

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

ÉTUDE DES DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES PROPRES À
L'ACTIVATION D'UT PAR L'UROTENSIN-II RELATED PEPTIDE

Par

Étienne Billard

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Charles Calmettes
INRS-IAF

Examineur externe

Éric Marsault
Université de Sherbrooke

Examineur externe

Philippe Sarret
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

David Chatenet
INRS-IAF

REMERCIEMENTS

Avant tout, merci David du fond du cœur pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire, cru en moi et donné l'opportunité de collaborer sur tant de projets. Ta patience, ta pédagogie et ta disponibilité m'ont apporté rigueur et esprit critique, mais ont fait également de ce doctorat une merveilleuse expérience.

Merci Myriam pour m'avoir accompagné au laboratoire, aidé et conseillé à maintes reprises et enseigné les rudiments de la mécanique HPLC.

Merci Alain, pour ta bienveillance et tes encouragements.

Merci à mes camarades du laboratoire, Mathilde pour tous ces bons moments qu'on a passé ensemble dans et hors du laboratoire, Mustapha pour nos discussions et parties d'échecs, Hassan, pour tous les coups de mains que tu m'as offert et Laura pour ce partenariat formidable.

Merci à tous les autres, Morgane, Abdenour, Morgane, Vincent, Marjolaine, Philippine... La liste ne sera pas exhaustive. Vous m'avez rendu la vie belle ici à l'INRS.

Et enfin, un grand merci à Anne Philippon, qui m'a accompagné dans absolument toutes mes démarches administratives durant mon séjour à l'INRS.

RÉSUMÉ

Le système urotensinergique, composé de deux peptides endogènes, à savoir l'urotensine II (UII) et l'*urotensin II-related peptide* (URP) et d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) UT, est actuellement considéré comme une cible prometteuse pour le traitement de l'athérosclérose et de l'hypertension artérielle pulmonaire, deux pathologies pour lesquelles aucun traitement n'existe. Alors que plusieurs études chez les animaux ont démontré l'utilité d'antagonistes d'UT comme agents thérapeutiques potentiels, les essais cliniques chez l'homme ont eu un succès limité en raison de la pharmacologie de ce système qui apparaît complexe et majoritairement inconnue. Bien que possédant une forte homologie structurale, notamment au niveau de leur site bioactif (-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-), les deux ligands endogènes semblent être capables de stabiliser différentes conformations du récepteur et ainsi posséder des profils signalétiques distincts, une caractéristique connue sous le terme d'agonisme biaisé ou sélectivité fonctionnelle. Au cours des dernières années, notre groupe a développé à partir de la structure de l'URP les premiers modulateurs allostériques du système urotensinergique, *i.e.* urocontrin (UC) et urocontrin A (UCA), capable de discriminer *in vitro* et *in vivo* les activités biologiques associées à l'UII et/ou l'URP (effet *probe-dependent*). Nous avons alors émis l'hypothèse que le domaine intracyclique de l'URP, quoique commun à celui de l'UII, établit des interactions avec le récepteur différentes de celles établies par l'UII. Nous avons entrepris au cours de ce doctorat deux études de relation structure-activité dans lesquelles les résidus Phe³ et Tyr⁶ de l'URP ont été remplacés par des acides aminés non naturels et contraints. Chaque composé a été évalué pharmacologiquement pour sa capacité à lier UT, à induire la contraction d'anneaux aortiques de rat et à activer certaines voies de signalisation. La substitution de ces deux résidus dans l'URP a permis d'accéder à des ligands biaisés, ayant perdu la capacité d'activer efficacement la protéine G_q mais pas G₁₂. De plus, les ligands [D-Phe(pI)³]URP, [Bip³]URP et [Pep⁶]URP se sont avérés être des antagonistes capables de discriminer les activités contractiles de l'UII et de l'URP, suggérant ainsi que ces deux positions sont des nouveaux points d'accès pour développer des modulateurs allostériques du système urotensinergique. De tels ligands pourront fournir des données biologiques cruciales quant au rôle joué par chacun des peptides dans la régulation de l'homéostasie cardiaque, et guideront ainsi la conception rationnelle de futurs analogues.

ABSTRACT

The urotensinergetic system, composed of two endogenous peptides urotensin II (UII) and urotensin II-related peptide (URP) and a G protein-coupled receptor UT, is currently considered as a promising target for the treatment of atherosclerosis and pulmonary arterial hypertension, two conditions for which no therapy exists. While several animal studies have demonstrated the utility of UT antagonists as potential therapeutic agents, clinical trials had limited success due to the complex and mostly unknown pharmacology of this system. Although possessing a strong structural homology, especially at their bioactive site (-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-), the two endogenous ligands seem to be able to stabilize different conformations of the receptor and thus distinct signaling profiles, a feature known as biased agonism or functional selectivity. In recent years, our group has developed from the URP structure the first allosteric modulators of the urotensinergetic system, *i.e.* urocontrin (UC) and urocontrin A (UCA). Those molecules are able to discriminate *in-vitro* and *in-vivo* the biological activities associated with UII and / or URP (probe-dependent effect). We therefore hypothesized that the intracyclic domain of URP, although common with that of UII, establishes interactions with UT that are distinct from those established by UII. During this Ph.D., we undertook two structure-activity relationship studies in which the Tyr⁶ and Phe³ residues of URP were replaced by unnatural and constrained amino-acids. Each compound has been evaluated pharmacologically for its ability to bind UT, to induce rat aortic ring contraction, and to activate certain signaling pathways. The substitution of these two residues in URP generated several biased ligands that have lost their ability to activate G_q while maintaining G₁₂ activation. In addition, we observed that [D-Phe(pI)³]URP, [Bip³]URP and [Pep⁶]URP can antagonize differentially the contractile activities of UII and URP, suggesting that these two positions are new access points for developing allosteric modulators. Such ligands may provide crucial biological data as to the role played by each of the peptides in the regulation of cardiac homeostasis, which will guide the future rational design of analogs capable of fine tuning this system.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----|
| Première partie : Introduction | 1 |
| i. Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TMRs) | 1 |
| 1. Présentation des 7TMRs | 1 |
| 2. Voies de signalisation associées aux 7TMRs..... | 3 |
| 3. Sélectivité fonctionnelle..... | 6 |
| 4. Expression du biais. | 10 |
| 5. Modulation allostérique | 11 |
| 6. Multimérisation et allostérie latérale..... | 12 |
| ii. Le système Urotensinergique..... | 14 |
| 1. Découverte de l'UII et de l'URP..... | 14 |
| 2. Distribution chez les mammifères..... | 16 |
| 3. Le récepteur UT | 17 |
| 4. Voies de signalisation et activités associées | 20 |
| 5. Implication de ce système dans les pathologies cardiovasculaires | 23 |
| 6. UT et sélectivité fonctionnelle | 25 |
| 7. UT en tant qu'homodimère ? | 26 |
| iii. Relations Structure-Activité (RSA) | 27 |
| 1. Importance des résidus intracycliques | 27 |
| 2. Conformation structurale | 30 |
| 3. RSA du Tryptophane - développement des premiers modulateurs allostériques d'UT | 32 |
| 4. RSA de la Tyrosine..... | 36 |
| 5. RSA de la Phénylalanine..... | 37 |
| Hypothèse et objectifs | 39 |
| Deuxième partie : Présentation des articles | 41 |
| i. Premier article | 41 |
| ii. Deuxième article | 71 |
| Troisième partie : Discussion..... | 105 |
| i. Préambule | 105 |
| ii. Impact conformationnel du résidu Tyr ⁶ de l'URP | 107 |
| iii. Comportement du résidu Phe ³ de l'URP..... | 115 |
| iv. Variabilité inter-espèce et effets observés..... | 122 |
| v. Conclusion. | 123 |
| Bibliographie..... | 126 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Isoformes d'UUI et URP dans différents mammifères..... | 16 |
| Tableau 2 : Activités biologiques des N-Me-Tyr et N-Me-Cys adjacents..... | 109 |
| Tableau 3 : Activités biologiques des N-Me-Phe et N-Me-Trp adjacents..... | 119 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Schéma descriptif de la structure des RCPGs | 2 |
| Figure 2 : Schéma descriptif des mouvements des hélices de l'opsine, vue intracytoplasmique | 3 |
| Figure 3 : Signalisation associée aux RCPGs | 4 |
| Figure 4 : Courbes concentration/réponse représentant différents types d'agonistes..... | 7 |
| Figure 5 : Signalisation biaisée | 9 |
| Figure 6 : Multimérisation des RCPGs | 13 |
| Figure 7 : Distribution du système urotensinergique | 17 |
| Figure 8 : Récepteur UT humain..... | 19 |
| Figure 9 : Voies de signalisation d'UT entraînant la contraction | 21 |
| Figure 10 : Principales voies de signalisation associées à l'activation d'UT..... | 22 |
| Figure 11 : Cinétique de dissociation associée à l'UUI et l'URP..... | 27 |
| Figure 12 : Structures de l'UUI et l'URP, ainsi que de plusieurs analogues peptidiques. | 28 |
| Figure 13 : Influence de la portion N-ter de l'UUI et de l'URP sur leur liaison | 31 |
| Figure 14 : Conformations possibles d'une chaîne latérale | 33 |
| Figure 15 : Quelques modifications introduites dans les structures de l'UUI et/ou l'URP..... | 34 |
| Figure 16 : Urocontrin et Urocontrin A | 35 |
| Figure 17 : Activation de G _q et G ₁₂ des modulateurs allostériques décrits. | 106 |
| Figure 18 : Équilibre cis-trans..... | 110 |
| Figure 19 : Comparaison des conformations potentielles du résidu Tic(OH) ⁶ et N-Me-Tyr ⁶ | 111 |
| Figure 20 : Conformations permises aux résidus Aic(5-OH) et Hat..... | 113 |
| Figure 21 : Conformations permises du résidu Aba..... | 114 |
| Figure 22 : Substitutions proposées du résidu Tyr..... | 114 |
| Figure 23 : Substitutions proposées du résidu Phe..... | 121 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

urotensine II (UII)
urotensin II-related peptide (URP)
récepteur couplé aux protéines G (RCPG)
urocontrin (UC)
urocontrin A (UCA)
récepteur à 7 domaines transmembranaires (7TMR)
relations structure-activité (RSA)
extrémité N-terminale (N-ter)
domaine transmembranaire (TM)
boucle extracellulaire (EL)
extrémité C-terminale (C-ter)
guanosine diphosphate (GDP)
guanosine triphosphate (GTP)
adénylate cyclase (AC)
adénosine triphosphate (ATP)
adénosine monophosphate cyclique (AMPc)
protéine kinase A (PKA)
protéines kinases mitogènes activées (MAPKs)
récepteur adrénergique β_2 (β_2 AR)
monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS)
oxyde nitrique (NO)
phospholipase C β (PLC β)
phosphatidylinositol-4,5-diphosphate membranaire (PIP $_2$)
diacylglycérol (DAG)
inositol-1,4,5-triphosphate (IP $_3$)
calcium intracytosolique (Ca $^{2+}_i$)

phosphoinositide 3 kinase γ (PI3K γ)
kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERK_{1/2})
récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR)
récepteur de la cholécystokinine (CCKR)
lignée ovarienne de hamster chinois (CHO)
récepteur de l'angiotensine 1 de type I (AT1)
pituitary adenylyl cyclase 1 (PAC1)
récepteur aux opiacés (OR)
modulateurs allostériques positifs, négatifs ou silencieux (PAM/NAM/SAM)
acide γ -aminobutyrique (GABA)
récepteur de la dopamine (DR)
récepteur de la sérotonine (5-HTR)
récepteur métabotrope du glutamate (mGluR)
U11 humaine (hU11)
récepteur à la somatostatine (SSTR)
Rho kinases (RhoK)
cellules vasculaires de muscle lisse (CVML)
hypertension artérielle pulmonaire (HAP)
cellules musculaires lisses (CML)
UT de rat (rUT)
UT humain (hUT)
peptide natriurétique atrial (ANP)
 β,β -diméthylcystéine (Pen)
ornithine (Orn)
2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido [3,4-b] indole-3-carboxylique (Tpi)
acide tétrahydroisoquinoléine-1-carboxylique (Tiq)
lignée rénale embryonnaire humaine 293 (HEK 293)

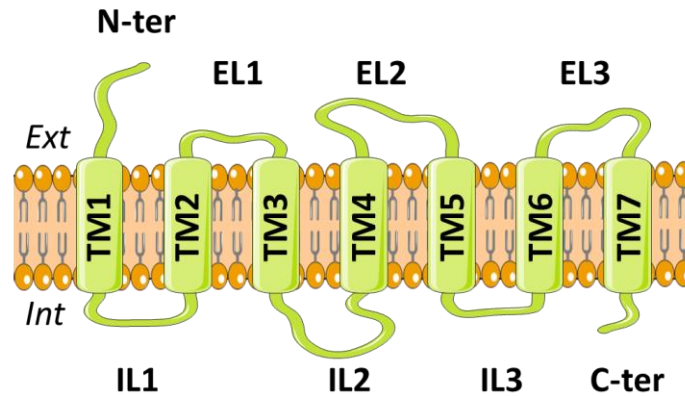
Première partie : Introduction

i. Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TMRs)

1. Présentation des 7TMRs

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires sont aussi appelés communément récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Chez l'homme, plus de 800 gènes codant pour des RCPGs ont été identifiés (Millar and Newton 2010) et à l'heure actuelle, 30 à 50 % des médicaments présents sur le marché ciblent ce type de protéines membranaires (Garland 2013). Les RCPG sont généralement classés en 5 familles en fonction de leurs homologies de séquence et de la présence de motifs ou de résidus conservés. On retrouve ainsi la famille des récepteurs homologues à la Rhodopsine, à la Sécrétine, aux récepteurs d'adhésions et au Glutamate ainsi que la famille des récepteurs Frizzled/Taste (Millar and Newton 2010). De façon générale, les RCPGs sont des protéines de quelques centaines d'acides aminés globalement caractérisées par (1) une extrémité N-terminale (N-ter) extracellulaire pouvant être N-glycosylée, (2) 7 domaines transmembranaires organisés en hélices α (TM1 à TM7) et reliés entre eux par 3 boucles intracellulaires (IL1 à IL3), et 3 boucles extracellulaires (EL1 à EL3), (3) la présence d'un pont disulfure, parfois deux (Peeters, van Westen et al. 2011) permettant de stabiliser la structure, et (4) une extrémité C-terminale (C-ter) intracellulaire présentant des sites de phosphorylation et éventuellement de palmitoylation (Figure 1) (Cramer, Schmenger et al. 2001).

Figure 1 : Schéma descriptif de la structure des RCPGs. Extrémité N-terminale (N-ter), domaines transmembranaires (TM1-7), boucles intracellulaires (IL1-3), boucles extracellulaires (EL1-3), extrémité C-terminale (C-ter).

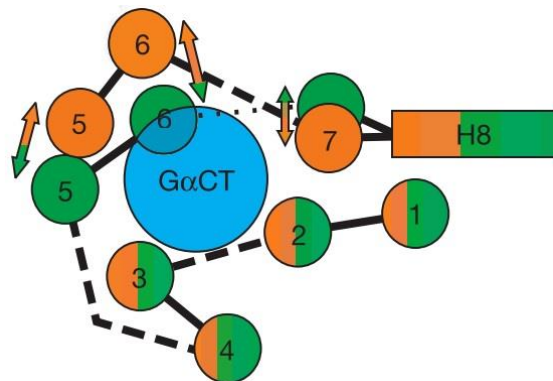


La région pointant vers le milieu extracellulaire a pour but d'accommoder le ligand endogène de manière spécifique. Dans les RCPGs de classe A, la fixation du ligand s'opère assez profondément au sein de la poche hydrophobe formée par les domaines transmembranaires. Ce site est délimité par les acides aminés des TM orientés vers le centre du récepteur, et par la boucle EL2 qui connecte TM4 et TM5 (Cherezov and Caffrey 2007). Cette interaction initiale s'accompagne d'un changement de conformation majeur, facilité par certains éléments structuraux conservés, appelés *micro-switches*. Ces *micro-switches* sont des motifs hautement conservés tel que les résidus Pro^{5.50}, Ile^{3.40} et Phe^{6.44} (*transmission switch*), Asp/Glu^{3.49}, Arg^{3.50} et Tyr^{3.51} (*activation switch/ionic lock*) ou Cys^{6.47}, Trp^{6.48}, Xaa et Pro^{6.50} (*toggle switch*) qui agissent de concorde afin de verrouiller ou faire basculer le récepteur vers certains états conformationnels (Nygaard, Frimurer et al. 2009). Outre ces différents motifs, le site de fixation du ligand contient de nombreuses molécules d'eau qui participent à la structuration et à l'activation du récepteur en formant un réseau de liaisons hydrogène connectant des résidus polaires sur les TMs I, II, VI et VII (Nygaard, Frimurer et al. 2009), ainsi qu'une pochette de liaison pour l'ion sodium,

coordonné avec le résidu Asp^{2.50} présent dans le TM II, qui stabilise la forme inactive du récepteur (Katritch, Fenalti et al. 2014).

Ainsi, le changement topologique local induit par la fixation du ligand va se répercuter jusqu'à la région intracellulaire *via* un déplacement des hélices V, VI (3 à 14 Å vers l'extérieur) et VII (3 à 5 Å vers le cœur), modifiant ainsi l'interface et l'interaction entre le récepteur et différentes protéines cytosoliques (Figure 2). Ces dernières, nommées protéines effectrices, vont alors activer/inhiber différentes cibles au sein de la cellule, modifiant ainsi son homéostasie (Scheerer, Park et al. 2008).

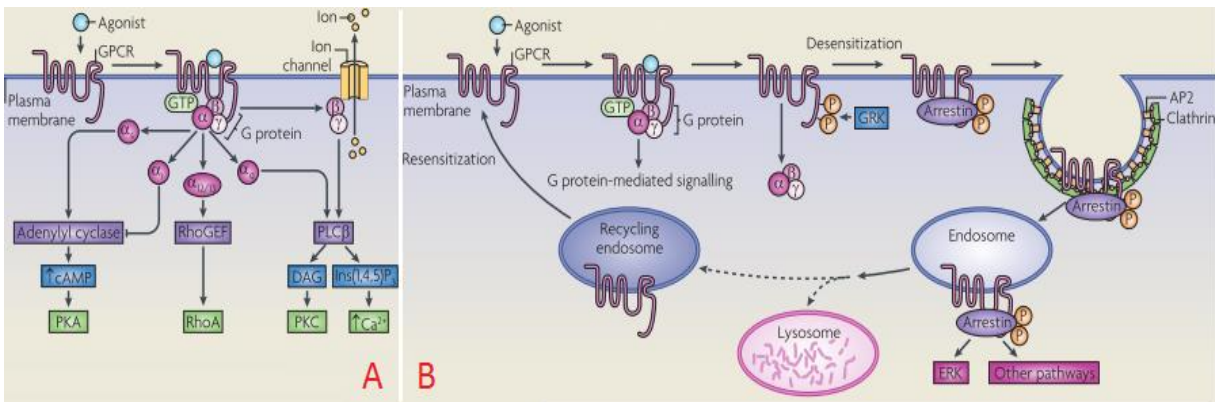
Figure 2 : Schéma descriptif des mouvements des hélices de l'opsine, vue intracytoplasmique. En vert l'état inactif, en orange l'état actif, lié à la portion C-ter de la protéine G α (en bleu) (Scheerer, Park et al. 2008)



2. Voies de signalisation associées aux RCPGs

L'activation d'un RCPG provoque un changement conformationnel global qui va entraîner la transduction du message, c'est-à-dire le déclenchement d'une cascade d'évènements intracellulaires constituant la réponse biologique. Deux protéines adaptatrices interagissent principalement avec les RCPGs soient les protéines G hétérotrimériques et les β -arrestines (Figure 3) (Whalen, Rajagopal et al. 2011).

Figure 3 : Signalisation associée aux RCPGs. Signal dépendant de l'activation (A) des protéines G ou (B) des β -arrestines (Ritter and Hall 2009)



Les protéines G hétérotrimériques (G pour GTPase) sont constituées de trois sous-unités: $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Lorsque le récepteur est au repos, ces trois sous unités forment un complexe stable lié au récepteur. Suite à l'activation du récepteur, une molécule de guanosine diphosphate (GDP) est échangée avec une molécule de guanosine triphosphate (GTP) à l'intérieur de la sous-unité $G\alpha$ de la protéine G menant ainsi à la dissociation des sous-unités α et $\beta\gamma$. Chacune de ces sous-unités est alors capable d'activer ses propres effecteurs. Chez l'humain, il existe 17 protéines $G\alpha$ différentes regroupées en 4 grandes familles, $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o/t/z}$, $G\alpha_q$, and $G\alpha_{12}$, 5 $G\beta$ et 12 $G\gamma$.

$G\alpha_s$ est par exemple responsable de l'activation de l'adénylate cyclase (AC) alors que $G\alpha_{i/o}$ provoque son inhibition. L'AC, qui catalyse la conversion d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc), va ensuite activer, entre autres, la protéine kinase A (PKA) (Ritter and Hall 2009) et favoriser la phosphorylation des protéines kinases mitogènes activées (MAPKs). En outre, la PKA est également capable de phosphoryler les RCPGs afin de modifier leurs affinités pour différents effecteurs cytosoliques. Il a ainsi été montré que la phosphorylation PKA-dépendante du récepteur adrénergique β_2 (β_2 AR) diminue son affinité pour $G\alpha_s$ et l'augmente pour $G\alpha_i$ (Lefkowitz, Pierce et al. 2002). En fonction du contexte cellulaire, la

PKA peut également phosphoryler la monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS), responsable de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) (Li, Yang et al. 2012). Le recrutement de Gαq entraîne pour sa part l'activation de la phospholipase C β (PLCβ) laquelle va alors permettre la lyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate membranaire (PIP₂) en diacylglycérol (DAG), un lipide membranaire, et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). L'IP₃ généré va alors être capable d'activer le canal calcique sensible à l'IP₃ présent à la surface du réticulum endoplasmique, augmentant ainsi la concentration en calcium intracytosolique (Ca²⁺_i) (Marchant and Taylor 1997). Le calcium, ainsi que le DAG, sont tous deux capables d'activer la protéine kinase C (PKC) laquelle active à son tour la voie des MAPKs (Cargnello and Roux 2011). Finalement, la protéine Gα12/13 active, quant à elle, la voie des Rho kinases *via* la phosphorylation des Rho GTPases (Suzuki, Nakamura et al. 2003). Enfin, il faut noter que les sous-unités βγ n'ont pas qu'un simple rôle régulateur pour la sous-unité α puisqu'elles participent également à la signalisation, en activant par exemple la phosphoinositide 3 kinase γ (PI3Kγ), la PLCβ ou l'AC (Engelhardt and Rochais 2007).

