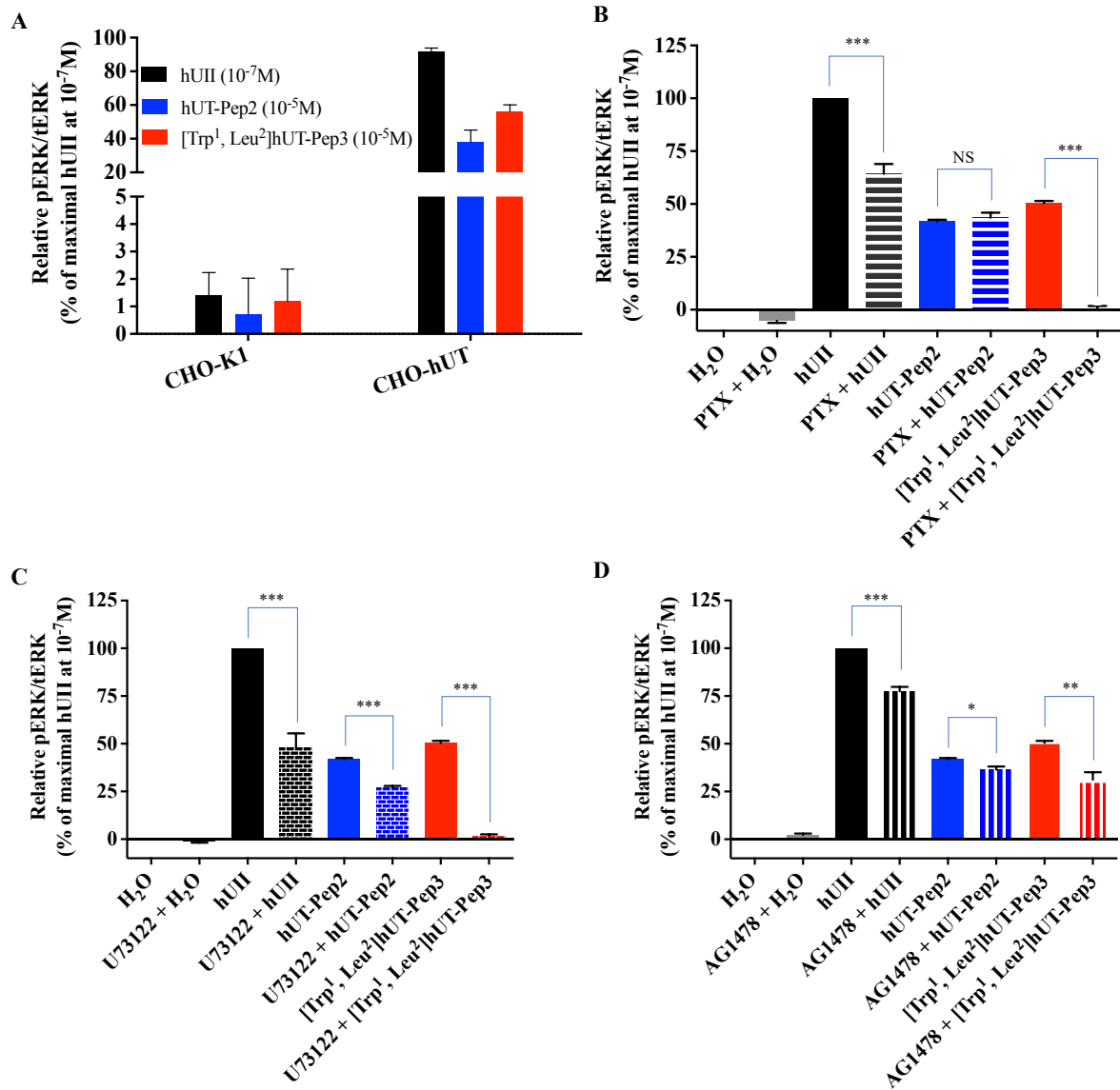
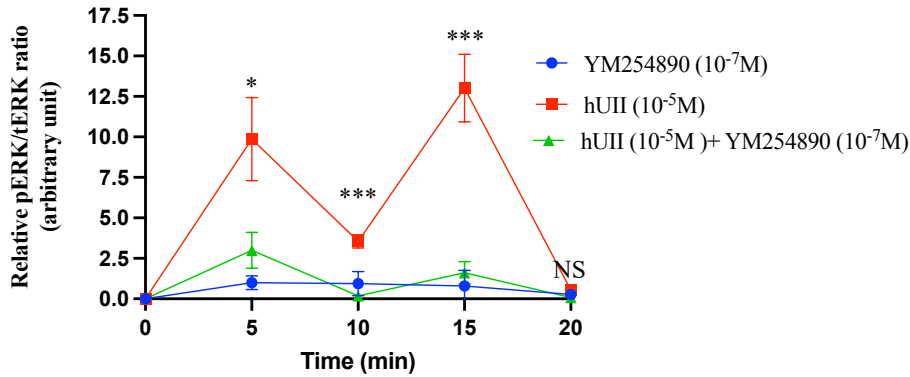


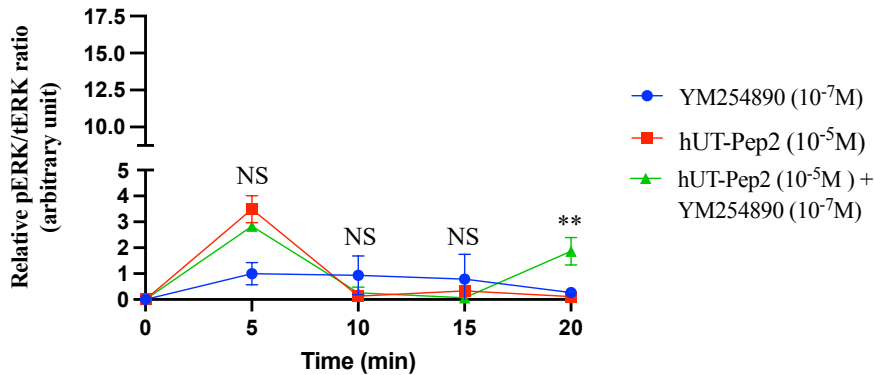
Figure 4. Effect of hUII, hUT-Pep2, and [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 on ERK1/2 phosphorylation in CHO-K1 cells or CHO-K1 cells stably expressing the hUT receptor (CHO-K1-hUT).

ERK_{1/2} phosphorylation was measured by western blot. (A) CHO-K1, which does not express hUT, and CHO-K1-hUT cells were treated for 5 min with hUII (10⁻⁷M), hUT-Pep2, or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁵M) for 5 min. (B-D) CHO-K1-hUT cells were treated with hUII (10⁻⁷M), hUT-Pep2, or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁶M) in the absence or presence of PTX (200 ng/mL, 24h), U73122 (1 μM, 60 min) or AG1478 (5 μM, 30 min). The data are normalized to the hUII maximum effect at 10⁻⁷M and after 5 min incubation. Quantification of ERK_{1/2} phosphorylation level was performed in three independent experiments done in triplicate (Mean ± S.E.M, n=3, ****P* < 0.001, ***P* < 0.01 or **P* < 0.05, vs. control).

A



B



C

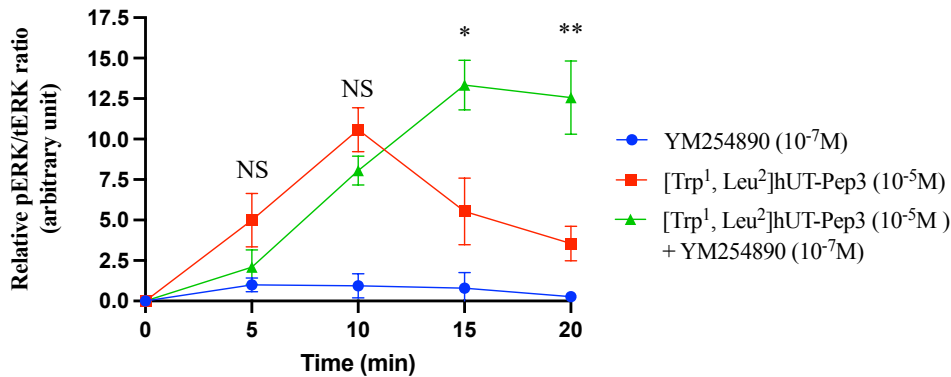


Figure 5. ERK1/2 phosphorylation kinetics after hUT receptor activation.

hUT-mediated ERK_{1/2} phosphorylation following hUII, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 in the absence or presence of YM254890 was evaluated by western blot. Data are normalized to the hUII maximum effect at each time point. Curves represent mean ± SEM of 3 independent kinetic experiments performed in triplicate. Statistical comparisons between hUII, hUT-pepducins treated or not with YM254890 were analyzed by the Student's t-test, and differences were considered significant where **P* < 0.05, ***P* < 0.01 or ****P* < 0.001.

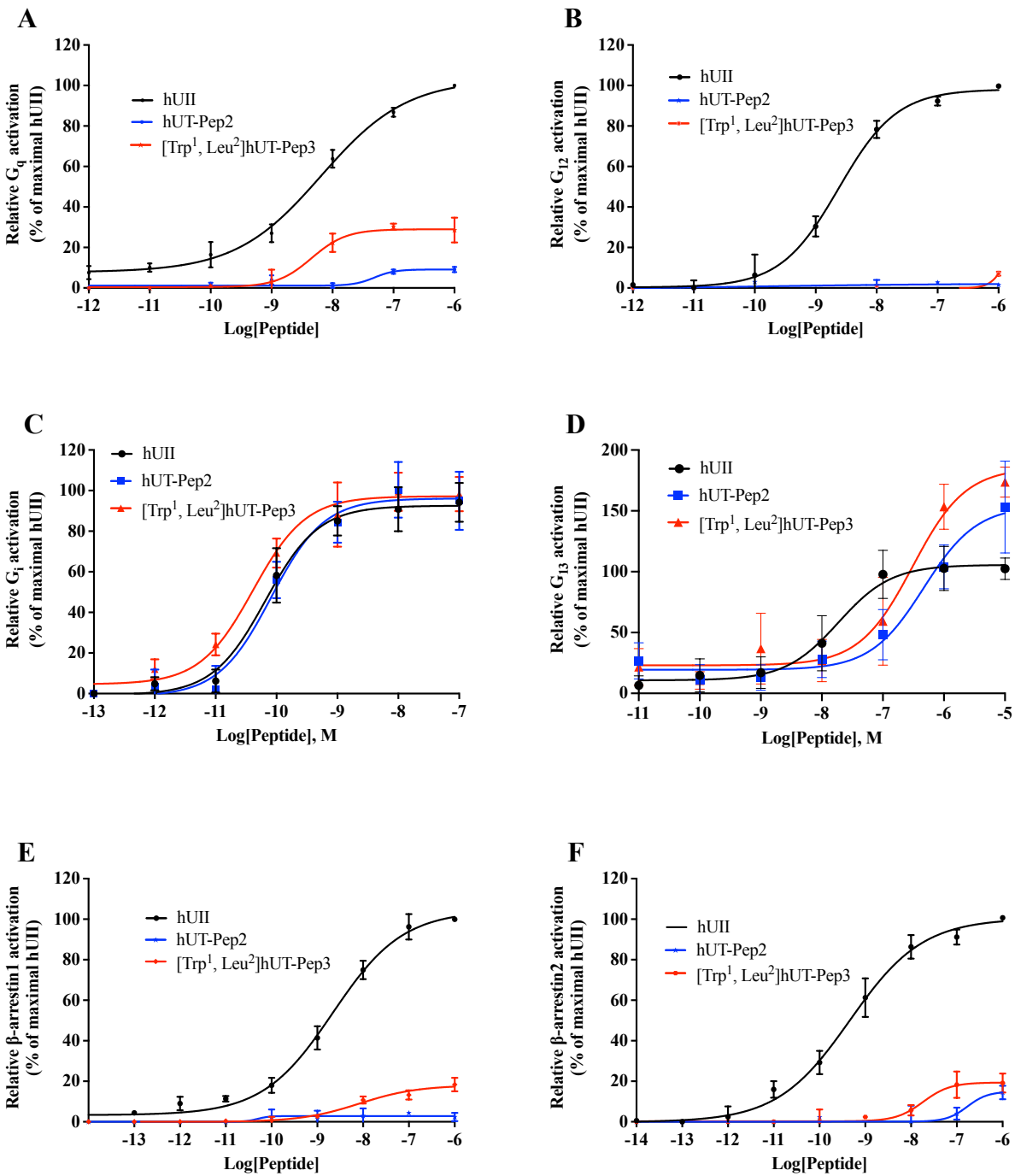


Figure 6. Signaling signature of hUT-pepducins following hUT receptor activation.

BRET measurements were performed following hUT stimulation with increasing concentrations of hUII, or hUT-derived pepducins in HEK 293-hUT cells. The data are normalized to maximal hUII responses (10^{-6} M or 10^{-5} M). Each curve represents mean \pm SEM of at least three independent concentration-response experiments performed in triplicate.

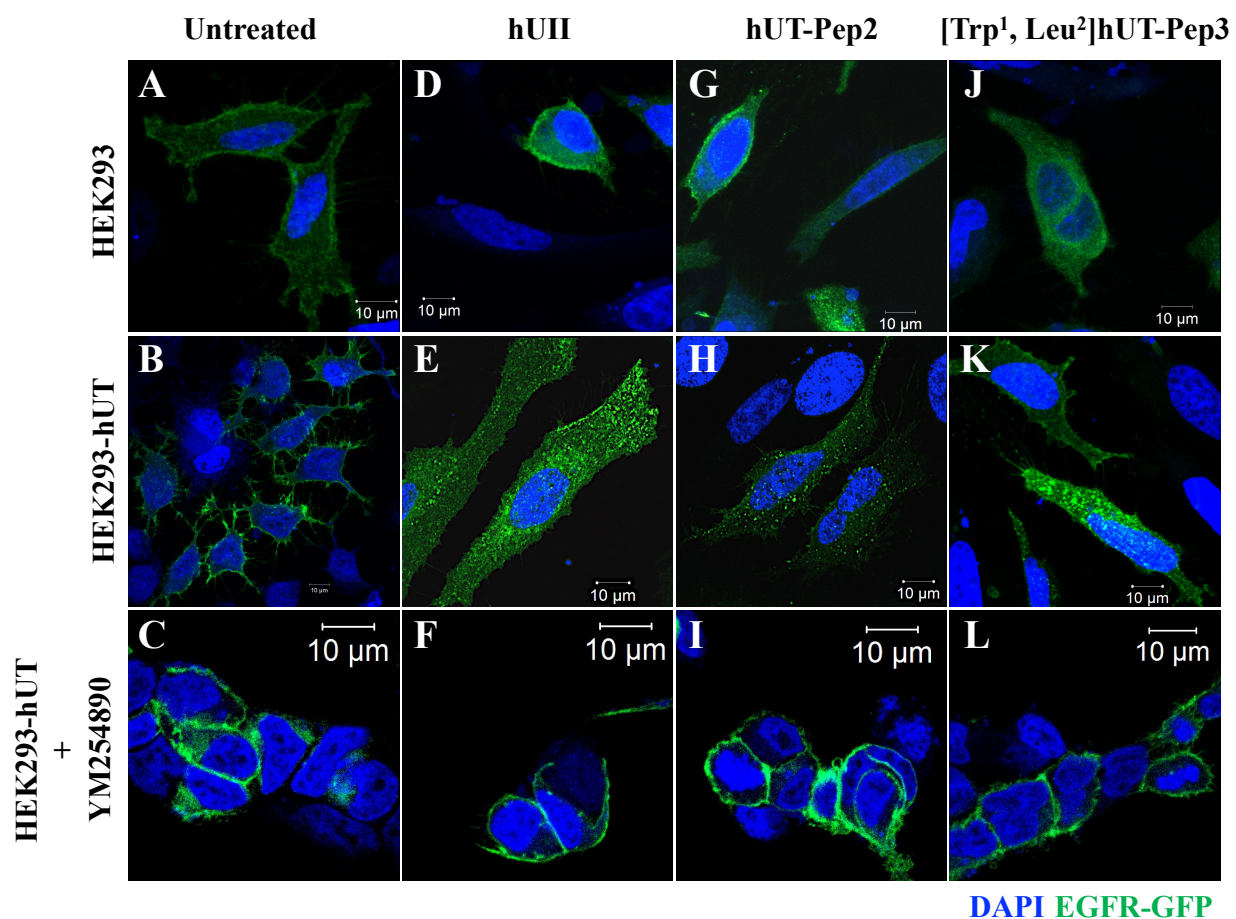


Figure 7. UT-pepducins-mediated transactivation of EGFR following hUT activation.

HEK 293 cells stably expressing wild type hUT (B, E, H, K) or not (A, D, G, J) and transfected with GFP-EGFR were treated with hUII, hUT-Pep2, or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 in the presence (C, F, I, L) or not of YM254890. EGFR internalization, following hUT stimulation with various ligands for 30 min, was visualized using confocal microscopy. The image shown are from representative experiments repeated at least three times.

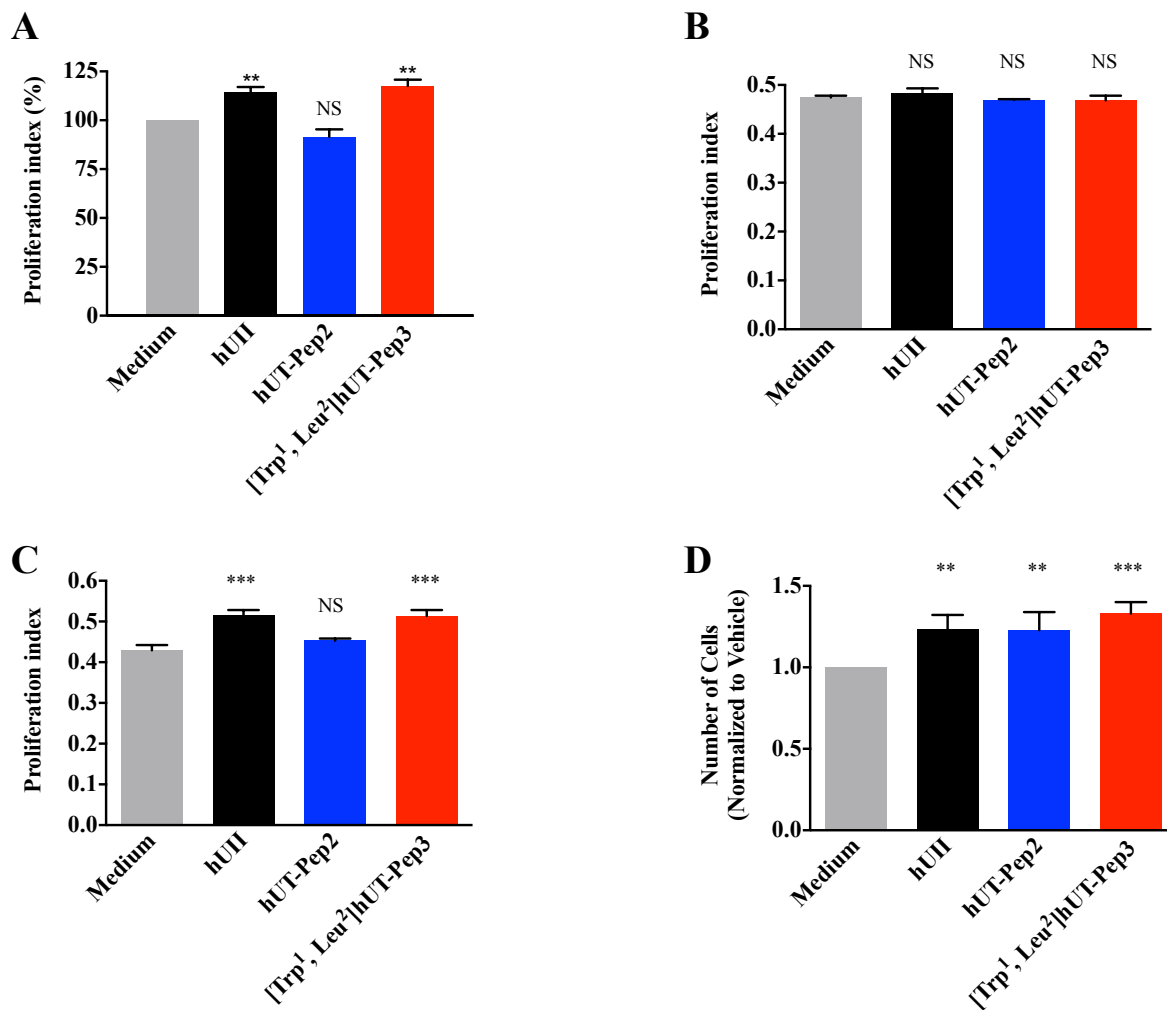


Figure 8. Effects of hUII and UT-derived pepducins on proliferation of hUT receptor-expressing HEK 293 cell and rat neonatal fibroblasts.

HEK 293 cells stably expressing hUT were treated with hUII, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁶M) and cell proliferation was evaluated by MTT assay (A) or flow cytometry (C). HEK 293 cells were treated with hUII, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁶M) and cell proliferation was also evaluated by MTT assay (B). (D) Rat neonatal fibroblasts endogenously expressing UT were treated with hUII, hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 (10⁻⁶M) and proliferation was evaluated with an Opera Phoenix using smooth muscle α -actin as primary antibody and an anti-rabbit Alexa Fluor 488 as secondary antibody. Each bar corresponds to the mean \pm SEM obtained from 3 independent experiments conducted in triplicate.

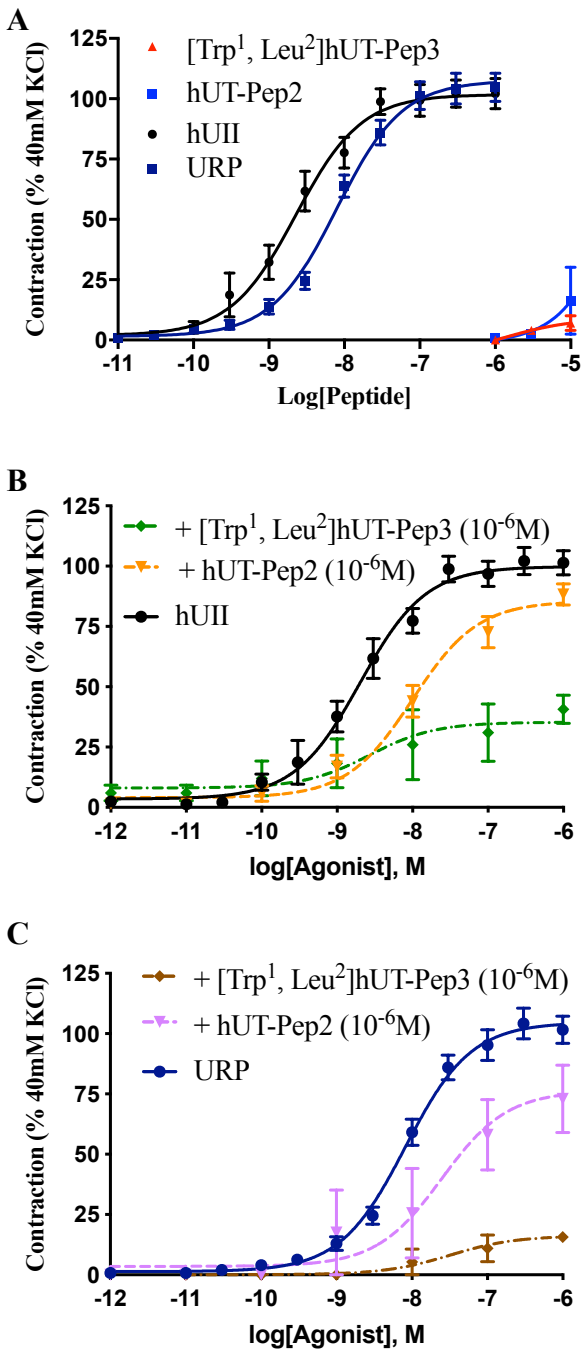


Figure 9. Vasocontractile action of hUT-derived pepducins.

(A) Representative concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of hUII or hUT-derived pepducins. Representative concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of hUII (B) or URP (C) following pre-treatment with hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3. Each replicate (n) was conducted on tissue obtained from at least 3 different animals. Data represent mean \pm S.E.M.

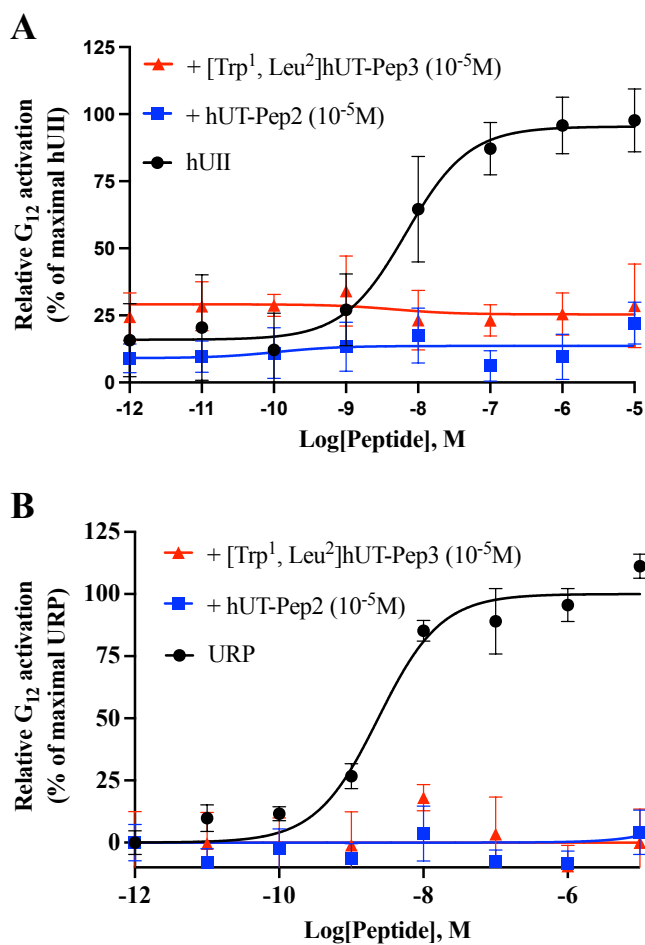


Figure 10. Effect of hUT-pepducins on hUT-mediated G12 activation.

Representative concentration-response curves obtained after cumulative additions of hUII (A) or URP (B) following pre-treatment with hUT-Pep2 or [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 at 10⁻⁵M for 15 min. The data are normalized to maximal hUII or URP responses (10⁻⁵M). Each curve represents mean \pm SEM of at least three independent concentration-response experiments performed in triplicate.