En marge des protéines G, les β-arrestines sont un autre exemple de protéines capables d'interagir et de moduler l'activité des RCPGs. Lors de l'activation par leurs agonistes respectifs, les 7TMRs adoptent une conformation active qui, en plus de provoquer l'activation des protéines G hétérotrimériques, enclenchent une série d'évènements qui mènent à la désensibilisation de la réponse associée aux récepteurs activés (Kang, Tian et al. 2014). Ainsi, aussitôt activés les récepteurs sont rapidement phosphorylés par des kinases spécifiques (GRK, PKA ou encore PKC) qui vont provoquer la dissociation du complexe récepteur-protéines G et ainsi favoriser l'ancrage des β-arrestines (Tobin, Butcher et al. 2008). Cet état conduit généralement à l'internalisation des récepteurs dans des vésicules endocytiques (Ritter and Hall 2009).

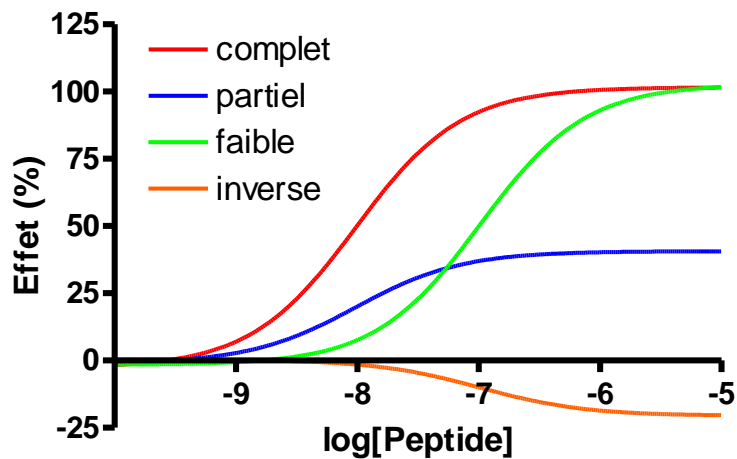
Cependant, en marge de leur rôle dans la désensibilisation et l'internalisation des RCPGs, plusieurs études ont clairement démontré que les β -arrestines, sont également capables d'activer certaines voies de transduction et ce, distinctement de la voie classique associée aux protéines G. Ainsi, il a été démontré que le récepteur AT1 de l'angiotensine II (Tohgo, Pierce et al. 2002), le récepteur V2 de la vasopressine (Tohgo, Choy et al. 2003) et le récepteur β 1 adrénergique (Noma, Lemaire et al. 2007) sont tous capables d'activer les kinases régulées par les signaux extracellulaires ($ERK_{1/2}$) par un processus dépendant de l'activation des β -arrestines. L'interaction entre β -arrestine_{1/2} et un RCPG peut également permettre l'activation de Src laquelle provoque la transactivation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) en absence de son ligand (Buchanan, Gorden et al. 2006).

3. Sélectivité fonctionnelle

Le concept d'allostérie fut pour la première fois décrit pour expliquer le mode de fonctionnement de l'hémoglobine. En effet, la fixation d'une molécule d'O₂ sur une des sous-unités de la protéine provoque un changement conformationnel qui va augmenter l'affinité pour l'O₂ des 3 sous-unités voisines. L'allostérie désigne donc la capacité d'une interaction à modifier une autre interaction distante spatialement au sein d'une macromolécule (Monod, Wyman et al. 1965). Les RCPGs sont maintenant reconnus comme des protéines allostériques dynamiques capables d'adopter de multiples états conformationnels. En présence d'un ligand, certaines sous-populations seront privilégiées de manière à favoriser la liaison de protéines cytosoliques spécifiques (protéines G ou β -arrestines par exemple) (Kenakin and Miller 2010). Ce mécanisme, initié par exemple suite à l'interaction extracellulaire d'un ligand avec son récepteur, constitue donc le moyen de faire parvenir l'information jusqu'au cytosol.

Deux termes décrivent l'effet d'un ligand sur le récepteur : l'efficacité (l'effet maximal qu'un ligand peut produire, E_{max}) et la puissance (la concentration de ligand nécessaire pour produire 50% de son effet maximal, EC_{50}). Un agoniste complet est capable d'activer la réponse maximale pour un test donné. Un agoniste faible active la réponse maximale, mais avec une puissance inférieure. L'agoniste partiel quant à lui possède une efficacité réduite par rapport au ligand de référence. L'agoniste inverse, en défavorisant un couplage préexistant avec le récepteur, possède une efficacité négative (Figure 4). Enfin, un antagoniste est capable de se lier au site orthostérique sans toutefois activer le récepteur, et bloque la réponse des agonistes.

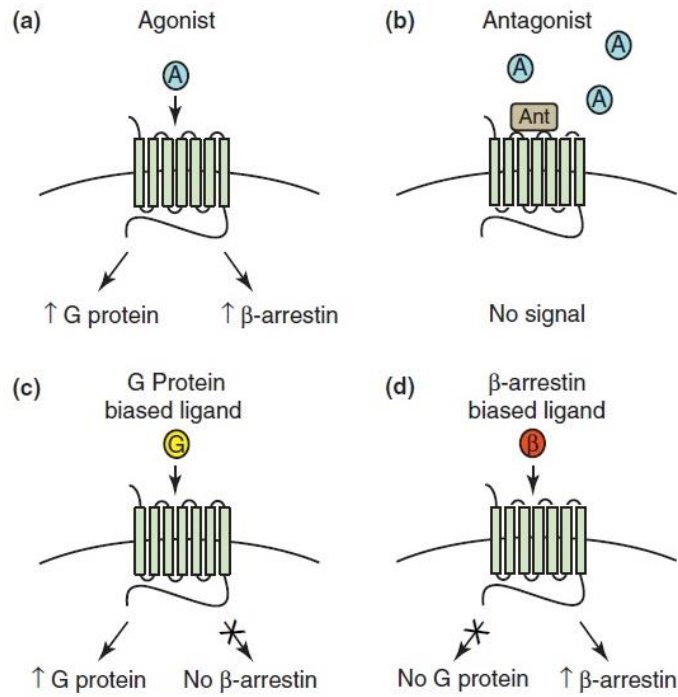
Figure 4 : Courbes concentration/réponse représentant différents types d'agonistes.



La vision classique représentait les RCPGs comme des interrupteurs capables ou non de transmettre le signal suite à l'interaction avec leurs ligands. L'ensemble des voies de signalisation associées à un récepteur n'étant généralement pas complètement caractérisé, l'évaluation de l'efficacité et de la puissance d'un composé était alors simplifiée et ramenée à ne considérer qu'un seul paramètre constituant cet ensemble. Cependant, cette notion fut modifiée suite à l'observation que différents ligands, présentant des affinités semblables pour leur récepteur,

étaient capables de favoriser de manière spécifique certains seconds messagers (Kenakin 2005). Par exemple, les agonistes du récepteur de la cholécystokinine (CCKR) entraînent dans une lignée ovarienne de hamster chinois (CHO) transfectée une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, puis conduisent à l'inactivation et l'internalisation du récepteur. En revanche, le D-Tyr-Gly-[(Nle^{28,31},D-Trp³⁰)CCK₂₆₋₃₂]-phenethyl ester (D-Trp-OPE), longtemps considéré comme un antagoniste de CCKR, n'entraîne pas de mobilisation calcique mais se trouve néanmoins capable de promouvoir l'internalisation du récepteur (Roettger, Ghanekar et al. 1997). Autre exemple illustrant ce principe, le ligand synthétique SII-AngII du récepteur à l'angiotensine 1 (AT1) conduit à la phosphorylation du récepteur, mais contrairement au ligand naturel, ce dernier est incapable de favoriser l'accumulation des IPs et d'internaliser le récepteur (Thomas, Qian et al. 2000). Afin d'expliquer ces résultats, le terme de sélectivité fonctionnelle a été introduit (Tsai, del Sol et al. 2008). Il désigne la capacité de deux ligands à influencer de manières distinctes certaines voies de signalisation (Figure 5). Ainsi, la fixation d'un agoniste permet de stabiliser le récepteur dans certaines conformations créant ainsi des surfaces d'interactions spécifiques avec certains seconds messagers. Ces surfaces agissent alors comme des plateformes et peuvent donc moduler la puissance, l'efficacité voire la cinétique de recrutement d'un effecteur (Tsai, del Sol et al. 2008).

Figure 5 : Signalisation biaisée. L'agoniste complet (a) entraîne l'activation de l'ensemble de la signalisation. L'antagoniste (b) occupe le site de fixation sans toutefois signaler. Les ligands biaisés (c et d), n'activent qu'une partie de la signalisation cellulaire associée au récepteur (Whalen, Rajagopal et al. 2011)



La sélectivité fonctionnelle n'est pas toutefois cantonnée aux ligands synthétiques. Plusieurs familles importantes de RCPG se lient à de multiples agonistes endogènes. Or, chacun de ces ligands, en raison de leur différence structurale, peut apporter une texture particulière lors de l'activation du récepteur comme observé pour le récepteur pituitary adenylyl cyclase 1 (PAC1) et ses deux ligands endogènes PACAP₁₋₂₇ et PACAP₁₋₃₈. Bien que ces deux formes, qui ne diffèrent que par leur extrémité C-terminale, exercent de puissants effets neuroprotecteurs, il a été montré que le PACAP₂₇ est plus puissant et efficace que son homologue de 38 résidus pour stimuler la production d'AMPc dans des cellules transfectées avec le récepteur PAC1, alors que cet ordre est inversé au niveau de la production d'IP₃ (Spengler, Waeber et al. 1993).

Enfin, d'un point de vue thérapeutique, l'utilisation d'un ligand biaisé pourrait présenter un avantage considérable. Dans certains systèmes, l'apparition d'effets indésirables est reliée à l'activation de certaines voies de signalisation. Dans le cas de la morphine, un agoniste du récepteur μ opiacé (MOR), il est admis que l'effet analgésique est relié à l'activation des protéines G, alors que la dépression respiratoire qu'elle entraîne est reliée aux β -arrestines. L'utilisation d'un ligand biaisé en faveur des protéines G permettrait donc d'obtenir un antalgique plus sûr d'utilisation (Kenakin 2017).

4. Expression du biais.

Un problème crucial quant à l'évaluation de la sélectivité fonctionnelle consiste en la transposition des résultats d'un modèle à l'autre. Chaque type cellulaire possède sa propre « machinerie » (genre et nombre d'effecteurs, de récepteur) ce qui entraîne un biais dans l'observation de la sélectivité fonctionnelle : désigné par le biais système. De plus, chaque test possède sa propre sensibilité, et les conditions dans lesquelles le test est réalisé (pH, température, lignée cellulaire...) peuvent entraîner des différences de mesure et d'expression des seconds messagers : il s'agit d'un biais d'observation (Kenakin and Christopoulos 2013). Aucun de ces biais n'a de sens d'un point de vue thérapeutique et il est nécessaire de s'en affranchir : c'est à cet effet que le coefficient de transduction $\log(\tau/K_A)$ a été introduit. Ce coefficient prend en compte à la fois l'efficacité $\tau = [R_t]/K_E$ ($[R_t]$ densité de récepteur, K_E efficacité intrinsèque), et l'affinité conditionnelle $1/K_A$. $\log(\tau/K_A)$ est obtenu expérimentalement pour un ligand A donné en faisant coïncider les données expérimentales avec le modèle opérationnel de Black-Leff :

$$\text{réponse} = (E_{\max} [A] \tau) / ([A] \tau + ([A] + K_A))$$

A partir de là peut être exprimé le biais de l'agoniste par rapport à un ligand de référence :

$$\Delta \log(\tau/K_A)$$

Et finalement pour un agoniste donné entre deux voies (j_1 et j_2) :

$$\text{Biais} = 10^{\Delta \log(\tau/K_A)} j_1 - j_2$$

Enfin, les agonistes peuvent avoir des cinétiques d'association et de dissociation différentes, or la durée d'un complexe ligand-récepteur a un impact sur les différents effecteurs qui seront engagé. Afin d'avoir un portrait précis d'un biais de signalisation, il est donc nécessaire de prendre ce biais cinétique en considération et suivre l'activation d'un effecteur au cours du temps (Klein Herenbrink, Sykes et al. 2016).

5. Modulation allostérique

Par définition, le ligand endogène d'un récepteur se fixe à un site dit orthostérique. La fixation d'un ligand au site orthostérique conduit soit à l'activation du 7TMR pour un agoniste, soit à son inactivation pour un antagoniste. Les modulateurs allostériques se fixent quant à eux sur un site distinct du point de vue topographique: le site allostérique. Comme l'activité et la structure sont interdépendantes, le changement conformationnel induit par un modulateur allostérique peut se traduire par un changement d'affinité des ligands orthostériques pour le récepteur, mais également par un changement sélectif d'efficacité pour chaque voie de signalisation impliquée, allant parfois jusqu'à un remodelage total de l'effet biologique mesuré (Kenakin 2007). D'un point de vue pharmacologique, on peut caractériser trois types de modulateurs allostériques à savoir les modulateurs allostériques positifs, négatifs ou silencieux (PAM/NAM/SAM) (Garland 2013). Par exemple, LY2033298 est un PAM du

récepteur muscarinique M4, capable de potentialiser de manière saturable la fixation de l'acétylcholine, sans affecter la liaison de l'antagoniste N-Me-scopolamine. De plus ce composé est extrêmement sélectif puisqu'il exerce une très légère modulation sur M2, et qu'il est complètement inactif sur M1, M3 et M5 (Chan, McKinzie et al. 2008).

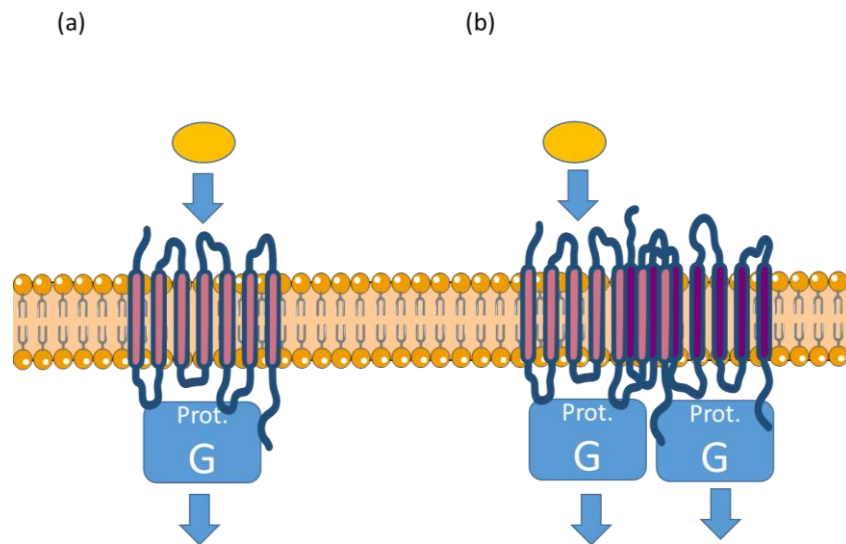
La modulation allostérique est une approche thérapeutique et/ou pharmacologique relativement nouvelle et très attractive qui permet de corriger des fonctions biologiques avec une très grande sélectivité : tant du point de vue du sous-type de récepteur ciblé que du ou des voies de signalisation impliquées dans la progression de la maladie. Par exemple, l'AMD1170, un modulateur allostérique du récepteur CXCR4, bloque l'entrée du VIH sans toutefois bloquer la signalisation associée à ce récepteur (il peut donc être considéré comme un SAM), ce qui pourrait entraîner des effets indésirables comme par exemple une leucocytose (Mosi, Anastassova et al. 2012). L'utilisation d'un modulateur allostérique pourrait également permettre de restaurer l'homéostasie dans le cas d'une dérégulation endocrine, en potentialisant l'effet d'une hormone faiblement exprimée ou en réduisant l'effet en cas de surproduction. Qui plus est, le modulateur allostérique restera inactif tant que le ligand endogène n'est pas fixé, son effet est donc exercé au moment requis : c'est-à-dire au moment où le corps synthétise le ligand (hormone, neurotransmetteur) pour répondre à un besoin précis (del Sol, Tsai et al. 2009).

6. Multimérisation et allostérie latérale

Alors que les RCPGs ont été jusqu'ici considérés en temps qu'espèces monomériques, un faisceau de preuve suggère que ces derniers existent également en tant qu'espèces dimériques/oligomériques (Figure 6) (Kenakin 2012). Ce fait est à l'heure actuelle couramment accepté en ce qui concerne les 7-TMR de classe C. En effet, seule la cotransfection avec des

cDNA des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) GABAB₁ et GABAB₂ permet d'obtenir une réponse GABAergique et des études de co-immunoprécipitation ont montré dans des tissus natifs une interaction physique entre ces deux récepteurs (Jones, Tamm et al. 2000). Pour les récepteurs de classe A, s'il a été montré qu'un monomère est capable d'activer à lui seul la protéine G (Whorton, Bokoch et al. 2007), de nombreux complexes dimériques/oligomériques ont été mis à jour comme par exemple l'hétérodimère des récepteurs à la dopamine (D) D1/D2 (Lee, So et al. 2004), l'homodimère du récepteur à la sérotonine (5-HT) 5-HT₇ (Teitler and Klein 2012) ou le complexe des récepteurs à la sérotonine avec les récepteurs métabotropes du glutamate (mGlu) 5-HT_{2A}-5-HT_{2A}-mGlu2-mGlu2 (Moreno, Miranda-Azpiazu et al. 2016).

Figure 6 : Multimérisation des RCPGs. Alors que la fonctionnalité des RCPGs est traditionnellement reliée à la vision d'une entité monomérique (a), les RCPGs peuvent en réalité former des structures multimériques telles des dimères (b).



Or, *via* des phénomènes allostériques, l'oligomérisation des RCPGs influence l'efficacité et la spécificité d'un ligand. Par exemple, les récepteurs D1 et D2 de la dopamine sont capables de recruter Gs et Gi respectivement, alors que l'hétéromère D1/D2 signale spécifiquement au travers de Gq (Lee, So et al. 2004). L'ensemble de ces données suggère que l'état conformationnel du RCPGs, induit par la formation de complexe dimérique/oligomérique, pourrait être également responsable du transfert d'information dans le cytosol *via* le recrutement de différents seconds messagers, c'est le principe d'allostérie latérale. Également, la fixation d'un ligand sur l'un des protomères peut modifier la liaison d'un ligand sur l'autre protomère, ainsi que la signalisation résultante (Teitler and Klein 2012). Ainsi, la risperidone, décrit initialement comme un antagoniste non-compétitif, entraîne l'inactivation total de 5-HT₇, quoique le [³H]risperidone n'occupe que 50% des sites de fixation disponibles de manière non compétitive, et 50% de manière compétitive avec 5-HT (Knight, Smith et al. 2009). Or l'antagoniste compétitif clozapine est capable de déplacer complètement [³H]risperidone (Teitler, Toohey et al. 2010). Cela suggère que l'action d'un ligand non compétitif pourrait, dans bien des cas, s'expliquer par une allostérie latérale.

ii. Le système Urotensinergique

1. Découverte de l'UII et de l'URP

L'urotensine II (UII) fut isolée dans les années 1960 à partir de l'urophyse d'un poisson téléostéen, le gobie *Gillichthys mirabilis* (Bern and Lederis 1969). Ce neuropeptide, possédant des homologies de séquence et des similarités structurales avec la somatostatine (Brazeau, Vale et al. 1973) attira l'attention en raison de son activité spasmogène sur les muscles lisses.