5.7 REFERENCES

1. Vaudry, H., Leprince, J., Chatenet, D., Fournier, A., Lambert, D. G., Le Mevel, J. C., Ohlstein, E. H., Schwertani, A., Tostivint, H., and Vaudry, D. (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCII. Urotensin II, urotensin II-related peptide, and their receptor: from structure to function. *Pharmacological reviews* 67, 214-258
2. Nassour, H., Iddir, M., and Chatenet, D. (2019) Towards Targeting the Urotensinergic System: Overview and Challenges. *Trends in pharmacological sciences* 40, 725-734
3. Watson, A. M., Olukman, M., Koulis, C., Tu, Y., Samijono, D., Yuen, D., Lee, C., Behm, D. J., Cooper, M. E., Jandeleit-Dahm, K. A., Calkin, A. C., and Allen, T. J. (2013) Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 56, 1155-1165
4. You, Z., Genest, J., Jr., Barrette, P. O., Hafiane, A., Behm, D. J., D'Orleans-Juste, P., and Schwertani, A. G. (2012) Genetic and pharmacological manipulation of urotensin II ameliorate the metabolic and atherosclerosis sequelae in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32, 1809-1816
5. Zhao, J., Xie, L. D., Song, C. J., Mao, X. X., Yu, H. R., Yu, Q. X., Ren, L. Q., Shi, Y., Xie, Y. Q., Li, Y., Liu, S. S., and Yang, X. H. (2014) Urotensin II receptor antagonist improves atherosclerosis by controlling C-reactive protein, monocyte chemoattractant protein-1 and transforming growth factor-beta expression in rats. *Exp Ther Med* 7, 1647-1652
6. Zhao, J., Yu, Q. X., Kong, W., Gao, H. C., Sun, B., Xie, Y. Q., and Ren, L. Q. (2013) The urotensin II receptor antagonist, urotensin II, protects against atherosclerosis in rats. *Exp Ther Med* 5, 1765-1769
7. Lee, J. H., Park, B. K., Oh, K. S., Yi, K. Y., Lim, C. J., Seo, H. W., and Lee, B. H. (2016) A urotensin II receptor antagonist, KR36676, decreases vascular remodeling and inflammation in experimental pulmonary hypertension. *International immunopharmacology* 40, 196-202
8. Pehlivan, Y., Dokuyucu, R., Demir, T., Kaplan, D. S., Koc, I., Orkmez, M., Turkbeyler, I. H., Ceribasi, A. O., Tutar, E., Taysi, S., Kisacik, B., and Onat, A. M. (2014) Palonoserin treatment effective as bosentan in the treatment model of pulmonary arterial hypertension. *Inflammation* 37, 1280-1288
9. Wang, Y., Tian, W., Xiu, C., Yan, M., Wang, S., and Mei, Y. (2019) Urotensin II receptor antagonist improves the structure and function of right ventricle as determined by echocardiography in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rat model. *Clinical rheumatology* 38, 29-35
10. Bousette, N., Hu, F., Ohlstein, E. H., Dhanak, D., Douglas, S. A., and Giaid, A. (2006) Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 41, 285-295
11. Bousette, N., Pottinger, J., Ramli, W., Ohlstein, E. H., Dhanak, D., Douglas, S. A., and Giaid, A. (2006) Urotensin-II receptor blockade with SB-611812 attenuates cardiac remodeling in experimental ischemic heart disease. *Peptides* 27, 2919-2926
12. Oh, K. S., Lee, J. H., Yi, K. Y., Lim, C. J., Park, B. K., Seo, H. W., and Lee, B. H. (2017) A novel urotensin II receptor antagonist, KR-36996, improved cardiac function and attenuated cardiac hypertrophy in experimental heart failure. *European journal of pharmacology* 799, 94-102
13. Billard, E., Iddir, M., Nassour, H., Lee-Gosselin, L., Poujol de Molliens, M., and Chatenet, D. (2018) New directions for urotensin II receptor ligands. *Peptide Science*, e24056

14. Kim, S. K., Li, Y., Park, C., Abrol, R., and Goddard, W. A., 3rd. (2010) Prediction of the three-dimensional structure for the rat urotensin II receptor, and comparison of the antagonist binding sites and binding selectivity between human and rat receptors from atomistic simulations. *ChemMedChem* 5, 1594-1608
15. Brancaccio, D., Merlino, F., Limatola, A., Yousif, A. M., Gomez-Monterrey, I., Campiglia, P., Novellino, E., Grieco, P., and Carotenuto, A. (2015) An investigation into the origin of the biased agonism associated with the urotensin II receptor activation. *J Pept Sci* 21, 392-399
16. Merlino, F., Billard, E., Yousif, A. M., Di Maro, S., Brancaccio, D., Abate, L., Carotenuto, A., Bellavita, R., d'Emmanuele di Villa Bianca, R., Santicioli, P., Marinelli, L., Novellino, E., Hebert, T. E., Lubell, W. D., Chatenet, D., and Grieco, P. (2019) Functional Selectivity Revealed by N-Methylation Scanning of Human Urotensin II and Related Peptides. *J Med Chem* 62, 1455-1467
17. Chatenet, D., Letourneau, M., Nguyen, Q. T., Doan, N. D., Dupuis, J., and Fournier, A. (2013) Discovery of new antagonists aimed at discriminating UII and URP-mediated biological activities: insight into UII and URP receptor activation. *Br J Pharmacol* 168, 807-821
18. Chatenet, D., Nguyen, Q. T., Letourneau, M., Dupuis, J., and Fournier, A. (2012) Urocontrin, a novel UT receptor ligand with a unique pharmacological profile. *Biochem Pharmacol* 83, 608-615
19. Doan, N. D., Nguyen, T. T., Letourneau, M., Turcotte, K., Fournier, A., and Chatenet, D. (2012) Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart. *Br J Pharmacol* 166, 243-257
20. Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C., Desrues, L., Tokay, T., Chatenet, D., Leprince, J., Rossi, O., Vaudry, H., Tonon, M. C., Prezeau, L., Castel, H., and Gandolfo, P. (2010) The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J* 428, 113-124
21. Prosser, H. C., Forster, M. E., Richards, A. M., and Pemberton, C. J. (2008) Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Peptides* 29, 770-777
22. Billard, E., Hebert, T. E., and Chatenet, D. (2018) Discovery of New Allosteric Modulators of the Urotensinergic System through Substitution of the Urotensin II-Related Peptide (URP) Phenylalanine Residue. *J Med Chem* 61, 8707-8716
23. Billard, E., Letourneau, M., Hebert, T. E., and Chatenet, D. (2017) Insight into the role of urotensin II-related peptide tyrosine residue in UT activation. *Biochem Pharmacol*, 100-107
24. Douchez, A., Billard, E., Hebert, T. E., Chatenet, D., and Lubell, W. D. (2017) Design, Synthesis, and Biological Assessment of Biased Allosteric Modulation of the Urotensin II Receptor Using Achiral 1,3,4-Benzotriazepin-2-one Turn Mimics. *J Med Chem* 60, 9838-9859
25. Dufour-Gallant, J., Chatenet, D., and Lubell, W. D. (2015) De Novo Conception of Small Molecule Modulators Based on Endogenous Peptide Ligands: Pyrrolodiazepin-2-one gamma-Turn Mimics That Differentially Modulate Urotensin II Receptor-Mediated Vasoconstriction ex Vivo. *J Med Chem* 58, 4624-4637
26. Merlino, F., Yousif, A. M., Billard, E., Dufour-Gallant, J., Turcotte, S., Grieco, P., Chatenet, D., and Lubell, W. D. (2016) Urotensin II((4-11)) Azasulfuryl Peptides: Synthesis and Biological Activity. *J Med Chem* 59, 4740-4752

27. Strack, M., Billard, E., Chatenet, D., and Lubell, W. D. (2017) Urotensin core mimics that modulate the biological activity of urotensin-II related peptide but not urotensin-II. *Bioorg Med Chem Lett* 27, 3412-3416
28. Kenakin, T. (2012) The potential for selective pharmacological therapies through biased receptor signaling. *BMC Pharmacol Toxicol* 13, 3
29. Kenakin, T. (2011) Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 296-302
30. Chaturvedi, M., Schilling, J., Beautrait, A., Bouvier, M., Benovic, J. L., and Shukla, A. K. (2018) Emerging Paradigm of Intracellular Targeting of G Protein-Coupled Receptors. *Trends Biochem Sci* 43, 533-546
31. Dimond, P., Carlson, K., Bouvier, M., Gerard, C., Xu, L., Covic, L., Agarwal, A., Ernst, O. P., Janz, J. M., Schwartz, T. W., Gardella, T. J., Milligan, G., Kuliopulos, A., Sakmar, T. P., and Hunt, S. W., 3rd. (2011) G protein-coupled receptor modulation with pepducins: moving closer to the clinic. *Ann N Y Acad Sci* 1226, 34-49
32. Carlson, K., McMurry, T., and Hunt, S. W., 3rd. (2012) Pepducins: lipopeptide allosteric modulators of GPCR signaling. *Drug discovery today. Technologies* 9, e1-e70
33. Covic, L., Gresser, A. L., Talavera, J., Swift, S., and Kuliopulos, A. (2002) Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 643-648
34. Covic, L., Misra, M., Badar, J., Singh, C., and Kuliopulos, A. (2002) Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med* 8, 1161-1165
35. Kaneider, N. C., Agarwal, A., Leger, A. J., and Kuliopulos, A. (2005) Reversing systemic inflammatory response syndrome with chemokine receptor pepducins. *Nat Med* 11, 661-665
36. Quoyer, J., Janz, J. M., Luo, J., Ren, Y., Armando, S., Lukashova, V., Benovic, J. L., Carlson, K. E., Hunt, S. W., 3rd, and Bouvier, M. (2013) Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E5088-5097
37. Carr, R., 3rd, Du, Y., Quoyer, J., Panettieri, R. A., Jr., Janz, J. M., Bouvier, M., Kobilka, B. K., and Benovic, J. L. (2014) Development and characterization of pepducins as Gs-biased allosteric agonists. *J Biol Chem* 289, 35668-35684
38. Tressel, S. L., Koukos, G., Tchernychev, B., Jacques, S. L., Covic, L., and Kuliopulos, A. (2011) Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models. *Methods Mol Biol* 683, 259-275
39. O'Callaghan, K., Kuliopulos, A., and Covic, L. (2012) Turning receptors on and off with intracellular pepducins: new insights into G-protein-coupled receptor drug development. *J Biol Chem* 287, 12787-12796
40. Saviello, M. R., Malfi, S., Campiglia, P., Cavalli, A., Grieco, P., Novellino, E., and Carotenuto, A. (2010) New insight into the mechanism of action of the temporin antimicrobial peptides. *Biochemistry* 49, 1477-1485
41. Doreleijers, J. F., Rullmann, J. A., and Kaptein, R. (1998) Quality assessment of NMR structures: a statistical survey. *J Mol Biol* 281, 149-164

42. Zhang, P., Leger, A. J., Baleja, J. D., Rana, R., Corlin, T., Nguyen, N., Koukos, G., Bohm, A., Covic, L., and Kuliopulos, A. (2015) Allosteric Activation of a G Protein-coupled Receptor with Cell-penetrating Receptor Mimetics. *J Biol Chem* 290, 15785-15798
43. Brule, C., Perzo, N., Joubert, J. E., Sainsily, X., Leduc, R., Castel, H., and Prezeau, L. (2014) Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *FASEB J* 28, 5148-5162
44. Lukashева, V., Devost, D., Le Gouill, C., Namkung, Y., Martin, R. D., Longpre, J. M., Amraei, M., Shinjo, Y., Hogue, M., Lagace, M., Breton, B., Aoki, J., Tanny, J. C., Laporte, S. A., Pineyro, G., Inoue, A., Bouvier, M., and Hebert, T. E. (2020) Signal profiling of the beta1AR reveals coupling to novel signalling pathways and distinct phenotypic responses mediated by beta1AR and beta2AR. *Scientific reports* 10, 8779
45. He, Y. H., Hong, J. M., Guo, H. S., Wei, J. R., Chen, H., Zuo, H. H., and Li, Z. L. (2004) [Effects of urotensin II on cultured cardiac fibroblast proliferation and collagen type I mRNA expression]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 24, 505-508
46. Zhang, Y. G., Li, J., Li, Y. G., and Wei, R. H. (2008) Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *J Hypertens* 26, 1119-1126
47. Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P., and Loirand, G. (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 88, 1102-1104
48. Luttrell, L. M., Maudsley, S., and Bohn, L. M. (2015) Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism. *Mol Pharmacol* 88, 579-588
49. Gurbel, P. A., Bliden, K. P., Turner, S. E., Tantry, U. S., Gesheff, M. G., Barr, T. P., Covic, L., and Kuliopulos, A. (2016) Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36, 189-197
50. Armstrong, C. W. D., Coulter, J. A., Ong, C. W., Maxwell, P. J., Walker, S., Butterworth, K. T., Lyubomska, O., Berlinger, S., Gallagher, R., O'Sullivan, J. M., Jain, S., Mills, I. G., Prise, K. M., Bristow, R. G., LaBonte, M. J., and Waugh, D. J. J. (2020) Clinical and functional characterization of CXCR1/CXCR2 biology in the relapse and radiotherapy resistance of primary PTEN-deficient prostate carcinoma. *NAR cancer* 2, zcaa012
51. Kuliopulos, A., Gurbel, P. A., Rade, J. J., Kimmelstiel, C. D., Turner, S. E., Bliden, K. P., Fletcher, E. K., Cox, D. H., and Covic, L. (2020) PAR1 (Protease-Activated Receptor 1) Pepducin Therapy Targeting Myocardial Necrosis in Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome Patients Undergoing Cardiac Catheterization: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 2 Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, ATVBAHA120315168
52. Carr, R., 3rd, and Benovic, J. L. (2016) From biased signalling to polypharmacology: unlocking unique intracellular signalling using pepducins. *Biochem Soc Trans* 44, 555-561
53. Buch, T. R., Biebertmann, H., Kalwa, H., Pinkenburg, O., Hager, D., Barth, H., Aktories, K., Breit, A., and Gudermann, T. (2008) G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin. *J Biol Chem* 283, 20330-20341
54. Goldsmith, Z. G., and Dhanasekaran, D. N. (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122-3142

55. Hains, M. D., Wing, M. R., Maddileti, S., Siderovski, D. P., and Harden, T. K. (2006) Galpha12/13- and rho-dependent activation of phospholipase C-epsilon by lysophosphatidic acid and thrombin receptors. *Mol Pharmacol* 69, 2068-2075
56. Mariggio, S., Bavec, A., Natale, E., Zizza, P., Salmona, M., Corda, D., and Di Girolamo, M. (2006) Galpha13 mediates activation of the cytosolic phospholipase A2alpha through fine regulation of ERK phosphorylation. *Cellular signalling* 18, 2200-2208
57. Fan, G. H., Zhou, T. H., Zhang, W. B., and Pei, G. (1998) Suppression of phospholipase C blocks Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. *European journal of pharmacology* 341, 317-322
58. Wu, Y. L., Pei, G., and Fan, G. H. (1998) Inhibition of phospholipase C blocks opioid receptor-mediated activation of Gi proteins. *Neuroreport* 9, 99-103
59. Belcheva, M. M., and Coscia, C. J. (2002) Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals* 11, 34-44
60. Blaukat, A., Barac, A., Cross, M. J., Offermanns, S., and Dikic, I. (2000) G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. *Mol Cell Biol* 20, 6837-6848
61. Handlogten, M. E., Huang, C., Shiraishi, N., Awata, H., and Miller, R. T. (2001) The Ca²⁺-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a Gqalpha -dependent ERK-independent pathway. *J Biol Chem* 276, 13941-13948
62. Oduori, O. S., Murao, N., Shimomura, K., Takahashi, H., Zhang, Q., Dou, H., Sakai, S., Minami, K., Chanclon, B., Guida, C., Kothegala, L., Tolo, J., Maejima, Y., Yokoi, N., Minami, Y., Miki, T., Rorsman, P., and Seino, S. (2020) Gs/Gq signaling switch in beta cells defines incretin effectiveness in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 130, 6639-6655
63. Esposito, G., Perrino, C., Cannavo, A., Schiattarella, G. G., Borgia, F., Sannino, A., Pironti, G., Gargiulo, G., Di Serafino, L., Franzone, A., Scudiero, L., Grieco, P., Indolfi, C., and Chiariello, M. (2011) EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by beta-arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic research in cardiology* 106, 577-589
64. Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Ruttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N. K., Ishida, S., Muller, I., Reher, R., Kawakami, K., Inoue, A., Rick, U., Kuhl, T., Imhof, D., Aoki, J., Konig, G. M., Hoffmann, C., Gomeza, J., Wess, J., and Kostenis, E. (2018) Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nature communications* 9, 341
65. Gohla, A., Harhammer, R., and Schultz, G. (1998) The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem* 273, 4653-4659
66. Kobilka, B. K., and Deupi, X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 28, 397-406
67. Devost, D., Sleno, R., Petrin, D., Zhang, A., Shinjo, Y., Okde, R., Aoki, J., Inoue, A., and Hebert, T. E. (2017) Conformational Profiling of the AT1 Angiotensin II Receptor Reflects Biased Agonism, G Protein Coupling, and Cellular Context. *J Biol Chem* 292, 5443-5456
68. Granier, S., and Kobilka, B. (2012) A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nat Chem Biol* 8, 670-673
69. Tsuji, M., Ueda, S., Hirayama, T., Okuda, K., Sakaguchi, Y., Isono, A., and Nagasawa, H. (2013) FRET-based imaging of transbilayer movement of pepducin in living cells by novel intracellular bioreductively activatable fluorescent probes. *Org Biomol Chem* 11, 3030-3037

70. Hwang, T. L., and Shaka, A. J. (1995) Water Suppression that Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson.* 112, 275-279
71. Marion, D., and Wuthrich, K. (1983) Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ¹H-¹H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 967-974
72. Piantini, U., Sorensen, O. W., and Ernst, R. R. (1982) Multiple Quantum Filters for Elucidating NMR Coupling Network. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6800-6801
73. Braunschweiler, L., and Ernst, R. R. (1983) Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J. Magn. Res.* 53, 521-528
74. Jenner, J., Meyer, B. H., Bachman, P., and Ernst, R. R. (1979) Investigation of Exchange Processes by Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 71, 4546-4553
75. States, D. J., Haberkorn, R. A., and Ruben, D. J. (1982) A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants. *J. Magn. Reson.* 42, 286-292
76. Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Guentert, P., and Wüthrich, K. (1995) The Program XEASY for Computer-Supported NMR Spectral Analysis of Biological Macromolecules. *J. Biomol. NMR* 6, 1-10
77. Wüthrich, K. (1986) In *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons: New York
78. Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wuthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* 273, 283-298
79. Maple, J. R., Dinur, U., and Hagler, A. T. (1988) Derivation of force fields for molecular mechanics and dynamics from ab initio energy surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5350-5354
80. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612
81. Breton, B., Sauvageau, E., Zhou, J., Bonin, H., Le Gouill, C., and Bouvier, M. (2010) Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys J* 99, 4037-4046
82. Zhang, Y. G., Li, Y. G., Liu, B. G., Wei, R. H., Wang, D. M., Tan, X. R., Bu, D. F., Pang, Y. Z., and Tang, C. S. (2007) Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol. *Acta Pharmacol Sin* 28, 36-43
83. Colombo, F., Gosselin, H., El-Helou, V., and Calderone, A. (2003) Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts proceeds via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway refractory to the antiproliferative action of cyclic AMP. *J Cell Physiol* 195, 322-330

DEUXIÈME ARTICLE

6

EVIDENCE FOR HETERODIMERIZATION AND FUNCTIONAL INTERACTION OF THE UROTENSIN II RECEPTOR AND THE ANGIOTENSIN TYPE 1 RECEPTOR

Évidence de l'hétérodimérisation et l'interaction fonctionnelle des récepteurs de l'urotensine II et de l'angiotensine de type 1

Auteurs

Hassan Nassour¹, Dominic Devost², Terence E. Hebert², David Chatenet¹

Affiliations professionnelles :

- ¹ Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada.
- ² Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal.

Contributions: Dans cet article, j'ai réalisé toutes les expériences de l'article sauf l'expérience de FLASH qui a été réalisé dans le laboratoire de Pr Terry Hebert à McGill.

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

British Journal of Pharmacology

14 mars 2022

Lien avec l'article précédent :

Comme dans l'article précédent, nous avons essayé de développer des nouvelles pistes pour utiliser le système urotensinergique comme cible pour le traitement des maladies cardiaques. En effet, on a montré l'existence d'un hétérodimère formé de hUT et AT1R, hétérodimère qui pourrait être un cible potentiel dans le traitement des maladies cardiaques dont la fibrose cardiaque.

6.1 ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE

Despite the observation of synergistic interactions between the urotensinergic and angiotensinergic systems, the interplay between the urotensin II receptor (hUT) and the angiotensin II type 1 receptor (hAT1R) in regulating cellular signaling under physiological and pathophysiological conditions remains incompletely understood. The interaction between hUT and AT1R could engender reciprocal allosteric modulations of their signaling signatures, defining a unique role for these complexes in cardiovascular physiology and pathophysiology. Hence, targeting such complexes first requires a more robust assessment of the molecular and cellular mechanisms that underlie their biology.

EXPERIMENTAL APPROACH

The physical interaction between hUT and hAT1R receptors was evaluated by co-immunoprecipitation, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and FAsH BRET-based conformational biosensors. To analyze how this functional interaction regulated proximal and distal hUT-associated signaling pathways, we used BRET-based signaling biosensors and western blots to profile pathway-specific signaling in HEK 293 cells expressing hUT, hAT1R or both.

KEY RESULTS

We first observed that hUT-hAT1R heterodimers triggered distinct signalling outcomes, in particular Gq/ G13/Gi/DAG/ β -arrestin-1/ERK1/2, compared to their respective parent receptors alone. Notably, co-transfection of hUT and hAT1R slightly potentiated (pEC50 = 8.04 ± 0.09 vs 7.40 ± 0.07 ; *P < 0.05) hUII-induced Gq activation but significantly reduced potency (pEC50 = 7.61 ± 0.09 vs 8.34 ± 0.11 ; *P < 0.05) and efficacy ($45 \pm 2\%$ vs $100 \pm 3\%$; **P < 0.01) of Ang II to mediate Gq activation. Using a FAsH-walk approach, we observed that the presence of unliganded UT altered conformational dynamics of hAT1R but that addition of hUII or URP did not produce further alterations.

CONCLUSION

Assembly of hUT with hAT1R might be important for allosteric modulation of outcomes associated with specific hardwired signaling complexes in healthy and disease states. Our work validates such complexes as potential targets to promote the design of compounds that modulate heterodimer function selectively. Moreover, characterization of GPCR heteromers involved in cardiac

hypertrophy and fibrosis may reshape drug discovery programs increasing the breadth and depth of targets for therapeutic intervention.

Keywords:

Urotensin II, Urotensin II-related peptide, Angiotensin II, human urotensin II receptor, G protein-coupled receptor, Bioluminescence resonance energy transfer, Heterodimerization

Abbreviations: Angiotensin II (Ang II), Angiotensin receptor type 1 (AT1R), Angiotensin receptor type 2 (AT2R), Bioluminescence resonance energy transfer (BRET), Bradykinin B2 receptor (B2R), Diacylglycerol (DAG), Fluorescent biarsenical hairpin binders (FlAsH), G protein coupled receptor (GPCR), Heart failure (HF), Human embryonic kidney 293 (HEK 293), Human urotensin II (hUII), Human urotensin II receptor (hUT), Plasma membrane (PM), Prostaglandin F₂- α receptor (F₂ α), Urotensin related peptide (URP).

6.2 INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GPCRs) convert extracellular stimuli into specific cellular responses by activating a wide variety of downstream signaling pathways [1]. GPCRs can exist as monomers, homo- and heterodimers as well as higher-order oligomeric assemblies and these complexes can affect ligand binding, signaling efficacy and receptor trafficking [2]. In recent years, the potentially large functional and physiological roles of GPCR heterodimers have generated a great deal of excitement around the opportunity that dimerization could enable novel drug discovery [2]. Indeed, GPCR heterodimers distribution is expected to be much more restricted than GPCR monomers, which suggests that highly selective drugs with fewer side effects can be developed. Targeting specific dimers linked to pathophysiological signaling properties may therefore constitute a very appealing strategy for the development of drugs with improved efficacy and specificity [3].

Over the years, the urotensinergic system, composed of a single GPCR, UT, and two endogenous peptides, urotensin II (UII) and urotensin II-related peptide (URP), was presented as a promising therapeutic target in atherosclerosis, pulmonary arterial hypertension, metabolic syndrome, as well as cardiac and renal failure [4, 5]. This system, notably upregulated in pathological conditions associated with heart failure (HF), is associated with various biomarkers of cardiovascular dysfunctions and is involved in changes in cardiac contractility, fibrosis and hypertrophy contributing, like the angiotensinergic system, to the pathogenesis and progression of HF [6, 7]. Historically, numerous GPCRs have been involved in cardiac homeostasis and some of them, such as the angiotensin II type 1 receptor (AT1R), have been targeted for therapeutic interventions [8]. Interestingly, earlier reports have highlighted a potential interaction between the angiotensinergic and the urotensinergic systems. Notably, angiotensin II (Ang II), secreted under hypoxic conditions, increases UII expression and UII promoter activity in rat cardiomyocytes and fibroblasts [9]. Interestingly, losartan (AT1R antagonist) inhibited these actions as well as protein synthesis induced by UII stimulation in rat cardiac fibroblasts [9]. Also, while Ang II potentiated UII-induced myocardial stiffness in rabbits, UII potentiated Ang II-induced rat vascular responses *ex vivo*, an action blocked by urantide (UT antagonist) but also by losartan [10-12]. It therefore appears that these systems are able to modulate their associated cardiac fibrotic and hypertrophic effects. In the present study, we investigated the possibility that human UT (hUT) and human AT1R (hAT1R) could allosterically regulate each other, therefore defining a potentially unique role for hUT-hAT1R complexes in cardiovascular physiology and pathophysiology. The objective of the present study

was to investigate the putative functional interaction between hUT and hAT1R as well as their physical interaction, in HEK 293 cells. By using co-immunoprecipitation assays, hAT1R FIAsh BRET-based conformational biosensors and BRET between hUT and AT1R, we first demonstrated the existence of hUT-hAT1R heterocomplexes that do not seem to be modulated by ligand binding. Then, using a panel of BRET-based biosensors and other assays, we noted that hUT and hAT1R can cross modulate their respective signaling pathways albeit to different extents. Notably, hUT seems to act as a negative regulator of hAT1R-mediated signaling. Interestingly, human UII (hUII) and URP produced different signaling outcomes in the presence of unliganded hAT1R. Overall, the characterization of such heterodimers, formed by two GPCRs involved in cardiac hypertrophy and fibrosis, may reshape drug discovery programs and increase the breadth and depth of targets for therapeutic intervention, potentially broadening the therapeutic armamentarium for heart failure treatment.

6.3 MATERIALS AND METHODS

Materials

All materials used for cell culture were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Polyclonal goat anti-rabbit IgG-HRP conjugates and C18 cartridges were obtained from Fisher (Burlington, ON, Canada) while polyclonal anti-Flag M2 affinity gel antibody was from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, USA). Coelenterazine and polyethylenimine (PEI) were purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada). All peptides were prepared in house as previously reported [13, 14].

Cell culture

HEK 293 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U.mL⁻¹) and streptomycin (0.1 mg.mL⁻¹). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and passages were performed using trypsinization when cells reached approximately 60% confluence.

Radioligand binding assays

Synthetic hUII (H-Glu-Thr-Pro-Asp-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH), URP (H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH) and Ang II (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH) were

radiolabeled with Na¹²⁵I using the chloramine T technique as previously reported [15]. Iodinated 125I-hUII, 125I-URP and 125I-Ang II were purified on a C18 cartridge, collected and stored at -20°C until use. Saturation binding experiments for each of these peptides were performed using HEK 293 cells transiently transfected with hUT (750 ng), hAT1R (750 ng) or both (1500 ng total; 1:1) by using a 3:1 polyethylenimine (PEI)/DNA ratio. Transfected cells were plated in 96-well plates at a density of 37,500 cells/well. Forty-eight hours post-transfection, cells are washed twice with the binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MnCl₂, 0.5% BSA) and then incubated on ice and for 2h with increasing concentration of a radiolabeled peptide (10⁻¹¹ to 10⁻⁵ M). Non-specific binding was determined by exposing cells to 10⁻⁵ M of cold hUII, URP or Ang II. At the end of the incubation period, cells were washed twice with a cold binding buffer and then lysed with a solution of 1M sodium hydroxide. Cell-bound radioactivity was quantified using a γ -counter (1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Montreal, QC, Canada). Results were expressed as a percentage of 125I-hUII, 125I-URP, or 125I-Ang II specific binding.

FAsH-BRET experiments

pIRES-SP-FLAG-AT1R-ICL P2 and pIRES-SP-FLAG-AT1R-c-tail constructs were used as described with an untagged hUT construct with or without ligand stimulation [16]. Data collection with the FAsH/BRET-based conformation biosensors was previously described [17]. Briefly, cells grown in white 96 well plates were incubated with 2 μ M coelenterazine H (Nanolight) for 5 minutes. Plates were then loaded into a Victor X Light Luminescence plate reader (Perkin Elmer) and luminescence captured through F460 and F535 filters for BRET1. Filtered signals were collected every 0.6 s with an integration time of 0.2 s for 50 reads. Drug was then injected into the well using an attached injector module and signals through each filter were collected for another 100 reads. To calculate changes in BRET, the signal through the F535 filter was divided by that through the F460 filter. Basal BRET refers to the average BRET across the first 50 reads prior to agonist injection and the change in BRET due to drug binding (deltaBRET) was calculated by subtracting the basal BRET from the average BRET across the last 50 reads post-injection.

Detection of hUT-AT1R heterodimers using BRET experiments

BRET experiments and analysis were performed following an established protocol [18]. The following plasmids pcDNA3/FLAG-hAT1R-mTurquoise and pcDNA3/FLAG-hUT-RLucII were used for these experiments. The donor to acceptor pairs and molar ratio were optimized using

various concentrations of each plasmid and once optimized, remained constant throughout the study. The optimal ratio between hUT-RLucII and hAT1R-mTurquoise (hAT1R-mTur) receptors was determined using transiently transfected HEK 293 cells with a fixed amount of hUT-RLucII donor plasmid (75ng) and increasing amounts of hAT1R-mTurceptor plasmid (75 – 750ng). Following transfection of both receptors, cells were seeded into white opaque 96-well plates at a density of 50,000 cells per well. Cells were then incubated or not with hUII, URP or Ang II (10^{-5} M) for 5 min prior to adding coelenterazine h (5 mM) solubilized in PBS, to each well. The resulting BRET signals were measured using a TECAN Infinite M1000 (Morrisville, NC, USA) with sequential integration of both the RLucII (410 nm) and the mTur (470 nm) emission signals. The BRET signal is determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by hAT1R-Tur over the light intensity emitted by the hUT-RLucII netBRET is determined by subtracting the BRET ratio obtained under unstimulated (vehicle control) conditions from the BRET ratio obtained when cells were exposed to ligands (hUII, URP or Ang II).

BRET-based biosensor signal profiling

Using BRET biosensors, we analyzed proximal and distal signaling pathways associated with hUT and/or hAT1R activation in order to capture differences in signaling signatures of their respective endogenous ligands in the presence of the second protomer in putative heterodimers. This allowed us to monitor 1) activation of Gq and production of diacylglycerol (DAG), 2) activation of G13 and Gi, and 3) recruitment of β -arrestin (β -arr) 1 and 2. The two receptors were individually or concomitantly transfected (500 ng for each receptor) in HEK 293 cells with single BRET-based biosensors (500 ng/well for pLVXi2H-Polycis_Gq/G13 RLucII-GFP10/ protein biosensor or 50 ng/well for distal pLVXi2H-Polycis biosensors like DAG). In order to evaluate translocation of β -arrestins at the plasma membrane following hUT or hAT1R activation, enhanced bystander BRET was used as previously reported [19]. HEK 293 cells expressing hUT, hAT1R or both are also transfected with 120 ng of β arr1 or 2-RLucII along with 480 ng of rGFP-CAAX was used to monitor PM translocation of β -arrestins. Polyethylenimine (PEI; 3:1 ratio of PEI to DNA (w/w)) was used as a transfection reagent. For all experiments, cells were first trypsinized and re-suspended at a density of 150,000 cells/mL in DMEM supplemented with 2.5% FBS. Then, DNA and PEI, mixed in OptiMEM and incubated at room temperature for 30 min, were added to the cells. Transfected cells were then seeded at a density of 15,000 cells/well in 96-well plates. After 24 h, medium was

removed and replaced with DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml of penicillin/streptomycin. Cells were then incubated for an additional 24 h. Cells were washed with 150 μ L PBS solution supplemented with 0.1 % glucose, and then incubated with 80 μ L of this solution for 2h. For ligand treatments, 10 μ L of a 1/20 dilution (diluted just before use) of coelenterazine 400A (from a 1 mM stock solution in ethanol) in PBS supplemented with 0.1 % glucose and 10 μ L of increasing concentration of each peptide, solubilized in PBS (0.1% glucose), were added (10⁻⁵ to 10⁻¹² M). Filters were set at 410 nm and 515 nm to detect the Renilla luciferase II (RLucII, donor) and green fluorescent protein 10 (GFP10, acceptor) light emissions, respectively. BRET signals, measured on a TECAN Infinite M1000 (Morrisville, NC, USA), were monitored for 5 min after co-addition of coelenterazine 400A and ligands. BRET ratios were determined by calculating the ratio of the light emitted by GFP10 over the light emitted by the RLucII. BRET signals were normalized to the maximum signal measured with hUII, URP or Ang II (10⁻⁵ M).

Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation experiments were performed using HEK 293 cells transiently co-transfected with Flag-tagged hAT1R (10 μ g of cDNA) and wild type hUT (10 μ g of cDNA). Cells were then harvested 72h post-transfection, washed three times with PBS, and incubated in a blocking buffer (PBS containing 0.2% BSA) for 1h on ice. Subsequently, cells were washed and then exposed to a mouse monoclonal anti-Flag antibody (1:250 dilution) diluted in the blocking buffer for an additional 1h on ice. Following two washes with the blocking buffer and two washes with PBS, cells were solubilized in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM iodoacetamide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mg.mL⁻¹ benzamidine, 2.5 mg.mL⁻¹ leupeptin) for 30 min on ice. This mixture was then centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C to remove cellular debris. For immunoprecipitation of the total receptor pool, lysates were incubated overnight at 4°C with additional anti-Flag antibodies (1:200 dilution). Following the addition of protein G-Sepharose (50 μ L) (Thermofisher, Burlington, ON, Canada), the incubation is then resumed for another 3 h. Protein G-Sepharose-antibody-antigen complexes were then collected by centrifugation at 12,000 g for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and immunoprecipitates were washed four times with cold buffer, resuspended in a buffer containing 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 4 M urea, and 100 mM dithiothreitol and heated at 100°C for 5 min. Protein samples were resolved by 10% SDS

polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a protran nitrocellulose membrane, and then subjected to immunoblotting using a rabbit monoclonal anti-hUT antibody (Abcam, 1:1000 dilution). Renaissance chemiluminescence reagent (PerkinElmer Life Sciences) was used for western blot development.

Western blot

HEK 293 cells expressing hUT, AT1R or both receptors were grown in 6-well plates to 70-80% confluence. Each cells expressing receptor were starved for 2h in a PBS/glucose (0.1%) and treated with 10⁻⁵M of hUII, URP or Ang II for 5 minutes. Cells were then rinsed twice with ice-cold PBS and homogenized in 0.5 mL of lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerolphosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg.mL⁻¹ leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) at 4°C. Insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min. The extract was treated with Laemmli sample buffer and heated for 5 min at 95°C. Aliquots were assayed for protein concentration (BioRad) and an equal amount of total protein was subjected to 10% SDS–PAGE, followed by transfer to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked and then probed with primary antibody (phospho-p44/42 MAPK) at the optimal dilution (1/2000) with gentle agitation overnight at 4°C. After washing with TBST, membranes were then incubated with secondary antibody, conjugated with horseradish peroxidase (anti-rabbit HRP) diluted in TBST containing 5% skim milk (w/v) for 1 h at room temperature. Immunoreactive species were visualized by enhanced chemiluminescence using X-ray film and Thermo Scientific™ SuperSignal™ chemiluminescent substrates according to the manufacturer's instructions. Films were digitized and the intensity of the immunoreactive bands determined using Quantity One software from Bio-Rad. To confirm equal protein loading in individual lanes, the membrane was stripped and reprobed with antibody against total ERK1/2 (diluted 1:5000).

Data Analysis

Binding and functional experiments were performed at least in triplicate and data, expressed as mean ± S.E.M, were analyzed with the Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In all experiments, n represents the total number of animals studied or individual assays performed. EC₅₀, pEC₅₀, pIC₅₀ as well as E_{max} values were determined from corresponding concentration-response

curves obtained through a sigmoidal dose-response fit with variable slope. Statistical differences were calculated by the unpaired two-tail t-test and differences were considered significant when *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001.

6.4 RESULTS

Physical Interaction of hUT with AT1R

To investigate potential interactions between hUT and hAT1R, co-immunoprecipitation assays were performed in HEK 293 cells co-expressing both receptors. In cells co-transfected with both receptors, hUT and hAT1R were individually detected using anti-hUT and anti-Flag antibodies, respectively (Figure 1A, input). Cell lysates from HEK 293 cells co-expressing both receptors were then precipitated using antibodies directed against the Flag tag located at the N-terminus of hAT1R. Pull downs were then tested for hUT presence using monoclonal anti-hUT antibody (Figure 1A). The immunoreactivity of each receptor was observed at the appropriate molecular weight (~42-43 kDa for hUT and Flag-hAT1R) after being subjected to polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions. This experiment, performed in the absence of ligands, showed that formation of such complexes is constitutive. To support our results, BRET saturation experiments were performed using hUT-RLucII and hAT1R-mTur (Figure 1B-C). Keeping hUT-RLucII transfection constant (75 ng), cells were transfected with increasing amounts of hAT1R-mTur (Figure 1B). As seen in Figure 1B, increasing the acceptor plasmid increased BRET at 530 nm and reach a plateau when 150 ng of acceptor plasmid was transfected with 75 ng of hUT. Using non saturating condition (75 ng of hUT-RLucII (donor) and 75 ng of hAT1R-mTur (acceptor)), we observed that the treatment of HEK 293 cells co-expressing both receptors with hUII, URP or Ang II (10⁻⁷M) increased the netBRET compared to untreated cells (*P < 0.001, Figure 1C). This may indicate that ligand binding stabilizes the hUT-hAT1R heterodimer.

Interaction of hUT with AT1R does not alter the binding ability of their respective ligands

Using saturation binding assays, we next evaluated how the formation of hUT-hAT1R complexes modulates the binding affinity of each endogenous ligand. As shown in Table 1, the presence of hAT1R do not affect hUII binding (K_d = 92 ± 13 pM for hUT vs 90 ± 9 pM for hUT-hAT1R) or

URP ($K_d = 210 \pm 22$ pM for hUT vs 199 ± 26 pM for hUT-hAT1R) binding affinity (Table 1). Similar observations were made in cells expressing only hAT1R or co-expressing both receptors, when treated with Ang II ($K_d = 152 \pm 38$ pM for hAT1R vs 124 ± 12 pM for hUT-hAT1R). No changes in B_{max} values were noticed in these different conditions. All together, these data suggest that the physical interaction between hUT and hAT1R does not impact the binding affinity of their respective ligands.

Allosteric interactions between hUT and hAT1R

To understand the nature of interactions between hUT and AT1R, we next studied how the presence of unliganded and liganded hUT modulated the conformational dynamics of hAT1R using FAsH BRET-based conformational biosensors. To generate these hAT1R conformation-sensitive biosensors, a FAsH binding tetracysteine tag was introduced by mutagenesis into the intracellular loop 3 (ICL3) or the C-terminal tail of hAT1R along with RLucII at the distal end of its C-terminus [17]. This assay reports on conformational rearrangements induced in response to ligand stimulation or partner interactions. We expressed in HEK 293 cells hAT1R-ICL3-RLucII and hAT1R-C-tail-RLucII without (Figure 2A) or with wild-type hUT (Figure 2B). When expressed alone, both hAT1R constructs showed a significant BRET response following Ang II stimulation compared to vehicle (Figure 2A). Unsurprisingly, no effect on AT1R conformation was observed with hUII or URP, the two cognate ligands for hUT in the absence of hUT (Figure 2A). However, when cells co-expressed the AT1R conformational biosensors and hUT, Ang II-induced conformational changes in both hAT1R constructions were reduced, demonstrating that the presence of unliganded hUT modulated Ang II-mediated conformational changes in hAT1R (Figure 2B). Stimulation of hUT with hUII or URP elicited no further effects on hAT1R conformation. Together, these results suggest that hUT allosterically modulates hAT1R, potentially altering structural changes induced by the binding of Ang II.

hUT-AT1R heterodimerization modulates hUT and hAT1R activation

To determine the functional consequence of hUT and hAT1R heterodimerization, we evaluated how the presence of unliganded hAT1R modulates hUT-mediated signaling using BRET-based biosensors. In HEK 293 cells expressing equivalent levels of hAT1R and hUT (see Table 1), we observed that the presence of unliganded AT1R significantly modulate, albeit to different extend,

the potency and efficacy of hUII to trigger Gq, G13, and Gi (Figure 3A and 3B; Table 2). Indeed, while the presence of hAT1R significantly increased potency of hUII for activation of Gq ($pEC_{50} = 7.40 \pm 0.08$ vs 8.04 ± 0.09 , $**P < 0.01$) and G13 ($pEC_{50} = 8.53 \pm 0.24$ vs 9.37 ± 0.28 , $**P < 0.01$), it significantly reduced the ability of hUT to activate Gi ($pEC_{50} = 7.76 \pm 0.11$ vs 6.54 ± 0.19 , $**P < 0.01$). In all cases, the presence of hAT1R reduced hUII efficacy by almost 15% (Table 2). When examining β -arrestin 1 and 2 recruitment, the presence of unliganded hAT1R did not alter hUII potency, but surprisingly increased the extent of β -arrestin 1 recruitment ($E_{max} = 100 \pm 4$ vs 144 ± 6) and to a lesser extent β -arrestin 2 as well (Figure 4, Table 2). Simply the presence of unliganded AT1R increased the efficacy of hUII to promote recruitment of β -arrestin 1 by 50% (Table 2).

Similar experiments were also performed to evaluate the impact of unliganded hUT on Ang II-mediated signaling. Again, in HEK 293 cells expressing hAT1R and hUT, the presence of unliganded hUT had no effect on potency of Ang II to mediate G13 activation ($pEC_{50} = 6.82 \pm 0.16$ vs 6.99 ± 0.30) but altered the potency of Ang II to activate Gq and Gi (Table 2). Indeed, while the presence of hUT significantly reduced the potency of Ang II to mediate Gq activation ($pEC_{50} = 8.34 \pm 0.13$ vs 7.61 ± 0.17), it modestly increased Ang II-mediated Gi activation ($pEC_{50} = 6.41 \pm 0.12$ vs 6.87 ± 0.11). In terms of efficacy, the presence of hUT significantly reduced Ang II efficacy by 50% (Gq and G13) and 15% (Gi) (Table 2). For β -arrestin 1 and 2 recruitment, the presence of unliganded hUT had little effect on Ang II potency for β -arrestin 1 recruitment but in contrast altered the potency to recruit β -arrestin 2 ($pEC_{50} = 8.03 \pm 0.14$ vs 6.98 ± 0.15). Once again, much like for G protein activation, unliganded hUT significantly reduced the efficacy of hUII to promote β -arrestin 1 and 2 recruitment, respectively (Figure 4, Table 2). It is important to mention that neither hUII and Ang II were able to stimulate the other receptor when expressed alone (Figure 3; Table 2). We next examined how two distal outputs, i.e. DAG and ERK1/2, were affected by the putative hUT-AT1R complex. As shown in Figure 5, unliganded AT1R or hUT had no effect on the potency of either hUII- or Ang II to mediate DAG production (Figure 5, Table 2). While unliganded hUT drastically reduced the efficacy ($E_{max} = 108 \pm 5$ vs 43 ± 2) of Ang II to mediate DAG production, unliganded hAT1R has negligible effects on hUII efficacy (Figure 5, Table 2). Finally, as shown in Figure 6, Ang II- and hUII-associated ERK1/2 phosphorylation was significantly increased in the presence of unliganded partner (Figure 6). Activation of the hUT-hAT1R complex by hUII modestly potentiated hUII-associated ERK1/2 phosphorylation observed upon activation of hUT only.

However, Ang II produced a striking 3-fold higher ERK1/2 phosphorylation when activating hUT/hAT1R compared to hAT1R alone.

Functional selectivity of hUII and URP in the presence of unliganded hAT1R

In recent years, several reports highlighted the functional selectivity of hUII and URP, both ligands probably stabilize different hUT conformations through distinct interactions with the receptor [20]. We next investigated if unliganded hAT1R could differentially modulate URP compared to hUII. In contrast with what was observed with hUII, the unliganded AT1R did not alter URP potency or efficacy to mediate Gq activation (Table 3, Figure 7). However, it increased, to a greater extent than hUII (Table 2), the potency ($pEC_{50} = 7.55 \pm 0.17$ vs 9.61 ± 0.45) of URP to activate G13 while drastically reducing (up to 80%) its efficacy, something not observed with hUII (Table 3). Finally, much like for hUII, unliganded the AT1R modestly decreased URP potency to activate Gi, but in contrast to hUII, had no effect on efficacy (Table 3). Interestingly, while activation of hUT-hAT1R by hUII did not alter the potency of hUII to recruit β -arrestin 1 and 2 although efficacy was better. Stimulation of this complex by URP increased the potency to recruit β -arrestin 1 ($pEC_{50} = 6.60 \pm 0.23$ vs 8.45 ± 0.23) and 2, albeit to a lesser extent ($pEC_{50} = 7.19 \pm 0.09$ vs 7.72 ± 0.11), with no significant effect on efficacy (Table 3, Figure 7). Next, while the presence of hAT1R has only a marginal effect of the potency and efficacy of hUII to trigger, it significantly increases the efficacy but not the potency of URP to produce DAG ($E_{max} = 108 \pm 5$ vs 43 ± 2 , Table 3). Finally, much like hUII, the presence of unliganded hAT1R did not affect URP-mediated ERK1/2 phosphorylation (data not shown). Altogether, these results suggest that the presence of hAT1R altered the functional selectivity of hUII and URP [21, 22], which could be linked to specific outcomes mediated by the heterodimer.

6.5 DISCUSSION

An expanding cohort of GPCRs, including hAT1R and hUT, has been shown to influence cardiac remodeling, including hypertrophy, fibrosis and survival [23-25]. Further increasing the complexity of hAT1R and hUT molecular and cellular pharmacology, previous reports suggested that the angiotensinergic and urotensinergic systems modulate biological activity associated with either receptor [9-12, 26]. These observations prompted us to investigate the possibility this molecular crosstalk was mediated via allosteric interactions between hAT1R and hUT, positing a unique role for these complexes in cardiovascular physiology and pathophysiology.

Several heteromers involving cardiovascular GPCRs such as the AT1R and the apelin receptor [27], the β 2-adrenergic receptor [28], the bradykinin B2 receptor [29] and the prostaglandin F₂ α receptor (FP) [17, 30] have been identified. However, allosteric regulation through heterodimerization of hAT1R and hUT has never been described. Here, we demonstrated an interplay between both systems that creates a novel pharmacological entity in terms of receptor binding, signaling, and biological activity that could be ultimately exploited for therapeutic intervention.

The first part of this study was focused on demonstrating the physical interactions between both receptors using complementary approaches. Using HEK 293 cells transiently co-expressing both receptors, we were able to immunoprecipitate FLAG-AT1R using a monoclonal anti-FLAG antibody to pull down associated hUT. These data support the idea that hUT and AT1R may form a heteromeric protein complex. However, cell disruption and protein solubilization can generate artefactual aggregation despite rigorous controls. Therefore, to support and confirm the existence of this heterodimer, we used two previously reported hAT1R FAsH BRET-based conformational biosensors [17]. This approach has notably been used to capture biased allosterism in FP, ligand bias in hAT1R and allostery between GPCR dimers [17, 31, 32] In the present work, using hAT1R FAsH-BRET-based conformational biosensors (ICL3-P3 and C-tail) transiently transfected in HEK 293 cells, we observed that the presence of unliganded hUT was sufficient to alter the conformational dynamics of hAT1R driven by Ang II. Interestingly, occupation of hUT with either of its endogenous ligands, i.e. hUII or URP, did not further modulate hAT1R conformational dynamics following activation by Ang II. However, as suggested in Figure 1C, these ligands as well as Ang II seem to stabilize the hAT1R-hUT complex or promote the subsequent formation of hUT-hAT1R. Besides, the existence of hUT-hAT1R complexes in the absence of ligand stimulation suggests that the formation of this heterodimer is agonist-independent but more likely assembled in

the endoplasmic reticulum or exists in a monomer-dimer equilibrium as previously demonstrated [33, 34]. While some studies report that heterodimers are formed in ligand-dependent manner [35], our study indicates that this GPCR pair is constitutively formed prior to surface trafficking or agonist binding [36]. However, stimulation of one the protomer forming the dimer alter the stability of hUT-hAT1R or change the overall conformation of the complex. Altogether, these results show an allosteric connection between hUT and hAT1R that could alter pharmacological and functional outcomes compared to when each receptor is expressed alone.

Next, we investigated the propensity of each receptor to modulate the binding affinity of the endogenous of the second protomer forming the heterodimer through lateral allosterism. Interestingly, despite a physical interaction between the two receptors, no changes in binding affinity or membrane expression have been observed compared to when each receptor is expressed alone. However, their interactions had significant consequences for AT1R and hUT downstream signaling.

Globally, the sole presence of hUT left mostly unaffected Ang II potency to trigger G13, Gi, DAG, and β -arrestin 1 but significantly reduced efficacy (Table 2). Interestingly, hUT drastically reduced the potency and efficacy of Ang II to promote Gq activation and β -arrestin 2 recruitment. While no parallel can be drawn with previously reported results obtained in tissue preparations and vascular cells due to differences in cellular context, our results suggest that hUT could act as a negative regulator of hAT1R signaling. As previously reported, various physiological responses appear to be mediated by hAT1R heterodimerization with other cardiovascular receptors [8], including the apelin receptor [27], the β 2-adrenergic receptor [28], the bradykinin B2 receptor [29], and FP [17, 30]. In all cases, receptor heterodimerization resulted in altered signaling profiles and differential physiological responses. For instance, AT1R-B2R (B2R: récepteur de Bradakynine 2) heterodimerization has been implicated in preeclampsia where it increases Ang II-mediated vasoconstriction leading to reduced blood flow in maternal organs and as consequence increases the risk of multi-organ dysfunction [29, 37, 38]. Also, as reported, AT1R can heterodimerize with AT2R in rat fetal fibroblasts [39]. This interaction results in the inhibition of the inositol phosphate production through AT1R, leading to a lower AT1R response [39]. Interestingly, decrease of AT1R/AT2R heterodimerization in myometrial tissue of pregnant women was correlated with increased Ang II responsiveness [39]. In the present study, Gq activation, which is associated with profibrogenic, hypertrophic, and vasocontractile cardiovascular actions [40], was reduced which

could alter how the events are modulated *in vivo*. Associated with the reduced ability of Ang II to promote β -arrestin recruitment, this could be ultimately linked to reduced internalization of these complexes and altered signaling responses.

Interestingly, hAT1R did not have the same effect on hUT activation mediated by hUII, suggesting that their mutual effects on one another may be asymmetric in nature. Indeed, the presence of hAT1R potentiated hUII potency but not its efficacy to activate Gq and G13, two G proteins involved in hUT profibrogenic and hypertrophic effects [25, 41-43]. At the same time, hAT1R did not alter hUT potency for β -arrestin recruitment but increased efficacy which could promote more robust internalization of these complexes. Whether such action promotes β -arrestin-dependent signaling or just recycling/degradation will require further studies.

The urotensinergic system involves two endogenous ligands that have been described as functionally selective over the years [20]. Notably, it seems that both hUII and URP, by interacting in a specific manner with hUT [21, 22], trigger common but also distinct biological and physiological outcomes. How such functional selectivity will be affected in hUT-hAT1R complex was also investigated in the present study. Unlike what was observed with hUII following the activation of hUT-hAT1R, URP-mediated Gq activation was similar compared to when hUT was expressed alone. However, while the presence of hAT1R significantly increased the potency of hUII to activate G13 without altering its efficacy, the potency of URP to activate this G protein was also significantly increased but accompanied by a drastic reduction in efficacy. A similar impact of hAT1R on Gi activation was observed for both peptides following activation of their cognate receptors. As previously reported, hUII and URP can promote aortic ring contraction through Gq and G13 and their respective secondary messengers, i.e. DAG and Rho. In the presence of hAT1R, the ability of hUII to promote the production of DAG remains unchanged compared to hUT activation alone. However, when hUT, in complex with hAT1R, was activated by URP, the signalling dynamics of URP to promote DAG production were altered. It has been demonstrated that ligand-bound receptor affects not only receptor conformation but also alters G protein behavior which in turn alters downstream signaling [44]. Finally, while in the presence of hAT1R, hUII efficacy but not potency to promote β -arrestins was increased, URP potency but not efficacy was significantly modified by the presence of AT1R, highlighting again differences between hUII and URP-mediated effects, further strengthening the notion of distinct functions for hUII and URP in cardiovascular disease. Interestingly, hUII, but not URP, significantly reduced APOA1-dependent

cholesterol efflux in M2-macrophages and ABCA1 protein expression in human aortic valve interstitial cells, increased β -catenin nuclear localization and promoted cell mineralization [45]. In patients with acute heart failure, a significant raise in hUII and URP plasma levels was observed but surprisingly, plasma URP concentration was almost 10 times higher than that of hUII, suggesting differential processing of their precursors under pathological conditions [46]. Also, in spontaneously hypertensive rats, expression of URP and UT, but not of UII, was up regulated [47]. These studies suggest that UII and URP may have distinct pathophysiological roles and could be linked to specific diseases or associated with specific steps in the pathogenesis and progression of a disease.

6.6 CONCLUSIONS

Whether or not hUT could represent, like hAT1R, a signaling hub and focal point of receptor cross-talk remains to be demonstrated. Because hUT and hAT1R are both critical for cardiovascular homeostasis, their mutual interaction may serve specific roles in the progression of cardiovascular diseases where both receptors have been implicated alone. For instance, heterodimerization of AT1R with B2R improves Ang II hypersensitivity leading to an increase activation of Gq and Gi but reduced endocytosis, playing an essential role in the evolution of diseases such as preeclampsia [29, 37, 38]. Assembly of hUT with hAT1R might be important for allosteric modulations of signaling outcomes associated with specific hardwired signaling complexes in healthy and disease states. More knowledge is needed to validate the potential of such complexes as therapeutic targets and to promote the design of compounds that modulate the heterodimer functions selectively.

Acknowledgments

We thank the Canadian Institutes of Health Research (CIHR - PJT-168839) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC - RGPIN-2015-04848) for funding. H.N. holds a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec - Santé. T.E.H. is the holder of the Canadian Pacific Chair in Biotechnology.

Conflicts of interest

None

6.7 FIGURES

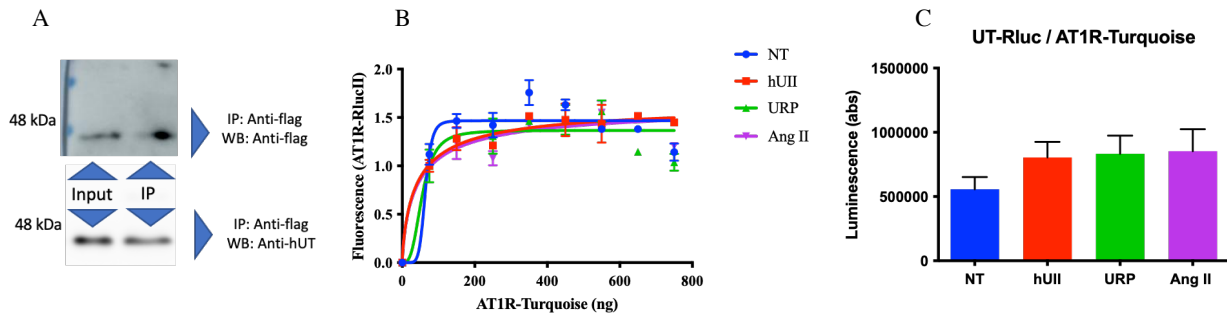


Figure 1. hUT and hAT1R forms heterodimers in HEK 293 cells.

(A) Representative western blot of co-immunoprecipitation experiments using anti-Flag (IP) and anti-hUT detection in whole cell lysate (input) and following AT1R immunoprecipitation using anti-Flag (IP). Data are representative of 3 experiments. (B) BRET saturation experiments. netBRET was determined using HEK 293 cells transiently transfected with a fixed amount of hUT-RLucII donor plasmid (75ng) and increasing amounts of hAT1R-mTurceptor plasmid. BRET signals were obtained by calculating the ratio of the light intensity emitted by hAT1-mTur over the light intensity emitted by hUT-RLucII. The net BRET ratio was calculated by subtracting only the donor BRET ratio from the donor to acceptor BRET ratio. (C) Impact of ligand binding on the formation of hUT-hAT1R complexes. Using non saturating conditions (75 ng of hUT-RLucII (donor) and 75 ng of hAT1R-mTur (acceptor)), netBRET fold change in the presence or absence of hUII, URP, and Ang II was measured and compared to untreated cells (* $P \leq 0.05$).

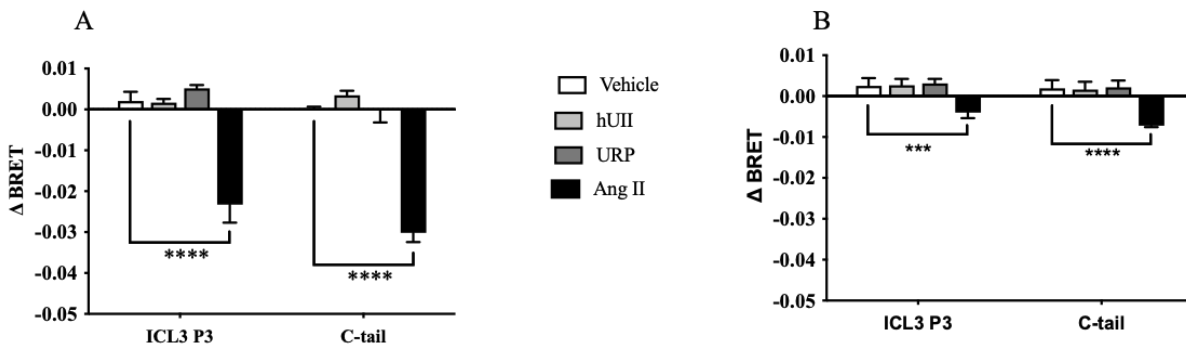
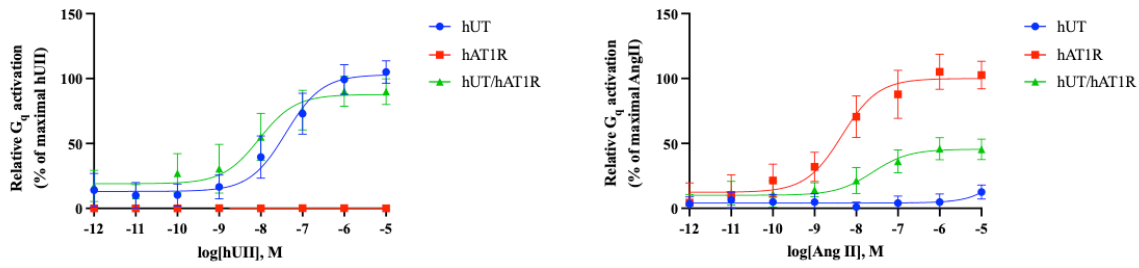


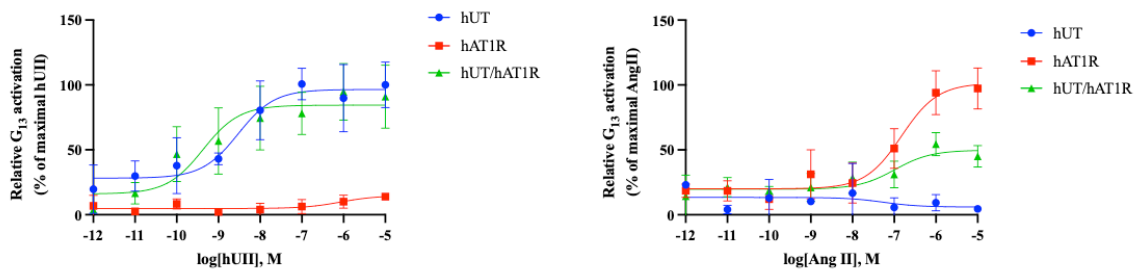
Figure 2. FLAsH-BRET-based conformational biosensors.

(A) Changes in BRET signals following treatment of AT1R ICL3 and C-tail conformational biosensors with Ang II, hUII or URP. (B) Changes in BRET signal following treatment of AT1R ICL3 and C-tail conformational biosensors with Ang II, hUII or URP in the presence of hUT. Asterisks represent ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

A



B



C

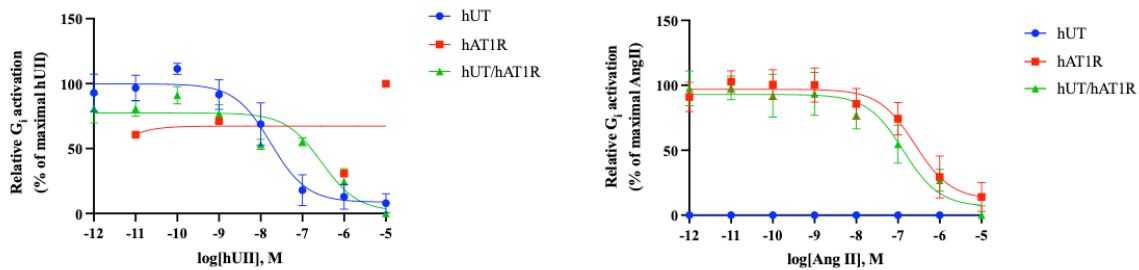
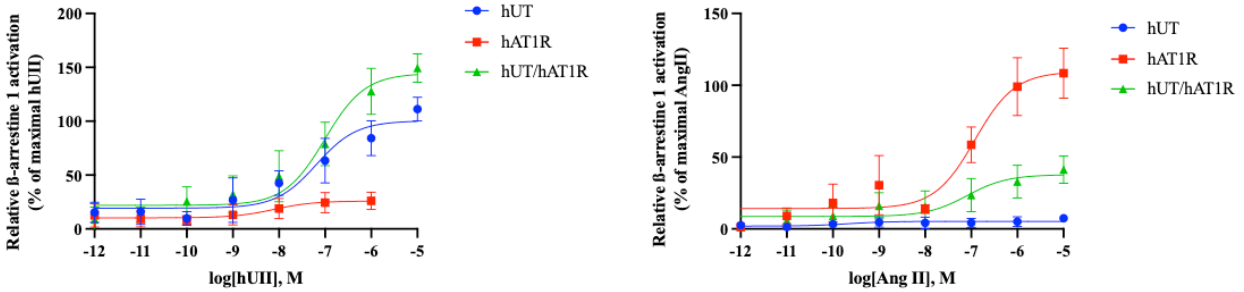


Figure 3. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon hUII or Ang II activation.

BRET measurements related to G_q , G_{13} , and G_i activation were performed following hUT, AT1R or hUT-hAT1R stimulation with increasing concentrations of hUII or Ang II in HEK 293 cells. The data are normalized to maximal hUII or Ang II responses (10^{-5} M). Each curve represents the mean \pm SEM of at least three independent concentration-response experiments performed in triplicate.

A



B

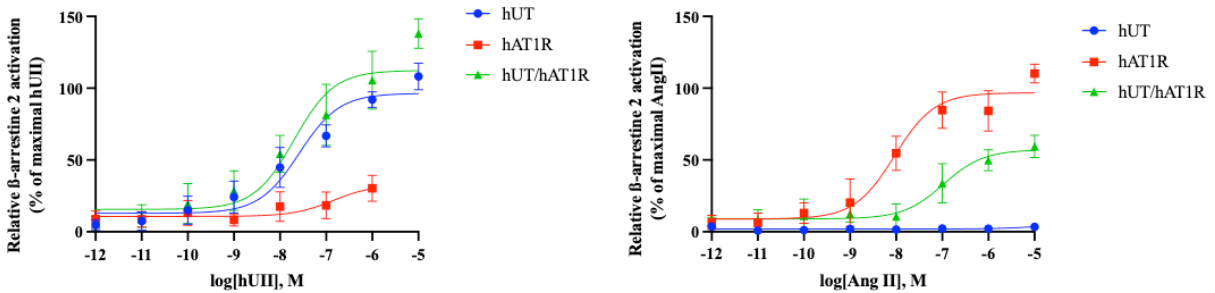
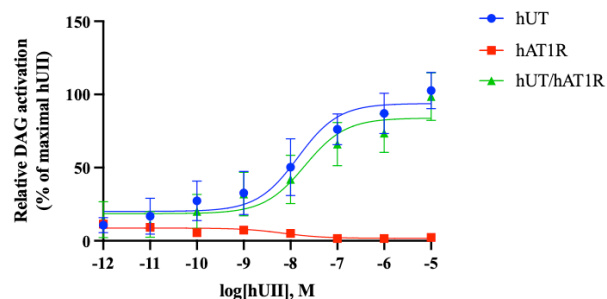


Figure 4. Impact of hUII and Ang II on hUT-hAT1R-mediated β -arrestin recruitment.

BRET measurements related to β -arrestin 1 and β -arrestin 2 recruitment were performed following hUT, AT1R or hUT-AT1R stimulation with increasing concentrations of hUII or Ang II in HEK 293 cells. The data are normalized to maximal hUII or AngII responses (10-5M). Each curve represents the mean \pm SEM of at least three independent concentration-response experiments performed in triplicate.

A



B

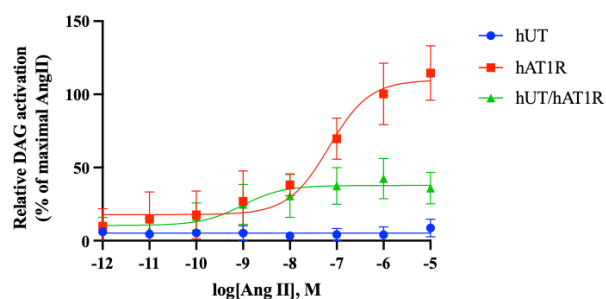


Figure 5. Effect of hUT-hAT1R activation by hUII and AngII on DAG production.

BRET measurements related to DAG production were performed following hUT, AT1R or hUT-AT1R stimulation with increasing concentrations of hUII or Ang II in HEK 293 cells. The data are normalized to maximal hUII or Ang II responses (10⁻⁵M). Each curve represents the mean ± SEM of at least three independent concentration-response experiments performed in triplicate.

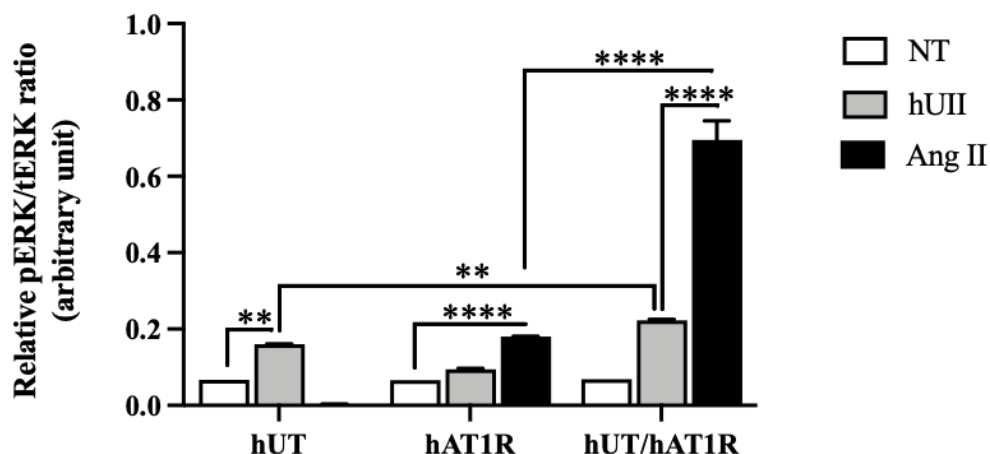


Figure 6. ERK1/2 phosphorylation following hUT, hAT1R or hUT-hAT1R activation.

hUT, AT1R and UT/AT1R mediated ERK1/2 phosphorylation was evaluated by western blot following hUII or Ang II treatment (10⁻⁵M). Statistical comparisons were analyzed by the two-way ANOVA, and differences were considered significant where **P < 0.01, or ***P < 0.001.

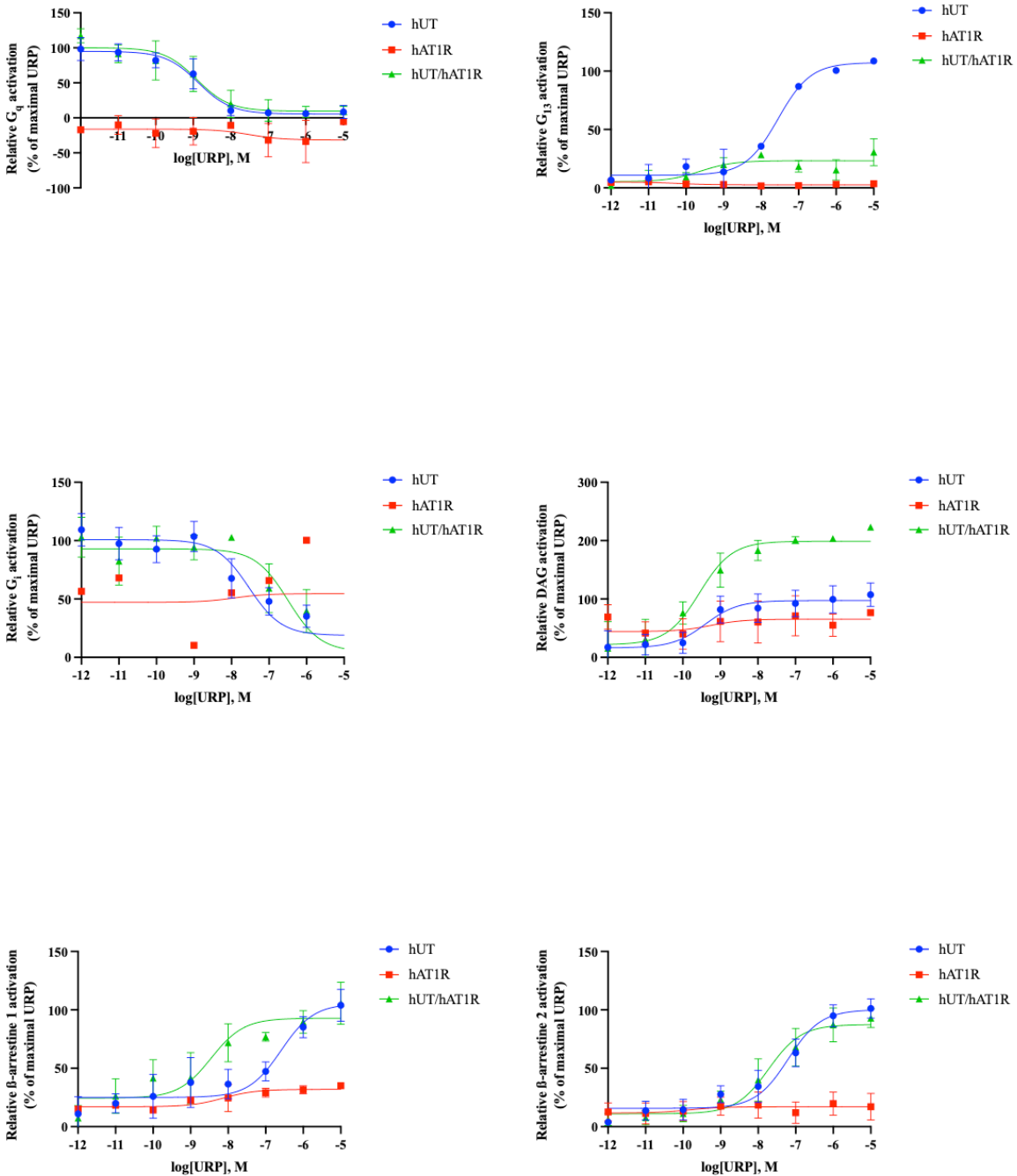


Figure 7. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon URP activation.

BRET measurements related to G_q, G₁₃, and G_i activation, DAG production and β-arrestin 1 and 2 recruitment were performed following hUT, AT1R or hUT-AT1R stimulation with increasing concentrations of URP in HEK 293 cells. The data are normalized to maximal URP responses (10-5M). Each curve represents the mean ± SEM of at least three independent concentration-response experiments performed in triplicate.

6.8 TABLES

Table 1. Saturation binding parameters.

	Radioligand ^a					
	¹²⁵ I-hUII		¹²⁵ I-URP		¹²⁵ I-Ang II	
	K _d (pM)	B _{max}	K _d (pM)	B _{max}	K _d (pM)	B _{max}
hUT	92 ± 13	112 ± 6	210 ± 22	120 ± 4	-	-
hAT1R	-	-	-	-	152 ± 38	110 ± 9
hUT-hAT1R	90 ± 8	110 ± 3	199 ± 26	107 ± 4	124 ± 12	107 ± 4

^aEach experiment (n = 4-6) was conducted on different cellular passages. GraphPad Prism5 was used to calculate K_d and B_{max}.

Table 2. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon hUII or Ang II activation.

hUII	hUT		hAT1R		hUT-hAT1R	
	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)
Gα _q	7.40 ± 0.08	103 ± 3	-	-	8.04 ± 0.09**	88 ± 2*
Gα ₁₃	8.53 ± 0.24	96 ± 5	-	-	9.37 ± 0.28**	84 ± 5
Gα _i	7.76 ± 0.11	91 ± 4	-	-	6.54 ± 0.19**	76 ± 7
DAG	7.84 ± 0.11	94 ± 3	-	-	7.70 ± 0.14	84 ± 3
β-arrestin 1	7.19 ± 0.15	100 ± 4	-	-	7.00 ± 0.11	144 ± 6**
β-arrestin 2	7.58 ± 0.09	96 ± 3	-	-	7.70 ± 0.12	112 ± 5*
Ang II	hUT		hAT1R		hUT-hAT1R	
	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)
Gα _q	-	-	8.34 ± 0.13	100 ± 3	7.61 ± 0.17*	46 ± 2***
Gα ₁₃	-	-	6.82 ± 0.16	101 ± 6	6.99 ± 0.30	50 ± 4**
Gα _i	-	-	6.41 ± 0.12	100 ± 4	6.87 ± 0.11*	86 ± 4
DAG	-	-	7.87 ± 0.12	108 ± 5	7.72 ± 0.23	43 ± 2***
β-arrestin 1	-	-	6.92 ± 0.16	110 ± 6	7.09 ± 0.23	38 ± 3***
β-arrestin 2	-	-	8.03 ± 0.14	97 ± 3	6.98 ± 0.15**	57 ± 3***

^apEC₅₀: -log EC₅₀. ^bThe maximum efficacy was expressed as a percentage of activation induced by hUII or Ang II (10⁻⁵M). All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using multiple t-tests, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001 versus values obtained for hUII or Ang II. Each replicate (n) was conducted on tissue from at least 3 different cellular passages. (-) indicates that we were unable to calculate a value.

Table 3. Functional characterization of hUT-hAT1R heterodimers upon URP activation.

URP	hUT		hAT1R		hUT-hAT1R	
	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	pEC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)
Gα _q	8.89 ± 0.09	100 ± 2	-	-	8.91 ± 0.14	96 ± 4
Gα ₁₃	7.55 ± 0.17	107 ± 5	-	-	9.61 ± 0.45***	23 ± 2***
Gα _i	7.54 ± 0.16	89 ± 5	-	-	6.72 ± 0.16**	97 ± 7
DAG	9.40 ± 0.21	97 ± 4	-	-	9.56 ± 0.15	199 ± 9***
β-arrestin 1	6.60 ± 0.23	105 ± 6	-	-	8.45 ± 0.23***	93 ± 5
β-arrestin 2	7.19 ± 0.09	100 ± 3	-	-	7.72 ± 0.11	87 ± 3

^apEC₅₀: -log EC₅₀. ^bThe maximum efficacy was expressed as a percentage of activation induced by URP (10⁻⁵M). All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using unpaired Student's t tests, **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, ****P* ≤ 0.001, versus values obtained for URP. Each replicate (n) was conducted on tissue from at least 3 different cellular passages. (-) indicates we were unable to calculate a value.

6.9 REFERENCES

1. Luttrell, L.M., Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol*, 2008. 39(3): p. 239-64.
2. Ferre, S., et al., Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol*, 2009. 5(3): p. 131-4.
3. Parker, M.S., et al., Dimers of the neuropeptide Y (NPY) Y2 receptor show asymmetry in agonist affinity and association with G proteins. *J Recept Signal Transduct Res*, 2008. 28(5): p. 437-51.
4. Maryanoff, B.E. and W.A. Kinney, Urotensin-II receptor modulators as potential drugs. *J Med Chem*, 2010. 53(7): p. 2695-708.
5. Vaudry, H., et al., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCII. Urotensin II, urotensin II-related peptide, and their receptor: from structure to function. *Pharmacol Rev*, 2015. 67(1): p. 214-58.
6. Gruson, D., et al., Raised plasma urotensin II in type 2 diabetes patients is associated with the metabolic syndrome phenotype. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2010. 12(8): p. 653-60.
7. Gruson, D., et al., Urotensin II induction of adult cardiomyocytes hypertrophy involves the Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Peptides*, 2010. 31(7): p. 1326-33.
8. Toth, A.D., et al., Novel mechanisms of G-protein-coupled receptors functions: AT1 angiotensin receptor acts as a signaling hub and focal point of receptor cross-talk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2018. 32(2): p. 69-82.
9. Chiu, C.Z., B.W. Wang, and K.G. Shyu, Angiotensin II and the JNK pathway mediate urotensin II expression in response to hypoxia in rat cardiomyocytes. *J Endocrinol*, 2014. 220(3): p. 233-46.
10. Fontes-Sousa, A.P., et al., Urotensin II-induced increase in myocardial distensibility is modulated by angiotensin II and endothelin-1. *Physiol Res*, 2009. 58(5): p. 653-660.
11. Wang, Y.X., et al., Role of PKC in the novel synergistic action of urotensin II and angiotensin II and in urotensin II-induced vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 292(1): p. H348-59.
12. Ahmed, A.H. and I.M. Maulood, Endothelin-1 and angiotensin-II modulate urotensin-II vasoconstriction in rat aorta exposed to mercury. *Bratisl Lek Listy*, 2018. 119(7): p. 444-449.
13. Chatenet, D., et al., Development and pharmacological characterization of conformationally constrained urotensin II-related peptide agonists. *J Med Chem*, 2013. 56(23): p. 9612-22.
14. Tadevosyan, A., et al., Photoreleasable ligands to study intracrine angiotensin II signalling. *J Physiol*, 2015. 593(3): p. 521-39.
15. Chatenet, D., et al., Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides*, 2004. 25(10): p. 1819-30.
16. Devost, D., et al., Conformational Profiling of the AT1 Angiotensin II Receptor Reflects Biased Agonism, G Protein Coupling, and Cellular Context. *J Biol Chem*, 2017. 292(13): p. 5443-5456.
17. Sleno, R., et al., Conformational biosensors reveal allosteric interactions between heterodimeric AT1 angiotensin and prostaglandin F2 α receptors. *J Biol Chem*, 2017. 292(29): p. 12139-12152.
18. Pflieger, K.D. and K.A. Eidne, Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods*, 2006. 3(3): p. 165-74.

19. Cao, Y., Y. Namkung, and S.A. Laporte, Methods to Monitor the Trafficking of beta-Arrestin/G Protein-Coupled Receptor Complexes Using Enhanced Bystander BRET. *Methods Mol Biol*, 2019. 1957: p. 59-68.
20. Nassour, H., M. Iddir, and D. Chatenet, Towards Targeting the Urotensinergic System: Overview and Challenges. *Trends Pharmacol Sci*, 2019. 40(10): p. 725-734.
21. Brancaccio, D., et al., An investigation into the origin of the biased agonism associated with the urotensin II receptor activation. *J Pept Sci*, 2015. 21(5): p. 392-9.
22. Chatenet, D., et al., Discovery of new antagonists aimed at discriminating UII and URP-mediated biological activities: insight into UII and URP receptor activation. *Br J Pharmacol*, 2013. 168(4): p. 807-21.
23. Belmonte, S.L. and B.C. Blaxall, Conducting the G-protein Coupled Receptor (GPCR) Signaling Symphony in Cardiovascular Diseases: New Therapeutic Approaches. *Drug Discov Today Dis Models*, 2012. 9(3): p. e85-e90.
24. Salazar, N.C., J. Chen, and H.A. Rockman, Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1768(4): p. 1006-18.
25. Tzanidis, A., et al., Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res*, 2003. 93(3): p. 246-53.
26. Shyu, K.G., et al., Angiotensin II mediates urotensin II expression by hypoxia in cultured cardiac fibroblast. *Eur J Clin Invest*, 2012. 42(1): p. 17-26.
27. Siddiquee, K., et al., The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br J Pharmacol*, 2013. 168(5): p. 1104-17.
28. Barki-Harrington, L., L.M. Luttrell, and H.A. Rockman, Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation*, 2003. 108(13): p. 1611-8.
29. Wilson, P.C., et al., The arrestin-selective angiotensin AT1 receptor agonist [Sar1,Ile4,Ile8]-AngII negatively regulates bradykinin B2 receptor signaling via AT1-B2 receptor heterodimers. *J Biol Chem*, 2013. 288(26): p. 18872-84.
30. Goupil, E., et al., Angiotensin II type I and prostaglandin F2alpha receptors cooperatively modulate signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2015. 290(5): p. 3137-48.
31. Bourque, K., et al., Distinct Conformational Dynamics of Three G Protein-Coupled Receptors Measured Using FLAsH-BRET Biosensors. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017. 8: p. 61.
32. Sleno, R., et al., Designing BRET-based conformational biosensors for G protein-coupled receptors. *Methods*, 2016. 92: p. 11-8.
33. Kasai, R.S., et al., Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol*, 2011. 192(3): p. 463-80.
34. Terrillon, S. and M. Bouvier, Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*, 2004. 5(1): p. 30-4.
35. Percherancier, Y., et al., Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, 2005. 280(11): p. 9895-903.
36. Pflieger, K.D., R.M. Seeber, and K.A. Eidne, Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc*, 2006. 1(1): p. 337-45.
37. AbdAlla, S., H. Lothar, and U. Quitterer, AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*, 2000. 407(6800): p. 94-8.

38. Quitterer, U., et al., Beta-Arrestin1 Prevents Preeclampsia by Downregulation of Mechanosensitive AT1-B2 Receptor Heteromers. *Cell*, 2019. 176(1-2): p. 318-333 e19.
39. Kaschina, E. and T. Unger, Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*, 2003. 12(2): p. 70-88.
40. Yamazaki, T., I. Komuro, and Y. Yazaki, Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol*, 1999. 83(12A): p. 53H-57H.
41. Johns, D.G., et al., Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004. 370(4): p. 238-50.
42. Onan, D., et al., Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol*, 2004. 18(9): p. 2344-54.
43. Takefuji, M., et al., G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure. *Circulation*, 2012. 126(16): p. 1972-82.
44. Furness, S.G.B., et al., Ligand-Dependent Modulation of G Protein Conformation Alters Drug Efficacy. *Cell*, 2016. 167(3): p. 739-749 e11.
45. Khan, K., et al., Urotensin II, urotensin-related peptide, and their receptor in aortic valve stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019.
46. Jani, P.P., H. Narayan, and L.L. Ng, The differential extraction and immunoluminometric assay of Urotensin II and Urotensin-related peptide in heart failure. *Peptides*, 2013. 40: p. 72-6.
47. Hirose, T., et al., Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides*, 2009. 30(6): p. 1124-9.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Rôle du système urotensinergique dans la fibrose cardiaque

La fibrose cardiaque est un phénomène qui se déroule à la suite d'une dérégulation de l'homéostasie entre la dégradation et la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC), où une synthèse excessive de MEC est produite à la suite d'une lésion cardiaque. Cette dérégulation au niveau de la MEC engendre donc plusieurs autres événements. Les macrophages sont d'abord recrutés au niveau des sites de lésion où ils établissent des interactions avec les composantes de la MEC telle la fibronectine. Ces interactions amènent les macrophages à sécréter des protéases dégradant la MEC, à libérer des cytokines et à stimuler le recrutement d'autres types de cellules immunitaires telles que les leucocytes. Les fibrocytes situés au niveau du myocarde et les fibroblastes sont ensuite activés par cette réponse inflammatoire et déclenchent la production de collagène, un élément essentiel de la MEC (Zeisberg et al. 2007). L'activation de TGF- β se lie aux récepteurs du TGF- β de type I et du TGF- β de type II. Le récepteur TGF- β de type I est une kinase, et dans le cas des fibroblastes, il est appelé kinase liée à l'activine (ALK) 5. ALK5 phosphoryle Smad2 et 3 ; Smad2/3 phosphorylé se lie à Smad4, se transloque dans le noyau pour activer la transcription. TGF- β promouvoit le dépôt d'ECM en (1) régulant positivement l'ECM et les inhibiteurs tissulaires de l'expression du gène de la métalloprotéinase matricielle (TIMP) et (2) en supprimant l'expression du gène de la métalloprotéinase matricielle (MMP). Donc, TGF- β provoque la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Leask 2015). Ces derniers sont caractérisés par l'expression de différentes protéines comme l'*alpha-smooth actin*, la fibronectine et le collagène. Les myofibroblastes sont toutefois morphologiquement distincts des fibroblastes, dans le sens où ces cellules contiennent maintenant des fibres de stress qui leur permettent de se contracter (Leask 2015). Cette différenciation en myofibroblastes peut être induite par des peptides vasoactifs tels que l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (AngII) et l'urotensine II (UII) (Barnes and Gorin 2011). La contraction des myofibroblastes est un événement clé dans la guérison de la lésion fibrique et la cicatrisation de cette lésion cardiaque à la suite de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Cette différenciation est induite par l'expression de fibronectine, de l'*alpha smooth actin* et du collagène, marqueurs précoces dans le développement de la fibrose. Ces protéines sont exprimées au moment de la contraction des myofibroblastes tel qu'indiqué ci-dessus et resteront

jusqu'à la cicatrisation complète de la lésion cardiaque. La présence de myofibroblastes au site de lésion à la suite de la cicatrisation, due à une dérégulation de médiateurs tels que l'AngII, mène à la fibrose cardiaque. En effet, le système rénine-angiotensine-aldostérone joue un rôle important dans le développement de cette maladie. L'activation d'AT1R par AngII est notamment responsable de l'activation des fibroblastes (Sabri et al. 1997) et son inactivation par des inhibiteurs ou des antagonistes (comme le losartan) réduit le développement de la fibrose chez l'humain (Leask 2015). De la même manière, l'aldostérone et son récepteur minéralocorticoïde (MR) est un déterminant essentiel de la fibrose cardiaque car ils sont tous deux exprimés au niveau des macrophages et sont ainsi responsables en grande partie de l'activation de ces derniers (Usher et al. 2010). L'activation du récepteur MR via l'aldostérone conduit notamment les macrophages à surexprimer l'ostéopontine (OPN), une cytokine essentielle dans le développement de la fibrose cardiaque (Azibani et al. 2012). L'inhibition de ce système réduit aussi considérablement le développement de la fibrose cardiaque. Pour finir, le système urotensinergique joue un rôle anti-apoptotique dans cette maladie, où il augmente la viabilité cellulaire des myofibroblastes et favorise donc le développement de la fibrose.

Médiateurs clés dans le développement de la fibrose cardiaque

Tel que mentionné précédemment, les macrophages jouent un rôle important dans le développement de la fibrose cardiaque. L'infiltration des macrophages durant un stimulus chronique mène ces cellules inflammatoires à sécréter de manière continue des facteurs de croissance comme TGF β et d'autres cytokines menant ainsi au développement de la fibrose cardiaque, ce qui résulte en une perte de structure tissulaire et donc perte de la fonction cardiaque. Cette infiltration des macrophages est favorisée par la surexpression de l'enzyme ACAT-1 par hUII (Pereira-Castro, Bras-Silva, and Fontes-Sousa 2019). Fait intéressant, à la suite d'un stress au niveau cardiaque, l'OPN est surexprimée par plusieurs types cellulaires tels que les myocytes, les fibroblastes ainsi que les macrophages (Singh, Dalal, and Singh 2014). Dans les situations normales, le cœur exprime de faibles quantités d'OPN (Singh, Dalal, and Singh 2014) alors que, dans les conditions pathologiques incluant les pathologies cardiovasculaires, l'expression et la sécrétion de cette cytokine augmente considérablement (Trueblood et al. 2001). Durant le développement de la fibrose cardiaque, l'inhibition du système angiotensinergique réduit l'expression de l'OPN (Matsui et al. 2004; Qiu et

al. 2012). Également, tel qu'il en sera discuté plus tard, l'inhibition de la synthèse de l'OPN permet de prévenir la formation de la fibrose.

Contrôle signalétique de l'OPN et de l'aldostérone via le système urotensinergique

Des études ont montré que l'OPN est un facteur clé dans le processus de remodelage vasculaire (Isoda et al. 2002). Une étude intéressante réalisée en 2011 par Zhang Gang Y et al. (Zhang et al. 2011) a caractérisé le rôle de l'UII et de l'OPN dans la migration des fibroblastes et l'effet de l'UII sur le niveau d'expression de l'OPN. Dans cette étude, l'UII de rat menait à la stimulation de la migration des fibroblastes, alors que l'inhibition de l'OPN *via* un oligonucléotide anti-sens réduisait considérablement cette migration. De plus, l'UII augmentait considérablement et de manière simultanée l'expression génique de l'OPN dans les fibroblastes, cette augmentation de l'expression génique et protéique de l'OPN pouvant être inhibée par un antagoniste d'UT. L'étude a également montré que cette régulation passe par l'activation de $G\alpha_q$, des MAPK, de la Rho kinase, des canaux calciques et de la PKC.

Enfin, Li Jun et al., 2018 ont montré que l'UII stimule la sécrétion de l'aldostérone et l'expression de son récepteur MR dans les fibroblastes cardiaques. Ce même groupe a aussi montré que le système urotensinergique induit la sécrétion de facteurs proinflammatoires *via* les voies impliquées dans le contrôle de l'expression et de la sécrétion de l'OPN.

Redirection de la signalisation d'un RCPG pour une action plus précise et des effets secondaires diminués

Dans le contexte de la fibrose cardiaque, le contrôle de l'expression et de la sécrétion d'OPN semble important pour réduire la progression de la maladie. Tel que mentionné plus haut, les systèmes urotensinergique et angiotensinergique participent à la régulation de l'expression de l'OPN en activant quasiment les mêmes voies de signalisation à savoir $G\alpha_q$, des MAPK, de la Rho kinase, des canaux calciques et de la PKC. Ainsi, le développement d'outils permettant la redirection du signal du système urotensinergique et/ou angiotensinergique vers des voies autres que celles mentionnés ci-haut pourrait être un avenir très encourageant pour traiter les maladies cardiaques comme la fibrose. Cette redirection du signal pourrait aussi permettre de minimiser les effets secondaires, car,

contrairement à l'utilisation d'antagonistes, ce ne serait pas toutes les voies associées au récepteur qui seraient inhibées.