Longtemps considérée comme restreinte aux poissons, l'action de l'U^{II}, d'abord mise en évidence sur le rectum de truite (Pearson, Shively et al. 1980), fut également observée sur des sections d'aortes de rat (Gibson 1987), suggérant ainsi l'existence d'un peptide homologue chez les mammifères. Cette hypothèse se confirma quand, dans les années 1990, furent clonés les ADNc codant le précurseur de l'U^{II}, la prépro-U^{II}, chez de nombreuses espèces mammifères, incluant le rat, la souris, le porc, le singe et l'homme (Elshourbagy, Douglas et al. 2002). Bien que la longueur de la séquence peptidique varie d'une espèce à l'autre, avec 17 acides aminés chez la souris pour 11 chez l'homme (hU^{II}) (Vaudry, Do Rego et al. 2010), toutes les isoformes de l'U^{II} possèdent dans leur région C-ter un domaine hexacyclique (-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-) strictement conservé (Tableau 1). Cette région est généralement flanquée en amont d'un résidu acide (Asp ou Glu) et en aval d'un résidu hydrophobe (Ile ou Val). La stricte conservation de cette séquence laissait donc présager le rôle crucial joué par cette portion dans l'activité biologique de l'U^{II}. En revanche, le domaine N-ter varie considérablement d'une espèce à l'autre (Tableau 1). Plus récemment, l'équipe de Sugo et al, en cherchant à isoler la forme mature d'U^{II} produite chez le rat, est parvenue, à partir d'anticorps dirigés contre la région cyclique de l'U^{II}, à isoler un peptide cyclique paralogue qu'ils ont appelé urotensin II-related peptide (URP) (Sugo, Murakami et al. 2003). À l'instar de l'U^{II}, la séquence intracyclique de l'URP est strictement conservée au cours de l'évolution (Vaudry, Do Rego et al. 2010). Mais contrairement à l'U^{II}, son domaine N-ter est restreint à un seul résidu de nature hydrophobe (Ala) (Tableau 1). Ce peptide est capable, comme l'U^{II}, de se lier à UT, d'entraîner la mobilisation intracellulaire de calcium et de provoquer une hypotension chez des rats anesthésiés (Sugo, Murakami et al. 2003)

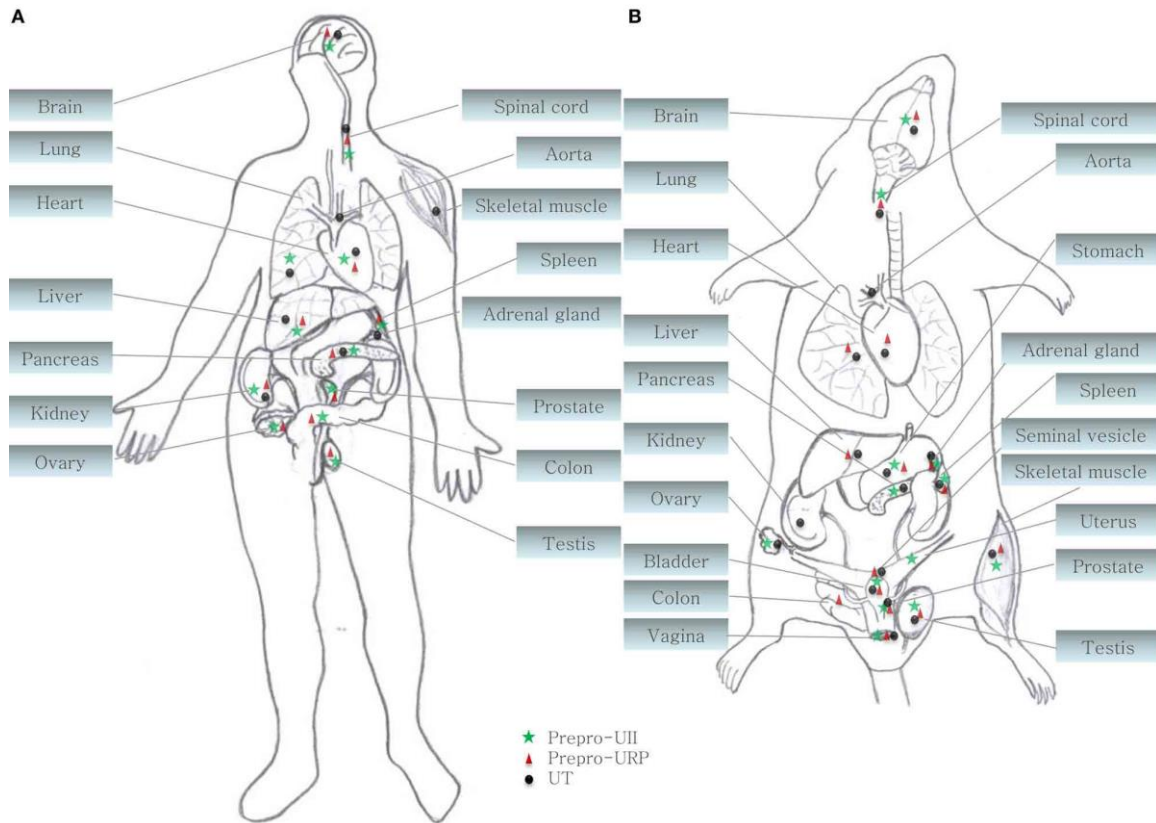
Tableau 1 : Isoformes d'UII et URP dans différents mammifères. (<Gln = pyroglutamine) Alors que la portion N-ter de l'UII est variable, l'URP est très conservée. Les portions intracycliques d'UII et d'URP sont semblables dans toutes les espèces. D'après Chatenet et al. 2012.

| Espèces | Séquences |
|-----------|--|
| | Urotensine II |
| Souris | <Gln-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Ile-OH |
| Rat | <Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Ile-OH |
| Chimpanzé | H-Glu-Thr-Pro-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH |
| Humain | H-Glu-Thr-Pro-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH |
| | URP |
| Souris | H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH |
| Rat | H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH |
| Chimpanzé | H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH |
| Humain | H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH |

2. Distribution chez les mammifères

UII et URP sont issus du clivage des précurseurs prépro-UII et prépro-URP. Chez l'humain, les ARNm codant pour ces précurseurs sont exprimés tant au niveau du système nerveux central qu'en périphérie (Figure 7) et notamment dans les systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrine (Sugo, Murakami et al. 2003). Le rein et le foie sont des lieux d'expression (Sugo, Murakami et al. 2003). Dans le système cardiovasculaire, UII est exprimé dans le myocarde, l'oreillette droite et le septum ventriculaire (Matsushita, Shichiri et al. 2001). L'URP est également exprimé dans le tissu cardiaque mais des analyses exhaustives n'ont pas encore été réalisées. Il est important de noter que certains tissus n'expriment qu'un seul de ces peptides: le cortex cérébral par exemple n'exprime que l'URP, alors que les poumons n'expriment que l'UII (Sugo, Murakami et al. 2003). Bien que l'UII et l'URP semblent être exprimés chez tous les mammifères, on retrouve néanmoins des différences notables inter-espèces quant à leurs distributions. Ainsi, chez la souris, l'UII et l'URP sont exprimés dans le vagin, ce qui n'est pas le cas chez l'humain (Dubessy, Cartier et al. 2008).

Figure 7 : Distribution du système urotensinergique. Distribution centrale et périphérique de prepro-UI, prepro-URP et UT chez (A) les primates (humain et singe cynomolgus) et (B) les rongeurs (rat et souris) (Ames et al., 1999; Sugo et al., 2003; Dubessy et al., 2008; Maguire et al., 2008; Doan et al., 2012; Nguyen et al., 2012). D'après Chatenet et al. 2012.

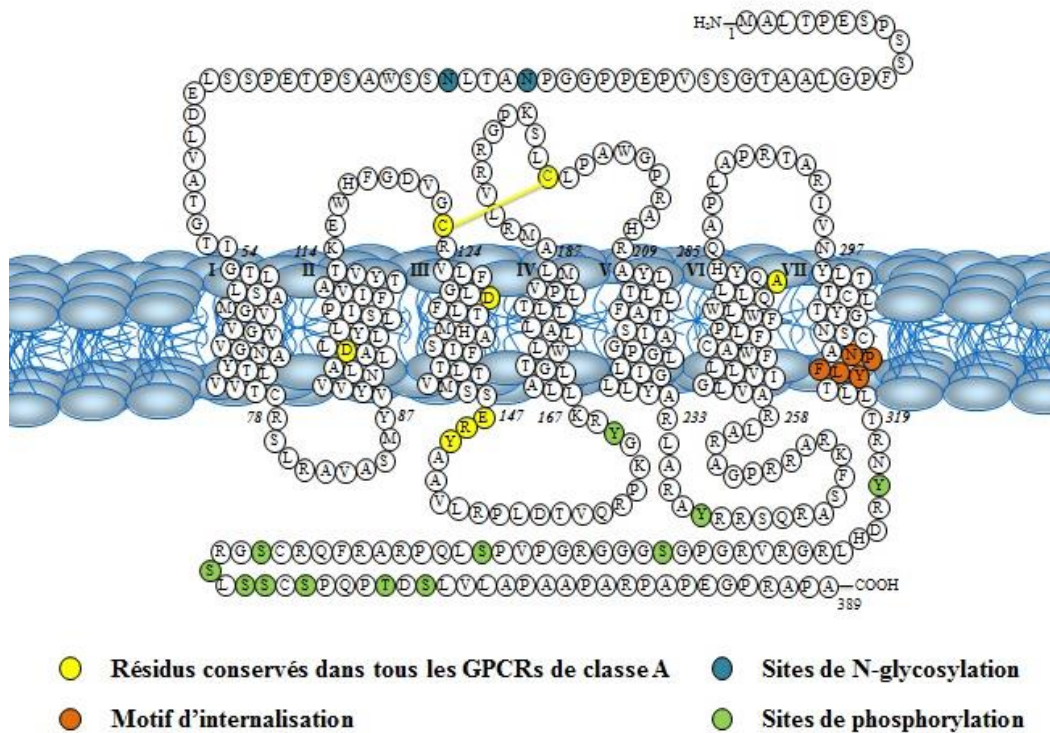


3. Le récepteur UT

Il aura fallu attendre presque dix ans après la découverte de l'UII avant que son récepteur ne soit identifié. L'utilisation de sondes oligonucléotidiques dégénérées a permis de cloner chez le rat un ADNc codant pour un récepteur orphelin, nommé GPR14 (Marchese, Heiber et al. 1995). Grâce à des sondes hétérologues, un clone de 9 kb, codant une protéine de 389 acides aminés, fut ainsi extrait d'une banque génomique humaine (Ames, Sarau et al. 1999). Afin de découvrir le ligand endogène de GPR14, le criblage d'une chimiothèque fut ainsi réalisé sur des

lignées cellulaires transfectées avec GPR14. Via cette approche dite de pharmacologie inverse, quatre équipes ont ainsi pu démontrer que l'UUI était le ligand endogène du GPR14, qui a depuis été renommé UT (Ames, Sarau et al. 1999, Liu, Pong et al. 1999, Mori, Sugo et al. 1999, Nothacker, Wang et al. 1999). Ce récepteur partage une certaine homologie de séquence avec ceux de la somatostatine (SST2/4/5) et aux opioïdes ($\mu/\delta/\kappa$ OR). Ainsi, pour le récepteur SST4 de la somatostatine, UT partage environ 27% d'homologie, dont 41% dans la région transmembranaire (Marchese, Heiber et al. 1995). La somatostatine est ainsi capable d'activer UT à une concentration de l'ordre du micromolaire (Liu, Pong et al. 1999), UUI et URP étant quant à eux aussi capables d'activer SST2 et SST4 à ces mêmes concentrations (Liu, Pong et al. 1999, Malagon, Molina et al. 2008). Le récepteur UT, comme tous ceux appartenant à la classe A des 7TMRs (famille rhodopsin), est constitué d'un segment N-ter court (54 acides aminés chez l'homme), d'un résidu Asp dans le TM2 essentiel dans l'interaction avec le ligand, d'un motif D/ERY à la jonction entre TM3 et IL2 responsable du « ionic lock » et de multiples sites possibles de phosphorylation Ser/Thr dans IL3 et le segment C-ter. Il existe également un pont disulfure entre Cys¹²³ et Cys¹⁹⁹ reliant EL1 et EL2 ainsi que deux sites de glycosylation dans le segment N-ter au niveau des Asn²⁹ et Asn³³ (Onan, Hannan et al. 2004). En outre, on peut noter la présence d'un site de palmitoylation pour le récepteur de rat (rUT) (Marchese, Heiber et al. 1995), qui est toutefois absent pour le récepteur humain (hUT) (Ames, Sarau et al. 1999) (Figure 8).

Figure 8 : Récepteur UT humain d'après Chatenet et al. 2012.



Chez l'humain, le récepteur UT est exprimé tant au niveau du système nerveux central que dans les organes périphériques et notamment le cœur, le foie, le rein et le pancréas (Onan, Hannan et al. 2004). Ce récepteur est également présent dans des tissus n'exprimant pas les ARNm codant pour UII ou URP comme par exemple dans les artères coronaires ou dans les muscles squelettiques (Maguire, Kuc et al. 2008). L'inverse est également vrai puisque qu'on peut noter que le récepteur n'est pas exprimé dans les testicules ou les ovaires bien que ces tissus expriment les deux ligands (Maguire, Kuc et al. 2008). De façon surprenante, chez d'autres espèces, comme la souris, UT est exprimé dans l'appareil génital : les ovaires et les testicules (Dubessy, Cartier et al. 2008), démontrant ainsi des variations inter-espèces pouvant conduire à des fonctions différentes de ce système. Enfin, il est intéressant de noter que la délétion d'UT dans des souris

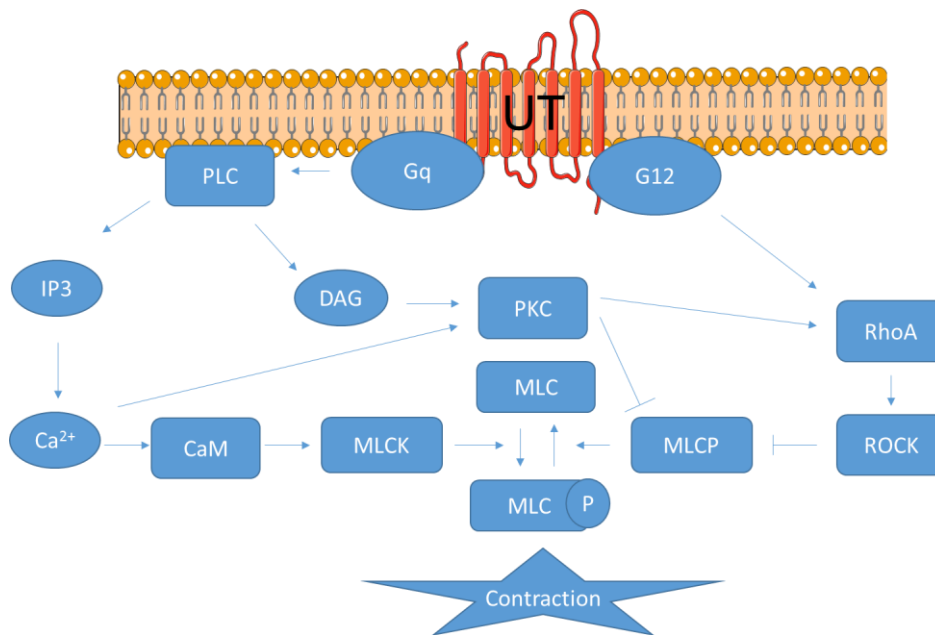
transgéniques ne semble conduire à aucune altération phénotypique, notamment en ce qui concerne les fonctions cardio-vasculaires, si ce n'est une perte de sensibilité à UII (Behm, Harrison et al. 2003).

4. Voies de signalisation et activités associées

L'UII est un vasoconstricteur de puissance de 8 à 110 fois supérieure à celle de l'endothéline en fonction de l'espèce et des tissus étudiés (Ames, Sarau et al. 1999, MacLean, Alexander et al. 2000, Maguire, Kuc et al. 2000, Paysant, Rupin et al. 2001, Russell, Molenaar et al. 2001, Camarda, Guerrini et al. 2002). En inhibant la phospholipase C, *via* l'utilisation de l'inhibiteur spécifique U-73122, l'effet vasoconstricteur induit par l'UII sur des aortes de rats est partiellement inhibé suggérant ainsi une action en partie dépendante de l'activation de $G\alpha_q$ (Rossowski, Cheng et al. 2002). En effet, l'activation de $G\alpha_q$ conduit à la production d' IP_3 et de DAG *via* la $PLC\beta$. L' IP_3 va alors mobiliser les réserves calciques du réticulum endoplasmique (Jaconi, Bony et al. 2000) et le calcium ainsi libéré va lier la calmoduline formant ainsi un complexe actif capable d'interagir avec la myosin light chain kinase pour induire la contraction (Saetrum Opgaard, Nothacker et al. 2000, Tasaki, Hori et al. 2004). Le DAG, quant à lui, entraîne l'activation de la PKC laquelle va conduire à la phosphorylation subséquente de RhoA puis des Rho kinases (RhoK) le tout aboutissant à la contraction des muscles lisses. L'inhibition pharmacologique de la voie des RhoK par le Y-27632 entraîne en effet le blocage de la vasoconstriction induite par UII (Sauzeau, Le Mellionec et al. 2001). $G\alpha_{12}$ étant également en amont de l'activation de RhoA, cela suggère en marge de $G\alpha_q$ son intervention dans la contraction (Proulx, Holleran et al. 2008). En outre, d'autres voies de signalisation incluant les MAPKs sont également impliquées dans la genèse des effets vasoconstricteurs induits par l'UII

sur des cellules vasculaires de muscle lisse (CVML) (Tasaki, Hori et al. 2004). En revanche, l'activation d'UT présent au niveau des cellules endothéliales provoque la libération d'oxyde nitrique qui va ultimement générer des effets vasodilatateurs sur les CVML (Stirrat, Gallagher et al. 2001). Les voies principales associées à la contraction sont répertoriées dans la figure ci-dessous (Figure 9).

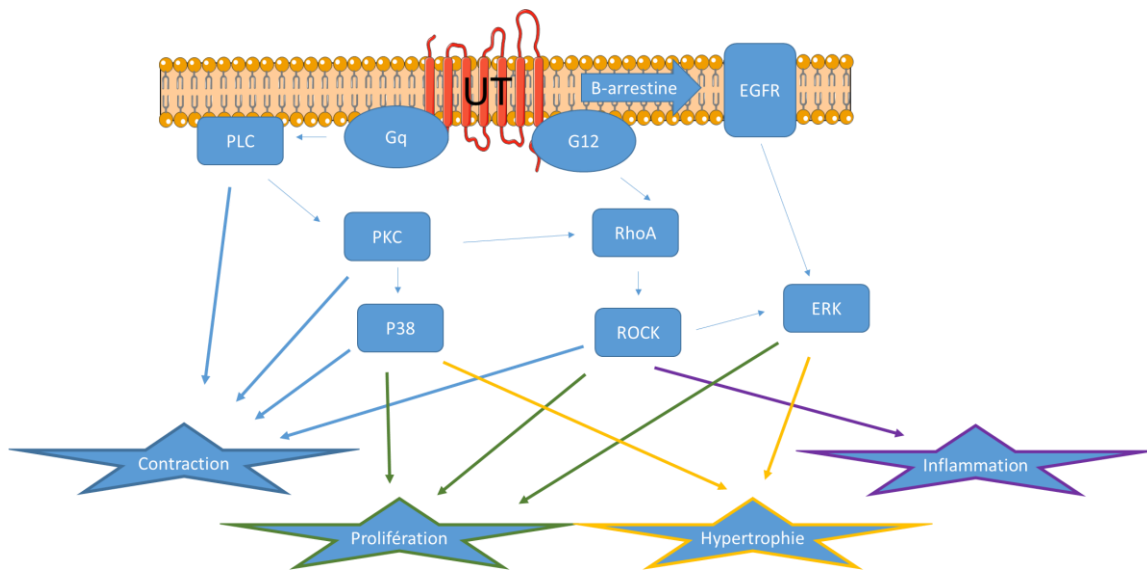
Figure 9 : Voies de signalisation d'UT entraînant la contraction.



En marge de ces effets vasoactifs, le système urotensinergique est également impliqué dans la prolifération cellulaire. Selon le type cellulaire, les acteurs impliqués peuvent être distincts. Dans les cellules endothéliales, les lignées transfectées CHO-UT ainsi que les CVML, l'effet mitogène est dépendant de l'activation de ERK_{1/2} (Matsushita, Shichiri et al. 2003), de RhoA/RhoK (Sauzeau, Le Mellionec et al. 2001) mais également de la PKC (Chen, Zhao et al. 2004). Sur des cultures primaires d'astrocytes de rat, l'UII mais pas l'URP induit une prolifération qui semble dépendante de l'activation de Gi/o : en effet, l'utilisation de la toxine pertussique

réduit l'incorporation de [³H]inositol causé par UII mais pas par l'URP (Jarry, Diallo et al. 2010). Des effets pro-inflammatoires ont également été rapportés. En effet, les monocytes expriment UT en grande concentration, et son activation entraîne un recrutement des monocytes via un remodelage du cytosquelette et l'activation de la voie des Rho kinases (Segain, Rolli-Derkinderen et al. 2007). Des effets hypertrophiques ont également été mis en évidence dans les cardiomyocytes (Onan, Pipolo et al. 2004). Les auteurs ont ainsi montré que ce mécanisme dépendait de la phosphorylation de ERK_{1/2} et de p38, ainsi que de la transactivation du récepteur EGRF. Ce dernier semble également impliqué dans la survie cellulaire induite par UII puisque l'utilisation d'ARN antisens dirigés contre β -arrestine_{1/2} prévient la transactivation de EGFR par UII, et réduit le taux de ERK phosphorylés, ce qui conduit à de l'apoptose et provoque une fibrose (Esposito, Perrino et al. 2011). Les principales voies de signalisation associées à la stimulation d'UT sont récapitulées dans la figure ci-dessous (Figure 10).

Figure 10 : Principales voies de signalisation associées à l'activation d'UT.