Le sujet de cette thèse portant notamment sur le développement de nouvelles stratégies permettant de rediriger le signal du système urotensinergique, nous nous sommes d'abord penchés sur la conception de pepducines dérivées des boucles intracellulaires de hUT. Les pepducines sont des petits peptides pour lesquels les séquences en acides aminés sont dérivées des séquences des boucles intracellulaires du RCPG auxquels ils sont associés. Un groupement lipidique est ensuite ajouté à ces peptides au niveau de l'extrémité N-terminale afin de leur permettre de diffuser de manière passive à travers la membrane plasmique et ainsi interagir avec le RCPG duquel elles sont dérivées (Chaturvedi et al. 2018). Suite à leur diffusion à travers la membrane plasmique, les pepducines stabilisent certains sous-ensembles de populations associés aux états conformationnels soient actifs ou inactifs du RCPG ('Pepducins: lipopeptide allosteric modulators of GPCR signaling' 2012). Par conséquent, les pepducines peuvent autant fonctionner comme agonistes allostériques que modulateurs allostériques positifs ou négatifs. Cette diversité d'action les rend très intéressantes pour l'étude de la signalisation des RCPGs comme les récepteurs aux chimiokines (Kaneider et al. 2005) et les récepteurs β -adrénergiques (Carr et al. 2014), ainsi que pour le traitement potentiel de diverses maladies, notamment les maladies inflammatoires, les pathologies cardiaques et le cancer.

Mécanisme cellulaire des pepducines dérivées de hUT

Dans le cas notre étude, deux pepducines provenant de la deuxième et troisième boucle de hUT ont été synthétisées manuellement. L'utilisation de divers biosenseurs de type BRET a permis de démontrer que hUT-Pep2 et [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 présentent un biais clair vers l'activation de $G\alpha_i$ et $G\alpha_{13}$, mais n'activent que très faiblement les voies de $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ et les β -arrestines 1 et 2. Par ailleurs, et comparativement à hUII, hUT-Pep2 et [Trp¹, Leu²] hUT-Pep3 stimulent la phosphorylation de ERK_{1/2} avec une puissance et une efficacité inférieure à celle de hUII. L'analyse plus approfondie des mécanismes permettant la phosphorylation de ERK_{1/2} à la suite de l'activation de hUT par hUT-Pep2 a montré que cette dernière était partiellement réduite après le traitement des cellules avec des inhibiteurs de PLC (U73122), $G\alpha_q$ (YM254890) et EGFR (AG1478), mais n'était pas affectée par le traitement par la toxine pertussis (PTX); Gi. Dans les mêmes conditions, les actions de hUII étaient considérablement réduites. Par conséquent, l'absence d'effet de PTX sur la phosphorylation de ERK_{1/2} semble indiquer que $G\alpha_i$ n'est pas impliqué dans ce mécanisme

contrairement à $G\alpha_q$, $G\alpha_{13}$, β -arrestine 1 et 2 ainsi que la transactivation d'EGFR. Notamment, $G\alpha_{13}$, qui est stimulé de manière puissante par hUT-Pep2 après l'activation de hUT, peut favoriser l'activation d'ERK_{1/2} et la production d'inositol *via* les GTPases, PLC ϵ , Ras et RhoA (Buch et al. 2008; Hains et al. 2006; Mariggio et al. 2006). Le faible effet inhibiteur de U73122, YM254890 et AG1478 sur la phosphorylation de ERK_{1/2} médiée par hUT-Pep2 suggère que cet effet est probablement médié par $G\alpha_{13}$. En revanche, la réduction drastique de la phosphorylation d'ERK_{1/2} induite par [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 à la suite de l'inhibition de $G\alpha_i$ ou de PLC semblait suggérer, dans un premier temps, une implication possible de $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ dans la phosphorylation d'ERK_{1/2}. L'inhibition de la PLC par U73122 peut également bloquer l'activation médiée par les récepteurs des protéines $G\alpha_i$ (Fan et al. 1998; Wu, Pei, and Fan 1998). Les RCPGs sont connus pour activer PLC, soit *via* des sous-unités liées au GTP de la classe $G\alpha_q$, soit par des dimères $G\beta\gamma$ libérés des protéines $G\alpha_i$ (Belcheva and Coscia 2002). Ainsi, l'inhibition complète de la phosphorylation de ERK_{1/2} médiée par [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, par PTX ou U73122 suggère une connection directe entre les voies de $G\alpha_q$ et $G\alpha_i$, et pourrait impliquer les sous-unités $G\beta\gamma$ de $G\alpha_i$. L'hétérodimérique $G\beta\gamma$ joue un rôle important dans le contrôle de l'activité des effecteurs à différentes localisations subcellulaires (178). Effectivement, ce complexe contrôle différents processus cellulaires, allant du système immunitaire en passant par le cœur et la migration cellulaire ainsi que par le cancer où $G\beta\gamma$ favorise le développement de métastases (Clapham and Neer 1997; Smrcka 2008). Il a ainsi été démontré que $G\beta\gamma$ a la capacité de se transloquer au niveau du noyau et d'interagir avec l'ADN polymérase II afin de contrôler l'expression de différents gènes (Khan, Sung, and Hebert 2016). À l'appui de cette hypothèse, il a été démontré que, pour obtenir une stimulation efficace de la cascade d'ERK_{1/2}, certains RCPGs nécessitent la coopération des voies médiées par $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ (Blaukat et al. 2000). Cependant, dans notre étude, l'inhibition sélective de $G\alpha_q$ avec le YM254890 n'a entraîné qu'une réduction faible de la phase précoce de la phosphorylation d'ERK_{1/2} avec une phase tardive qui était à la fois renforcée et soutenue. Les écarts entre ce résultat et celui observé avec U73122, un inhibiteur de PLC à large spectre, qui peut également bloquer la phospholipase A2 (PLA2) (Handlogten et al. 2001), peuvent s'expliquer par la propension de $G\alpha_{13}$ à déclencher la phosphorylation d'ERK_{1/2} *via* PLC ϵ et PLA2, les deux actions étant inhibées par U73122 (Mariggio et al. 2006; Hains et al. 2006). Enfin, pour expliquer l'effet observé de [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3 à la suite du traitement par YM254890, il est possible qu'en inhibant l'interaction de G_q avec hUT, un couplage différent, avec $G\alpha_{13}$ ou $G\alpha_i$ par exemple, soit favorisé amplifiant ainsi l'action médiée par

ces voies. Un changement similaire a été récemment démontré pour expliquer la variation de la sécrétion d'insuline *via* différentes incrétines (Oduori et al. 2020). En effet, il a été montré que l'inhibition du canal K_{ATP} provoquait un passage de $G\alpha_s$ à $G\alpha_q$ dans une voie importante régulant la sécrétion d'insuline, ce qui déterminait l'efficacité insulinothérapeutique relative des incrétines (Oduori et al. 2020).

Plusieurs études ont suggéré que la transactivation d'EGFR joue un rôle critique dans la réponse hypertrophique provoquée par UT dans les cardiomyocytes de rat (Esposito et al. 2011). Il est intéressant de noter qu'une telle activation a été empêchée par le knockdown des β -arrestines (Esposito et al. 2011). Cependant, comme cela a été démontré, l'absence d'activation de la protéine G empêche la signalisation de la β -arrestine (Grundmann et al. 2018). Pour disséquer le mécanisme de la translocation d'EGFR induite par hUII, hUT-Pep2 et [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, nous avons surveillé par microscopie confocale l'internalisation d'EGFR-GFP dans des cellules HEK 293-hUT transfectées. À la suite de la stimulation de hUT par les pepducines, la EGFR-GFP membranaire a été redistribuée dans les vésicules endocytiques. Le pré-traitement avec YM254890 a considérablement réduit l'internalisation de l'EGFR induite par hUII, hUT-Pep2 et [Trp¹, Leu²]hUT-Pep3, démontrant ainsi une implication de $G\alpha_q$ dans leurs réponses respectives. En se basant sur des publications antérieures (Esposito et al. 2011), il semble que, au moins pour hUII, l'internalisation de l'EGFR nécessite à la fois $G\alpha_q$ et β -arrestines. Pour les deux pepducines dérivées de hUT, une certaine quantité d'EGFR-GFP pouvait encore être visible au niveau du cytosol malgré le prétraitement avec YM254890. Sur la base de leur propension à activer $G\alpha_{13}$ et du fait que l'activation de cette protéine G peut également favoriser la transactivation de l'EGFR comme démontré pour les récepteurs de la thyrotropine et de l'acide lysophatidique (Gohla, Harhammer, and Schultz 1998; Buch et al. 2008), nous ne pouvons pas exclure que la transactivation de l'EGFR soit, au moins dans une certaine mesure, médiée par la stimulation de $G\alpha_{13}$ associée à hUT et ces pepducines.

Finalement, tel que démontré, nos deux pepducines peuvent activer la prolifération cellulaire de fibroblastes des rats néonataux probablement via l'activation des voies $G\alpha_i$ et/ou $G\alpha_{13}$, deux voies connues pour leur implication dans la prolifération des astrocytes (Jarry et al. 2010) et des cellules vasculaires lisses (Sauzeau et al. 2001), respectivement. Au niveau de la contraction des anneaux d'aorte de rats, nos deux pepducines sont capables de réduire la contraction induite par hUII et URP en inhibant probablement la voie de $G\alpha_{12}$ (car ils activent $G\alpha_{13}$ et $G\alpha_q$ mais n'active pas $G\alpha_{12}$).

Perspectives des pepducines dérivées de hUT dans le contexte de la fibrose cardiaque

Afin de prévenir/contrer la fibrose cardiaque, la plupart des efforts actuels visent à éliminer les myofibroblastes des cicatrices tissulaires pathologiques. De nouvelles stratégies et de nouveaux médicaments doivent donc être développés pour contrer spécifiquement l'action de ces derniers. À l'heure actuelle, le traitement de la fibrose cardiaque repose sur l'inhibition de l'action pléiotropique de cytokines telle que l'OPN. Malheureusement, cette stratégie présente un inconvénient important car elle affecte une multitude de cellules incluant celles impliquées dans la réparation tissulaire. La stratégie proposée lors de cette thèse est de développer des outils pour rediriger la signalisation du système urotensinergique vers des voies non impliquées dans le développement de la fibrose cardiaque. Plusieurs études ont mentionné que les antagonistes conventionnels de ce système jouent un rôle pour contrer différentes maladies comme l'hypertension artérielle pulmonaire et les problèmes cardiaques tel que la fibrose. Nos pepducines montrent une capacité d'activer spécifiquement des voies non impliquées dans le développement de la fibrose cardiaque comme la voie de $G\alpha_i$, la transactivation de la voie d'EGFR *via* $G\alpha_q/G\alpha_{13}$. Il est important de rappeler que nos deux pepducines n'activent que très faiblement $G\alpha_q$ ce qui les rend particulièrement intéressant dans ce contexte puisque l'activation de cette protéine G est directement liée à l'expression de l'OPN.

En perspective et pour faire suite à cette étude sur les pepducines, il sera intéressant d'éventuellement évaluer comment ces pepducines modulent les voies de signalisation associées à hUT en présence de hUII ou URP dans un contexte cellulaire proche de celui visé thérapeutiquement. Par ailleurs, nous avons récemment montré que hUT peut se dimériser (discuté ci-bas). Dans cet ordre d'idée, il sera alors intéressant de voir si ces pepducines peuvent affecter le dimère, en le brisant par exemple, et ainsi moduler son activité. De plus, plusieurs voies de signalisation sont très faiblement activées par les pepducines tels que $G\alpha_q$ et les β -arrestines 1 et 2. Toutefois, nos expériences ont été réalisées sur un traitement de seulement cinq minutes. Ainsi, la faible activité observée des voies mentionnées ci-dessus pourrait être due au fait que les pepducines auraient la capacité d'activer ces voies plus tard. Une cinétique serait alors importante à réaliser afin d'observer si les pepducines montrent une capacité d'activer ces voies et même activer d'autres voies dans le temps. Une telle cinétique avec les pepducines pourrait aussi être réalisée en présence de hUII et URP dans différents modèles cellulaires, tels que les cellules importantes dans le développement de la fibrose cardiaque, soit des cardiomyocytes primaires, des fibroblastes et des

myofibroblastes, afin de mieux comprendre comment ces peptidocines agiront au niveau du cœur en présence constante et/ou changeante des ligands endogènes. De plus, une co-culture complexe utilisant ces cellules avec des macrophages dans de telles conditions pourrait aussi permettre de voir l'effet de tous ces joueurs clés sur la production de l'OPN, chimiokine importante dans le développement de la fibrose, et l'effet de cette dernière sur les différents modèles cellulaires de manière simultanée.

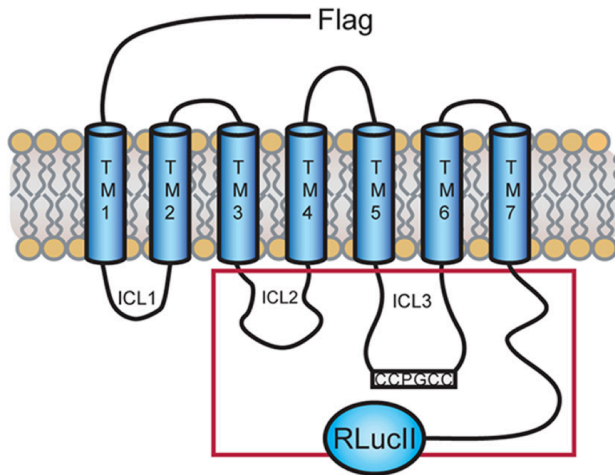
L'oligomérisation de hUT avec AT1R fournit un cadre pour la redirection et la modulation de signaux spécifiques

Dans le premier volet de cette thèse, nous avons réussi à moduler la signalisation du système urotensinergique en utilisant des modulateurs allostériques dérivés des boucles intracellulaires du récepteur hUT. Toutefois, au cours des dernières années, une autre alternative permettant de moduler les voies de signalisation associées à un RCPG est apparue et repose essentiellement sur l'exploitation de partenaires protéiques formant des hétérodimères avec ces derniers (Fillion et al. 2019). Par exemple, de nombreux récepteurs localisés au niveau du cœur (voir Tableau 6 dans l'introduction) sont capables de s'associer physiquement à AT1R et ainsi affecter le comportement de ce récepteur. Plusieurs études ont mis en évidence une certaine synergie entre les systèmes urotensinergique et angiotensinergique tel que discuté ci-haut. Song N et al. 2012 ont ainsi montré que UII et AngII agissent en synergie pour stimuler l'expression de VEGF au niveau des fibroblastes adventitiels de rats, l'un des premiers sites d'initiation pour le remodelage vasculaire et cardiaque (Chiu, Wang, and Shyu 2014). Ils ont ainsi démontré que la stimulation de VEGF par UII dans les fibroblastes adventitiels se fait *via* le récepteur UT en activant notamment les voies des MAPK et de p38, deux voies également impliquées dans l'activation de VEGF *via* le récepteur AT1R. Également, plusieurs facteurs neuro-hormonaux sont impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires dont le système angiotensinergique. Plusieurs d'autres études ont ainsi montré que UII communique avec AngII et ET-1. En effets, quelques effets d'UII au niveau du système cardiovasculaires sont le résultat de cette communication intracellulaire signalétique (Fontes-Sousa et al. 2009). Un autre lien entre les systèmes urotensinergique et angiotensinergique a été démontré dans les cardiomyocytes lors d'une hypoxie chronique (Chiu, Wang, and Shyu 2014). L'hypoxie chronique peut mener au développement de maladies cardiaques tel que l'hypertrophie et la fibrose cardiaque. Il a ainsi été démontré que AngII augmente la sécrétion de collagène, mène à la

surexpression de UII et favorise la phosphorylation de JNK, une protéine kinase activée à la suite de la sécrétion d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans le cas d'hypoxie (Djordjevic et al. 2005). En effet, à la suite de la liaison de l'AngII à son récepteur AT1R, la kinase JNK est activée par phosphorylation avant de se relocaliser au noyau des cardiomyocytes afin d'activer le facteur de transcription *activating protein-1* (AP-1) responsable de l'activation de la transcription du gène codant pour UII (Chiu, Wang, and Shyu 2014). Cette surexpression stimule alors la sécrétion du collagène, dérégulant ainsi l'homéostasie entre la forme synthétisée et dégradée de ce dernier, et donc menant à la fibrose cardiaque. En lien avec ce qui précède, l'inhibition de la voie d'ACE abolit les réponses vasculaires associées hUII, ce qui montre que la voie d'AngII joue effectivement un rôle clé dans la vasoconstriction et l'insuffisance vasculaire associées à UII (Angeli et al. 2013). Ainsi, le *cross-talk* entre hUT et AT1R semble être plus complexe que nous ne le pensions auparavant. Les systèmes urotensinergique et angiotensinergique ont des rôles physiopathologiques essentiels au cours de l'hypoxie. Cette dernière stimule entre autres la régulation positive de hUT à la fois *in vitro* et *in vivo* [328]. Cette augmentation de la densité de hUT à la suite de la production de ROS augmente la probabilité d'une éventuelle formation d'hétérodimères impliquant hUT avec d'autres RCPGs cardiaques et en particulier AT1R.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons cherché à démontrer des interactions physiques entre les deux récepteurs à l'aide d'approches complémentaires. En co-exprimant de manière transitoire les récepteurs hUT et AT1R dans des cellules HEK 293, nous avons observé par co-immunoprécipitation que ces deux récepteurs peuvent s'associer et ainsi former un complexe protéique hétérodimérique. Ces résultats ont été confirmés en utilisant deux biosenseurs conformationnels de AT1R utilisant une technique nommée FIAsh-BRET (Sleno et al. 2017). En utilisant les constructions ICL3-P3 et C-tail (démontrées ci-dessous à la Figure 20), nous avons observé que la présence de hUT sans ses ligands était suffisante pour modifier la dynamique conformationnelle d'AT1R activée par AngII. Fait intéressant, l'activation de hUT avec l'un de ses ligands endogènes, c'est-à-dire hUII ou URP, n'a pas modulé davantage la dynamique conformationnelle d'AT1R après son activation par son ligand endogène. De plus, nous avons observé par BRET que l'hétérodimère constitué de hUT et AT1R était formé en absence de ligands. La présence de ces derniers semblait cependant stabiliser le complexe AT1R-hUT ou favoriser la formation subséquente de cet hétérodimère. L'existence de complexes AT1R-hUT formés en absence de stimulation d'un ligand suggère que ceux-ci sont probablement assemblés dans le

réticulum endoplasmique ou existent dans un équilibre monomère-dimère comme précédemment démontré (Kasai et al. 2011; Terrillon and Bouvier 2004). En effet, l'association entre les RCPGs pour former des homo/hétérodimères est largement affectée par la composition lipidique de la membrane plasmique (Prasanna et al. 2020). Prassanna et al., 2020 ont ainsi montré que le cholestérol agit sur la plasticité des hétérodimères de façon à moduler leur conformation et favoriser leur formation au niveau de la membrane (Prasanna et al. 2020). Plusieurs hétérodimères impliquant des RCPGs cardiaques tels que AT1R et le récepteur de l'apéline (Siddiquee et al. 2013), le récepteur β_2 -AR (Barki-Harrington, Luttrell, and Rockman 2003) et le récepteur de la bradykinine B2 (Wilson et al. 2013) ont été identifiés. Peu de données montrent si les hétérodimères de RCPGs existent seulement lors d'une maladie cardiaque, c'est-à-dire s'ils ne sont formés que lors du développement de la maladie ou s'ils sont présents mêmes lors de conditions saines. En effet, un hétérodimère pourrait apparaître durant la progression d'une maladie en raison de la surexpression de chacun des récepteurs composant le dimère et donc devenir une cible potentielle de traitement surtout si, en conditions saines, cet hétérodimère n'existait pas ou peu. Par exemple, AT1R et le récepteur α_{1D} adrénergique forment un hétérodimère au niveau de l'aorte qui a été associé au développement de la pré-éclampsie chez les rates enceintes alors que chez les rates non enceintes, l'hétérodimère n'était pas présent (AbdAlla, Lothar, and Quitterer 2000; Gonzalez-Hernandez Mde et al. 2010). De plus, très peu de données sur ces hétérodimères soulèvent un autre point important quant à déterminer si, en condition de pathologie ou non, ces hétérodimères se forment seulement au niveau du cœur et non dans d'autres organes. Ainsi, des molécules ciblant spécifiquement l'hétérodimérisation de ces systèmes deviendraient des voies thérapeutiques idéales.



ICL3	wild type	LIWKALKKAYEIQKNKPRNDDIFK
	position 1 K220-A221	LIWK CCPGCC ALKKAYEIQKNKPRNDDIFK
	position 2 K224-A225	LIWKALKK CCPGCC AYEIQKNKPRNDDIFK
	position 3 I228-Q229	LIWKALKKAYEI CCPGCC QKNKPRNDDIFK
	position 4 K232-P233	LIWKALKKAYEIQKNK CCPGCC PRNDDIFK
	position 5 D236-D237	LIWKALKKAYEIQKNKPRND CCPGCC DIFK
C-tail	wild type	LNPLFYGFLGKKFKRYFLQLLKYIPPAKSHSNLSTKMSTL SYRPSDNVSSSTKKPAPCFEVE
	position 1 K333-M334	LNPLFYGFLGKKFKRYFLQLLKYIPPAKSHSNLSTK CCPGCC MSTL SYRPSDNVSSSTKKPAPCFEVE

Figure 20. Représentation du principe de FIAsh-BRET
(Figure tirée de Devost D. et al, 2016).

Nous avons donc démontré pour la première fois que le récepteur hUT possède un partenaire protéique, soit AT1R, avec qui il forme un hétérodimère fonctionnel. Nous avons notamment étudié la capacité de chacun des récepteurs à moduler l'affinité de liaison du ligand endogène du deuxième protomère formant l'hétérodimère par allostérie latérale. De fait, les RCPGs peuvent glisser dans la membrane plasmique vers des microenvironnements lipidiques et interagir latéralement les uns avec les autres afin de se moduler mutuellement de manière allostérique, générant ainsi des propriétés pharmacologiques uniques (Schelshorn et al. 2012). Fait intéressant, malgré une interaction physique entre les récepteurs hUT et AT1R, aucun changement dans l'affinité de liaison ou l'expression membranaire n'a été observée par rapport à chaque récepteur exprimé seul. En utilisant le même principe, en faisant des courbes de saturation, il serait intéressant de voir si les constantes de dissociation (K_d) des deux ligands changent lorsque les deux ligands co-existent ensemble, chacun liant son propre récepteur. Ceci permettrait de déterminer s'il y a une coopérativité entre les

deux ligands lors de la formation de l'hétérodimère. En ce qui concerne les signalisations associées aux récepteurs, la seule présence de hUT n'a pratiquement pas affecté la puissance d'AngII à activer $G\alpha_{13}$, $G\alpha_i$, DAG et β -arrestine 1 et 2, mais a considérablement réduit son efficacité. De plus, hUT a considérablement réduit la puissance et l'efficacité de l'AngII à favoriser l'activation de $G\alpha_q$ et le recrutement des β -arrestines 1 et 2. Comme indiqué précédemment, diverses réponses physiologiques semblent être médiées par l'hétérodimérisation de AT1R avec d'autres récepteurs cardiovasculaires [8], y compris le récepteur de l'apéline (Siddiquee et al. 2013), le β 2-AR (Wilson et al. 2013), le récepteur de la bradykinine B2 (B2R) (Wilson et al. 2013) et le récepteur de prostaglandine F2 α (FP). Dans tous ces cas, l'hétérodimérisation des récepteurs entraîne des profils de signalisation altérés et des réponses physiologiques différentes. Par exemple, l'hétérodimérisation AT1R-B2R a été impliquée dans la pré-éclampsie où elle augmente la vasoconstriction médiée par AngII, entraînant une réduction du flux sanguin dans les organes maternels et, par conséquent, augmente le risque de dysfonctionnement multiviscéral (Wilson et al. 2013; AbdAlla, Lother, and Quitterer 2000; Quitterer et al. 2019). AT1R peut aussi s'hétérodimériser avec AT2R dans les fibroblastes de rat fœtaux (Quitterer et al. 2019). Cette interaction entraîne l'inhibition de la production d'inositol phosphate par AT1R, conduisant à une réponse AT1R plus faible (Quitterer et al. 2019). De plus, la diminution de l'hétérodimérisation AT1R/AT2R dans le tissu myométrial des femmes enceintes semble corrélée à une augmentation de la réactivité à l'AngII [39]. Dans l'étude présentée dans cette thèse, l'activation de $G\alpha_q$, qui est associée à des actions cardiovasculaires profibrogéniques, hypertrophiques et vasocontractiles (Yamazaki, Komuro, and Yazaki 1999), a été réduite, ce qui pourrait modifier la façon dont les événements sont modulés *in vivo*. De plus, la capacité réduite de l'AngII à favoriser le recrutement de la β -arrestine pourrait être liée à une internalisation réduite de ces complexes et à des réponses de signalisation altérées.

De manière intéressante, AT1R n'a pas eu le même effet sur l'activation de hUT médiée par hUII, ce qui suggère que leurs effets mutuels peuvent être de nature asymétrique. En effet, la présence de AT1R potentialise la puissance de hUII mais pas son efficacité à activer $G\alpha_q$ et $G\alpha_{13}$, deux protéines G impliquées dans les effets profibrogéniques et hypertrophiques de hUT (Tzanidis et al. 2003; Johns et al. 2004; Onan et al. 2004; Takefuji et al. 2012). Pourtant, en même temps, AT1R n'a pas modifié la puissance de hUT pour le recrutement des β -arrestines, mais a augmenté son efficacité, ce qui pourrait favoriser une internalisation plus robuste de ces complexes. Des études

supplémentaires seront toutefois nécessaires afin de déterminer si une telle action favorise la signalisation dépendante de la β -arrestine ou simplement le recyclage et la dégradation.

Le système urotensinergique implique deux ligands endogènes qui ont été décrits comme fonctionnellement sélectifs au fil des années (Nassour, Iddir, and Chatenet 2019). Notamment, il semble que hUII et URP, en interagissant de manière spécifique avec hUT (Brancaccio et al. 2015; Chatenet et al. 2013), déclenchent des résultats biologiques et physiologiques communs mais aussi distincts. La façon dont cette sélectivité fonctionnelle est affectée dans le complexe AT1R-hUT a également été étudiée dans cette partie de la thèse. Contrairement à ce qui a été observé avec hUII après l'activation de AT1R-hUT, l'activation de $G\alpha_q$ médiée par l'URP était similaire à celle observée lorsque hUT était exprimé seul. Cependant, alors que la présence de AT1R augmentait significativement la puissance de hUII pour activer $G\alpha_{13}$ sans altérer son efficacité, la puissance de l'URP pour activer cette protéine G était également significativement augmentée mais accompagnée d'une réduction drastique de l'efficacité. Un impact similaire de AT1R sur l'activation de $G\alpha_i$ a été observé pour les deux peptides après l'activation de leurs récepteurs apparentés. Comme indiqué précédemment, hUII et URP peuvent favoriser la contraction d'anneaux aortiques via $G\alpha_q$ et $G\alpha_{13}$ et leurs messagers secondaires respectifs, à savoir DAG et Rho, respectivement. En présence de AT1R, la capacité de hUII à favoriser la production de DAG reste inaltérée par rapport à l'activation de hUT seule. Cependant, lorsque hUT, en complexe avec AT1R, a été activé par l'URP, la dynamique de signalisation de l'URP menant à la favorisation de la production de DAG a été modifiée. Il a été démontré que le récepteur lié au ligand affecte non seulement la conformation du récepteur, mais modifie également le comportement de la protéine G qui, à son tour, modifie la signalisation en aval (Furness et al. 2016). Enfin, alors qu'en présence de AT1R, l'efficacité de hUII mais pas sa puissance à promouvoir les β -arrestines était augmentée, la puissance de l'URP mais pas son efficacité était significativement modifiée par la présence d'AT1R, soulignant à nouveau les différences entre les effets médiés par hUII et URP et renforçant encore la notion de fonctions distinctes pour hUII et URP dans les maladies cardiovasculaires. Fait intéressant, hUII, mais pas URP, a réduit de manière significative l'efflux de cholestérol dépendant de l'APOA1 dans les macrophages M2 et l'expression de la protéine ABCA1 dans les cellules interstitielles de la valve aortique humaine, a augmenté la localisation nucléaire de la β -caténine et a favorisé la minéralisation cellulaire (Khan et al. 2019). Chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque aiguë, une augmentation significative des taux plasmatiques de hUII et d'URP a été observée, mais

étonnamment, la concentration plasmatique d'URP était presque 10 fois supérieure à celle de hUII, suggérant un traitement différentiel de leurs précurseurs dans des conditions pathologiques [46]. De plus, chez les rats spontanément hypertendus, l'expression de l'URP et d'UT, mais pas de l'UII, était régulée à la hausse (Hirose et al. 2009). Ces études suggèrent que l'hUII et l'URP peuvent avoir des rôles physiopathologiques distincts et pourraient être liés à des maladies spécifiques ou associés à des étapes spécifiques de la pathogenèse et de la progression d'une maladie. Que hUT puisse ou non représenter, comme AT1R, un *hub* de signalisation des récepteurs reste à démontrer. Étant donné que hUT et AT1R sont tous deux essentiels à l'homéostasie cardiovasculaire, leur interaction mutuelle peut jouer un rôle spécifique dans la progression des maladies cardiovasculaires. Par exemple, l'hétérodimérisation d'AT1R avec le récepteur de la B2R améliore l'hypersensibilité à l'AngII conduisant à une augmentation de l'activation de $G\alpha_q$ et $G\alpha_i$ mais réduit l'endocytose, jouant un rôle essentiel dans l'évolution des maladies. Plusieurs autres hétérodimères montrent un comportement similaire à AT1R-hUT. Par exemple, notre étude montre clairement que hUT, non activé par son ligand, réduit considérablement l'internalisation d'AT1R lié à AngII. En effet, plusieurs autres RCPGs réduisent la capacité d'AT1R à être internalisé, incluant entre autres la B2R qui peut former un hétérodimère avec AT1R. Cette association réduit de manière significative l'internalisation de l'hétérodimère comparativement à AT1R seul. Par ailleurs, AT1R, en formant un hétérodimère avec AT2R, est antagonisé par ce dernier, tout comme ce qu'on observe avec hUT (Wilson et al. 2013). Un autre récepteur qui forme un hétérodimère avec AT1R et réduit son internalisation est le récepteur FP. En présence d'AngII, un hétérodimère formé par ces deux récepteurs, qui sont impliqués dans le contrôle de la contraction des cellules musculaire lisses, réduit considérablement l'internalisation de l'hétérodimère en inhibant le recrutement des β -arrestines (Fillion et al. 2019). Cette même étude a aussi montré que la délétion des protéines $G\alpha_q$ et $G\alpha_{13}$ abolirait le recrutement des β -arrestines 1 et 2 [327]. Dans le cas de l'hétérodimère AT1R-hUT, ceci pourrait donc expliquer la réduction du recrutement des β -arrestines 1 et 2, considérant que l'hétérodimère stimulé avec AngII seul réduit de plus que 50% l'activation des protéines $G\alpha_q$ et $G\alpha_{13}$. Finalement, quels que soient les voies de signalisation activées à la suite de la formation de l'hétérodimère, il faut encore rappeler l'importance du contexte cellulaire. En effet, l'environnement de la membrane plasmique pourrait affecter les interfaces d'interaction entre les deux RCPGs de façon à modifier les voies qui seront activées *via* les mêmes RCPGs formant l'hétérodimère (Goupil, Laporte, and Hebert 2013).

Effet de réduction de l'internalisation d'AT1R et perspectives sur l'hétérodimérisation hUT-AT1R

La diminution de l'internalisation d'AT1R par d'autres RCPGs tel que hUT pourrait être liée au développement des maladies cardiovasculaires. Cet effet se manifeste par une activation anormale de l'hétérodimère dû à une non-désensibilisation. Par exemple, l'activation anormale du système β -adrénergique chez les patients souffrant de cardiomyopathie dilatée idiopathique est dû à l'utilisation d'auto-anticorps qui mènent à la réduction de l'internalisation du récepteur (Bornholz et al. 2013). En effet, basé sur nos résultats avec l'hétérodimère AT1R-hUT ainsi que les résultats d'autres RCPGs qui s'hétérodimérisent avec AT1R, la signalisation prolongée à travers un hétérodimère pourrait être une piste commune des RCPGs cardiaques qui indiquerait leur propensité à développer des maladies cardiaques. Dans des expériences futures, il serait donc intéressant d'investiguer l'existence de l'hétérodimère AT1R-hUT dans les fibroblastes cardiaques des personnes saines *vs* malades. S'il existe en conditions pathologiques seulement, il sera alors intéressant d'essayer de développer des molécules pouvant favoriser la forme monomérique de la forme hétérodimérique. Par ailleurs, si cet hétérodimère existe effectivement dans les conditions natives et pathologiques, la comparaison des voies de signalisation dans chacun des cas serait très intéressante. Finalement, il serait intéressant d'étudier le comportement de l'hétérodimère en présence de hUII et/ou de manière simultanée à la présence de AngII, ce qui permettrait de mieux refléter ce qui se passe *in vivo*.

Cependant, l'un des plus grands défis dans le développement de drogues ciblant les hétérodimères est à la fois d'identifier les hétérodimères à cibler et ceux impliqués dans les maladies dont les maladies cardiaques. Alors que l'identification des hétérodimères dans les cellules saines croît de plus en plus et plusieurs parmi ces derniers peuvent potentiellement être ciblés dans des contextes de maladies, il existe peu d'évidences qui montrent si un hétérodimère est encore présent dans des conditions pathologiques. Ainsi, avant de déterminer si un hétérodimère pourrait être une cible dans le cas des maladies cardiaques, il faut savoir si cet hétérodimère pourrait exister dans les cellules/tissus du patient développant la maladie cardiaque tel que la fibrose cardiaque.

Conclusion générale

En conclusion, les études présentées dans cette thèse aident à souligner et renforcer l'importance du système urotensinergique dans les maladies cardiovasculaires. Bien que des études supplémentaires prenant en compte la diversité de signalisation induite par les ligands endogènes hUII et URP du récepteur hUT dans des modèles plus physiologiquement rapprochés mais aussi prenant en compte toutes complexités moléculaires, cellulaires et temporelles des maladies cardiovasculaires soient encore nécessaires, les études présentées dans cette thèse sont clés pour démontrer l'importance et la possibilité de moduler la signalisation du système urotensinergique dans les contextes pathologiques, autant par des modulateurs allostériques telles les pepducines que par une signalisation biaisée via le récepteur AT1R capable de former un hétérodimère avec hUT. Ainsi, dans un futur proche, il sera possible d'utiliser de telles voies afin de développer des thérapies aidant à soigner les maladies cardiovasculaires.

. !!! INVALID CITATION !!! .

AbdAlla, S., H. Lothar, A. Langer, Y. el Faramawy, and U. Quitterer. 2004. 'Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis', *Cell*, 119: 343-54.

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

Adachi, N., D. T. Hess, M. Kaku, C. Ueda, C. Numa, and N. Saito. 2019. 'Differential S-palmitoylation of the human and rodent beta3-adrenergic receptors', *J Biol Chem*, 294: 2569-78.

Adams, J. W., A. L. Pagel, C. K. Means, D. Oksenberg, R. C. Armstrong, and J. H. Brown. 2000. 'Cardiomyocyte apoptosis induced by G α q signaling is mediated by permeability transition pore formation and activation of the mitochondrial death pathway', *Circ Res*, 87: 1180-7.

Agarwal, A., L. Covic, L. M. Seigny, N. C. Kaneider, K. Lazarides, G. Azabdaftari, S. Sharifi, and A. Kuliopulos. 2008. 'Targeting a metalloprotease-PAR1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer', *Mol Cancer Ther*, 7: 2746-57.

Ahn, S., A. W. Kahsai, B. Pani, Q. T. Wang, S. Zhao, A. L. Wall, R. T. Strachan, D. P. Staus, L. M. Wingler, L. D. Sun, J. Sinnaeve, M. Choi, T. Cho, T. T. Xu, G. M. Hansen, M. B. Burnett, J. E. Lamerdin, D. L. Bassoni, B. J. Gavino, G. Husemoen, E. K. Olsen, T. Franch, S. Costanzi, X. Chen, and R. J. Lefkowitz. 2017. 'Allosteric "beta-blocker" isolated from a DNA-encoded small molecule library', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 1708-13.

Alexander, S. P. 2012. 'So what do we call GPR18 now?', *Br J Pharmacol*, 165: 2411-3.

Ames, R. S., H. M. Sarau, J. K. Chambers, R. N. Willette, N. V. Aiyar, A. M. Romanic, C. S. Loudon, J. J. Foley, C. F. Sauermelch, R. W. Coatney, Z. Ao, J. Disa, S. D. Holmes, J. M. Stadel, J. D. Martin, W.

- S. Liu, G. I. Glover, S. Wilson, D. E. McNulty, C. E. Ellis, N. A. Elshourbagy, U. Shabon, J. J. Trill, D. W. Hay, E. H. Ohlstein, D. J. Bergsma, and S. A. Douglas. 1999. 'Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14', *Nature*, 401: 282-6.
- Angeli, J. K., C. A. Cruz Pereira, T. de Oliveira Faria, I. Stefanon, A. S. Padilha, and D. V. Vassallo. 2013. 'Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2', *Free Radic Biol Med*, 65: 838-48.
- Aplin, M., G. L. Christensen, M. Schneider, A. Heydorn, S. Gammeltoft, A. L. Kjolbye, S. P. Sheikh, and J. L. Hansen. 2007a. 'The angiotensin type 1 receptor activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by G protein-dependent and -independent pathways in cardiac myocytes and langendorff-perfused hearts', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 100: 289-95.
- . 2007b. 'Differential extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation by the angiotensin type 1 receptor supports distinct phenotypes of cardiac myocytes', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 100: 296-301.
- Armstrong, C. W. D., J. A. Coulter, C. W. Ong, P. J. Maxwell, S. Walker, K. T. Butterworth, O. Lyubomska, S. Berlinger, R. Gallagher, J. M. O'Sullivan, S. Jain, I. G. Mills, K. M. Prise, R. G. Bristow, M. J. LaBonte, and D. J. J. Waugh. 2020. 'Clinical and functional characterization of CXCR1/CXCR2 biology in the relapse and radiotherapy resistance of primary PTEN-deficient prostate carcinoma', *NAR Cancer*, 2: zcaa012.
- Ayoub, M. A., Y. Zhang, R. S. Kelly, H. B. See, E. K. Johnstone, E. A. McCall, J. H. Williams, D. J. Kelly, and K. D. Pflieger. 2015. 'Functional interaction between angiotensin II receptor type 1 and chemokine (C-C motif) receptor 2 with implications for chronic kidney disease', *PLoS One*, 10: e0119803.
- Azibani, F., L. Benard, S. Schlossarek, R. Merval, F. Tournoux, L. Fazal, E. Polidano, J. M. Launay, L. Carrier, C. Chatziantoniou, J. L.

- Samuel, and C. Delcayre. 2012. 'Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart', *Hypertension*, 59: 1179-87.
- Bader, M. 2010. 'Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50: 439-65.
- Ballesteros, Juan, and John Ransom. 2006. 'In-Target versus Off-Target allosteric modulators of GPCRs', *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3: 445-50.
- Barki-Harrington, L., L. M. Luttrell, and H. A. Rockman. 2003. 'Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo', *Circulation*, 108: 1611-8.
- Barnes, J. L., and Y. Gorin. 2011. 'Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases', *Kidney Int*, 79: 944-56.
- Barnes, W. G., E. Reiter, J. D. Violin, X. R. Ren, G. Milligan, and R. J. Lefkowitz. 2005. 'beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation', *J Biol Chem*, 280: 8041-50.
- Bartels, C., T. Xia, M. Billeter, P. Guentert, and K. Wüthrich. 1995. 'The Program XEASY for Computer-Supported NMR Spectral Analysis of Biological Macromolecules.', *J. Biomol. NMR*, 6: 1-10.
- Bel, E. H. 2013. 'Clinical Practice. Mild asthma', *N Engl J Med*, 369: 549-57.
- Belcheva, M. M., and C. J. Coscia. 2002. 'Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase', *Neurosignals*, 11: 34-44.
- Bellot, M., S. Galandrin, C. Boullaran, H. J. Matthies, F. Despas, C. Denis, J. Javitch, S. Mazeret, S. J. Sanni, V. Pons, M. H. Seguelas, J. L. Hansen, A. Pathak, A. Galli, J. M. Senard, and C. Gales. 2015. 'Dual agonist occupancy of AT1-R-alpha2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling', *Nat Chem Biol*, 11: 271-9.
- Bian, J., S. Zhang, M. Yi, M. Yue, and H. Liu. 2018. 'The mechanisms behind decreased internalization of angiotensin II type 1 receptor', *Vascul Pharmacol*, 103-105: 1-7.

- Billard, E., T. E. Hebert, and D. Chatenet. 2018. 'Discovery of New Allosteric Modulators of the Urotensinergic System through Substitution of the Urotensin II-Related Peptide (URP) Phenylalanine Residue', *J Med Chem*, 61: 8707-16.
- Billard, E., M. Iddir, H. Nassour, L. Lee-Gosselin, M. Poujol de Molliens, and D. Chatenet. 2018. 'New directions for urotensin II receptor ligands', *Peptide Science*: e24056.
- Billard, E., M. Letourneau, T. E. Hebert, and D. Chatenet. 2017. 'Insight into the role of urotensin II-related peptide tyrosine residue in UT activation', *Biochem Pharmacol*: 100-07.
- Blaukat, A., A. Barac, M. J. Cross, S. Offermanns, and I. Dikic. 2000. 'G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals', *Mol Cell Biol*, 20: 6837-48.
- Boire, A., L. Covic, A. Agarwal, S. Jacques, S. Sherifi, and A. Kuliopulos. 2005. 'PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells', *Cell*, 120: 303-13.
- Bologna, Z., J. P. Teoh, A. S. Bayoumi, Y. Tang, and I. M. Kim. 2017. 'Biased G Protein-Coupled Receptor Signaling: New Player in Modulating Physiology and Pathology', *Biomol Ther (Seoul)*, 25: 12-25.
- Bornholz, B., S. Weidtkamp-Peters, S. Schmitmeier, C. A. Seidel, L. R. Herda, S. B. Felix, H. Lemoine, J. Hescheler, F. Nguemo, C. Schafer, M. O. Christensen, C. Mielke, and F. Boege. 2013. 'Impact of human autoantibodies on beta1-adrenergic receptor conformation, activity, and internalization', *Cardiovasc Res*, 97: 472-80.
- Bouaboula, M., S. Perrachon, L. Milligan, X. Canat, M. Rinaldi-Carmona, M. Portier, F. Barth, B. Calandra, F. Pecceu, J. Lupker, J. P. Maffrand, G. Le Fur, and P. Casellas. 1997. 'A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions', *J Biol Chem*, 272: 22330-9.

- Bousette, N., F. Hu, E. H. Ohlstein, D. Dhanak, S. A. Douglas, and A. Giaid. 2006. 'Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation', *J Mol Cell Cardiol*, 41: 285-95.
- Bousette, N., L. Patel, S. A. Douglas, E. H. Ohlstein, and A. Giaid. 2004. 'Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta', *Atherosclerosis*, 176: 117-23.
- Bousette, N., J. Pottinger, W. Ramli, E. H. Ohlstein, D. Dhanak, S. A. Douglas, and A. Giaid. 2006. 'Urotensin-II receptor blockade with SB-611812 attenuates cardiac remodeling in experimental ischemic heart disease', *Peptides*, 27: 2919-26.
- Bouvier, M. 2001. 'Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors', *Nat Rev Neurosci*, 2: 274-86.
- Brancaccio, D., F. Merlino, A. Limatola, A. M. Yousif, I. Gomez-Monterrey, P. Campiglia, E. Novellino, P. Grieco, and A. Carotenuto. 2015. 'An investigation into the origin of the biased agonism associated with the urotensin II receptor activation', *J Pept Sci*, 21: 392-9.
- Braunschweiler, L., and R. R. Ernst. 1983. 'Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy.', *J. Magn. Res.*, 53: 521-28.
- Breton, B., E. Sauvageau, J. Zhou, H. Bonin, C. Le Gouill, and M. Bouvier. 2010. 'Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer', *Biophys J*, 99: 4037-46.
- Brkovic, A., A. Hattenberger, E. Kostenis, T. Klabunde, S. Flohr, M. Kurz, S. Bourgault, and A. Fournier. 2003. 'Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay', *J Pharmacol Exp Ther*, 306: 1200-9.
- Brouillette, R. L., E. Besserer-Offroy, C. E. Mona, M. Chartier, S. Lavenus, M. Sousbie, K. Belleville, J. M. Longpre, E. Marsault, M. Grandbois, and P. Sarret. 2020. 'Cell-penetrating pepducins targeting the neurotensin receptor type 1 relieve pain', *Pharmacol Res*, 155: 104750.

- Bruchas, M. R., T. A. Macey, J. D. Lowe, and C. Chavkin. 2006. 'Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes', *J Biol Chem*, 281: 18081-9.
- Brule, C., N. Perzo, J. E. Joubert, X. Sainsily, R. Leduc, H. Castel, and L. Prezeau. 2014. 'Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors', *FASEB J*, 28: 5148-62.
- Buch, T. R., H. Biebermann, H. Kalwa, O. Pinkenburg, D. Hager, H. Barth, K. Aktories, A. Breit, and T. Gudermann. 2008. 'G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin', *J Biol Chem*, 283: 20330-41.
- Busillo, J. M., and J. L. Benovic. 2007. 'Regulation of CXCR4 signaling', *Biochim Biophys Acta*, 1768: 952-63.
- Campden, R., N. Audet, and T. E. Hebert. 2015. 'Nuclear G protein signaling: new tricks for old dogs', *J Cardiovasc Pharmacol*, 65: 110-22.
- Carbone, M. L., J. Bregeon, N. Devos, G. Chadeuf, A. Blanchard, M. Azizi, P. Pacaud, X. Jeunemaitre, and G. Loirand. 2015. 'Angiotensin II activates the RhoA exchange factor Arhgef1 in humans', *Hypertension*, 65: 1273-8.
- Carlson, K., T. McMurry, and S. W. Hunt, 3rd. 2012. 'Pepducins: lipopeptide allosteric modulators of GPCR signaling', *Drug Discov Today Technol*, 9: e1-e70.
- Carr, R., 3rd, and J. L. Benovic. 2016. 'From biased signalling to polypharmacology: unlocking unique intracellular signalling using pepducins', *Biochem Soc Trans*, 44: 555-61.
- Carr, R., 3rd, Y. Du, J. Quoyer, R. A. Panettieri, Jr., J. M. Janz, M. Bouvier, B. K. Kobilka, and J. L. Benovic. 2014. 'Development and characterization of pepducins as Gs-biased allosteric agonists', *J Biol Chem*, 289: 35668-84.
- Carr, R., 3rd, C. Koziol-White, J. Zhang, H. Lam, S. S. An, G. G. Tall, R. A. Panettieri, Jr., and J. L. Benovic. 2016. 'Interdicting Gq Activation in Airway Disease by Receptor-Dependent and Receptor-Independent Mechanisms', *Mol Pharmacol*, 89: 94-104.

- Castel, H., L. Desrues, J. E. Joubert, M. C. Tonon, L. Prezeau, M. Chabbert, F. Morin, and P. Gandolfo. 2017. 'The G Protein-Coupled Receptor UT of the Neuropeptide Urotensin II Displays Structural and Functional Chemokine Features', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8: 76.
- Changeux, J. P. 1961. 'The feedback control mechanisms of biosynthetic L-threonine deaminase by L-isoleucine', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 26: 313-8.
- Chatenet, D., C. Dubessy, C. Boullaran, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, I. Lihmann, P. Pacaud, M. C. Tonon, H. Vaudry, and J. Leprince. 2006. 'Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: identification of a urotensin II antagonist', *J Med Chem*, 49: 7234-8.
- Chatenet, D., C. Dubessy, J. Leprince, C. Boullaran, L. Carlier, I. Segalas-Milazzo, L. Guilhaudis, H. Oulyadi, D. Davoust, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, M. C. Tonon, I. Lihmann, P. Pacaud, and H. Vaudry. 2004. 'Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide', *Peptides*, 25: 1819-30.
- Chatenet, D., M. Letourneau, Q. T. Nguyen, N. D. Doan, J. Dupuis, and A. Fournier. 2013. 'Discovery of new antagonists aimed at discriminating UII and URP-mediated biological activities: insight into UII and URP receptor activation', *Br J Pharmacol*, 168: 807-21.
- Chatenet, D., Q. T. Nguyen, M. Letourneau, J. Dupuis, and A. Fournier. 2012. 'Urocontrin, a novel UT receptor ligand with a unique pharmacological profile', *Biochem Pharmacol*, 83: 608-15.
- Chatin, B., M. Mevel, J. Devalliere, L. Dallet, T. Haudebourg, P. Peuziat, T. Colombani, M. Berchel, O. Lambert, A. Edelman, and B. Pitard. 2015. 'Liposome-based Formulation for Intracellular Delivery of Functional Proteins', *Mol Ther Nucleic Acids*, 4: e244.
- Chaturvedi, M., J. Schilling, A. Beautrait, M. Bouvier, J. L. Benovic, and A. K. Shukla. 2018. 'Emerging Paradigm of Intracellular Targeting of G Protein-Coupled Receptors', *Trends Biochem Sci*, 43: 533-46.

- Chen, X. T., P. Pitis, G. Liu, C. Yuan, D. Gotchev, C. L. Cowan, D. H. Rominger, M. Koblish, S. M. Dewire, A. L. Crombie, J. D. Violin, and D. S. Yamashita. 2013. 'Structure-activity relationships and discovery of a G protein biased mu opioid receptor ligand, [(3-methoxythiophen-2-yl)methyl]({2-[(9R)-9-(pyridin-2-yl)-6-oxaspiro-[4.5]decan-9-yl]ethyl})amine (TRV130), for the treatment of acute severe pain', *J Med Chem*, 56: 8019-31.
- Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, and R. C. Stevens. 2007. 'High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor', *Science*, 318: 1258-65.
- Cheung, A. H., R. R. Huang, M. P. Graziano, and C. D. Strader. 1991. 'Specific activation of Gs by synthetic peptides corresponding to an intracellular loop of the beta-adrenergic receptor', *FEBS Lett*, 279: 277-80.
- Chien, E. Y., W. Liu, Q. Zhao, V. Katritch, G. W. Han, M. A. Hanson, L. Shi, A. H. Newman, J. A. Javitch, V. Cherezov, and R. C. Stevens. 2010. 'Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist', *Science*, 330: 1091-5.
- Chiu, C. Z., B. W. Wang, and K. G. Shyu. 2014. 'Angiotensin II and the JNK pathway mediate urotensin II expression in response to hypoxia in rat cardiomyocytes', *J Endocrinol*, 220: 233-46.
- Chun, L., W. H. Zhang, and J. F. Liu. 2012. 'Structure and ligand recognition of class C GPCRs', *Acta Pharmacol Sin*, 33: 312-23.
- Cisowski, J., K. O'Callaghan, A. Kuliopulos, J. Yang, N. Nguyen, Q. Deng, E. Yang, M. Fogel, S. Tressel, C. Foley, A. Agarwal, S. W. Hunt, 3rd, T. McMurry, L. Brinckerhoff, and L. Covic. 2011. 'Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating pepducins in lung cancer', *Am J Pathol*, 179: 513-23.
- Claing, A., W. Chen, W. E. Miller, N. Vitale, J. Moss, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz. 2001. 'beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis', *J Biol Chem*, 276: 42509-13.

- Clapham, D. E., and E. J. Neer. 1997. 'G protein beta gamma subunits', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 167-203.
- Colombo, F., H. Gosselin, V. El-Helou, and A. Calderone. 2003. 'Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts proceeds via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway refractory to the antiproliferative action of cyclic AMP', *J Cell Physiol*, 195: 322-30.
- Covic, L., A. L. Gresser, J. Talavera, S. Swift, and A. Kuliopulos. 2002a. 'Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 643-48.
- . 2002b. 'Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 643-8.
- Covic, L., and A. Kuliopulos. 2018. 'Protease-Activated Receptor 1 as Therapeutic Target in Breast, Lung, and Ovarian Cancer: Pepducin Approach', *Int J Mol Sci*, 19.
- Covic, L., M. Misra, J. Badar, C. Singh, and A. Kuliopulos. 2002. 'Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation', *Nat Med*, 8: 1161-5.
- Dalman, H. M., and R. R. Neubig. 1991. 'Two peptides from the alpha 2A-adrenergic receptor alter receptor G protein coupling by distinct mechanisms', *J Biol Chem*, 266: 11025-9.
- De Cavanagh, E. M., J. E. Toblli, L. Ferder, B. Piotrkowski, I. Stella, C. G. Fraga, and F. Inserra. 2005. 'Angiotensin II blockade improves mitochondrial function in spontaneously hypertensive rats', *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 51: 573-8.
- de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, and T. Unger. 2000. 'International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors', *Pharmacol Rev*, 52: 415-72.
- Desmyter, A., S. Spinelli, A. Roussel, and C. Cambillau. 2015. 'Camelid nanobodies: killing two birds with one stone', *Curr Opin Struct Biol*, 32: 1-8.

- Deupi, X., and B. K. Kobilka. 2010. 'Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function', *Physiology (Bethesda)*, 25: 293-303.
- Devost, D., R. Sleno, D. Petrin, A. Zhang, Y. Shinjo, R. Okde, J. Aoki, A. Inoue, and T. E. Hebert. 2017. 'Conformational Profiling of the AT1 Angiotensin II Receptor Reflects Biased Agonism, G Protein Coupling, and Cellular Context', *J Biol Chem*, 292: 5443-56.
- DeVree, B. T., J. P. Mahoney, G. A. Velez-Ruiz, S. G. Rasmussen, A. J. Kuszak, E. Edwald, J. J. Fung, A. Manglik, M. Masureel, Y. Du, R. A. Matt, E. Pardon, J. Steyaert, B. K. Kobilka, and R. K. Sunahara. 2016. 'Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs', *Nature*, 535: 182-6.
- DeWire, S. M., S. Ahn, R. J. Lefkowitz, and S. K. Shenoy. 2007. 'Beta-arrestins and cell signaling', *Annu Rev Physiol*, 69: 483-510.
- DeWire, S. M., and J. D. Violin. 2011. 'Biased ligands for better cardiovascular drugs: dissecting G-protein-coupled receptor pharmacology', *Circ Res*, 109: 205-16.
- Dikalov, S. I., and R. R. Nazarewicz. 2013. 'Angiotensin II-induced production of mitochondrial reactive oxygen species: potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease', *Antioxid Redox Signal*, 19: 1085-94.
- Dimmeler, S., and A. M. Zeiher. 2000. 'Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors', *Regul Pept*, 90: 19-25.
- Dimond, P., K. Carlson, M. Bouvier, C. Gerard, L. Xu, L. Covic, A. Agarwal, O. P. Ernst, J. M. Janz, T. W. Schwartz, T. J. Gardella, G. Milligan, A. Kuliopulos, T. P. Sakmar, and S. W. Hunt, 3rd. 2011. 'G protein-coupled receptor modulation with pepducins: moving closer to the clinic', *Ann N Y Acad Sci*, 1226: 34-49.
- Djordjevic, T., R. S. BelAiba, S. Bonello, J. Pfeilschifter, J. Hess, and A. Gorlach. 2005. 'Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 519-25.

- Doan, N. D., T. T. Nguyen, M. Letourneau, K. Turcotte, A. Fournier, and D. Chatenet. 2012. 'Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart', *Br J Pharmacol*, 166: 243-57.
- Doreleijers, J. F., J. A. Rullmann, and R. Kaptein. 1998. 'Quality assessment of NMR structures: a statistical survey', *J Mol Biol*, 281: 149-64.
- Douchez, A., E. Billard, T. E. Hebert, D. Chatenet, and W. D. Lubell. 2017. 'Design, Synthesis, and Biological Assessment of Biased Allosteric Modulation of the Urotensin II Receptor Using Achiral 1,3,4-Benzotriazepin-2-one Turn Mimics', *J Med Chem*, 60: 9838-59.
- Douglas, S. A., and E. H. Ohlstein. 2000. 'Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease', *Trends Cardiovasc Med*, 10: 229-37.
- Dubessy, C., D. Cartier, B. Lectez, C. Bucharles, N. Chartrel, M. Montero-Hadjadje, P. Bizet, D. Chatenet, H. Tostivint, E. Scalbert, J. Leprince, H. Vaudry, S. Jegou, and I. Lihmann. 2008. 'Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin II-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: evidence of urotensin II at the neuromuscular junction', *J Neurochem*, 107: 361-74.
- Dufour-Gallant, J., D. Chatenet, and W. D. Lubell. 2015. 'De Novo Conception of Small Molecule Modulators Based on Endogenous Peptide Ligands: Pyrrolodiazepin-2-one gamma-Turn Mimics That Differentially Modulate Urotensin II Receptor-Mediated Vasoconstriction ex Vivo', *J Med Chem*, 58: 4624-37.
- Esposito, G., C. Perrino, A. Cannavo, G. G. Schiattarella, F. Borgia, A. Sannino, G. Pironti, G. Gargiulo, L. Di Serafino, A. Franzone, L. Scudiero, P. Grieco, C. Indolfi, and M. Chiariello. 2011. 'EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by beta-arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy', *Basic Res Cardiol*, 106: 577-89.

- Fan, G. H., T. H. Zhou, W. B. Zhang, and G. Pei. 1998. 'Suppression of phospholipase C blocks Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity', *Eur J Pharmacol*, 341: 317-22.
- Farran, B. 2017. 'An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers', *Pharmacol Res*, 117: 303-27.
- Felker, G. M., C. M. O'Connor, E. Braunwald, and Investigators Heart Failure Clinical Research Network. 2009. 'Loop diuretics in acute decompensated heart failure: necessary? Evil? A necessary evil?', *Circ Heart Fail*, 2: 56-62.
- Feng, Y. H., K. Noda, Y. Saad, X. P. Liu, A. Husain, and S. S. Karnik. 1995. 'The docking of Arg2 of angiotensin II with Asp281 of AT1 receptor is essential for full agonism', *J Biol Chem*, 270: 12846-50.
- Fillion, D., D. Devost, R. Sleno, A. Inoue, and T. E. Hebert. 2019. 'Asymmetric Recruitment of beta-Arrestin1/2 by the Angiotensin II Type I and Prostaglandin F2alpha Receptor Dimer', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: 162.
- Fontes-Sousa, A. P., A. L. Pires, V. F. Monteiro-Cardoso, and A. F. Leite-Moreira. 2009. 'Urotensin II-induced increase in myocardial distensibility is modulated by angiotensin II and endothelin-1', *Physiol Res*, 58: 653-60.
- Freedman, N. J., and R. J. Lefkowitz. 1996. 'Desensitization of G protein-coupled receptors', *Recent Prog Horm Res*, 51: 319-51; discussion 52-3.
- Furness, S. G. B., Y. L. Liang, C. J. Nowell, M. L. Halls, P. J. Wookey, E. Dal Maso, A. Inoue, A. Christopoulos, D. Wootten, and P. M. Sexton. 2016. 'Ligand-Dependent Modulation of G Protein Conformation Alters Drug Efficacy', *Cell*, 167: 739-49 e11.
- Gabl, M., M. Winther, S. L. Skovbakke, J. Bylund, C. Dahlgren, and H. Forsman. 2014. 'A pepducin derived from the third intracellular loop of FPR2 is a partial agonist for direct activation of this receptor in neutrophils but a full agonist for cross-talk triggered reactivation of FPR2', *PLoS One*, 9: e109516.