5. Implication de ce système dans les pathologies cardiovasculaires

Le système urotensinergique est impliqué dans la régulation et le maintien des fonctions cardiovasculaires, pulmonaires, nerveuses et rénales. La perturbation de ce système peut ainsi conduire au développement ou à la progression de différents états pathologiques, ainsi qu'à plusieurs applications thérapeutiques, notamment concernant l'hypertension artérielle, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, l'asthme, le diabète, les troubles de l'érection, l'insuffisance rénale et certains cancers (Ross, McKendy et al. 2010, di Villa Bianca, Mitidieri et al. 2015, Vaudry, Leprince et al. 2015). En raison d'une étude visant à évaluer le potentiel thérapeutique d'un modulateur développé par notre équipe (Chatenet, Letourneau et al. 2013) et impliquant notre laboratoire, l'institut de cardiologie de Montréal et Amorce, nous nous concentrerons ici sur le rôle de ce système dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HAP). L'HAP est une pathologie évolutive, potentiellement fatale, caractérisée par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire, corrélée à une inflammation pulmonaire, une hypertrophie des artéioles et une insuffisance cardiaque du ventricule droit (Djordjevic and Gorlach 2007). Le système urotensinergique semble jouer un rôle déterminant dans la mise en place de cette maladie. Tout d'abord, chez des rats soumis à une hypoxie chronique, l'immunoréactivité de type UII détectée dans les cellules musculaires lisses (CML) est augmentée de manière significative par rapport aux animaux contrôles (Hongfang, Cong et al. 2006). De plus, l'UII est capable (1) de stimuler la prolifération des CML artérielles pulmonaires (Djordjevic, BelAiba et al. 2005) et (2) d'induire l'hypertrophie d'une lignée de cardiomyocytes (Onan, Pipolo et al. 2004). Ces deux effets sont directement impliqués dans le rétrécissement du diamètre de la lumière des artères pulmonaires *via* l'épaississement des parois vasculaires pulmonaires causé par l'hypertrophie et l'hyperplasie des différentes couches cellulaires. Il a également été observé que l'UII est capable de recruter les monocytes par chimiotactisme et ainsi

entraîner une réponse inflammatoire (Segain, Rolli-Derkinderen et al. 2007) souvent associée, dans l'HAP, avec la destruction du tissu endothélial (Djordjevic and Gorlach 2007). Dès lors, sachant que l'application d'Ull sur des aortes de rat induit une vasorelaxation en présence d'endothélium intact, mais une puissante vasoconstriction sur des sections désendothélialisées (Bottrill, Douglas et al. 2000), l'augmentation de la pression sanguine dans les artéioles pulmonaires observée dans cette pathologie semble être elle aussi en lien avec les effets de l'Ull. En conséquence, l'administration de Palosuran ou d'Urantide, deux antagonistes du système urotensinergique, s'est avérée concluante afin de diminuer les effets de l'HAP induits chez le rat par la monocrotaline (Mei, Jin et al. 2011, Pehlivan, Dokuyucu et al. 2014).

Toutefois, les études cliniques réalisées sur divers modèles animaux avec ces antagonistes ont eu un succès limité en raison de leur manque d'efficacité chez l'humain. La variabilité interspèce du récepteur UT pourrait être incriminée. Une étude de docking virtuel a ainsi montré que la chaîne latérale de Met¹⁸⁴ d'UT de rat (rUT) présente répulsion stérique avec le cycle quinoline du palosuran qui n'est pas retrouvé avec l'UT humain (hUT) (Kim, Li et al. 2010). L'absence de cette interaction augmente considérablement l'affinité du palosuran pour hUT. En revanche, certains antagonistes comme le SB657510 possèdent une interaction et donc une affinité semblable pour rUT et hUT. Bien que la variabilité interspèce puisse expliquer en partie le phénomène, cette hypothèse ne semble pas généralisable. En outre, une caractérisation plus poussée de l'Urantide a montré qu'il s'agit non d'un pur antagoniste mais d'un ligand biaisé, capable d'activer la signalisation dépendante des protéines G mais incapable d'activer β arrestine₁ (Brule, Perzo et al. 2014). Ainsi, seule une meilleure compréhension de la pharmacologie moléculaire associée à UT permettra la mise au point de futures thérapies.

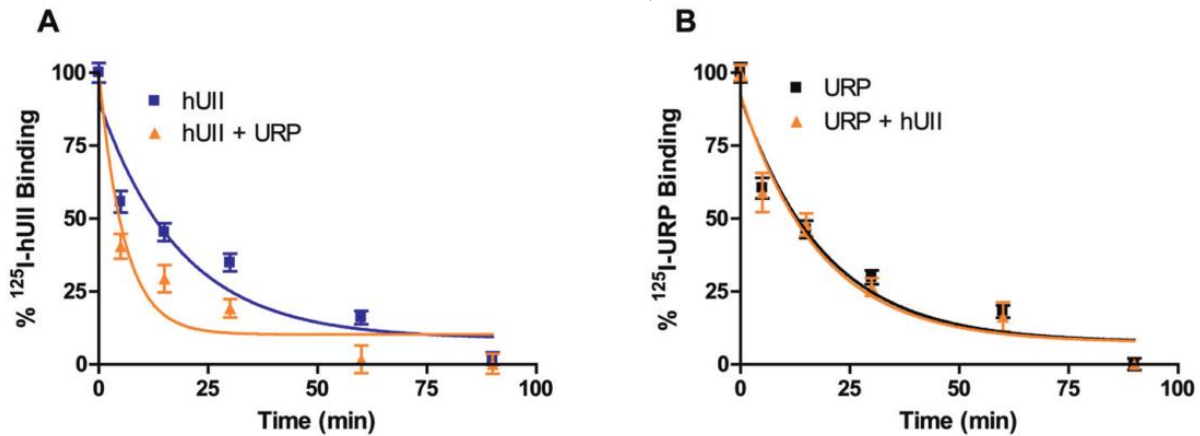
6. UT et sélectivité fonctionnelle

À l'instar du système urotensinergique, de nombreux RCPG sont capables de lier plus d'un agoniste endogène comme par exemple les récepteurs de la somatostatine et les récepteurs opioïdes. Au sein de ces systèmes, une sélectivité fonctionnelle entre les différents ligands représente un moyen de contrôler plus finement la signalisation induite par un récepteur donné et également les fonctions physiologiques associées (Thompson, Canals et al. 2014). Ainsi, plusieurs études ont rapporté une action différente de l'UII et de l'URP au niveau de l'initiation de la transcription, (Doan, Nguyen et al. 2012) de la prolifération cellulaire, (Jarry, Diallo et al. 2010) et de la contraction myocardique (Prosser, Forster et al. 2008). Notamment, l'UII, mais pas l'URP, exerce une activité mitogène dose-dépendante sur les astrocytes (Jarry, Diallo et al. 2010). Dans un modèle de lésion d'ischémie-reperfusion cardiaque chez le rat, l'UII (rUII) du rat réduit la contractilité ventriculaire gauche post-ischémie, ce qui n'est pas le cas pour l'URP (Prosser, Forster et al. 2008), De plus, si dans ce modèle rUII et URP réduisent tous deux significativement la libération de créatine kinase cardiaque après reperfusion, seul rUII atténue la sécrétion du peptide natriurétique atrial (ANP) (Prosser, Forster et al. 2008). Enfin, des tests d'initiation de la transcription, réalisés *in vitro* sur des noyaux de cœur de rats fraîchement isolés, ont suggéré que l'UII, mais pas l'URP, participe à l'expression des gènes associé à l'UT nucléaire (Doan, Nguyen et al. 2012). Par ailleurs, chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère, les concentrations en URP sont significativement plus élevées que celle d'UII (Jani, Narayan et al. 2013). L'ensemble de ces observations supporte un rôle biologique distinct pour ces deux peptides, de même qu'une implication physiopathologique différente ce qui démontre la nécessité de mieux comprendre les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction de chacun de ces peptides avec UT.

7. UT en tant qu'homodimère ?

La liaison de l'UII et de l'URP à UT a été étudiée à l'aide de divers tests de liaison. Plusieurs travaux rapportent l'existence dans une lignée transfectée (Clozel, Binkert et al. 2004) ainsi que dans une lignée native (Castel, Diallo et al. 2006) de deux sites de liaison d'UT de différentes affinités. De plus, bien que de multiples expériences de compétition ont montré que ces deux peptides possédaient une affinité similaire pour UT, des expériences de dissociation ont quant à elles mises à jour la capacité de l'URP à augmenter la vitesse de dissociation de l'UII, l'inverse n'étant pas observé (Chatenet, Letourneau et al. 2013) (Figure 11). Ces résultats, en mettant en lumière un effet de coopérativité entre l'UII et l'URP, suggèrent que ces deux ligands pourraient agir *via* un récepteur homodimérique. Par ailleurs, alors que l'UII₍₄₋₁₁₎ est capable d'augmenter la vitesse de dissociation de l'UII mais pas celle de l'URP, le fragment rUII₍₁₋₇₎, soit uniquement la partie N-ter de rUII, est capable de bloquer la contraction aortique induite par l'URP, sans modifier celle de l'UII (Chatenet, Letourneau et al. 2013). Ceci implique que l'UII, en raison de la présence d'un domaine N-terminal plus long que l'URP, pourrait avoir une coopérativité distincte de l'URP dans le contexte d'un homodimère d'UT. Des expériences sont actuellement en cours pour confirmer l'existence d'homodimères d'UT dans des lignées transfectées mais également natives.

Figure 11 : Cinétique de dissociation associée à l'UII et l'URP. Influence de l'URP sur la dissociation d'UII (A), influence d'UII sur la dissociation de l'URP (B) (Chatenet, Letourneau et al. 2013)



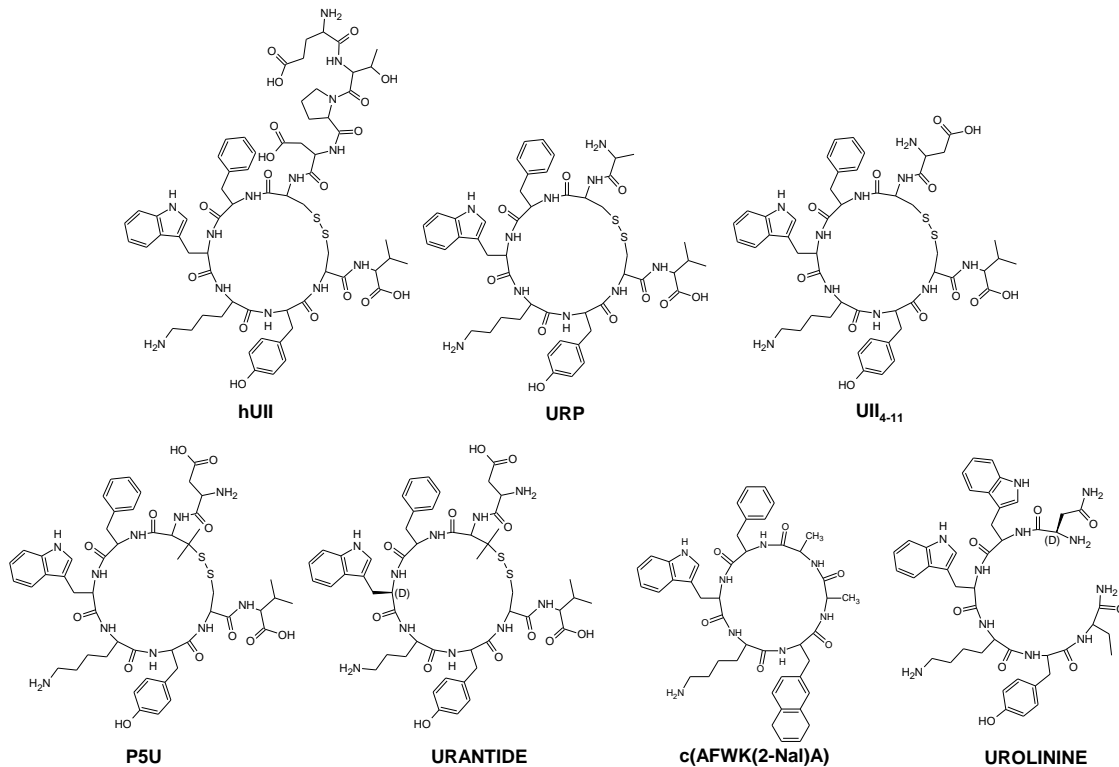
iii. Relations Structure-Activité (RSA)

1. Importance des résidus intracycliques

L'UII et l'URP sont deux peptides cycliques qui varient uniquement au niveau de leur segment N-terminal (Figure 12) (Leprince, Chatenet et al. 2008). La délétion de façon successive des acides aminés extracycliques de la partie N-terminale a peu d'incidence sur la capacité du peptide à induire la mobilisation intracellulaire de calcium ou la contraction aortique (Leprince, Chatenet et al. 2008). Au terme de différentes études, le fragment 4-11 de l'UII : H-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]Val-OH (Figure 12) a été défini comme la séquence minimale biologiquement active (Kinney, Almond Jr et al. 2002). Le pont disulfure fut initialement décrit comme jouant un rôle crucial dans la liaison à UT et son activation (Flohr, Kurz et al. 2002, Brkovic, Hattenberger et al. 2003, Labarrere, Chatenet et al. 2003, Leprince, Chatenet et al. 2008). Sa rupture, obtenue en substituant une cystéine par son isostère la sérine (Brkovic, Hattenberger et al. 2003, Labarrere, Chatenet et al. 2003, Leprince, Chatenet et al. 2008) ou la

substitution par des cycles lactames (Grieco, Carotenuto et al. 2002), entraîne une perte majeure d'affinité et d'activité. Cela dit, les cystéines ne sont pas obligatoires à la liaison, puisque le composé cyclique c(AFWK(2-Nal)A) (Figure 12) possède une affinité de l'ordre du nM pour UT (Foister, Taylor et al. 2006), et le remplacement de Cys⁵ dans l'UII₄₋₁₁ par une β,β-diméthylcystéine (Pen) a conduit à un superagoniste : le P5U (Figure 12) , *i.e.* [Pen⁵]UII₄₋₁₁ (Grieco, Carotenuto et al. 2002), ce qui laisse présager qu'une certaine rigidification de la structure améliore l'interaction avec UT. En revanche, et de façon surprenante, un composé linéaire baptisé Urolinine (nWWK-Tyr(3-NO₂)-Abu-NH₂) (Figure 12) s'est avéré capable d'induire un flux calcique avec une puissance similaire à l'UII tout en retenant une affinité très faible (de l'ordre du micromolaire) et une absence d'activité contractile (Bandholtz, Erdmann et al. 2016).

Figure 12 : Structures de l'UII et l'URP, ainsi que de plusieurs analogues peptidiques.



Afin de déterminer l'importance de la chaîne latérale de chaque acide aminé, un Ala-scan (chaque acide aminé (a.a.) est remplacé par une alanine) et un D-scan (chaque a.a. est remplacé par son isomère D) ont été effectués sur hUII (Flohr, Kurz et al. 2002, Brkovic, Hattenberger et al. 2003). Comme mentionné précédemment, le remplacement des acides aminés extracycliques, par une alanine ou leur isomère D respectif, n'entraîne aucune perte majeure d'activité ou d'affinité. En revanche, mise à part le dérivé [D-Trp⁷]UII qui possède une activité agoniste marquée (Guerrini, Camarda et al. 2005), la substitution de Phe, Trp, Lys ou Tyr par une alanine ou le remplacement de Phe, Lys et Tyr par leur isomère D provoque une perte notable voire totale de la liaison et de l'activité contractile confirmant ainsi l'importance de ces résidus intracycliques (Brkovic, Hattenberger et al. 2003, Labarrere, Chatenet et al. 2003, Leprince, Chatenet et al. 2008). Si l'importance des 3 résidus aromatiques sera couverte plus en détail dans les parties suivantes, il est à noter que le caractère basique de la lysine semble critique (Guerrini, Camarda et al. 2005) et ce en raison de son interaction potentielle avec le résidu Asp¹³⁰ (TM3) d'UT (Kinney, Almond Jr et al. 2002). En outre, le remplacement de la lysine par une ornithine (Orn) produit un composé, *i.e.* [Orn⁸]UII₄₋₁₁ possédant une activité antagoniste (Guerrini, Camarda et al. 2005). Des modifications subséquentes de ce composé ont ainsi permis de concevoir l'urantide (Figure 12), *i.e.* [Pen⁵,D-Trp⁷,Orn⁸]UII₄₋₁₁, un puissant antagoniste peptidique d'UT (Patacchini, Santicioli et al. 2003).

Suite à la découverte de l'URP, et afin de confirmer les résultats obtenus avec l'UII, une étude semblable a été menée pour ce peptide (Chatenet, Dubessy et al. 2004). Bien que la majorité des résultats soient en adéquation avec les études réalisées avec l'UII, il fut cependant observé que le [D-Trp⁴]URP se comportait comme un agoniste partiel, et possédait une activité antagoniste capable de bloquer la contraction d'anneaux d'aorte de rat induite par l'UII. Pour

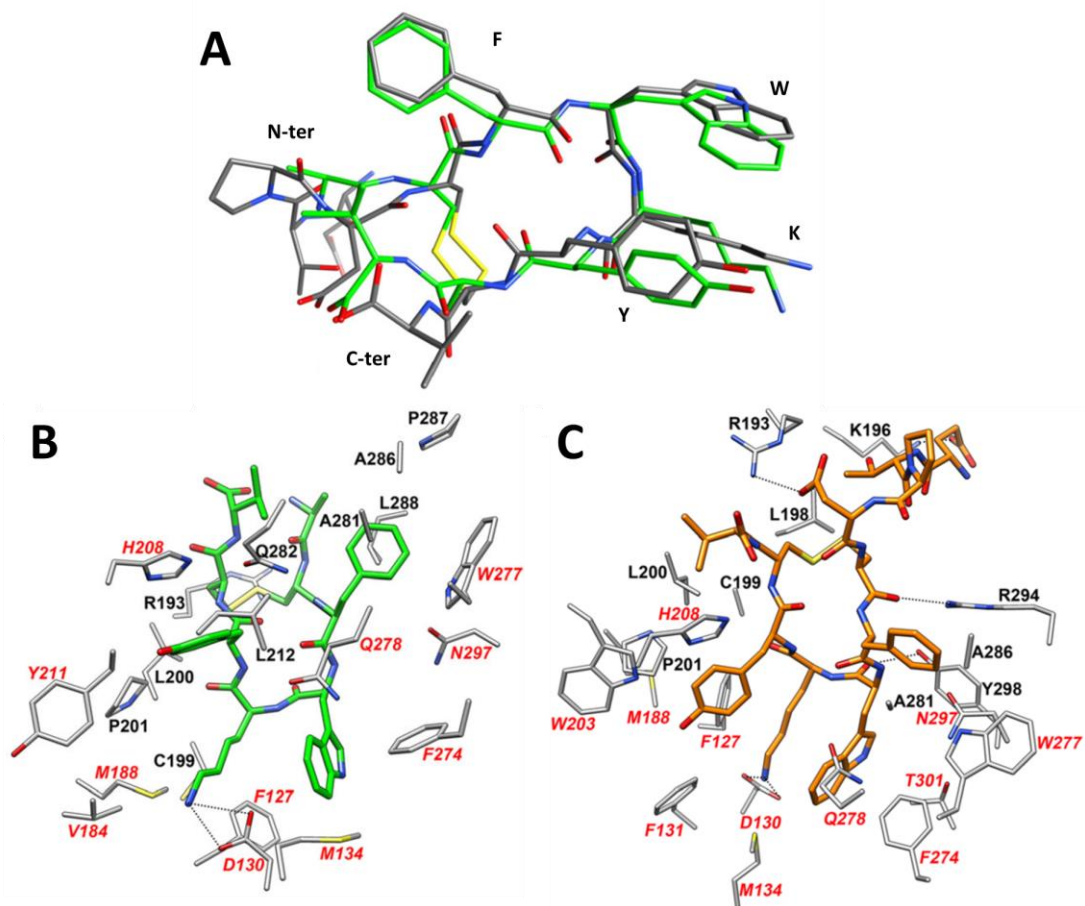
rappel, le composé [D-Trp⁷]UII (Guerrini, Camarda et al. 2005) fut caractérisé comme un agoniste complet dans ce même essai. Cette action différente d'une même modification au niveau des deux peptides endogènes, lesquels partagent pourtant la même région intracyclique, suggère une implication différente de ce résidu pour la fixation et l'activation d'UT par UII et URP.

2. Conformation structurale

Alors que les études de RSA ont démontré l'importance de la portion intracyclique pour conserver l'activité biologique, les structures obtenues par RMN viennent compléter les informations à propos des exigences structurales. La première structure de l'UII de Gobie (H-Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH) dans le DMSO a montré que les résidus aromatiques Phe, Trp et Tyr sont disposés du même côté du cycle, suggérant ainsi l'existence d'un cluster aromatique/hydrophobique participant à la reconnaissance avec le récepteur (Bhaskaran, Arunkumar et al. 1994). Des études plus récentes ont démontré que, dans l'eau, la portion N-ter de l'UII humaine se révèle hautement flexible alors que la région cyclique est capable d'adopter deux conformations de type γ -turn inverse, centrées sur les résidus Trp⁷-Lys⁸-Tyr⁹ et Lys⁸-Tyr⁹-Cys¹⁰ (Lescot, Sopkova-de Oliveira Santos et al. 2007). En revanche, dans des micelles de SDS, les résidus Trp⁷ à Tyr⁹ sont arrangés selon un β -turn de type II dans l'UII tout comme UII₄₋₁₁ (Carotenuto, Grieco et al. 2004). Cela est aussi vrai pour l'URP, dont les conformations les plus stables peuvent s'arranger en γ -turn inverse dans l'eau (Chatenet, Dubessy et al. 2004), ou en β -turn de type II dans des micelles de SDS (Brancaccio, Merlino et al. 2015). D'autre part, des études de dynamique moléculaire ont montré qu'aussi bien l'UII que l'URP évoluent selon un large éventail de conformations de manière relativement similaire (Haensele, Mele et al. 2017). Toutefois, le docking virtuel des structures RMN de l'UII et l'URP dans le site

orthostérique supposé a révélé des interactions différentes entre chacun de ces peptides et UT, suggérant qu'aucune conformation privilégiée adoptée par l'un ou l'autre peptide serait responsable de la sélectivité fonctionnelle, mais qu'au contraire c'est l'interaction entre UT et la portion N-ter différente entre UII et URP qui est capable de « remodeler » le site de fixation d'UT de manière différente pour l'un ou l'autre peptide (Figure 13) (Brancaccio, Merlino et al. 2015).

Figure 13 : Influence de la portion N-ter de l'UII et de l'URP sur leur liaison. Superposition des structures majoritaires obtenue par RMN en micelles de SDS de l'UII (gris) et l'URP (couleur), montrant une similarité structurale de la portion intracyclique (A). Toutefois le docking virtuel de l'URP (B) et l'UII (C) montre des différences d'interaction notamment au niveau de la portion N-ter (Brancaccio, Merlino et al. 2015).