- Galandrin, S., G. Oligny-Longpre, and M. Bouvier. 2007. 'The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery', *Trends Pharmacol Sci*, 28: 423-30.
- Gao, H., Y. Sun, Y. Wu, B. Luan, Y. Wang, B. Qu, and G. Pei. 2004. 'Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways', *Mol Cell*, 14: 303-17.
- Gether, U. 2000. 'Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors', *Endocr Rev*, 21: 90-113.
- Gether, U., and B. K. Kobilka. 1998. 'G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation', *J Biol Chem*, 273: 17979-82.
- Gohla, A., R. Harhammer, and G. Schultz. 1998. 'The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho', *J Biol Chem*, 273: 4653-9.
- Goldsmith, Z. G., and D. N. Dhanasekaran. 2007. 'G protein regulation of MAPK networks', *Oncogene*, 26: 3122-42.
- Gonzalez-Hernandez Mde, L., D. Godinez-Hernandez, R. A. Bobadilla-Lugo, and P. Lopez-Sanchez. 2010. 'Angiotensin-II type 1 receptor (AT1R) and alpha-1D adrenoceptor form a heterodimer during pregnancy-induced hypertension', *Auton Autacoid Pharmacol*, 30: 167-72.
- Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen, and J. L. Benovic. 1996. 'Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor', *Nature*, 383: 447-50.
- Goupil, E., D. Fillion, S. Clement, X. Luo, D. Devost, R. Sleno, D. Petrin, H. U. Saragovi, E. Thorin, S. A. Laporte, and T. E. Hebert. 2015. 'Angiotensin II type I and prostaglandin F2alpha receptors cooperatively modulate signaling in vascular smooth muscle cells', *J Biol Chem*, 290: 3137-48.
- Goupil, E., S. A. Laporte, and T. E. Hebert. 2013. 'GPCR heterodimers: asymmetries in ligand binding and signalling output offer new targets for drug discovery', *Br J Pharmacol*, 168: 1101-3.
- Granier, S., and B. Kobilka. 2012. 'A new era of GPCR structural and chemical biology', *Nat Chem Biol*, 8: 670-3.

- Gray, G. A., M. R. Jones, and I. Sharif. 2001. 'Human urotensin II increases coronary perfusion pressure in the isolated rat heart: potentiation by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition', *Life Sci*, 69: 175-80.
- Grenegard, M., K. Vretenbrant-Oberg, M. Nylander, S. Desilets, E. G. Lindstrom, A. Larsson, I. Ramstrom, S. Ramstrom, and T. L. Lindahl. 2008. 'The ATP-gated P2X1 receptor plays a pivotal role in activation of aspirin-treated platelets by thrombin and epinephrine', *J Biol Chem*, 283: 18493-504.
- Grieco, P., A. Carotenuto, P. Campiglia, E. Zampelli, R. Patacchini, C. A. Maggi, E. Novellino, and P. Rovero. 2002. 'A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge', *J Med Chem*, 45: 4391-4.
- Grieco, P., A. Carotenuto, R. Patacchini, C. A. Maggi, E. Novellino, and P. Rovero. 2002. 'Design, synthesis, conformational analysis, and biological studies of urotensin-II lactam analogues', *Bioorg Med Chem*, 10: 3731-9.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai. 2000. 'NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease', *Circ Res*, 86: 494-501.
- Grundmann, M., N. Merten, D. Malfacini, A. Inoue, P. Preis, K. Simon, N. Ruttiger, N. Ziegler, T. Benkel, N. K. Schmitt, S. Ishida, I. Muller, R. Reher, K. Kawakami, A. Inoue, U. Rick, T. Kuhl, D. Imhof, J. Aoki, G. M. Konig, C. Hoffmann, J. Gomeza, J. Wess, and E. Kostenis. 2018. 'Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins', *Nat Commun*, 9: 341.
- Guerrini, R., V. Camarda, E. Marzola, M. Arduin, G. Calo, M. Spagnol, A. Rizzi, S. Salvadori, and D. Regoli. 2005. 'Structure-activity relationship study on human urotensin II', *J Pept Sci*, 11: 85-90.
- Guidolin, D., G. Albertin, and D. Ribatti. 2010. 'Urotensin-II as an angiogenic factor', *Peptides*, 31: 1219-24.
- Guntert, P., C. Mumenthaler, and K. Wuthrich. 1997. 'Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA', *J Mol Biol*, 273: 283-98.

- Gurbel, P. A., K. P. Bliden, S. E. Turner, U. S. Tantry, M. G. Gesheff, T. P. Barr, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2016. 'Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36: 189-97.
- Gurevich, V. V., and J. L. Benovic. 1993. 'Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin', *J Biol Chem*, 268: 11628-38.
- Haga, K., A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, and T. Kobayashi. 2012. 'Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist', *Nature*, 482: 547-51.
- Hains, M. D., M. R. Wing, S. Maddileti, D. P. Siderovski, and T. K. Harden. 2006. 'G α 12/13- and rho-dependent activation of phospholipase C-epsilon by lysophosphatidic acid and thrombin receptors', *Mol Pharmacol*, 69: 2068-75.
- Hamrahan, S. M., and B. Falkner. 2017. 'Hypertension in Chronic Kidney Disease', *Adv Exp Med Biol*, 956: 307-25.
- Handlogten, M. E., C. Huang, N. Shiraishi, H. Awata, and R. T. Miller. 2001. 'The Ca²⁺-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a G α 12-dependent ERK-independent pathway', *J Biol Chem*, 276: 13941-8.
- Hanyaloglu, A. C., and M. von Zastrow. 2008. 'Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48: 537-68.
- He, Y. H., J. M. Hong, H. S. Guo, J. R. Wei, H. Chen, H. H. Zuo, and Z. L. Li. 2004. '[Effects of urotensin II on cultured cardiac fibroblast proliferation and collagen type I mRNA expression]', *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 24: 505-8.
- Hilairt, S., M. Bouaboula, D. Carriere, G. Le Fur, and P. Casellas. 2003. 'Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716', *J Biol Chem*, 278: 23731-7.

- Hirose, T., K. Takahashi, N. Mori, T. Nakayama, M. Kikuya, T. Ohkubo, M. Kohzuki, K. Totsune, and Y. Imai. 2009. 'Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1', *Peptides*, 30: 1124-9.
- Hofmann, K. P., P. Scheerer, P. W. Hildebrand, H. W. Choe, J. H. Park, M. Heck, and O. P. Ernst. 2009. 'A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model', *Trends Biochem Sci*, 34: 540-52.
- Holdfeldt, A., S. Lind, C. Hesse, C. Dahlgren, and H. Forsman. 2020. 'The PAR4-derived pepducin P4Pal10 lacks effect on neutrophil GPCRs that couple to Galphaq for signaling but distinctly modulates function of the Galphai-coupled FPR2 and FFAR2', *Biochemical Pharmacology*, 180: 114143.
- Holloway, A. C., H. Qian, L. Pipolo, J. Ziogas, S. Miura, S. Karnik, B. R. Southwell, M. J. Lew, and W. G. Thomas. 2002. 'Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors', *Mol Pharmacol*, 61: 768-77.
- Hunyady, L., M. Bor, T. Balla, and K. J. Catt. 1994. 'Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor', *J Biol Chem*, 269: 31378-82.
- Hunyady, L., and K. J. Catt. 2006. 'Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II', *Mol Endocrinol*, 20: 953-70.
- Hussain, M., and F. R. Awan. 2018. 'Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease', *Clin Exp Hypertens*, 40: 344-52.
- Hwang, T. L., and A. J. Shaka. 1995. 'Water Suppression that Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients', *J. Magn. Reson.*, 112: 275-79.
- Ikeda, Y., H. Kumagai, Y. Motozawa, J. Suzuki, and I. Komuro. 2015. 'Biased Agonism of the Angiotensin II Type I Receptor', *Int Heart J*, 56: 485-8.

- Inuzuka, T., Y. Fujioka, M. Tsuda, M. Fujioka, A. O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, S. Tanaka, and Y. Ohba. 2016. 'Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C', *Sci Rep*, 6: 21613.
- Isberg, V., C. de Graaf, A. Bortolato, V. Cherezov, V. Katritch, F. H. Marshall, S. Mordalski, J. P. Pin, R. C. Stevens, G. Vriend, and D. E. Gloriam. 2015. 'Generic GPCR residue numbers - aligning topology maps while minding the gaps', *Trends Pharmacol Sci*, 36: 22-31.
- Isoda, K., K. Nishikawa, Y. Kamezawa, M. Yoshida, M. Kusuhara, M. Moroi, N. Tada, and F. Ohsuzu. 2002. 'Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation', *Circ Res*, 91: 77-82.
- Jaakola, V. P., M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman, and R. C. Stevens. 2008. 'The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist', *Science*, 322: 1211-7.
- Janz, J. M., Y. Ren, R. Looby, M. A. Kazmi, P. Sachdev, A. Grunbeck, L. Haggis, D. Chinnapen, A. Y. Lin, C. Seibert, T. McMurry, K. E. Carlson, T. W. Muir, S. Hunt, 3rd, and T. P. Sakmar. 2011. 'Direct interaction between an allosteric agonist pepducin and the chemokine receptor CXCR4', *J Am Chem Soc*, 133: 15878-81.
- Jarry, M., M. Diallo, C. Lecointre, L. Desrues, T. Tokay, D. Chatenet, J. Leprince, O. Rossi, H. Vaudry, M. C. Tonon, L. Prezeau, H. Castel, and P. Gandolfo. 2010. 'The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation', *Biochem J*, 428: 113-24.
- Jenner, J., B. H. Meyer, P. Bachman, and R. R. Ernst. 1979. 'Investigation of Exchange Processes by Two-Dimensional NMR Spectroscopy.', *J. Chem. Phys.*, 71: 4546-53.
- Johns, D. G., Z. Ao, D. Naselsky, C. L. Herold, K. Maniscalco, L. Sarov-Blat, K. Steplewski, N. Aiyar, and S. A. Douglas. 2004. 'Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor

- antagonism and role of inflammatory mediators', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 370: 238-50.
- Kahsai, A. W., J. W. Wisler, J. Lee, S. Ahn, T. J. Cahill Iii, S. M. Dennison, D. P. Staus, A. R. Thomsen, K. M. Anasti, B. Pani, L. M. Wingler, H. Desai, K. M. Bompiani, R. T. Strachan, X. Qin, S. M. Alam, B. A. Sullenger, and R. J. Lefkowitz. 2016. 'Conformationally selective RNA aptamers allosterically modulate the beta2-adrenoceptor', *Nat Chem Biol*, 12: 709-16.
- Kaneider, N. C., A. Agarwal, A. J. Leger, and A. Kuliopulos. 2005. 'Reversing systemic inflammatory response syndrome with chemokine receptor pepducins', *Nat Med*, 11: 661-5.
- Kaneider, N. C., A. J. Leger, A. Agarwal, N. Nguyen, G. Perides, C. Derian, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2007. 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage', *Nat Immunol*, 8: 1303-12.
- Kang, J., Y. Shi, B. Xiang, B. Qu, W. Su, M. Zhu, M. Zhang, G. Bao, F. Wang, X. Zhang, R. Yang, F. Fan, X. Chen, G. Pei, and L. Ma. 2005. 'A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription', *Cell*, 123: 833-47.
- Karip, E., G. Turu, K. Supeki, L. Szidonya, and L. Hunyady. 2007. 'Cross-inhibition of angiotensin AT1 receptors supports the concept of receptor oligomerization', *Neurochem Int*, 51: 261-7.
- Karnik, S. S., H. Unal, J. R. Kemp, K. C. Tirupula, S. Eguchi, P. M. Vanderheyden, and W. G. Thomas. 2015. 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]', *Pharmacol Rev*, 67: 754-819.
- Kasai, R. S., K. G. Suzuki, E. R. Prossnitz, I. Koyama-Honda, C. Nakada, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. 2011. 'Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging', *J Cell Biol*, 192: 463-80.
- Kashihara, T., H. Kawagishi, T. Nakada, T. Numaga-Tomita, S. Kadota, E. E. Wolf, C. K. Du, Y. Shiba, S. Morimoto, and M. Yamada. 2020. 'beta-Arrestin-Biased AT1 Agonist TRV027 Causes a Neonatal-

- Specific Sustained Positive Inotropic Effect Without Increasing Heart Rate', *JACC Basic Transl Sci*, 5: 1057-69.
- Katritch, V., V. Cherezov, and R. C. Stevens. 2013. 'Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53: 531-56.
- Kawai, T., S. J. Forrester, S. O'Brien, A. Baggett, V. Rizzo, and S. Eguchi. 2017. 'AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system', *Pharmacol Res*, 125: 4-13.
- Kemp, W., H. Krum, J. Colman, M. Bailey, T. Yandle, M. Richards, and S. Roberts. 2007. 'Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension', *Liver Int*, 27: 1232-9.
- Kenakin, T. 2003. 'Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem', *Trends Pharmacol Sci*, 24: 346-54.
- . 2011. 'Functional selectivity and biased receptor signaling', *J Pharmacol Exp Ther*, 336: 296-302.
- . 2012. 'The potential for selective pharmacological therapies through biased receptor signaling', *BMC Pharmacol Toxicol*, 13: 3.
- Khan, K., I. Albanese, B. Yu, Y. Shalal, H. Al-Kindi, H. Alaws, J. C. Tardif, O. Gourgas, M. Cerutti, and A. Schwertani. 2019. 'Urotensin II, urotensin-related peptide, and their receptor in aortic valve stenosis', *J Thorac Cardiovasc Surg*.
- Khan, S. M., J. Y. Sung, and T. E. Hebert. 2016. 'Gbetagamma subunits-Different spaces, different faces', *Pharmacol Res*, 111: 434-41.
- Kim, J., S. Ahn, X. R. Ren, E. J. Whalen, E. Reiter, H. Wei, and R. J. Lefkowitz. 2005. 'Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 1442-7.
- Kim, K. S., D. Abraham, B. Williams, J. D. Violin, L. Mao, and H. A. Rockman. 2012. 'beta-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303: H1001-10.
- Kim, S. K., Y. Li, C. Park, R. Abrol, and W. A. Goddard, 3rd. 2010. 'Prediction of the three-dimensional structure for the rat urotensin II receptor, and comparison of the antagonist binding sites and binding

- selectivity between human and rat receptors from atomistic simulations', *ChemMedChem*, 5: 1594-608.
- Kjelsberg, M. A., S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. 1992. 'Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation', *J Biol Chem*, 267: 1430-3.
- Kobilka, B. K. 2011. 'Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology', *Trends Pharmacol Sci*, 32: 213-8.
- Kobilka, B. K., and X. Deupi. 2007. 'Conformational complexity of G-protein-coupled receptors', *Trends Pharmacol Sci*, 28: 397-406.
- Kook, S., X. Zhan, T. S. Kaoud, K. N. Dalby, V. V. Gurevich, and E. V. Gurevich. 2013. 'Arrestin-3 binds c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and JNK2 and facilitates the activation of these ubiquitous JNK isoforms in cells via scaffolding', *J Biol Chem*, 288: 37332-42.
- Kotlikoff, M. I., and K. E. Kamm. 1996. 'Molecular mechanisms of beta-adrenergic relaxation of airway smooth muscle', *Annu Rev Physiol*, 58: 115-41.
- Kotula, J. W., J. Sun, M. Li, E. D. Pratico, M. P. Fereshteh, D. P. Ahrens, B. A. Sullenger, and J. J. Kovacs. 2014. 'Targeted disruption of beta-arrestin 2-mediated signaling pathways by aptamer chimeras leads to inhibition of leukemic cell growth', *PLoS One*, 9: e93441.
- Krishnan, A., S. Nijmeijer, C. de Graaf, and H. B. Schioth. 2016. 'Classification, Nomenclature, and Structural Aspects of Adhesion GPCRs', *Handb Exp Pharmacol*, 234: 15-41.
- Kruse, A. C., J. Hu, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. M. Rosenbaum, E. Rosemond, H. F. Green, T. Liu, P. S. Chae, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, J. Wess, and B. K. Kobilka. 2012. 'Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor', *Nature*, 482: 552-6.
- Kuliopulos, A., and L. Covic. 2003. 'Blocking receptors on the inside: pepducin-based intervention of PAR signaling and thrombosis', *Life Sciences*, 74: 255-62.

- Kuliopulos, A., P. A. Gurbel, J. J. Rade, C. D. Kimmelstiel, S. E. Turner, K. P. Bliden, E. K. Fletcher, D. H. Cox, and L. Covic. 2020. 'PAR1 (Protease-Activated Receptor 1) Pepducin Therapy Targeting Myocardial Necrosis in Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome Patients Undergoing Cardiac Catheterization: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 2 Study', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*: ATVBAHA120315168.
- Kuo, I. Y., and B. E. Ehrlich. 2015. 'Signaling in muscle contraction', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a006023.
- Labarrere, P., D. Chatenet, J. Leprince, C. Marionneau, G. Loirand, M. C. Tonon, C. Dubessy, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, B. Calas, P. Pacaud, and H. Vaudry. 2003. 'Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction', *J Enzyme Inhib Med Chem*, 18: 77-88.
- Lambright, D. G., J. Sondek, A. Bohm, N. P. Skiba, H. E. Hamm, and P. B. Sigler. 1996. 'The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein', *Nature*, 379: 311-9.
- Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron, and L. S. Barak. 1999. 'The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3712-7.
- Latek, D., A. Modzelewska, B. Trzaskowski, K. Palczewski, and S. Filipek. 2012. 'G protein-coupled receptors--recent advances', *Acta Biochim Pol*, 59: 515-29.
- Leask, A. 2015. 'Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis', *Circ Res*, 116: 1269-76.
- Lee, H. Y., S. D. Kim, J. W. Shim, H. J. Kim, J. Y. Kwon, J. M. Kim, S. H. Baek, J. S. Park, and Y. S. Bae. 2010. 'Activation of human monocytes by a formyl peptide receptor 2-derived pepducin', *FEBS Lett*, 584: 4102-8.
- Lee, J. H., B. K. Park, K. S. Oh, K. Y. Yi, C. J. Lim, H. W. Seo, and B. H. Lee. 2016. 'A urotensin II receptor antagonist, KR36676, decreases vascular remodeling and inflammation in experimental pulmonary hypertension', *Int Immunopharmacol*, 40: 196-202.

- Leger, A. J., S. L. Jacques, J. Badar, N. C. Kaneider, C. K. Derian, P. Andrade-Gordon, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2006. 'Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis', *Circulation*, 113: 1244-54.
- Leprince, J., D. Chatenet, C. Dubessy, A. Fournier, B. Pfeiffer, E. Scalbert, P. Renard, P. Pacaud, H. Oulyadi, I. Segalas-Milazzo, L. Guilhaudis, D. Davoust, M. C. Tonon, and H. Vaudry. 2008. 'Structure-activity relationships of urotensin II and URP', *Peptides*, 29: 658-73.
- Li, D., B. Yang, M. I. Philips, and J. L. Mehta. 1999. 'Proapoptotic effects of ANG II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1 receptor and PKC activation', *Am J Physiol*, 276: H786-92.
- Liang, Y., Y. Xu, L. Ding, X. Chen, and H. Li. 2021. 'Urotensin II Induces Cardiac Fibrosis through the TGF-beta/Smad Signaling Pathway during the Development of Cardiac Hypertrophy', *Int Heart J*, 62: 1135-44.
- Licht, T., L. Tsirulnikov, H. Reuveni, T. Yarnitzky, and S. A. Ben-Sasson. 2003. 'Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3)', *Blood*, 102: 2099-107.
- Lin, C., J. Duitman, J. Daalhuisen, M. Ten Brink, J. von der Thusen, T. van der Poll, K. Borensztajn, and C. A. Spek. 2014. 'Targeting protease activated receptor-1 with P1pal-12 limits bleomycin-induced pulmonary fibrosis', *Thorax*, 69: 152-60.
- Lin, H. H. 2013. 'G-protein-coupled receptors and their (Bio) chemical significance win 2012 Nobel Prize in Chemistry', *Biomed J*, 36: 118-24.
- Liu, W., Q. Han, Q. Liu, G. Liang, J. Wang, and C. Liu. 2015. 'An investigation into the expression and mechanism of action of urotensin II in chronic pressure-overloaded rat hearts', *Mol Med Rep*, 12: 6626-34.
- Liu, X., S. Ahn, A. W. Kahsai, K. C. Meng, N. R. Latorraca, B. Pani, A. J. Venkatakrishnan, A. Masoudi, W. I. Weis, R. O. Dror, X. Chen, R. J. Lefkowitz, and B. K. Kobilka. 2017. 'Mechanism of intracellular

- allosteric beta2AR antagonist revealed by X-ray crystal structure', *Nature*, 548: 480-84.
- Lukasheva, V., D. Devost, C. Le Gouill, Y. Namkung, R. D. Martin, J. M. Longpre, M. Amraei, Y. Shinjo, M. Hogue, M. Lagace, B. Breton, J. Aoki, J. C. Tanny, S. A. Laporte, G. Pineyro, A. Inoue, M. Bouvier, and T. E. Hebert. 2020. 'Signal profiling of the beta1AR reveals coupling to novel signalling pathways and distinct phenotypic responses mediated by beta1AR and beta2AR', *Sci Rep*, 10: 8779.
- Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. 1999. 'Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes', *Science*, 283: 655-61.
- Luttrell, L. M., S. Maudsley, and L. M. Bohn. 2015. 'Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism', *Mol Pharmacol*, 88: 579-88.
- Luttrell, L. M., J. Ostrowski, S. Cotecchia, H. Kendall, and R. J. Lefkowitz. 1993. 'Antagonism of catecholamine receptor signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptors', *Science*, 259: 1453-7.
- Luttrell, L. M., F. L. Roudabush, E. W. Choy, W. E. Miller, M. E. Field, K. L. Pierce, and R. J. Lefkowitz. 2001. 'Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 2449-54.
- Lymperopoulos, A., G. Rengo, C. Zincarelli, J. Kim, S. Soltys, and W. J. Koch. 2009. 'An adrenal beta-arrestin 1-mediated signaling pathway underlies angiotensin II-induced aldosterone production in vitro and in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 5825-30.
- Malik, R. U., M. Ritt, B. T. DeVree, R. R. Neubig, R. K. Sunahara, and S. Sivaramakrishnan. 2013. 'Detection of G protein-selective G protein-coupled receptor (GPCR) conformations in live cells', *J Biol Chem*, 288: 17167-78.

- Maple, J. R., U. Dinur, and A. T. Hagler. 1988. 'Derivation of force fields for molecular mechanics and dynamics from ab initio energy surfaces', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 5350-4.
- Mariggio, S., A. Bavec, E. Natale, P. Zizza, M. Salmona, D. Corda, and M. Di Girolamo. 2006. 'Galpha13 mediates activation of the cytosolic phospholipase A2alpha through fine regulation of ERK phosphorylation', *Cell Signal*, 18: 2200-8.
- Marion, D., and K. Wuthrich. 1983. 'Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of 1H-1H spin-spin coupling constants in proteins', *Biochem Biophys Res Commun*, 113: 967-74.
- Matsui, Y., N. Jia, H. Okamoto, S. Kon, H. Onozuka, M. Akino, L. Liu, J. Morimoto, S. R. Rittling, D. Denhardt, A. Kitabatake, and T. Uede. 2004. 'Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy', *Hypertension*, 43: 1195-201.
- McDonald, P. H., C. W. Chow, W. E. Miller, S. A. Laporte, M. E. Field, F. T. Lin, R. J. Davis, and R. J. Lefkowitz. 2000. 'Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3', *Science*, 290: 1574-7.
- McDonald, P. H., N. L. Cote, F. T. Lin, R. T. Premont, J. A. Pitcher, and R. J. Lefkowitz. 1999. 'Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation', *J Biol Chem*, 274: 10677-80.
- Merlino, F., E. Billard, A. M. Yousif, S. Di Maro, D. Brancaccio, L. Abate, A. Carotenuto, R. Bellavita, R. d'Emmanuele di Villa Bianca, P. Santicioli, L. Marinelli, E. Novellino, T. E. Hebert, W. D. Lubell, D. Chatenet, and P. Grieco. 2019. 'Functional Selectivity Revealed by N-Methylation Scanning of Human Urotensin II and Related Peptides', *J Med Chem*, 62: 1455-67.
- Merlino, F., A. M. Yousif, E. Billard, J. Dufour-Gallant, S. Turcotte, P. Grieco, D. Chatenet, and W. D. Lubell. 2016. 'Urotensin II((4-11)) Azasulfuryl Peptides: Synthesis and Biological Activity', *J Med Chem*, 59: 4740-52.

- Michael, E. S., A. Kuliopulos, L. Covic, M. L. Steer, and G. Perides. 2013. 'Pharmacological inhibition of PAR2 with the pepducin P2pal-18S protects mice against acute experimental biliary pancreatitis', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304: G516-26.
- Milano, C. A., P. C. Dolber, H. A. Rockman, R. A. Bond, M. E. Venable, L. F. Allen, and R. J. Lefkowitz. 1994. 'Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 10109-13.
- Mirzadegan, T., G. Benko, S. Filipek, and K. Palczewski. 2003. 'Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin', *Biochemistry*, 42: 2759-67.
- Monasky, M. M., D. M. Taglieri, M. Henze, C. M. Warren, M. S. Utter, D. G. Soergel, J. D. Violin, and R. J. Solaro. 2013. 'The beta-arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305: H856-66.
- Nassour, H., M. Iddir, and D. Chatenet. 2019. 'Towards Targeting the Urotensinergic System: Overview and Challenges', *Trends Pharmacol Sci*, 40: 725-34.
- Nelson, C. D., S. J. Perry, D. S. Regier, S. M. Prescott, M. K. Topham, and R. J. Lefkowitz. 2007. 'Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins', *Science*, 315: 663-6.
- Nelson, H. S., S. T. Weiss, E. R. Bleecker, S. W. Yancey, and P. M. Dorinsky. 2006. 'The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol', *Chest*, 129: 15-26.
- Nicholls, D. J., N. P. Tomkinson, K. E. Wiley, A. Brammall, L. Bowers, C. Grahames, A. Gaw, P. Meghani, P. Shelton, T. J. Wright, and P. R. Mallinder. 2008. 'Identification of a putative intracellular allosteric antagonist binding-site in the CXC chemokine receptors 1 and 2', *Mol Pharmacol*, 74: 1193-202.
- Nimjee, S. M., R. R. White, R. C. Becker, and B. A. Sullenger. 2017. 'Aptamers as Therapeutics', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57: 61-79.

- Nishimura, A., C. Sunggip, H. Tozaki-Saitoh, T. Shimauchi, T. Numaga-Tomita, K. Hirano, T. Ide, J. M. Boeynaems, H. Kurose, M. Tsuda, B. Robaye, K. Inoue, and M. Nishida. 2016. 'Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension', *Sci Signal*, 9: ra7.
- Noma, T., A. Lemaire, S. V. Naga Prasad, L. Barki-Harrington, D. G. Tilley, J. Chen, P. Le Corvoisier, J. D. Violin, H. Wei, R. J. Lefkowitz, and H. A. Rockman. 2007. 'Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection', *J Clin Invest*, 117: 2445-58.
- O'Callaghan, K., A. Kuliopulos, and L. Covic. 2012. 'Turning receptors on and off with intracellular pepducins: new insights into G-protein-coupled receptor drug development', *J Biol Chem*, 287: 12787-96.
- O'Callaghan, K., L. Lee, N. Nguyen, M. Y. Hsieh, N. C. Kaneider, A. K. Klein, K. Sprague, R. A. Van Etten, A. Kuliopulos, and L. Covic. 2012. 'Targeting CXCR4 with cell-penetrating pepducins in lymphoma and lymphocytic leukemia', *Blood*, 119: 1717-25.
- Oduori, O. S., N. Murao, K. Shimomura, H. Takahashi, Q. Zhang, H. Dou, S. Sakai, K. Minami, B. Chanclon, C. Guida, L. Kothegeala, J. Tolo, Y. Maejima, N. Yokoi, Y. Minami, T. Miki, P. Rorsman, and S. Seino. 2020. 'Gs/Gq signaling switch in beta cells defines incretin effectiveness in diabetes', *J Clin Invest*, 130: 6639-55.
- Oh, K. S., J. H. Lee, K. Y. Yi, C. J. Lim, S. Lee, C. H. Park, H. W. Seo, and B. H. Lee. 2015. 'The orally active urotensin receptor antagonist, KR36676, attenuates cellular and cardiac hypertrophy', *Br J Pharmacol*, 172: 2618-33.
- Oh, K. S., J. H. Lee, K. Y. Yi, C. J. Lim, B. K. Park, H. W. Seo, and B. H. Lee. 2017. 'A novel urotensin II receptor antagonist, KR-36996, improved cardiac function and attenuated cardiac hypertrophy in experimental heart failure', *Eur J Pharmacol*, 799: 94-102.
- Onan, D., L. Pipolo, E. Yang, R. D. Hannan, and W. G. Thomas. 2004. 'Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases', *Mol Endocrinol*, 18: 2344-54.

- Orij, G. K., and H. R. Keiser. 1997. 'Protein kinase C mediates angiotensin II-induced contractions and the release of endothelin and prostacyclin in rat aortic rings', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57: 135-41.
- Oswald, C., M. Rappas, J. Kean, A. S. Dore, J. C. Errey, K. Bennett, F. Deflorian, J. A. Christopher, A. Jazayeri, J. S. Mason, M. Congreve, R. M. Cooke, and F. H. Marshall. 2016. 'Intracellular allosteric antagonism of the CCR9 receptor', *Nature*, 540: 462-65.
- Otaki, J. M., and S. Firestein. 2001. 'Length analyses of mammalian G-protein-coupled receptors', *J Theor Biol*, 211: 77-100.
- Padwal, R. S., and S. R. Majumdar. 2007. 'Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant', *Lancet*, 369: 71-7.
- Papadopoulos, P., N. Bousette, and A. Giaid. 2008. 'Urotensin-II and cardiovascular remodeling', *Peptides*, 29: 764-9.
- Pardon, E., C. Betti, T. Laeremans, F. Chevillard, K. Guillemyn, P. Kolb, S. Ballet, and J. Steyaert. 2018. 'Nanobody-Enabled Reverse Pharmacology on G-Protein-Coupled Receptors', *Angew Chem Int Ed Engl*, 57: 5292-95.
- Pastore, L., A. Tessitore, S. Martinotti, E. Toniato, E. Alesse, M. C. Bravi, C. Ferri, G. Desideri, A. Gulino, and A. Santucci. 1999. 'Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo', *Circulation*, 100: 1646-52.
- Patacchini, R., P. Santicioli, S. Giuliani, P. Grieco, E. Novellino, P. Rovero, and C. A. Maggi. 2003. 'Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta', *Br J Pharmacol*, 140: 1155-8.
- Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz. 2006. 'Physiology of local renin-angiotensin systems', *Physiol Rev*, 86: 747-803.
- Pearson, D., J. E. Shively, B. R. Clark, Geschwind, II, M. Barkley, R. S. Nishioka, and H. A. Bern. 1980. 'Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 5021-4.
- Pehlivan, Y., R. Dokuyucu, T. Demir, D. S. Kaplan, I. Koc, M. Orkmez, I. H. Turkbeyler, A. O. Ceribasi, E. Tutar, S. Taysi, B. Kisacik, and A.

- M. Onat. 2014. 'Palosuran treatment effective as bosentan in the treatment model of pulmonary arterial hypertension', *Inflammation*, 37: 1280-8.
- 'Pepducins: lipopeptide allosteric modulators of GPCR signaling'. 2012. *Drug Discov Today Technol*, 9: e1-e70.
- Pereira-Castro, J., C. Bras-Silva, and A. P. Fontes-Sousa. 2019. 'Novel insights into the role of urotensin II in cardiovascular disease', *Drug Discov Today*, 24: 2170-80.
- Persson, P. B. 2003. 'Renin: origin, secretion and synthesis', *J Physiol*, 552: 667-71.
- Peterson, Y. K., and L. M. Luttrell. 2017. 'The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling', *Pharmacol Rev*, 69: 256-97.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. 2004. 'UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis', *J Comput Chem*, 25: 1605-12.
- Piantini, U., O.W. Sorensen, and R. R. Ernst. 1982. 'Multiple Quantum Filters for Elucidating NMR Coupling Network. ', *J. Am. Chem. Soc.*, 104: 6800-01.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman, and R. J. Lefkowitz. 1998. 'G protein-coupled receptor kinases', *Annu Rev Biochem*, 67: 653-92.
- Prasanna, X., M. Mohole, A. Chattopadhyay, and D. Sengupta. 2020. 'Role of cholesterol-mediated effects in GPCR heterodimers', *Chem Phys Lipids*, 227: 104852.
- Prosser, H. C., M. E. Forster, A. M. Richards, and C. J. Pemberton. 2008. 'Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury', *Peptides*, 29: 770-7.
- Pueyo, M. E., W. Gonzalez, A. Nicoletti, F. Savoie, J. F. Arnal, and J. B. Michel. 2000. 'Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 645-51.

- Puthenveedu, M. A., B. Lauffer, P. Temkin, R. Vistein, P. Carlton, K. Thorn, J. Taunton, O. D. Weiner, R. G. Parton, and M. von Zastrow. 2010. 'Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains', *Cell*, 143: 761-73.
- Qiu, Z. B., H. Xu, C. Duan, and X. Chen. 2012. 'Osteopontin is required for angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells', *Pharmazie*, 67: 553-8.
- Quitterer, U., and S. AbdAlla. 2014. 'Vasopressor meets vasodepressor: The AT1-B2 receptor heterodimer', *Biochem Pharmacol*, 88: 284-90.
- Quitterer, U., X. Fu, A. Pohl, K. M. Bayoumy, A. Langer, and S. AbdAlla. 2019. 'Beta-Arrestin1 Prevents Preeclampsia by Downregulation of Mechanosensitive AT1-B2 Receptor Heteromers', *Cell*, 176: 318-33 e19.
- Quoyer, J., J. M. Janz, J. Luo, Y. Ren, S. Armando, V. Lukashova, J. L. Benovic, K. E. Carlson, S. W. Hunt, 3rd, and M. Bouvier. 2013. 'Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E5088-97.
- Rashid, A. J., C. H. So, M. M. Kong, T. Furtak, M. El-Ghundi, R. Cheng, B. F. O'Dowd, and S. R. George. 2007. 'D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 654-9.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. Devree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis, and B. K. Kobilka. 2011. 'Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor', *Nature*, 469: 175-80.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis, and B. K. Kobilka. 2007. 'Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor', *Nature*, 450: 383-7.

- Rasmussen, S. G., B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, and B. K. Kobilka. 2011. 'Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex', *Nature*, 477: 549-55.
- Reiter, E., S. Ahn, A. K. Shukla, and R. J. Lefkowitz. 2012. 'Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52: 179-97.
- Reiter, E., M. A. Ayoub, L. P. Pellissier, F. Landomiel, A. Musnier, A. Trefier, J. Gandia, F. De Pascali, S. Tahir, R. Yvinec, G. Bruneau, A. Poupon, and P. Crepieux. 2017. 'beta-arrestin signalling and bias in hormone-responsive GPCRs', *Mol Cell Endocrinol*, 449: 28-41.
- Reiter, E., and R. J. Lefkowitz. 2006. 'GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling', *Trends Endocrinol Metab*, 17: 159-65.
- Remsberg, J. R., H. Lou, S. G. Tarasov, M. Dean, and N. I. Tarasova. 2007. 'Structural analogues of smoothed intracellular loops as potent inhibitors of Hedgehog pathway and cancer cell growth', *J Med Chem*, 50: 4534-8.
- Ross, B., K. McKendy, and A. Giaid. 2010. 'Role of urotensin II in health and disease', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298: R1156-72.
- Rozenfeld, R., A. Gupta, K. Gagnidze, M. P. Lim, I. Gomes, D. Lee-Ramos, N. Nieto, and L. A. Devi. 2011. 'AT1R-CB(1)R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II', *EMBO J*, 30: 2350-63.
- Russell, F. D., P. Molenaar, and D. M. O'Brien. 2001. 'Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro', *Br J Pharmacol*, 132: 5-9.
- Sabri, A., B. I. Levy, P. Poitevin, L. Caputo, E. Faggin, F. Marotte, L. Rappaport, and J. L. Samuel. 1997. 'Differential roles of AT1 and AT2 receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in

- response to stimulation with angiotensin II', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 257-64.
- Saetrum Opgaard, O., H. Nothacker, F. J. Ehlert, and D. N. Krause. 2000. 'Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates', *Eur J Pharmacol*, 406: 265-71.
- Sauliere, A., M. Bellot, H. Paris, C. Denis, F. Finana, J. T. Hansen, M. F. Altie, M. H. Seguelas, A. Pathak, J. L. Hansen, J. M. Senard, and C. Gales. 2012. 'Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT1 receptor entity', *Nat Chem Biol*, 8: 622-30.
- Sauzeau, V., E. Le Mellionnec, J. Bertoglio, E. Scalbert, P. Pacaud, and G. Loirand. 2001. 'Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase', *Circ Res*, 88: 1102-4.
- Saviello, M. R., S. Malfi, P. Campiglia, A. Cavalli, P. Grieco, E. Novellino, and A. Carotenuto. 2010. 'New insight into the mechanism of action of the temporin antimicrobial peptides', *Biochemistry*, 49: 1477-85.
- Schelshorn, D., F. Joly, S. Mutel, C. Hampe, B. Breton, V. Mutel, and R. Lutjens. 2012. 'Lateral allosterism in the glucagon receptor family: glucagon-like peptide 1 induces G-protein-coupled receptor heteromer formation', *Mol Pharmacol*, 81: 309-18.
- Schneditz, G., J. E. Elias, E. Pagano, M. Zaeem Cader, S. Saveljeva, K. Long, S. Mukhopadhyay, M. Arasteh, T. D. Lawley, G. Dougan, A. Bassett, T. H. Karlsen, A. Kaser, and N. C. Kaneider. 2019. 'GPR35 promotes glycolysis, proliferation, and oncogenic signaling by engaging with the sodium potassium pump', *Sci Signal*, 12.
- Schnermann, J., and J. P. Briggs. 2013. 'Tubular control of renin synthesis and secretion', *Pflugers Arch*, 465: 39-51.
- Schweda, F., U. Friis, C. Wagner, O. Skott, and A. Kurtz. 2007. 'Renin release', *Physiology (Bethesda)*, 22: 310-9.
- Segain, J. P., M. Rolli-Derkinderen, N. Gervois, D. Raingeard de la Bletiere, G. Loirand, and P. Pacaud. 2007. 'Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes', *J Immunol*, 179: 901-9.

- Sevigny, L. M., P. Zhang, A. Bohm, K. Lazarides, G. Perides, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2011. 'Interdicting protease-activated receptor-2-driven inflammation with cell-penetrating pepducins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 8491-6.
- Shenoy, S. K., and R. J. Lefkowitz. 2003. 'Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling', *Biochem J*, 375: 503-15.
- Shenoy, S. K., P. H. McDonald, T. A. Kohout, and R. J. Lefkowitz. 2001. 'Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin', *Science*, 294: 1307-13.
- Shi, H., Q. Han, J. Xu, W. Liu, T. Chu, and L. Zhao. 2016. 'Urotensin II induction of neonatal cardiomyocyte hypertrophy involves the CaMKII/PLN/SERCA 2a signaling pathway', *Gene*, 583: 8-14.
- Shiraishi, Y., T. Watanabe, T. Suguro, M. Nagashima, R. Kato, S. Hongo, H. Itabe, A. Miyazaki, T. Hirano, and M. Adachi. 2008. 'Chronic urotensin II infusion enhances macrophage foam cell formation and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice', *J Hypertens*, 26: 1955-65.
- Shukla, A. K., G. H. Westfield, K. Xiao, R. I. Reis, L. Y. Huang, P. Tripathi-Shukla, J. Qian, S. Li, A. Blanc, A. N. Oleskie, A. M. Dosey, M. Su, C. R. Liang, L. L. Gu, J. M. Shan, X. Chen, R. Hanna, M. Choi, X. J. Yao, B. U. Klink, A. W. Kahsai, S. S. Sidhu, S. Koide, P. A. Penczek, A. A. Kossiakoff, V. L. Woods, Jr., B. K. Kobilka, G. Skiniotis, and R. J. Lefkowitz. 2014. 'Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor', *Nature*, 512: 218-22.
- Siddiquee, K., J. Hampton, D. McAnally, L. May, and L. Smith. 2013. 'The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition', *Br J Pharmacol*, 168: 1104-17.
- Silvestre, R. A., E. M. Egido, R. Hernandez, J. Leprince, D. Chatenet, H. Tollemmer, N. Chartrel, H. Vaudry, and J. Marco. 2004. 'Urotensin-II is present in pancreatic extracts and inhibits insulin release in the perfused rat pancreas', *Eur J Endocrinol*, 151: 803-9.
- Singh, M., S. Dalal, and K. Singh. 2014. 'Osteopontin: At the cross-roads of myocyte survival and myocardial function', *Life Sci*, 118: 1-6.

- Sleno, R., D. Devost, D. Petrin, A. Zhang, K. Bourque, Y. Shinjo, J. Aoki, A. Inoue, and T. E. Hebert. 2017. 'Conformational biosensors reveal allosteric interactions between heterodimeric AT1 angiotensin and prostaglandin F2alpha receptors', *J Biol Chem*, 292: 12139-52.
- Smrcka, A. V. 2008. 'G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling', *Cell Mol Life Sci*, 65: 2191-214.
- Song, W., A. E. Abdel-Razik, W. Lu, Z. Ao, D. G. Johns, S. A. Douglas, R. J. Balment, and N. Ashton. 2006. 'Urotensin II and renal function in the rat', *Kidney Int*, 69: 1360-8.
- Sparks, M. A., S. D. Crowley, S. B. Gurley, M. Mirotsov, and T. M. Coffman. 2014. 'Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology', *Compr Physiol*, 4: 1201-28.
- States, D. J., R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben. 1982. 'A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants.', *J. Magn. Reson.*, 42: 286-92.
- Staus, D. P., L. M. Wingler, R. T. Strachan, S. G. Rasmussen, E. Pardon, S. Ahn, J. Steyaert, B. K. Kobilka, and R. J. Lefkowitz. 2014. 'Regulation of beta2-adrenergic receptor function by conformationally selective single-domain intrabodies', *Mol Pharmacol*, 85: 472-81.
- Strack, M., E. Billard, D. Chatenet, and W. D. Lubell. 2017. 'Urotensin core mimics that modulate the biological activity of urotensin-II related peptide but not urotensin-II', *Bioorg Med Chem Lett*, 27: 3412-16.
- Sugo, T., Y. Murakami, Y. Shimomura, M. Harada, M. Abe, Y. Ishibashi, C. Kitada, N. Miyajima, N. Suzuki, M. Mori, and M. Fujino. 2003. 'Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain', *Biochem Biophys Res Commun*, 310: 860-8.
- Szakadati, G., A. D. Toth, I. Olah, L. S. Erdelyi, T. Balla, P. Varnai, L. Hunyady, and A. Balla. 2015. 'Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation', *Mol Pharmacol*, 87: 972-81.

- Szalai, B., L. Barkai, G. Turu, L. Szidonya, P. Varnai, and L. Hunyady. 2012. 'Allosteric interactions within the AT(1) angiotensin receptor homodimer: role of the conserved DRY motif', *Biochem Pharmacol*, 84: 477-85.
- Takefuji, M., A. Wirth, M. Lukasova, S. Takefuji, T. Boettger, T. Braun, T. Althoff, S. Offermanns, and N. Wettschureck. 2012. 'G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure', *Circulation*, 126: 1972-82.
- Tamura, K., M. Okazaki, M. Tamura, K. Isozumi, H. Tasaki, and Y. Nakashima. 2003. 'Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: involvement of cell adhesion-mediated integrin signaling', *Life Sci*, 72: 1049-60.
- Tchernychev, B., Y. Ren, P. Sachdev, J. M. Janz, L. Haggis, A. O'Shea, E. McBride, R. Looby, Q. Deng, T. McMurry, M. A. Kazmi, T. P. Sakmar, S. Hunt, 3rd, and K. E. Carlson. 2010a. 'Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 22255-9.
- Tchernychev, B., Y. Ren, P. Sachdev, J. M. Janz, L. Haggis, A. O'Shea, E. McBride, R. Looby, Q. Deng, T. McMurry, M. A. Kazmi, T. P. Sakmar, S. Hunt, and K. E. Carlson. 2010b. 'Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 22255-59.
- Terrillon, S., and M. Bouvier. 2004. 'Roles of G-protein-coupled receptor dimerization', *EMBO Rep*, 5: 30-4.
- Thomas, W. G., H. Qian, C. S. Chang, and S. Karnik. 2000. 'Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT(1A)) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state', *J Biol Chem*, 275: 2893-900.
- Thompson, A. A., W. Liu, E. Chun, V. Katritch, H. Wu, E. Vardy, X. P. Huang, C. Trapella, R. Guerrini, G. Calo, B. L. Roth, V. Cherezov,

- and R. C. Stevens. 2012. 'Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic', *Nature*, 485: 395-9.
- Thomsen, A. R., B. Plouffe, T. J. Cahill, 3rd, A. K. Shukla, J. T. Tarrasch, A. M. Dosey, A. W. Kahsai, R. T. Strachan, B. Pani, J. P. Mahoney, L. Huang, B. Breton, F. M. Heydenreich, R. K. Sunahara, G. Skiniotis, M. Bouvier, and R. J. Lefkowitz. 2016. 'GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling', *Cell*, 166: 907-19.
- Toth, A. D., P. Gyombolai, B. Szalai, P. Varnai, G. Turu, and L. Hunyady. 2017. 'Angiotensin type 1A receptor regulates beta-arrestin binding of the beta2-adrenergic receptor via heterodimerization', *Mol Cell Endocrinol*, 442: 113-24.
- Touyz, R. M., G. Yao, and E. L. Schiffrin. 2003. 'c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 981-7.
- Tressel, S. L., G. Koukos, B. Tchernychev, S. L. Jacques, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2011. 'Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models', *Methods Mol Biol*, 683: 259-75.
- Trueblood, N. A., Z. Xie, C. Communal, F. Sam, S. Ngoy, L. Liaw, A. W. Jenkins, J. Wang, D. B. Sawyer, O. H. Bing, C. S. Apstein, W. S. Colucci, and K. Singh. 2001. 'Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin', *Circ Res*, 88: 1080-7.
- Tsuji, M., S. Ueda, T. Hirayama, K. Okuda, Y. Sakaguchi, A. Isono, and H. Nagasawa. 2013. 'FRET-based imaging of transbilayer movement of pepducin in living cells by novel intracellular bioreductively activatable fluorescent probes', *Org Biomol Chem*, 11: 3030-7.
- Tzanidis, A., R. D. Hannan, W. G. Thomas, D. Onan, D. J. Autelitano, F. See, D. J. Kelly, R. E. Gilbert, and H. Krum. 2003. 'Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy', *Circ Res*, 93: 246-53.

- Usher, M. G., S. Z. Duan, C. Y. Ivaschenko, R. A. Frieler, S. Berger, G. Schutz, C. N. Lumeng, and R. M. Mortensen. 2010. 'Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice', *J Clin Invest*, 120: 3350-64.
- Ushio-Fukai, M., K. K. Griendling, M. Akers, P. R. Lyons, and R. W. Alexander. 1998. 'Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits', *J Biol Chem*, 273: 19772-7.
- van der Westhuizen, E. T., C. Valant, P. M. Sexton, and A. Christopoulos. 2015. 'Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors', *J Pharmacol Exp Ther*, 353: 246-60.
- Vaudry, H., J. C. Do Rego, J. C. Le Mevel, D. Chatenet, H. Tostivint, A. Fournier, M. C. Tonon, G. Pelletier, J. M. Conlon, and J. Leprince. 2010. 'Urotensin II, from fish to human', *Ann N Y Acad Sci*, 1200: 53-66.
- Vaudry, H., J. Leprince, D. Chatenet, A. Fournier, D. G. Lambert, J. C. Le Mevel, E. H. Ohlstein, A. Schwertani, H. Tostivint, and D. Vaudry. 2015. 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCII. Urotensin II, urotensin II-related peptide, and their receptor: from structure to function', *Pharmacol Rev*, 67: 214-58.
- Violin, J. D., S. M. DeWire, D. Yamashita, D. H. Rominger, L. Nguyen, K. Schiller, E. J. Whalen, M. Gowen, and M. W. Lark. 2010. 'Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance', *J Pharmacol Exp Ther*, 335: 572-9.
- Waldhoer, M., J. Fong, R. M. Jones, M. M. Lunzer, S. K. Sharma, E. Kostenis, P. S. Portoghese, and J. L. Whistler. 2005. 'A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 9050-5.
- Wang, Y., L. Jin, Y. Song, M. Zhang, D. Shan, Y. Liu, M. Fang, F. Lv, R. P. Xiao, and Y. Zhang. 2017. 'beta-arrestin 2 mediates cardiac

- ischemia-reperfusion injury via inhibiting GPCR-independent cell survival signalling', *Cardiovasc Res*, 113: 1615-26.
- Wang, Y., W. Tian, C. Xiu, M. Yan, S. Wang, and Y. Mei. 2019. 'Urantide improves the structure and function of right ventricle as determined by echocardiography in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rat model', *Clin Rheumatol*, 38: 29-35.
- Wang, Y., X. R. Zheng, N. Riddick, M. Bryden, W. Baur, X. Zhang, and H. K. Surks. 2009. 'ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells', *Circ Res*, 104: 531-40.
- Watson, A. M., G. W. Lambert, K. J. Smith, and C. N. May. 2003. 'Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions', *Hypertension*, 42: 373-9.
- Watson, A. M., M. Olukman, C. Koulis, Y. Tu, D. Samijono, D. Yuen, C. Lee, D. J. Behm, M. E. Cooper, K. A. Jandeleit-Dahm, A. C. Calkin, and T. J. Allen. 2013. 'Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes', *Diabetologia*, 56: 1155-65.
- Watson, C., G. Chen, P. Irving, J. Way, W. J. Chen, and T. Kenakin. 2000. 'The use of stimulus-biased assay systems to detect agonist-specific receptor active states: implications for the trafficking of receptor stimulus by agonists', *Mol Pharmacol*, 58: 1230-8.
- Wielders, S. J., A. Bennaghmouch, C. P. Reutelingsperger, E. M. Bevers, and T. Lindhout. 2007. 'Anticoagulant and antithrombotic properties of intracellular protease-activated receptor antagonists', *J Thromb Haemost*, 5: 571-6.
- Wilson, P. C., M. H. Lee, K. M. Appleton, H. M. El-Shewy, T. A. Morinelli, Y. K. Peterson, L. M. Luttrell, and A. A. Jaffa. 2013. 'The arrestin-selective angiotensin AT1 receptor agonist [Sar1,Ile4,Ile8]-AngII negatively regulates bradykinin B2 receptor signaling via AT1-B2 receptor heterodimers', *J Biol Chem*, 288: 18872-84.

- Wingler, L. M., C. McMahon, D. P. Staus, R. J. Lefkowitz, and A. C. Kruse. 2019. 'Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody', *Cell*, 176: 479-90 e12.
- Winther, M., M. Gabl, T. I. Oprea, B. Jonsson, F. Boulay, J. Bylund, C. Dahlgren, and H. Forsman. 2014. 'Antibacterial activity of pepducins, allosterical modulators of formyl peptide receptor signaling', *Antimicrob Agents Chemother*, 58: 2985-8.
- Wise, A., K. Gearing, and S. Rees. 2002. 'Target validation of G-protein coupled receptors', *Drug Discov Today*, 7: 235-46.
- Wnorowski, A., and K. Jozwiak. 2014. 'Homo- and hetero-oligomerization of beta2-adrenergic receptor in receptor trafficking, signaling pathways and receptor pharmacology', *Cell Signal*, 26: 2259-65.
- Wu, Y. L., G. Pei, and G. H. Fan. 1998. 'Inhibition of phospholipase C blocks opioid receptor-mediated activation of Gi proteins', *Neuroreport*, 9: 99-103.
- Wüthrich, K. 1986. 'In NMR of Proteins and Nucleic Acids.', *John Wiley & Sons: New York*.
- Xiao, K., D. B. McClatchy, A. K. Shukla, Y. Zhao, M. Chen, S. K. Shenoy, J. R. Yates, 3rd, and R. J. Lefkowitz. 2007. 'Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 12011-6.
- Xu, J., Q. Han, H. Shi, W. Liu, T. Chu, and H. Li. 2017. 'Role of PKA in the process of neonatal cardiomyocyte hypertrophy induced by urotensin II', *Int J Mol Med*, 40: 499-504.
- Yamazaki, T., I. Komuro, and Y. Yazaki. 1999. 'Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy', *Am J Cardiol*, 83: 53H-57H.
- Yang, E., A. Boire, A. Agarwal, N. Nguyen, K. O'Callaghan, P. Tu, A. Kuliopulos, and L. Covic. 2009. 'Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis', *Cancer research*, 69: 6223-31.
- You, Z., J. Genest, Jr., P. O. Barrette, A. Hafiane, D. J. Behm, P. D'Orleans-Juste, and A. G. Schwertani. 2012. 'Genetic and pharmacological

- manipulation of urotensin II ameliorate the metabolic and atherosclerosis sequelae in mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: 1809-16.
- Young, B. M., E. Nguyen, M. A. J. Chedrawe, J. K. Rainey, and D. J. Dupre. 2017. 'Differential Contribution of Transmembrane Domains IV, V, VI, and VII to Human Angiotensin II Type 1 Receptor Homomer Formation', *J Biol Chem*, 292: 3341-50.
- Zafari, A. M., M. Ushio-Fukai, M. Akers, Q. Yin, A. Shah, D. G. Harrison, W. R. Taylor, and K. K. Griendling. 1998. 'Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy', *Hypertension*, 32: 488-95.
- Zeisberg, E. M., O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo, and R. Kalluri. 2007. 'Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis', *Nat Med*, 13: 952-61.
- Zha, D., H. Cheng, W. Li, Y. Wu, X. Li, L. Zhang, Y. H. Feng, and X. Wu. 2017. 'High glucose instigates tubulointerstitial injury by stimulating hetero-dimerization of adiponectin and angiotensin II receptors', *Biochem Biophys Res Commun*, 493: 840-46.
- Zhai, P., M. Yamamoto, J. Galeotti, J. Liu, M. Masurekar, J. Thaisz, K. Irie, E. Holle, X. Yu, S. Kupersmidt, D. M. Roden, T. Wagner, A. Yatani, D. E. Vatner, S. F. Vatner, and J. Sadoshima. 2005. 'Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G α q/G α i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice', *J Clin Invest*, 115: 3045-56.
- Zhang, P., A. Gruber, S. Kasuda, C. Kimmelstiel, K. O'Callaghan, D. H. Cox, A. Bohm, J. D. Baleja, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2012. 'Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin', *Circulation*, 126: 83-91.
- Zhang, P., A. J. Leger, J. D. Baleja, R. Rana, T. Corlin, N. Nguyen, G. Koukos, A. Bohm, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2015. 'Allosteric

- Activation of a G Protein-coupled Receptor with Cell-penetrating Receptor Mimetics', *J Biol Chem*, 290: 15785-98.
- Zhang, Y. G., Z. J. Kuang, Y. Y. Mao, R. H. Wei, S. L. Bao, L. B. Wu, Y. G. Li, and C. S. Tang. 2011. 'Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts', *Peptides*, 32: 2452-8.
- Zhang, Y. G., J. Li, Y. G. Li, and R. H. Wei. 2008. 'Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta', *J Hypertens*, 26: 1119-26.
- Zhang, Y. G., Y. G. Li, B. G. Liu, R. H. Wei, D. M. Wang, X. R. Tan, D. F. Bu, Y. Z. Pang, and C. S. Tang. 2007. 'Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol', *Acta Pharmacol Sin*, 28: 36-43.
- Zhao, J., L. D. Xie, C. J. Song, X. X. Mao, H. R. Yu, Q. X. Yu, L. Q. Ren, Y. Shi, Y. Q. Xie, Y. Li, S. S. Liu, and X. H. Yang. 2014. 'Urantide improves atherosclerosis by controlling C-reactive protein, monocyte chemoattractant protein-1 and transforming growth factor-beta expression in rats', *Exp Ther Med*, 7: 1647-52.
- Zhao, J., Q. X. Yu, W. Kong, H. C. Gao, B. Sun, Y. Q. Xie, and L. Q. Ren. 2013. 'The urotensin II receptor antagonist, urantide, protects against atherosclerosis in rats', *Exp Ther Med*, 5: 1765-69.
- Zheng, Y., L. Qin, N. V. Zacarias, H. de Vries, G. W. Han, M. Gustavsson, M. Dabros, C. Zhao, R. J. Cherney, P. Carter, D. Stamos, R. Abagyan, V. Cherezov, R. C. Stevens, I. Jzerman AP, L. H. Heitman, A. Tebben, I. Kufareva, and T. M. Handel. 2016. 'Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists', *Nature*, 540: 458-61.
- Zhou, Q., D. Yang, M. Wu, Y. Guo, W. Guo, L. Zhong, X. Cai, A. Dai, W. Jang, E. I. Shakhnovich, Z. J. Liu, R. C. Stevens, N. A. Lambert, M. M. Babu, M. W. Wang, and S. Zhao. 2019. 'Common activation mechanism of class A GPCRs', *Elife*, 8.
- Zimmerman, B., A. Beautrait, B. Aguila, R. Charles, E. Escher, A. Claing, M. Bouvier, and S. A. Laporte. 2012. 'Differential beta-arrestin-

dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs', *Sci Signal*, 5: ra33.

Zou, Y., R. Nagai, and T. Yamazaki. 2001. 'Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats', *FEBS Lett*, 508: 57-60.

ANNEXE I

Section supplémentaire expliquant la technique BRET utilisée :

La technique de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (*bioluminescence resonance energy transfer* – BRET) a été grandement utilisée pour les expériences incluses dans cette thèse. Cette technique est aussi simple que complexe, car elle requiert une attention particulière aux détails lors de la réalisation de l'expérience. Deux types de biosenseurs sont utilisés pour la technique BRET. Ces biosenseurs sont des plasmides. Le premier type utilise des biosenseurs dits bicistroniques, pour lesquels le gène codant pour une protéine G, β -arrestines, ERK et/ou DAG est fusionné du côté N-terminal à un Rluc et du côté C-terminal à un GFP. L'expression de ce biosenseur dans les cellules couplées à l'ajout de l'agoniste du récepteur nous permettra de mesurer l'activation de GFP par Rluc (suite à l'ajout du substrat de Rluc, la coelenterazine 400a). Donc, basé sur la mesure du changement au niveau de structure et activité du biosenseur, il est possible de déterminer des paramètres pharmacologiques tel que l'efficacité et la puissance. L'autre type de biosenseurs mesurent la dissociation du complexe des protéines G (alpha, beta et gamma) et le recrutement des beta-arrestines au niveau des membranes plasmiques. Dans ce cas ci, Rluc et GFP sont co-exprimés séparément. Dans le cas des protéines G, Rluc est fusionné au Galpga alors que GFP est couplé au Ggamma. Dans le cas des beta-arrestines, le GFP est fusionné au beta-arrestines alors que Rluc est fusionné à un peptide qui s'exprime au niveau de la membrane plasmique et ce dernier pour mesurer le recrutement des beta-arrestines au niveau de la membrane plasmique. Dans le cadre de nos études, on a utilisé ce dernier système pour mesurer le recrutement des β -arrestines au niveau des récepteur d'hAT1R et hUT. Dans le reste des expériences BRET pour les autres voies, on a utilisé le premier type de biosenseurs soit les biosenseurs polycistroniques.