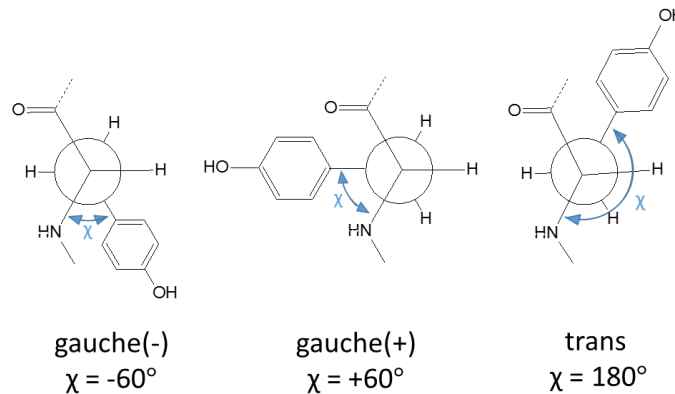
3. RSA du Tryptophane - développement des premiers modulateurs allostériques d'UT

Malgré un rôle clé dans la liaison à UT et son activation, peu d'études ont été réalisées autour du résidu tryptophane en position 7/4 de l'UII et de l'URP, respectivement (Leprince, Chatenet et al. 2008). Des études de spectroscopie RMN, réalisées dans des micelles de SDS, ont montré une différence entre le superagoniste P5U et l'antagoniste Urantide au niveau de l'orientation de leur résidu Trp respectif et de la distance entre le cycle indole de ce résidu et la chaîne latérale adjacente de Lys (P5U) ou Orn (Urantide). (Grieco, Carotenuto et al. 2009). Les deux structures conservent une conformation du cycle en type II β -hairpin suggérant ainsi un rôle de Trp7 dans le changement agoniste / antagoniste observé. Afin de délimiter clairement les éléments pharmacophoriques, notamment l'orientation rotamérique (orientation spatiale) de la chaîne latérale Trp responsables de chaque comportement, des autres modifications ont été utilisées.

Lors du remplacement du Trp⁷ dans P5U et urantide par un L/D-2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido [3,4-b] indole-3-carboxylique (Tpi), un acide aminé contraint dont les conformations sont limitées aux populations de rotamères à chaîne latérale g⁺ et g⁻, (Carotenuto, Auriemma et al. 2014) il a été observé de manière surprenante que l'orientation du résidu Tpi n'avait pratiquement aucun impact sur l'activité agoniste/antagoniste. En effet, la structure RMN de l'agoniste [Pen5, D-Tpi7]UII₍₄₋₁₁₎ et de l'antagoniste [Pen5, D-Tpi7, Orn8]UII₍₄₋₁₁₎ a révélé que la distance entre le groupe amine chargé positivement à la position 8 et le cycle indole du résidu Tpi n'est pas le paramètre responsable de la commutation de l'activité agoniste/antagoniste. Cependant, cette étude a également mise en évidence une différence majeure dans l'orientation de la chaîne latérale du résidu Tyr⁹ (Figure 14), l'anneau phénolique présentant une conformation g⁻ pour l'agoniste,

similaire à celle observée dans P5U, et une conformation trans pour l'antagoniste qui oriente l'anneau phénolique loin du résidu Orn⁸, une caractéristique aussi observée dans l'urantide (Carotenuto, Auriemma et al. 2014).

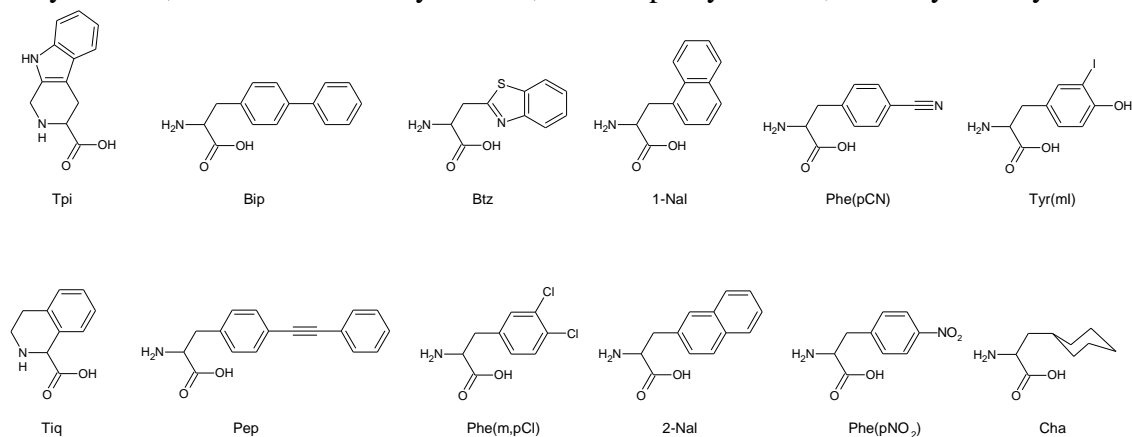
Figure 14 : Conformations possibles d'une chaîne latérale. Du fait de la répulsion stérique des groupements amine et carbonyle, la chaîne latérale d'un acide aminé (ici la tyrosine) ne peut emprunter que trois conformations : gauche(-) (g^-), gauche(+) (g^+) et trans (angle dièdre $\chi = -60^\circ$, $+60^\circ$ et $+180^\circ$ respectivement)



La même année, notre équipe a étudié l'importance du résidu Trp4 de l'URP en remplaçant ce résidu par des acides aminés naturels et non naturels (Chatenet, Folch et al. 2013). Dans cette étude, nous avons démontré pour l'URP que le cycle indole n'était en fait pas une caractéristique obligatoire pour une interaction efficace avec UT. Au moins pour l'URP, la chaîne latérale en position 4 stabilise la conformation bioactive en introduisant une contrainte dans la chaîne peptidique, stabilisant le positionnement des chaînes latérales d'autres résidus intracycliques notamment Lys⁵ et Tyr⁶ (Chatenet, Folch et al. 2013). Selon l'orientation adoptée par le résidu contraint et la torsion du squelette induite par la suite, l'activité des différents analogues variait d'agonistes partiels à agonistes complets plus ou moins puissants. Notamment, le remplacement du résidu Trp par l'acide tétrahydroisoquinoléine-1-carboxylique (Tiq, Figure 15) ou Tpi (Figure 15) dans l'URP a donné deux agonistes du récepteur UT équipotents qui sont caractérisés par des pharmacophores distincts (Chatenet, Folch et al. 2013).

Figure 15 : Quelques modifications introduites dans les structures de l'UII et/ou l'URP.

Tpi : 2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido [3,4-b] indole-3-carboxylique, Bip : biphenylalanine, Tiq : acide tétrahydroisoquinoléine-1-carboxylique, Pep : phényléthynyl-phénylalanine, Btz : benzothiazolylalanine, Nal : naphthylalanine, Cha : cyclohexylalanine.

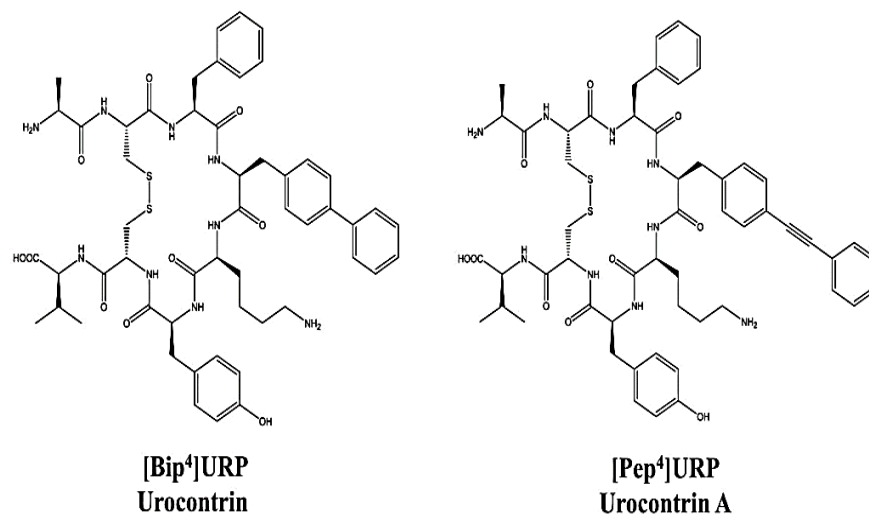


Au cours de cette étude, un composé, le [Bip⁴]URP auquel le nom d'Urocontrin (Figure 16) a été donné, s'est avéré capable de discriminer spécifiquement *ex vivo* la vasoconstriction induite par UII sans altérer celle provoquée par l'URP (Chatenet, Nguyen et al. 2012). Des résultats semblables ont également été observés *in vivo* sur des rats anesthésiés (Chatenet, Nguyen et al. 2012). Cependant ce composé possède une faible activité contractile et hémodynamique (Chatenet, Nguyen et al. 2012). Nos travaux subséquents ont toutefois montré que le remplacement en position 3 du groupement biphenyl (Figure 15) par un dérivé phenylethynylphenyl (Figure 15) permettait d'abolir l'activité contractile intrinsèque et d'augmenter la puissance du composé à réduire spécifiquement l'action vasoconstrictrice de l'UII (Chatenet, Letourneau et al. 2013). Ce composé, *i.e.* [Pep⁴]URP ou Urocontrin A (Figure 16), est également capable d'augmenter significativement et par un mécanisme non-compétitif la cinétique de dissociation de l'UII sans altérer celle de l'URP. Afin de vérifier l'influence du segment N-terminal de l'UII dans le processus d'activation, le dérivé [Pep⁷]hUII a été synthétisé. Ce dernier se comporte comme un faible agoniste du système urotensinergique démontrant ainsi

le rôle crucial joué par le domaine N-ter dans l'activation de UT. À la vue du profil pharmacologique de l'Urocontrin A, ce composé représente le premier modulateur allostérique du système urotensinergique et donc être un outil crucial pour étudier la pharmacologie complexe associée à ce système.

Étant donné les preuves suggérant qu'UT pourrait exister en tant qu'oligomères, (Clozel, Binkert et al. 2004, Castel, Diallo et al. 2006) et le fait que ces molécules, qui agissent d'une manière non compétitive, partagent pourtant presque la même séquence avec URP, nous avons proposé un modèle dans lequel ces modulateurs allostériques pourraient en fait influencer le profil pharmacologique de l'UII et/ou l'URP par allostérisme latéral, c'est-à-dire qu'il module la fonction d'un protomère du récepteur en ciblant un autre protomère du complexe. Un projet de doctorat est actuellement en cours pour confirmer cette hypothèse.

Figure 16 : Urocontrin et Urocontrin A. (Chatenet, Nguyen et al. 2012).



4. RSA de la Tyrosine.

La substitution du résidu tyrosine par une alanine ou par son énantiomère D a conduit dans l'UII (Brkovic, Hattenberger et al. 2003) comme dans l'URP (Chatenet, Dubessy et al. 2004) à une perte drastique d'affinité pour UT et du pouvoir contractile, démontrant ainsi l'importance clé de la nature et de l'orientation de la chaîne latérale. De plus, tel que mentionné précédemment, l'orientation trans du résidu Tyr⁹ dans l'UII semble être un déterminant clé dans le comportement antagoniste (Grieco, Carotenuto et al. 2009, Carotenuto, Auriemma et al. 2013, Brancaccio, Limatola et al. 2014). Une étude de RSA réalisée afin d'évaluer l'impact des substituants aromatiques polycycliques riches en électrons ou de dérivés phénylalanine para-substitués avec des groupements électrodonneurs/électroattracteurs à cette position particulière, a conduit à la découverte de deux superagonistes [Btz⁹]P5U (UPG100) et [(3,4-Cl)Phe⁹]P5U (UPG92) présentant une activité significativement supérieure à P5U (P5U, pEC₅₀ = 9,40 ± 0,20, [Btz⁹]P5U, pEC₅₀ = 10,71 ± 0,04 et [(3,4-Cl)Phe⁹]P5U; pEC₅₀ = 10,90 ± 0,14) dans un test *ex vivo* de contraction aortique (Carotenuto, Auriemma et al. 2014). Dans l'ensemble, ces expériences ont démontré que l'hydrophobicité est un paramètre crucial à cette position dans UII ou UII₄₋₁₁. Ainsi les résidus hydrophobes, tel que la naphthylalanine ou la benzothiazolylalanine (Figure 15), tendent à favoriser l'activité agoniste, et ce même dans un gabarit urantide. Au contraire l'activité antagoniste de l'urantide est conservée en substituant le phénol par un autre groupement polaire tel que cyano ou nitro (Figure 15) (Carotenuto, Auriemma et al. 2014). Ainsi cette position apparaît intéressante pour moduler les propriétés des ligands d'UT. Bien que peu de RSA ont été réalisées autour de cette position dans l'URP, il est intéressant de noter que le composé [Tyr(mI)⁶]URP (Figure 15) agit comme un agoniste faible (Chatenet, Dubessy et al. 2004), alors que son paralogue [Tyr(mI)⁹]UII₄₋₁₁ est un superagoniste (Labarrere, Chatenet et al.

2003), suggérant ainsi, tout comme pour le résidu Trp, une implication différente de ce résidu dans l'interaction avec UT.

5. RSA de la Phénylalanine.

Le résidu Phénylalanine fut initialement considéré comme peu important et donc exclu de la plupart des pharmacophores (Kinney, Almond Jr et al. 2002, Maryanoff and Kinney 2010). En effet, le composé [Ala⁶]UII agit comme un agoniste complet avec une puissance comparable à l'UII dans un test de mobilisation calcique vis-à-vis de rUT et hUT, suggérant ainsi un rôle minoritaire du groupement phenyl dans l'interaction avec UT (Brkovic, Hattenberger et al. 2003). Cependant, il fut également observé que ce même analogue était quasiment inactif à déclencher la contraction aortique (Brkovic, Hattenberger et al. 2003) ce qui est aussi le cas pour [Ala³]URP (Chatenet, Dubessy et al. 2004), démontrant l'implication crucial du résidu Phe dans l'activité contractile de UII et URP. Ainsi, si ce résidu peut être substitué, au moins dans l'UII par à peu près tout acide aminé naturel et tout de même conserver une mobilisation calcique très puissante (Bandholtz, Erdmann et al. 2016), la présence d'un cycle aromatique semble cruciale pour activer la contraction (Chatenet, Dubessy et al. 2006). Cela suggère la possibilité que la substitution à cette position pourrait permettre l'accès à des ligands biaisés. De plus le remplacement de la phénylalanine par une cyclohexylalanine (Figure 15) dans l'UII₄₋₁₁ a conduit à un composé inactif alors que le dérivé [Cha⁶]URP est un agoniste partiel capable de bloquer la contraction induite par hUII (Chatenet, Dubessy et al. 2006), mettant en évidence le rôle différent que pourrait jouer ce résidu dans la reconnaissance et l'activation d'UT par l'UII et l'URP.

Hypothèse et objectif.

Hypothèse :

L'activation d'UT provoque la contraction aortique *via* la mobilisation de plusieurs voies de signalisation. Sur la base des données de la littérature mais également sur celle de nos composés récemment découverts, nous avons émis l'hypothèse que l'introduction de certaines modifications à des endroits clés de la molécule, notamment au niveau des résidus aromatiques, pourrait conduire à des composés capables de bloquer/activer spécifiquement certaines voies de signalisation activées par UH et/ou URP générant ainsi des scalpels moléculaires très utiles tant d'un point de vue pharmacologique que thérapeutique.

Objectif :

Explorer les relations structures-activités de l'URP au niveau des résidus Tyrosine⁶ (article 1) et Phenylalanine³ (article 2).

Deuxième partie : Présentation des articles

i. Premier article – publié dans *Biochem. Pharmacol.* 144 : 100-107, 2017

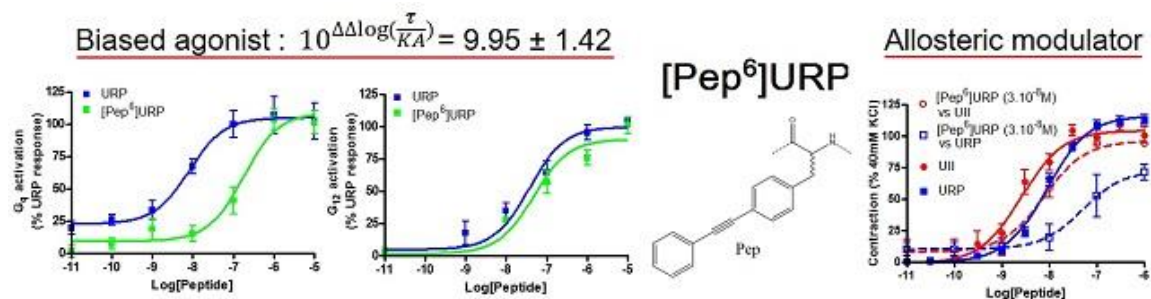
Insight into the role of Urotensin II-Related Peptide Tyrosine residue in UT activation

Mise en lumière du rôle du résidu Tyr⁶ de l'Urotensin II-related peptide dans l'activation d'UT

Etienne Billard¹, Myriam Létourneau¹, Terence E. Hébert², David Chatenet^{1,*}

¹INRS – Institut Armand-Frappier, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, Québec, Canada

²Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, Canada



Contributions :

Etienne Billard : Réalisation et conception des expériences, écriture du manuscrit.

Myriam Létourneau : Synthèse de [Tic(OH)⁶]URP et [Bip⁶]URP.

Terence E. Hébert : Conception des expériences de BRET, révision du manuscrit.

David Chatenet : Conception des expériences, révision et correction du manuscrit et des figures.

Résumé :

Tout en partageant une activité biologique commune, les deux ligands endogènes du récepteur à 7 domaines transmembranaires UT : urotensine II (UII) et *Urotensin II-related peptide* (URP) présentent également des effets distincts, qui pourraient s'expliquer par des interactions distinctes avec leur récepteur. En conséquence, l'introduction d'une substitution similaire au niveau du résidu Tyr intracyclique présent dans UII et URP conduit à des composés avec des profils pharmacologiques divergents. En supposant que le résidu Tyr⁶ de l'URP est un élément clé pour comprendre l'activation spécifique de l'UT par l'URP, nous avons entrepris une étude de relation structure-activité dans laquelle ce résidu particulier a été remplacé par des acides aminés non naturels et contraints. Chaque composé a été évalué pharmacologiquement pour sa capacité à lier l'UT, à induire la contraction d'anneaux aortiques de rat et à activer la voie de signalisation Gq et G12. Nous avons identifié [Pep⁶]URP qui lie UT avec une affinité similaire à celle de l'URP, mais se comporte comme un agoniste biaisé. Utilisé comme antagoniste, ce peptide est également capable de réduire sélectivement la contraction aortique maximale de l'URP mais pas celle de l'UII. Nos résultats suggèrent que l'orientation du résidu Tyr peut stabiliser au moins deux conformations différentes d'UT, conduisant à un signal biaisé et à un effet de *probe-dependence*.

Abbreviations:

BRET, bioluminescence resonance energy transfer; ACN, acetonitrile; Bip, biphenylalanine; Boc, tert-butoxycarbonyl; BOP, (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate; CHO cells, Chinese Hamster Ovary cells; DCM, dichloromethane; DIEA, N,N-diisopropylethylamine; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMF, dimethylformamide; FBS, foetal bovine serum; Fmoc, Fluorenylmethyloxycarbamate; GFP 10, green fluorescent protein 10; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK 293 cells, Human Embryonic Kidney 293 cells; $K_3[Fe(CN)_6]$, potassium ferricyanide; MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight; NMR, nuclear magnetic resonance; PAH, pulmonary arterial hypertension; $PdCl_2(PPh_3)_2$, Bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride; Pep, (phenylethynyl)-phenylalanine; Phe(pI), para-iodo-phenylalanine; Phg, phenylglycine; RlucII, *Renilla* luciferase II; RP-HPLC, Reverse phase-high performance liquid chromatography; Tic(7-OH), 7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline; Tyr(mI), meta-iodo-tyrosine; UII, Urotensin II; URP, Urotensin II-related peptide; UT, urotensin II receptors.

Abstract

While sharing common biological activity, the two endogenous ligands of the G protein-coupled receptor UT: urotensin II (UII) and urotensin II-related peptide (URP) also exhibit distinct effects, which could be explained by distinct interactions with their cognate receptor (UT). Accordingly, introduction of a similar substitution at the intracyclic Tyr residue in UII and URP led to compounds with divergent pharmacologic profiles. Hypothesizing that the Tyr⁶ residue of URP is a key-element to understand the specific activation of UT by URP, we undertook a study of the structure-activity relationship in which this particular residue was replaced by non-natural and constrained amino acids. Each compound was evaluated for its ability to bind UT, to induce rat aortic ring contraction and to activate G_q and G₁₂ signalling pathways. We identified [Pep⁶]URP, that binds UT with an affinity similar to that of URP, but behaves as a biased ligand. Used as an antagonist, this peptide is also able to selectively reduce the maximal aortic contraction of URP but not UII. Our results suggest that the orientation of the Tyr residue can stabilize at least two different conformations of UT, leading to biased signalling and a probe-dependent allosteric effect.

Keywords: urotensin II-related peptide, human UT, aortic ring bioassay, BRET-based biosensor, bias agonism.

1. Introduction

The urotensinergic system, formed by a G protein-coupled receptor (GPCR) termed UT and two endogenous peptide ligands Urotensin II (UII, H-Glu-Thr-Pro-Asp-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH) and Urotensin II-related peptide (URP, H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH), is currently regarded as a potential key contributor to cardiovascular function [1, 2]. Notably, UII is considered one of the most potent endogenous vasoconstrictor and inotropic agents ever described [3, 4]. Over the years, evidence has highlighted the involvement of this system in the genesis and progression of various cardiovascular pathologies including atherosclerosis [5] and pulmonary arterial hypertension (PAH) [6]. Multiple animal studies have shown the therapeutic potential of UT antagonists for treatment of such pathologies but also hypertension, metabolic syndrome, as well as cardiac and renal failure [7-11]. Unfortunately, discrepancies and disappointments were observed with urantide, an antagonist/partial agonist of the urotensinergic system [12], and other candidates as well pointing out a greater need for understanding UT pharmacology at both the molecular and cellular levels.

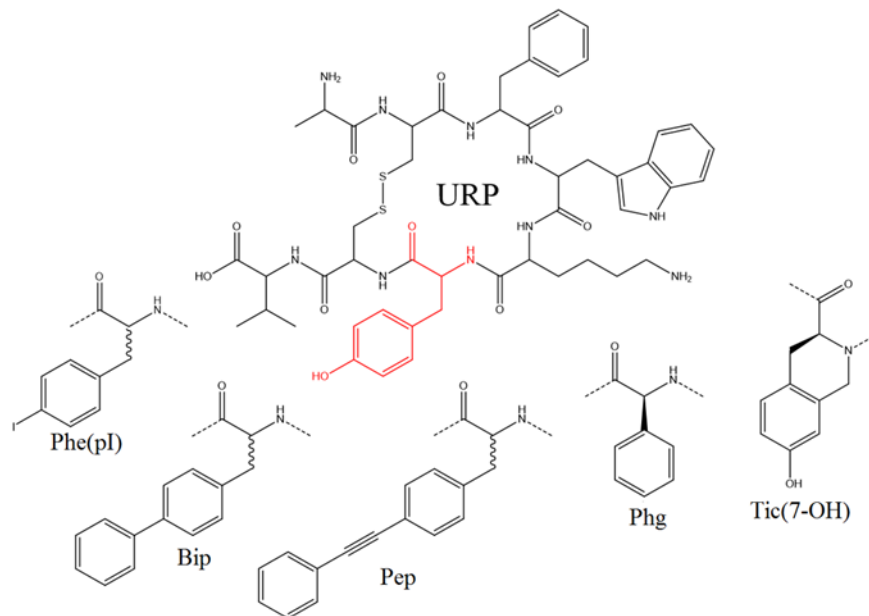
UII and URP are cyclic peptides that share a common and strictly conserved bioactive cyclic core (-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-) but differ by their extracyclic N-terminal residues [4]. Accordingly, while modifications at the N-terminus of UII or URP have almost no impact on their biological activity, several structure-activity relationship analyses, including Ala- and D-scans, revealed that both the nature and orientation of these intracyclic residues were crucial for UT recognition and activation [13-18]. In particular, these studies demonstrated the important role played by the tyrosine residue in UII and URP. For instance, and as recently reported, the replacement of the Tyr residue with more hydrophobic and/or bulky residues such as (3,4-Cl)Phe or 3-iodo-Tyr as well as the conservation of a specific g^- orientation of the side chain of these

residue gave rise to potent UT agonists [19]. While these assumptions are true for UII and its equiactive analog UII₍₄₋₁₁₎, we currently have limited information regarding the role played by this residue in URP biological activity. UII and URP share common biological actions, however a body of evidence has shown that the two peptides also exert distinct functions, suggesting that these two endogenous UT ligands might be functionally selective [20-24]. As recently demonstrated by virtual docking, the acidic Asp⁴ residue of UII or UII₍₄₋₁₁₎, and not the corresponding aliphatic Ala¹ of URP, can establish a salt bridge with Arg¹⁹³ of the receptor, creating a different binding environment for the two peptides [25]. Supporting this observation, introduction of a Tyr(mI) moiety in UII₍₄₋₁₁₎ and URP, which only differ by their N-terminal amino acid (Asp versus Ala, respectively), gave rise to two distinct pharmacological profiles with [Tyr(mI)⁶]URP acting as a weak UT agonist while [Tyr(mI)⁹]UII₍₄₋₁₁₎ is known as a highly potent UT ligand [13, 15]. Such results imply that the Tyr environment in UT may be different for UII and URP following receptor binding. In this context, exploiting this apparent divergence between UII and URP could represent a good opportunity to understand the subtle and pluridimensional pharmacology of UT.

In order to generate insight into the mechanisms of UT recognition and activation by URP, we initiated a structure-activity relationship study at the Tyr⁶ position of URP by introducing highly hindered and/or conformationally constrained amino-acids (Figure 1). Compounds were pharmacologically evaluated for their ability 1) to bind UT, 2) to induce/modulate rat aortic ring contraction and 3) to promote activation of G_q and G₁₂ using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensors. The identification of a biased agonist, *i.e.* [Pep⁶]URP, reveals a crucial role of this residue in the fine tuning of UT signaling. Furthermore, the ability of this compound to selectively reduce maximal contractile response to URP but not UII indicates that

substitution at position 6 could open up new vistas for development of allosteric modulators specifically targeting URP functions.

Figure 1. Structures of the non-natural amino-acids introduced at position 6 in URP.



Phe(pI), para-iodo-phenylalanine; Bip, biphenylalanine; Pep, (phenylethynyl)-phenylalanine; Phg, phenylglycine; Tic(7-OH), 7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline.

2. Material and Methods

2.1. Materials

The fluorenylmethyloxycarbamate- (Fmoc-) protected amino-acids, Fmoc-Val-Wang resin and (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) were purchased from Chem-Impex (Wood Dale, IL). Trifluoroacetic acid (TFA), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), diethyl ether, N,N-dimethylformamide (DMF), piperidine and dichloromethane (DCM) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON). Na¹²⁵I was purchased from Perkin-Elmer (Montreal, QC). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON).

2.2. Peptide Synthesis

Peptides were prepared by solid-phase peptide synthesis using a Fmoc protection strategy and a commercially available Fmoc-Val-Wang resin 0.62 meq/g. All reactions were conducted under a nitrogen atmosphere. Fmoc deprotection was achieved with 20% piperidine in DMF for 15 min. Washes were performed with DMF (2x), MeOH (2x) and DCM (2x). Coupling of the Fmoc-protected amino-acids (3-equivalent excess based on the original resin substitution) were mediated by BOP (3 eq) and N,N-diisopropylethylamine (DIEA; 6 eq) in DMF for approximately 1 h. Completion of the coupling and deprotection steps was monitored with the qualitative Kaiser test. The phenylacetylenyl side chain was introduced on Boc-[L/D-Phe(pI)⁶]URP peptidyl-resins using the Sonogashira cross-coupling reaction and a previously reported procedure [20]. Briefly, a solution of DMF/DCM (50/50) is added to the peptidyl-resin (1 eq) and the mixture was degassed in the reactor with nitrogen 15 min prior to the reaction. Then, phenylacetylene (3 eq), Bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (PdCl₂(PPh₃)₂; 0.1 eq), copper iodide (CuI; 0.1 eq), tricyclohexylphosphine (0.2 eq) and triethylamine (3 eq) were added into the reaction vessel and the reaction mixture was then agitated through nitrogen bubbling overnight at room temperature (RT). The resin was then washed with DMF (2x), 0.1 M diethyldithiocarbamate in DMF (2x, 5 min) in order to remove the excess of Pd-catalyst, DMF (2x), MeOH (2x), and DCM (2x). All peptides were cleaved from their solid support with concomitant side-chain deprotection by exposing the peptidyl-resin to a mixture of trifluoroacetic acid containing water (2.5%), ethanedithiol (2.5%) and triisopropylsilane (1%) for 3 h at RT. The filtrate was evaporated and the crude peptide was precipitated with diethylether. In most cases, disulfide bridge formation was achieved through the iodine oxidation method as previously described [26]. However, for alkyne-containing peptides, cyclization was induced by dissolving the crude peptide in an

aqueous solution of acetonitrile (50/50; v/v) at a concentration of 1 mg/mL. Then, the pH was raised to 8 with a diluted solution of ammonium hydroxide prior to the addition of potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$; 2 eq). The mixture was stirred for 3 h and the pH was then adjusted to 3.5 with acetic acid. Purification of peptides was achieved by RP-HPLC using a X-Terra-Prep MS[©] C₁₈ column and a linear gradient of 0-100% eluant B (50 % acetonitrile in 0.06% water) over 2 h. Peptide homogeneity was evaluated by analytical RP-HPLC (C₁₈ CSC-Kromasil column and a linear gradient of 0-60 % of ACN over 30 min) and MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE, sources) in linear mode using α -cyanohydroxycinnamic acid as matrix. Fractions with a purity above 95 % were pooled, lyophilized and stored at -20°C.

2.3. Aortic ring contraction experiments

Adult male Sprague-Dawley rats (Charles-Rivers, San Diego, CA) weighing 250–300 g were housed in group cages under controlled illumination (12:12h 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-Institut Armand-Frappier*. As previously described [20], 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 4 mm rings. 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-Henseleit buffer. Eighty microliter of a 2.5 M potassium chloride solution (40 mM final concentration in bath) was used to evaluate the contractile responses of each vessel. Cumulative concentration-response curves to

synthetic peptides were obtained by increasing the concentration of each peptide in the organ chamber ($3 \cdot 10^{-11}$ to $3 \cdot 10^{-6}$ M). The amplitude of the contraction induced by each concentration of peptide was expressed as a percentage of the KCl-induced contraction. For antagonist assay, a concentration of $3 \cdot 10^{-8}$ M of [Pep⁶]URP was applied 30 minutes prior treatment with cumulative concentrations of UII or URP (10^{-11} to 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 3-19 animals.

2.4. Ligand Binding

Synthetic URP was radiolabeled with Na¹²⁵I using the chloramine T technique as previously reported [13]. Iodinated ¹²⁵I-URP were purified on a C₁₈ cartridge, collected and stored at -20°C until use. Competitive binding experiments were performed using a stable CHO-UT cell line, expressing the human UT isoform (generous gift from Drs H. Vaudry and C. Dubessy, Rouen, France), and as previously described [13]. Briefly, cells plated in 24-well plate at a density of 150,000 cells/well were incubated on ice and for 2h with increasing concentration of various peptides (10^{-11} to 10^{-5} M) in the presence of ¹²⁵I-URP (0.2 nM). Non-specific binding was established by exposing cells to 10^{-5} M cold URP. Cell-bound radioactivity was quantified using a γ -counter. Results were expressed as a percentage of the specific binding of ¹²⁵I-URP obtained in the absence of competitive ligands.

2.5. Generation of a stable HEK 293-cell line expressing human UT

A pcDNA3.1+ vector containing the human UT receptor cDNA cloned at EcoRI and BamHI restriction sites was obtained from Missouri S & T cDNA Resource Center. HEK 293 cells, grown in DMEM culture media supplemented with 10% foetal bovine serum, HEPES, and sodium pyruvate without antibiotics, were plated in a 6-well plate at 200,000 cells/well and transfected following a CaCl₂ procedure [27]. At 48 h post-transfection, cells were trypsinized and G418 (selection antibiotic) was added at 800 µg/mL to culture media. The optimal selection antibiotic concentration was determined by performing a kill curve assay on HEK 293 cells (data not shown). Cells were cultured under the selection antibiotic for 8-10 days (untransfected cells died within 10 days) with medium changed every 2 days. Positive cells (unaffected by the selection antibiotic) were maintained until they reached 80% confluency. Cells were then trypsinized, diluted and plated in 96-well plates at a very low density (about 1 cell/well) to isolate clones. Cells from single-colony wells were transferred to 6-well plates for expansion. For each clone, presence of UT mRNA was confirmed by RT-PCR and the clone, HEK 293-UT, having the best growing properties was chosen for our subsequent studies.

2.6. Gq and G₁₂ activation assays

HEK 293-UT cells were grown in DMEM culture media supplemented with 10% foetal bovine serum, HEPES, sodium pyruvate and G418 (400 µg/mL). 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 5 h later, cells were transiently transfected with 0.025 ng/well of a Gq-polycistronic or 0.005 ng/well of a G₁₂-polycistronic BRET sensor [28]. Sixteen hours post-transfection, medium was replaced with DMEM supplemented with 5% FBS, HEPES,

sodium pyruvate and G418 (400 µg/mL) and cell growth was resumed for another 24 h. Cells were washed with 120 µL PBS solution supplemented with 0.1 % of glucose, and then incubated with 80 µL of this solution for 2 h. Then, 10 µl of a 1/20 dilution (diluted before use) of coelenterazine 400A (stock at 1 mM in ethanol) in Krebs and 10 µl of the 10x appropriate concentration were added, and the luminescence was evaluated with 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 signals were monitored for 5 min after co-addition of coelenterazine 400A and ligands. 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 URP (10^{-5} M).

2.7. Statistical analysis

Aortic contraction assays, binding experiments and G-protein activation 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 dose-response fits with variable slope and one-site competition functions were used to determine EC₅₀ and IC₅₀, respectively. Bias between G_q and G₁₂ pathways was determined using the Black and Leff operational model [29]. Statistical comparisons were analyzed by the Student's t-test, and differences were considered significant where * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$.

3. Results

3.1. Peptide structure and analysis.

Structures of the non-natural amino-acids used in this study are presented in Figure 1. RP-HPLC analysis of URP and related analogs revealed that their purity was higher than 98%. For all peptides, the molecular weight observed by MS analysis agreed with theoretical values (Table 1).

Table 1. Amino acid sequences and analytical data of URP and its related analogs.

| <i>Peptide</i> | <i>Sequence</i> | <i>Calculated^a</i> | <i>Observed^a</i> |
|------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1016.4 | 1017.1 |
| [Phe(pI) ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Phe(pI)-Cys]-Val-OH | 1126.3 | 1127.7 |
| [Bip ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Bip-Cys]-Val-OH | 1076.5 | 1078.5 |
| [Pep ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Pep-Cys]-Val-OH | 1100.5 | 1101.8 |
| [D-Phe(pI) ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys- Phe(pI) -Cys]-Val-OH | 1126.3 | 1127.1 |
| [D-Bip ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys- Bip -Cys]-Val-OH | 1076.5 | 1077.4 |
| [D-Pep ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys- Pep -Cys]-Val-OH | 1100.5 | 1101.8 |
| [Tic(7-OH) ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tic(7-OH)-Cys]-Val-OH | 1028.4 | 1030.0 |
| [Phg ⁶]URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Phg-Cys]-Val-OH | 986.4 | 986.6 |

^aMALDI mass spectral analysis (m/z). The observed m/z of the monoisotope compared with the calculated monoisotopic mass. D-Amino acids are indicated in bold italic letters.

3.2. Binding Affinity of URP and related analogs.

As shown in Table 2, replacement of the Tyr residue with various hydrophobic substituents generated analogs that retained a good binding affinity toward UT (Figure 2). For instance, [Pep⁶]URP ($pIC_{50} = 7.70 \pm 0.09$) binds UT much like URP ($pIC_{50} = 7.64 \pm 0.09$). However, [Phe(pI)⁶]URP and [Bip⁶]URP exhibited a greater binding affinity ($pIC_{50} = 8.25^{**} \pm 0.10$ and

pIC₅₀ = 8.19 ± 0.12, respectively; *P* < 0.01) than the native ligand (pIC₅₀ = 7.64 ± 0.09). In contrast to their L-counterpart, [D-Phe(pI)⁶]URP, [D-Bip⁶]URP, and [D-Pep⁶]URP bound UT with a weak affinity (pIC₅₀ < 6). Finally, the introduction of constrained amino acids resulted in two compounds, [Tic(7-OH)⁶]URP and [Phg⁶]URP, which showed reduced binding affinity (pIC₅₀ = 6.11 ± 0.11 and 6.45 ± 0.22, respectively).

Table 2. Binding affinity and contractile activity of URP and related analogs.

| Peptide | Binding affinity | | Aortic ring contraction | | |
|------------------------------|------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | n | pIC ₅₀ | n | E _{max} ^a | pEC ₅₀ |
| URP | 6 | 7.64 ± 0.09 | 19 | 116 ± 4 | 8.11 ± 0.06 |
| [Phe(pI) ⁶]URP | 4 | 8.25 ± 0.10** | 4 | 95 ± 7* | 8.12 ± 0.20 |
| [Bip ⁶]URP | 3 | 8.19 ± 0.12** | 4 | 105 ± 8 | 7.50 ± 0.18*** |
| [Pep ⁶]URP | 3 | 7.70 ± 0.09 | 3 | 98 ± 5 | 6.77 ± 0.10*** |
| [D-Phe(pI) ⁶]URP | 3 | 5.46 ± 0.16*** | 4 | 61% @ 10 μM | |
| [D-Bip ⁶]URP | 3 | <5*** | 3 | 7% @ 10 μM | |
| [D-Pep ⁶]URP | 3 | 5.82 ± 0.08*** | 5 | 34% @ 10 μM | |
| [Tic(7-OH) ⁶]URP | 3 | 6.11 ± 0.11*** | 5 | 52 ± 5*** | 6.53 ± 0.20*** |
| [Phg ⁶]URP | 4 | 6.45 ± 0.22*** | 4 | 37 ± 12*** | 6.24 ± 0.49*** |

^aThe maximum efficacy is expressed as a percentage of the amplitude of the contraction induced by KCl (40 mM). All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using unpaired Student's t test, **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, ****P* ≤ 0.001, versus values obtained for URP. Each replicate (n) was conducted on tissue from different animal or on different cellular passage.

3.3. Vasocontractile action of URP and related analogs.

Each compound was then evaluated for its propensity to induce aortic ring contraction (Figure 3). While [Phe(pI)⁶]URP, [Bip⁶]URP, and [Pep⁶]URP exhibited a similar or even greater binding affinity compared to URP, these molecules exhibited very different vasoactive profiles (Figure 3, Table 2). For instance, [Pep⁶]URP, with a binding affinity similar to that of URP, induced aortic ring contraction with a potency significantly lower ($pEC_{50} = 6.77 \pm 0.10$) than that of URP ($pEC_{50} = 8.11 \pm 0.06$). Surprisingly, [Bip⁶]URP, which was a significantly better UT binder than URP, produced a less potent ($pEC_{50} = 7.50 \pm 0.18$) but still efficient ($E_{max} = 105 \pm 8\%$) aortic ring contraction compared to URP ($pEC_{50} = 8.11 \pm 0.06$; $E_{max} = 116 \pm 4\%$). Also, [Phe(pI)⁶]URP, which possessed a similar binding affinity to [Bip⁶]URP, was able, like URP, to potently ($pEC_{50} = 8.12 \pm 0.20$) and efficiently ($E_{max} = 95 \pm 7\%$) induce aortic ring contraction (Figure 3; Table 2). Surprisingly, these results appear to be in contrast with the results obtained in the radioligand binding assays. Compounds, [D-Phe(pI)⁶]URP, [D-Bip⁶]URP, and [D-Pep⁶]URP, retained low to very low binding affinity also exhibited a weak propensity to induce rat aortic contraction (Figure 3, Table 2). Finally, introduction of a conformational constraint within URP at position 6 produced two partial agonists, eliciting approximately 45% and 30% of the maximal URP-induced contraction ($E_{max} = 116 \pm 4\%$), respectively.

3.4. G_q and G₁₂ activations.

Discrepancies observed between our binding assays and our aortic ring contraction experiments could be the result of a system bias due to species differences or biased signaling. Since aortic ring contraction is in part mediated by intracellular calcium mobilization following activation of G_q [30] and by the stimulation of the small GTPase RhoA following G₁₂ activation [31], we next evaluated the ability of [Phe(pI)⁶]URP, [Pep⁶]URP, [D-Bip⁶]URP, and [Tic(7-OH)⁶]URP to

recruit G_q using a BRET-based biosensor (Figure 4, Table 3). Treatment of HEK 293-UT cells with [Phe(pI)⁶]URP produced G_q activation ($pEC_{50} = 7.85 \pm 0.17$) similar to that observed for URP ($pEC_{50} = 8.03 \pm 0.18$). These results are in accordance with the respective effects exerted by URP and [Phe(pI)⁶]URP in our aortic ring experiments. Similarly, [Pep⁶]URP ($pEC_{50} = 6.84 \pm 0.16$) and [Tic(7-OH)⁶]URP ($pEC_{50} = 7.00 \pm 0.24$) exhibited a lower propensity to activate G_q . Interestingly, while the efficiency of [Pep⁶]URP to stimulate G_q signalling was similar to that of URP, [Tic(7-OH)⁶]URP was only able to reach $61 \pm 7\%$ of the URP-associated G_q activation. [D-Bip⁶]URP failed to activate G_q .

We next evaluated the ability of those analogs to activate G_{12} . Except for [D-Bip⁶]URP that failed to activate G_{12} , all of them behaved as full agonists with varying potencies (Figure 5, Table 3). While [Pep⁶]URP and [Phe(pI)⁶]URP produced a similar activation of G_{12} ($pEC_{50} = 7.32 \pm 0.17$; $E_{max} = 90 \pm 6$ and $pEC_{50} = 7.57 \pm 0.20$; $E_{max} = 92 \pm 6$, respectively) compared to URP ($pEC_{50} = 7.43 \pm 0.15$; $E_{max} = 100$), [Tic(7-OH)⁶]URP-induced G_{12} activation was significantly less potent than URP ($pEC_{50} = 6.73 \pm 0.18$, $*P \leq 0.05$). Bias determination revealed that while [Phe(pI)⁶]URP was unbiased (1.51 ± 1.31), [Pep⁶]URP (9.95 ± 1.42 , $**P \leq 0.01$) and [Tic(7-OH)⁶]URP (22.13 ± 1.51 , $***P \leq 0.001$) were strongly and significantly biased toward G_{12} compared to URP.

Table 3. G-protein activation of URP and related analogs.

| Peptide | Gq activation | | | G ₁₂ activation | | | G ₁₂ /Gq activation bias ^b |
|------------------------------|---------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------|---|
| | n | E _{max} ^a | pEC ₅₀ | n | E _{max} ^a | pEC ₅₀ | 10 ^{ΔΔlog($\frac{\tau}{KA}$)}} |
| URP | 4 | 100 ± 5 | 8.03 ± 0.18 | 5 | 100 ± 5 | 7.43 ± 0.15 | 1.00 ± 1.32 |
| [Phe(pI) ⁶]URP | 6 | 92 ± 5 | 7.85 ± 0.17 | 5 | 92 ± 6 | 7.57 ± 0.20 | 1.51 ± 1.31 |
| [Pep ⁶]URP | 5 | 99 ± 6 | 6.84 ± 0.16 ** | 5 | 90 ± 6 | 7.32 ± 0.17 | 9.95 ± 1.42 ** |
| [D-Bip ⁶]URP | 3 | Inactive | | 5 | Inactive | | Inactive |
| [Tic(7-OH) ⁶]URP | 4 | 61 ± 6** | 7.00 ± 0.24 ** | 5 | 98 ± 7 | 6.73 ± 0.18 * | 22.13 ± 1.51 *** |

^aThe maximum efficacy is expressed as a percentage of the activation induced by URP (10⁻⁵M).

^bBias is calculated using the Black-Leff operational model and URP was used as the reference (unbiased) ligand. All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using unpaired Student's t test, **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, ****P* ≤ 0.001, versus values obtained for URP. Each replicate (n) was conducted on different cellular passage.

3.5. Antagonistic nature of [Pep⁶]URP.

Considering that [Pep⁶]URP has a similar affinity than URP but behave as a biased agonist, we investigated its propensity to block hU11- and/or URP-mediated rat aortic contraction as previously reported for several recently developed analogs [20, 21, 32-34]. Tested at 3 X 10⁻⁸M, a concentration that only produced 10% contraction, [Pep⁶]URP is able to reduce U11 contractile potency (pEC₅₀ = 8.11 ± 0.12 vs 8.52 ± 0.11 no treatment, **P* ≤ 0.05) without affecting its efficacy (Figure 5, Table 4). Surprisingly, this analog significantly diminished both the potency and the efficacy of URP to induce contraction (pEC₅₀ = 7.30 ± 0.24, ****P* ≤ 0.001; E_{max} = 73 ± 5, ****P* ≤ 0.001).

Table 4. Antagonistic contractile activity of [Pep⁶]URP.

| Peptide | Aortic ring contraction hUll | | | Aortic ring contraction URP | | |
|---|------------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| | n | E _{max} | pEC ₅₀ | n | E _{max} | pEC ₅₀ |
| No treatment | 15 | 102 ± 4 | 8.52 ± 0.11 | 19 | 116 ± 4 | 8.11 ± 0.06 |
| [Pep ⁶]URP 3.10 ⁻⁸ M | 3 | 96 ± 3 | 8.11 ± 0.12 * | 3 | 73 ± 5 *** | 7.30 ± 0.24 *** |

^aThe maximum efficacy is expressed as a percentage of the amplitude of the contraction induced by KCl (40 mM). Aortic rings were pre-treated with [Pep⁶]URP for 30 minutes prior Ull or URP treatment. All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using unpaired Student's t test, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, versus values obtained for URP. Each replicate (n) was conducted on tissue from different animal.

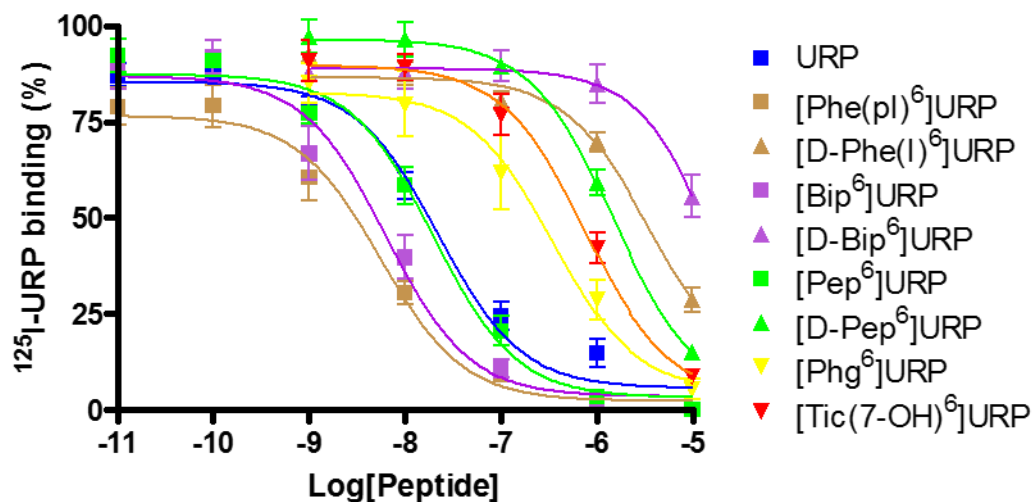
4. Discussion

Several studies have recently shown that Ull and URP might indeed be functionally selective UT agonists [20-24, 33, 34]. Over the years, characterization of structure-activity relationships (SAR) have highlighted the crucial role played by the common C-terminal cyclic core of Ull and URP in regards to their biological activity [4, 16]. The N-terminal domain of Ull was generally deemed unimportant for the function of Ull. However, we and others recently demonstrated the existence of an initial interaction between this N-terminal domain, particularly the glutamic and aspartic acid residues, and the receptor that could lead to specific topological changes associated with UT activation [20, 25]. Accordingly, a recent study suggested that the different biological effects of Ull and URP were not caused by differences in ring conformations but rather by different interactions with UT [35]. Since most of the SAR studies have been conducted on Ull, SAR studies on URP are rather sparse with limited information regarding UT activation. To date, all SAR studies, conducted on Ull, URP or their related analog Ull₍₄₋₁₁₎, have demonstrated the importance of the aromatic ring at position 6/9 of URP and Ull, respectively. Hence, while [Ala⁶]URP and [Ala⁹]Ull exhibited a drastic reduction in binding affinity and

biological activity [13, 18], almost all aromatic-substituted UII analogs retained good activity. The present study is the first to explore the impact of various para-substituted phenylalanine moieties on the binding and biological activity of URP.

Except [Phg⁶] and [Tic(7-OH)⁶]URP, all L-substituted URP analogs at position 6 retained a similar if not better binding affinity than URP, therefore suggesting that, as for UII [15, 18, 36, 37], the presence of an aromatic ring is a major determinant for its binding while the presence of an hydroxyl group is not crucial. Interestingly, the significantly higher affinity of [Bip⁶]URP and [Phe(pI)⁶]URP suggest that the augmentation of the hydrophobicity parameter augment the binding, which is also in line with previous studies [19, 37]. Notably, replacement of the Tyr residue in the UII-related analog, Ac-c[CFWKYC]-NH₂, resulted in a tenfold improvement in binding affinity compared to UII [37]. Other modifications introduced within URP, including isomer substitution or conformational restraint, generated weak UT binders. Since NMR analysis of URP has revealed the presence of a turn structure stabilised by the Tyr⁶ residue [13, 25, 38], perturbation of this secondary structure in URP, through side-chain modification/orientation like in [D-Pep⁶]URP and [Tic(7-OH)⁶]URP, has probably prevented its proper binding to UT. Overall, while the steric hindrance of the side chain at position 6 does not appear to be a critical parameter, the orientation of those side chains is of paramount importance for proper UT recognition.

Figure 2. Displacement curves of [¹²⁵I]URP binding for the different peptides of the library on CHO-UT cells.

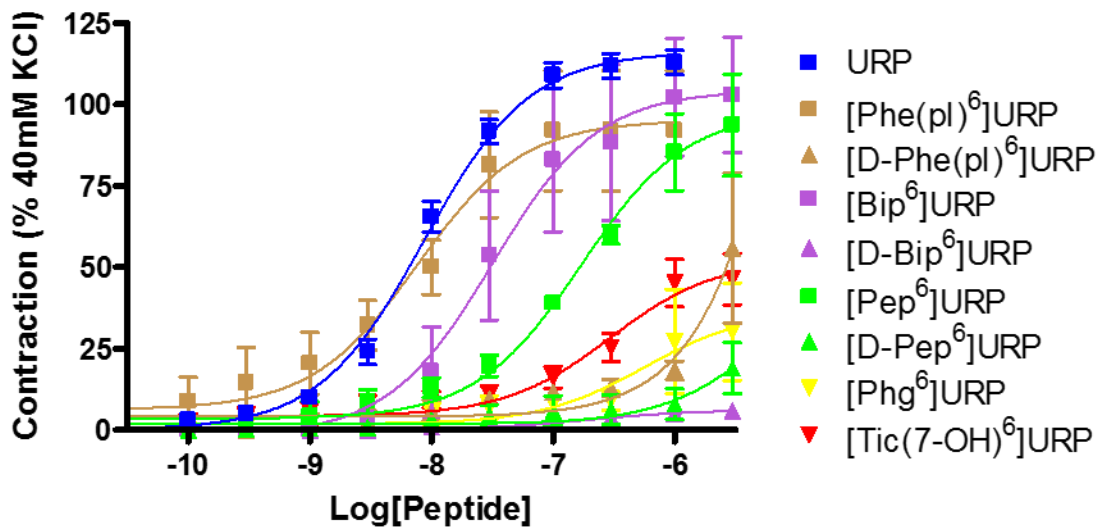


Data represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments each performed in duplicate.

On one hand and in accordance with their binding affinity, all D-isomers and conformationally restricted analogs exerted a weak to very weak contractile action. Notably, while all D-isomers acted as very weak agonists, reaching between 7 and 60% of URP maximum response at 10^{-5} M, the two constrained analogs behaved as weak partial agonists (Table 2, Figure 3). On the other hand, all L-substituted URP analogs were full UT agonists, their vasocontractile actions appear correlated with an augmentation of the steric parameter or with the length of the π -electronic cloud of the para-group. Altogether, while the orientation of the side chain is again a negative contributor for biological activity of URP analogs, the length of the substituent in para, which seems to preserve or improve binding affinity, tends to be an unfavorable determinant for their vasocontractile activity. However, as previously reported for UII and its related analogs UII₍₄₋₁₁₎, substitution of the Tyr residue by bulky aromatic amino acids including (2-naphthyl)-L-alanine, biphenylalanine, and 3-iodo-tyrosine or replacement of the hydroxyl group with various

substituents such as $-OCH_3$, $-NO_2$, $COOH$, and $-NH_2$ increased or left unaffected binding affinity and biological activity through enhancement of the hydrophobic interactions within a putative Tyr binding pocket of UT [36, 37]. Surprisingly, [3-iodo-Tyr⁶]URP is characterized by a two-fold decrease in binding affinity and a nine fold decrease in contractile activity [13]. While the common and minimal requirement at this position for UII and URP appeared to be the presence of an aromatic moiety, the introduction of substituted phenylalanine or tyrosine residues in UII and URP yielded distinct results that might suggest a different mode of interaction with UT.

Figure 3. Representative concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of URP or its analogs.

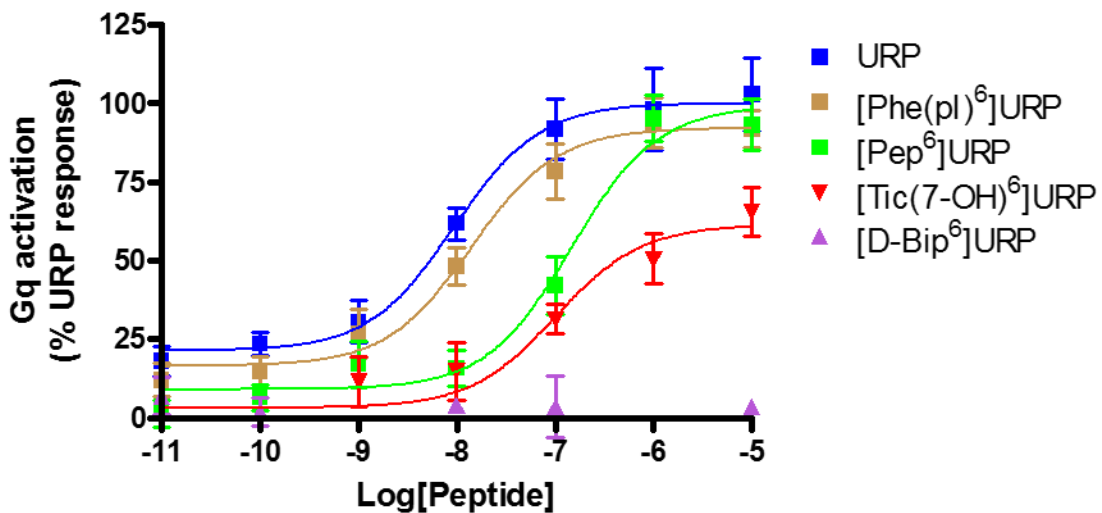


Efficacy is expressed as a percentage of the amplitude of the contraction induced by KCl (40 mM). Each replicate (n) was conducted on tissue from at least 3 different animals. Data represent the mean \pm S.E.M.

The significant differences observed for [Pep⁶]URP between its binding affinity and biological activity could result from inter-species variability, since hUT and rUT share only 75% of sequence homology [3], or signaling bias. In order to assess this question, we evaluated the

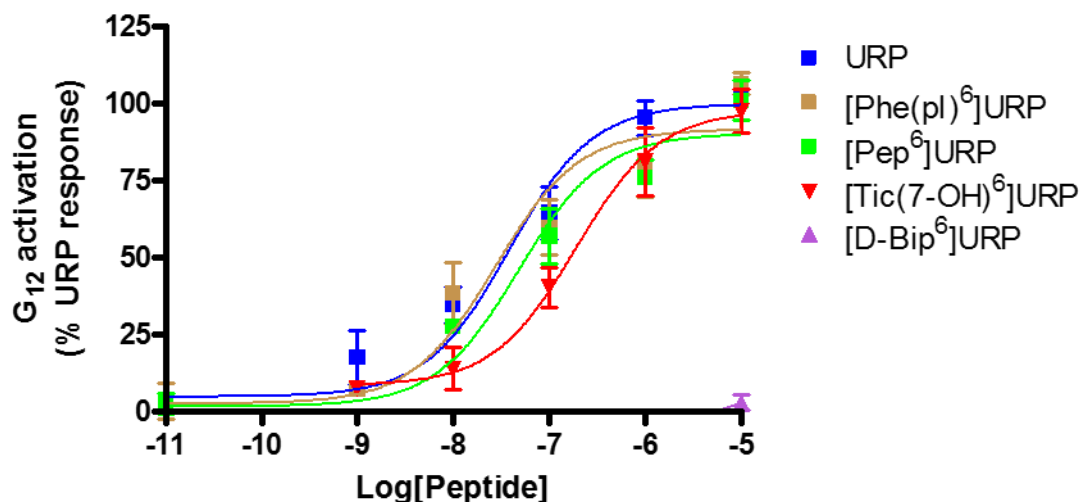
propensity of [Phe(pI)⁶]URP, [D-Bip⁶]URP, [Tic(7-OH)⁶]URP and [Pep⁶]URP to activate G_q and G₁₂ following stimulation of hUT. Using a G_q BRET-based biosensor, the results that we obtained were consistent with those obtained in the rat aortic contraction bioassay, negating the possibility of an interspecies bias. Notably, [Pep⁶]URP, which is less potent than URP to induce contraction, was also less potent than URP for triggering G_q activation. Interestingly, [Phe(pI)⁶]URP and [Pep⁶]URP activated G₁₂ with a potency and efficacy similar to that of URP while [D-Bip⁶]URP was inactive. The signaling bias observed with [Pep⁶]URP on G₁₂ over G_q but not [Phe(pI)⁶]URP could explain, at least in part, the discrepancies observed in this study between binding affinity and biological activity, those two G proteins being involved in the vasocontractile action of UII and URP.

Figure 4. Agonist properties of URP and its analogs on the G_q activation using a BRET-based biosensor.



Efficacy is expressed as a percentage of the URP maximal response (10^{-5} M). Data represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments each performed in duplicate.

Figure 5. Agonistic properties of URP and its analogs on the G₁₂ activation using a BRET-based biosensor.

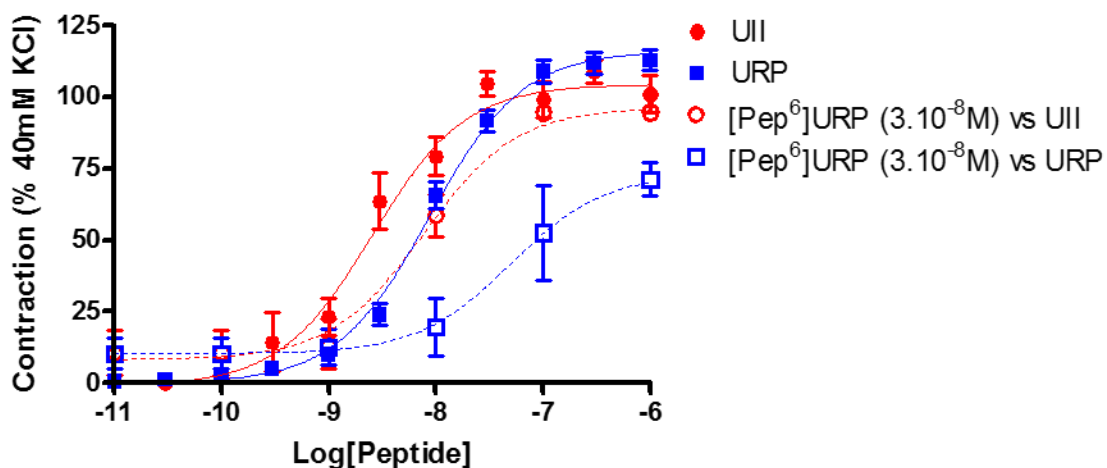


Efficacy is expressed as a percentage of the URP maximal response (10⁻⁵ M). Data represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments each performed in duplicate.

Tested at a concentration (3 X 10⁻⁸M) that does not trigger contraction, [Pep⁶]URP behaved as an atypical antagonist exerting a probe-dependent action on UUI and URP. On one hand, this analog reduced UUI potency to induce contraction without affecting its efficacy. On the other hand, it diminished both URP potency and efficacy. Binding experiments performed in this study suggest that URP and [Pep⁶]URP compete to a common binding site, however this probe-dependent mechanism suggests an allosteric mode of action. Due to the high similarity between [Pep⁶]URP and URP, it is unlikely that this peptide binds to a site distinct to the orthosteric one. Owing to the traditional view that GPCRs were monomeric, thus non-interacting proteins, allosteric modulators were usually defined as chemical entities that could alter the binding or function of orthosteric ligands by binding the same (monomeric) GPCR at a topographically different binding site [39]. However, allosteric binding sites can also be distinct at the molecular level. Indeed, as described by Kenakin: "Allosterism can be defined as the process by which the

interaction of a chemical or protein at one location on a protein or macromolecular complex (the allosteric site) influences the binding or function of the same or another chemical or protein at a topographically distinct site" [39]. Such a description provides a framework to understand the allosteric nature of GPCR oligomers. Hence, binding of the natural ligand (agonist) to one protomer of the complex is expected to modify, through allosteric communication between protomers, the binding of a second molecule by altering the conformation of the second protomer [39], giving rise to cooperative effects [40]. We therefore believe that $[\text{Pep}^6]\text{URP}$ is indeed working through such a mechanism involving UT homodimers. Supporting our hypothesis, binding experiments suggested the existence of two binding sites with varied affinity for UII in cultured rat astrocytes [23] and recombinant cells expressing human UT receptors [41].

Figure 6. Representative concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of URP or UII following a pre-treatment with $[\text{Pep}^6]\text{URP}$ (3.10^{-8} M).



Efficacy is expressed as a percentage of the amplitude of the contraction induced by KCl (40 mM). Each replicate (n) was conducted on tissue from at least 3 different animals. Data represent the mean \pm S.E.M.

NMR and docking experiments performed with P5U (a potent peptidic UT agonist) and urantide (a peptidic UT antagonist/biased agonist) revealed different orientation of their common Tyr residue [42, 43]. NMR studies driven in membrane-mimicking micelles showed a difference in the orientation of Tyr residue: g^- in agonists [17, 25, 44] *versus* $trans$ for antagonists [19, 43]. Urantide, which possesses a Tyr position in $trans$, has been shown to behave as a partial agonist in G_q activation [30]. In the present study, we showed that [Tic(7-OH)⁶], which conformation is restricted to g^+ acted also as a partial agonist, suggesting that a g^- conformation of the Tyr is necessary for complete activation of G_q .

Molecular recognition is determined by the structure and dynamics of both a protein and its ligand. The induced fit and conformational selection mechanisms are two models generally used to explain the transition of a GPCR from an unbound conformation to a bound conformation in complex with its ligand. In both models, agonist binding involves the formation and the disruption of intramolecular interactions between chemical substituents on the agonist and specific amino acids in the GPCR [45]. This process, occurring through kinetically distinct steps involving conformational intermediates, suggests that structurally different ligands will therefore disrupt distinct combinations of stabilizing intramolecular interactions leading ultimately to distinct signaling signature. Thus, the ability of [Pep⁶]URP to fully activate G_{12} but not G_q is probably linked to an augmentation of the length in *para* of the aromatic ring of this residue, creating steric hindrance that probably perturbs molecular microswitches involved in G_q but not G_{12} activation

Taken together, these observations indicate that Tyr⁶ represents a complex switch in URP since receptor-binding and agonism-defining determinants are structurally integrated. Strikingly, and in support of our proposed mechanism, similar observations, demonstrating the involvement of agonist switches during the AT1R activation, were reported. This study, apart from suggesting

an induced fit mode of activation, indicated that binding and activation of the AT1R by angiotensin II were not interrelated [46]. Finally, [Pep⁶]URP represents a new class of derivative that could reduce significantly both the efficacy and the potency of URP without altering the efficacy of hUII. Overall, our study highlights for the first time the crucial role of the Tyr residue of URP in the activation process of UT and suggests that modification at this position could open up new avenue in the design of allosteric modulators of the urotensinerpic system.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

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

References

- [1] S.A. Douglas, E.H. Ohlstein, Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease, *Trends in cardiovascular medicine* 10(6) (2000) 229-37.
- [2] S.A. Douglas, A.C. Sulpizio, V. Piercy, H.M. Sarau, R.S. Ames, N.V. Aiyar, E.H. Ohlstein, R.N. Willette, Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey, *British journal of pharmacology* 131(7) (2000) 1262-74.
- [3] R.S. Ames, H.M. Sarau, J.K. Chambers, R.N. Willette, N.V. Aiyar, A.M. Romanic, C.S. Loudon, J.J. Foley, C.F. Sauermelech, 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, S.A. Douglas, Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14, *Nature* 401(6750) (1999) 282-6.
- [4] H. Vaudry, J. Leprince, D. Chatenet, A. Fournier, D.G. Lambert, J.C. Le Mevel, E.H. Ohlstein, A. Schwertani, H. Tostivint, D. Vaudry, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*. XCII.

Urotensin II, urotensin II-related peptide, and their receptor: from structure to function, *Pharmacological reviews* 67(1) (2015) 214-58.

[5] I. Albanese, S.S. Daskalopoulou, B. Yu, Z. You, J. Genest, A. Alsheikh-Ali, A.G. Schwertani, The Urotensin II System and Carotid Atherosclerosis: A Role in Vascular Calcification, *Front Pharmacol* 7 (2016) 149.

[6] Y. Pehlivan, R. Dokuyucu, T. Demir, D.S. Kaplan, I. Koc, M. Orkmez, I.H. Turkbeyler, A.O. Ceribasi, E. Tutar, S. Taysi, B. Kisacik, A.M. Onat, Palosuran treatment effective as bosentan in the treatment model of pulmonary arterial hypertension, *Inflammation* 37(4) (2014) 1280-8.

[7] Y.A. Kim, D.G. Lee, K.Y. Yi, B.H. Lee, Y.S. Jung, Blockade of Urotensin II Receptor Prevents Vascular Dysfunction, *Biomol Ther (Seoul)* 24(5) (2016) 523-8.

[8] H. Krum, W. Kemp, Therapeutic potential of blockade of the urotensin II system in systemic hypertension, *Current hypertension reports* 9(1) (2007) 53-8.

[9] A.M. Watson, 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, T.J. Allen, Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes, *Diabetologia* 56(5) (2013) 1155-65.

[10] Z. You, J. Genest, Jr., P.O. Barrette, A. Hafiane, D.J. Behm, P. D'Orleans-Juste, A.G. Schwertani, Genetic and pharmacological manipulation of urotensin II ameliorate the metabolic and atherosclerosis sequelae in mice, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(8) (2012) 1809-16.

[11] Z. You, H. Al Kindi, A. Abdul-Karim, P.O. Barrette, A. Schwertani, Blocking the urotensin II receptor pathway ameliorates the metabolic syndrome and improves cardiac function in obese mice, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28(3) (2014) 1210-20.

[12] R. Patacchini, P. Santicioli, S. Giuliani, P. Grieco, E. Novellino, P. Rovero, C.A. Maggi, Urotensin II antagonist peptide in the rat aorta, *British journal of pharmacology* 140(7) (2003) 1155-8.

[13] D. Chatenet, 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, H. Vaudry, Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide, *Peptides* 25(10) (2004) 1819-30.

[14] S. Flohr, M. Kurz, E. Kostenis, A. Brkovich, A. Fournier, T. Klabunde, Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II, *Journal of medicinal chemistry* 45(9) (2002) 1799-805.

[15] P. Labarrere, D. Chatenet, J. Leprince, C. Marionneau, G. Loirand, M.C. Tonon, C. Dubessy, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, B. Calas, P. Pacaud, H. Vaudry, Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 18(2) (2003) 77-88.

[16] J. Leprince, 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, H. Vaudry, Structure-activity relationships of urotensin II and URP, *Peptides* 29(5) (2008) 658-73.

[17] A. Carotenuto, L. Auriemma, F. Merlino, A. Limatola, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, R. di Villa Bianca, D. Brancaccio, P. Santicioli, S. Meini, C.A. Maggi, E. Novellino, P. Grieco, New insight into the binding mode of peptides at urotensin-II receptor by Trp-constrained analogues of P5U and urotensin II, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 19(5) (2013) 293-300.

[18] A. Brkovic, A. Hattenberger, E. Kostenis, T. Klabunde, S. Flohr, M. Kurz, S. Bourgault, A. Fournier, Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306(3) (2003) 1200-9.

- [19] A. Carotenuto, L. Auriemma, F. Merlino, A.M. Yousif, D. Marasco, A. Limatola, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, P. Santicioli, S. Meini, C.A. Maggi, E. Novellino, P. Grieco, Lead optimization of P5U and urantide: discovery of novel potent ligands at the urotensin-II receptor, *Journal of medicinal chemistry* 57(14) (2014) 5965-74.
- [20] D. Chatenet, M. Letourneau, Q.T. Nguyen, N.D. Doan, J. Dupuis, A. Fournier, Discovery of new antagonists aimed at discriminating UII and URP-mediated biological activities: insight into UII and URP receptor activation, *British journal of pharmacology* 168(4) (2013) 807-21.
- [21] D. Chatenet, Q.T. Nguyen, M. Letourneau, J. Dupuis, A. Fournier, Urocontrin, a novel UT receptor ligand with a unique pharmacological profile, *Biochemical pharmacology* 83(5) (2012) 608-15.
- [22] N.D. Doan, T.T. Nguyen, M. Letourneau, K. Turcotte, A. Fournier, D. Chatenet, Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart, *British journal of pharmacology* 166(1) (2012) 243-57.
- [23] M. Jarry, M. Diallo, C. Lecointre, L. Desrues, T. Tokay, D. Chatenet, J. Leprince, O. Rossi, H. Vaudry, M.C. Tonon, L. Prezeau, H. Castel, P. Gandolfo, The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation, *The Biochemical journal* 428(1) (2010) 113-24.
- [24] H.C. Prosser, M.E. Forster, A.M. Richards, C.J. Pemberton, Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury, *Peptides* 29(5) (2008) 770-7.
- [25] D. Brancaccio, F. Merlino, A. Limatola, A.M. Yousif, I. Gomez-Monterrey, P. Campiglia, E. Novellino, P. Grieco, A. Carotenuto, An investigation into the origin of the biased agonism associated with the urotensin II receptor activation, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 21(5) (2015) 392-9.
- [26] J. Erchegyi, R. Cescato, C.R. Grace, B. Waser, V. Piccand, D. Hoyer, R. Riek, J.E. Rivier, J.C. Reubi, Novel, potent, and radio-iodinatable somatostatin receptor 1 (sst1) selective analogues, *Journal of medicinal chemistry* 52(9) (2009) 2733-46.
- [27] M. Kwon, B.L. Firestein, DNA transfection: calcium phosphate method, *Methods Mol Biol* 1018 (2013) 107-10.
- [28] B. Breton, E. Sauvageau, J. Zhou, H. Bonin, C. Le Gouill, M. Bouvier, Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer, *Biophys J* 99(12) (2010) 4037-46.
- [29] T. Kenakin, A. Christopoulos, Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact, *Nat Rev Drug Discov* 12(3) (2013) 205-16.
- [30] C. Brule, N. Perzo, J.E. Joubert, X. Sainsily, R. Leduc, H. Castel, L. Prezeau, Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28(12) (2014) 5148-62.
- [31] V. Sauzeau, E. Le Mellionec, J. Bertoglio, E. Scalbert, P. Pacaud, G. Loirand, Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase, *Circ Res* 88(11) (2001) 1102-4.
- [32] J. Dufour-Gallant, D. Chatenet, W.D. Lubell, De Novo Conception of Small Molecule Modulators Based on Endogenous Peptide Ligands: Pyrrolidiazepin-2-one gamma-Turn Mimics That Differentially Modulate Urotensin II Receptor-Mediated Vasoconstriction ex Vivo, *Journal of medicinal chemistry* 58(11) (2015) 4624-37.
- [33] F. Merlino, A.M. Yousif, E. Billard, J. Dufour-Gallant, S. Turcotte, P. Grieco, D. Chatenet, W.D. Lubell, Urotensin II((4-11)) Azasulfuryl Peptides: Synthesis and Biological Activity, *Journal of medicinal chemistry* 59(10) (2016) 4740-52.
- [34] M. Strack, E. Billard, D. Chatenet, W.D. Lubell, Urotensin core mimics that modulate the biological activity of urotensin-II related peptide but not urotensin-II, *Bioorg Med Chem Lett* (2017).

- [35] E. Haensele, N. Mele, M. Miljak, C.M. Read, D.C. Whitley, L. Banting, C. Delepee, J. Sopkova-de Oliveira Santos, A. Lepailleur, R. Bureau, J.W. Essex, T. Clark, Conformation and Dynamics of Human Urotensin II and Urotensin Related Peptide in Aqueous Solution, *J Chem Inf Model* (2017).
- [36] R. Guerrini, V. Camarda, E. Marzola, M. Arduin, G. Calo, M. Spagnol, A. Rizzi, S. Salvadori, D. Regoli, Structure-activity relationship study on human urotensin II, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 11(2) (2005) 85-90.
- [37] W.A. Kinney, H.R. Almond Jr, J. Qi, C.E. Smith, R.J. Santulli, L. de Garavilla, P. Andrade-Gordon, D.S. Cho, A.M. Everson, M.A. Feinstein, P.A. Leung, B.E. Maryanoff, Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model, *Angew Chem Int Ed Engl* 41(16) (2002) 2940-4.
- [38] E. Lescot, J. Sopkova-de Oliveira Santos, C. Dubessy, H. Oulyadi, A. Lesnard, H. Vaudry, R. Bureau, S. Rault, Definition of new pharmacophores for nonpeptide antagonists of human urotensin-II. Comparison with the 3D-structure of human urotensin-II and URP, *J Chem Inf Model* 47(2) (2007) 602-12.
- [39] T. Kenakin, L.J. Miller, Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery, *Pharmacological reviews* 62(2) (2010) 265-304.
- [40] L. Albizu, M.N. Balestre, C. Breton, J.P. Pin, M. Manning, B. Mouillac, C. Barberis, T. Durroux, Probing the existence of G protein-coupled receptor dimers by positive and negative ligand-dependent cooperative binding, *Mol Pharmacol* 70(5) (2006) 1783-91.
- [41] M. Clozel, P. Hess, C. Qiu, S.S. Ding, M. Rey, The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316(3) (2006) 1115-21.
- [42] P. Grieco, A. Carotenuto, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, L. Auriemma, M. Sala, C. Marcozzi, R. d'Emmanuele di Villa Bianca, D. Brancaccio, P. Rovero, P. Santicioli, S. Meini, C.A. Maggi, E. Novellino, New insight into the binding mode of peptide ligands at Urotensin-II receptor: structure-activity relationships study on PSU and urantide, *Journal of medicinal chemistry* 52(13) (2009) 3927-40.
- [43] D. Brancaccio, A. Limatola, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, E. Novellino, P. Grieco, A. Carotenuto, Urantide conformation and interaction with the urotensin-II receptor, *Archiv der Pharmazie* 347(3) (2014) 185-92.
- [44] A. Carotenuto, P. Grieco, P. Campiglia, E. Novellino, P. Rovero, Unraveling the active conformation of urotensin II, *Journal of medicinal chemistry* 47(7) (2004) 1652-61.
- [45] B.K. Kobilka, X. Deupi, Conformational complexity of G-protein-coupled receptors, *Trends Pharmacol Sci* 28(8) (2007) 397-406.
- [46] S. Miura, Y.H. Feng, A. Husain, S.S. Karnik, Role of aromaticity of agonist switches of angiotensin II in the activation of the AT1 receptor, *J Biol Chem* 274(11) (1999) 7103-10.

ii. Deuxième article – accepté dans J. Med. Chem. (révisions mineures)

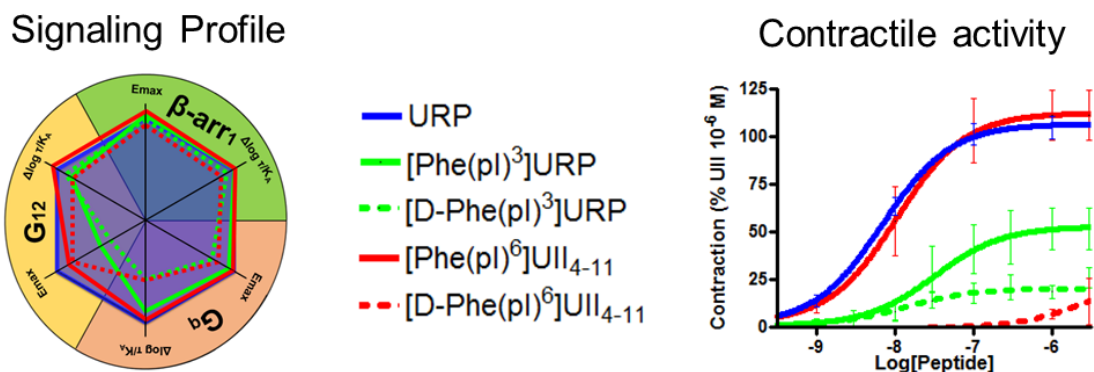
Discovery of new allosteric modulators of the urotensinergic system through substitution of the URP phenylalanine residue.

Découverte de nouveaux modulateurs allostériques du système urotensinergique par substitution du résidu phenylalanine de l'URP.

Etienne Billard¹, Terence E. Hébert², David Chatenet^{1,*}

¹INRS – Institut Armand-Frappier, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, Québec, Canada

²Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, Canada



Contributions :

Etienne Billard : Réalisation et conception des expériences, écriture du manuscrit.

Terence E. Hébert : Conception des expériences de BRET, révision du manuscrit.

David Chatenet : Conception des expériences, révision et correction du manuscrit et des figures.

Résumé :

Un faisceau de preuves attribue au système urotensinergique un rôle clé dans la fonction cardiovasculaire. Ces dernières années, il a été suggéré que les deux hormones à savoir l'Urotensine II (UII) et *Urotensin II-related peptide* (URP) sont sélectivement fonctionnelles, établissant ainsi différentes interactions avec leur récepteur UT malgré des structures hautement conservées. En particulier, il a été observé que la substitution du résidu phénylalanine conservé dans UII et URP par une cyclohexylalanine conduit à des composés présentant des profils pharmacologiques divergents. En supposant que le résidu Phe³ de l'URP est un élément clé de l'activation spécifique d'UT par l'URP, nous avons entrepris une étude de relation structure-activité dans laquelle ce résidu a été remplacé par des acides aminés non-naturels et contraints. Chaque composé a été évalué pour sa capacité à lier l'UT, à induire la contraction d'anneaux aortiques de rat et à activer les voies de signalisation Gq, G12 et β -arrestine 1. Conformément aux résultats précédents, nous avons montré qu'une modification identique à cette position dans l'URP et dans l'analogue tronqué mais équipotent d'UII UII₄₋₁₁ conduit à des activités radicalement différentes. De plus, au cours de nos études, nous avons identifié deux modulateurs d'UT structurellement différents, c'est-à-dire [D-Phe(pI)³]URP et [Bip³]URP, qui exercent des actions *probe-dependent* contre UII et URP.

Abstract :

Multiple evidence have highlighted the putative role of the urotensinergic system as a key-contributor to cardiovascular functions. In recent years, it has been suggested that the two hormones urotensin II (UII) and urotensin II-related peptide (URP) were functionally selective, therefore establishing different interactions with their cognate receptor despite highly conserved residues. In particular, it was observed that the substitution of the conserved phenylalanine residue in UII and URP by a cyclohexylalanine led to compounds with divergent pharmacologic profiles. Hypothesizing that the Phe³ residue of URP is a key-element to understand the specific activation of UT by URP, we undertook a structure-activity relationship study in which this particular residue was replaced by non-natural and constrained amino acids. Each compound was evaluated for its ability to bind UT, to induce rat aortic ring contraction and to activate G_q, G₁₂ and β arrestin₁ signalling pathways. In accordance with previous results, we showed that similar modification at this position in a URP and in a truncated but equipotent UII version UII₄₋₁₁ scaffolds lead to radically different activities. Moreover, along this structure-activity relationship study, we identified two structurally different UT modulator, *i.e.* [D-Phe(pI)³]URP and [Bip³]URP, which exert a probe-dependent action against UII and URP.

Keywords: urotensin II-related peptide, human urotensin II receptor, allosteric modulator, aortic ring bioassay, BRET-based biosensor, bias agonism.

Introduction

Discovered in 1999,(Ames, Sarau et al. 1999, Liu, Pong et al. 1999, Mori, Sugo et al. 1999, Nothacker, Wang et al. 1999) the urotensin II receptor (UT), which binds two peptidic hormones termed urotensin II (human UII, hUII, H-Glu-Thr-Pro-Asp-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH, **1**) and urotensin II related peptide (URP, Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH, **2**) is still regarded as a crucial regulator of physiological and pathophysiological processes of the cardiovascular system.(Vaudry, Leprince et al. 2015) Notably, the urotensinergic system is involved in the pathogenesis and progression of various diseases including metabolic disorders, congestive heart failure, atherosclerosis and both systemic and pulmonary hypertension.(Vaudry, Leprince et al. 2015) UII and URP are cyclic peptides that only differ by their extracyclic N-terminal residues, their bioactive cyclic core (-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-) being conserved throughout species. (Vaudry, Leprince et al. 2015) Accordingly, structure-activity relationships (SAR) studies have clearly showed that both the nature and orientation of these intracyclic residues were extremely important for UT binding and activation and that the N-terminal domain of UII was unimportant for UII function since UII₄₋₁₁ (**3**) retains a binding affinity and contractile activity similar to UII.(Flohr, Kurz et al. 2002, Labarrere, Chatenet et al. 2003, Chatenet, Dubessy et al. 2004, Leprince, Chatenet et al. 2008, Merlino, Di Maro et al. 2013) However, using dissociation kinetic experiment and virtual docking, we and others recently demonstrated the existence of an initial interaction between this N-terminal domain, and more particularly the glutamic and aspartic acids of UII, and UT that could lead to specific topological changes in UT conformation and therefore subtle changes in UT activation.(Chatenet, Letourneau et al. 2013, Brancaccio, Merlino et al. 2015) Accordingly, several studies have underlined differences in the biological activities of UII and URP including transcription initiation,(Doan, Nguyen et al. 2012) cell proliferation, (Jarry, Diallo et al. 2010) polyphosphoinositide turnover, (Jarry, Diallo et al.

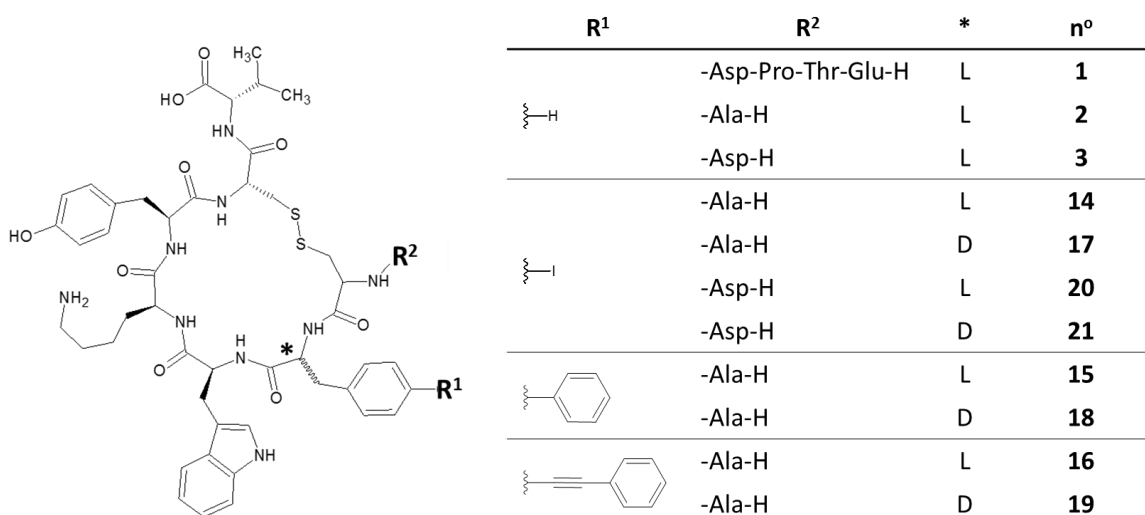
2010) ANP release,(Prosser, Forster et al. 2008) and myocardial contractile activities.(Prosser, Forster et al. 2008) Furthermore, in spontaneously hypertensive rats, expression of URP and UT, but not of UII, was up-regulated suggesting that UII and URP may have distinct pathophysiological roles, at least in hypertension.(Hirose, Takahashi et al. 2009) Also, in patients with acute heart failure, a significant raise in UII and URP plasma was observed but surprisingly, plasma URP concentration was almost 10 times higher than that of UII suggesting a distinct processing of their precursor in pathological conditions.(Jani, Narayan et al. 2013) Taken together, these observations suggest that UII and URP are functionally selective, and that altered UT signaling in response to UII or URP could therefore lead to distinct role for each peptide in the pathogenesis and progression of UT-associated diseases including atherosclerosis, pulmonary arterial hypertension, heart failure, and cancer.

Over the last few years, our team has specifically focused on the SAR of URP in order to pinpoint crucial differences between UII and URP molecular pharmacology. Among our achievements, we have identified, through the replacement of the intracyclic tryptophane residue of URP, two molecules that can reduce the contractile efficiency of UII without altering URP-associated contraction, therefore exerting a probe-dependent action through a non-competitive mechanism.(Chatenet, Nguyen et al. 2012, Chatenet, Letourneau et al. 2013) Termed Urocontrin (**4**, [Bip⁴]URP, Bip = 4,4'-biphenylalanine) and Urocontrin A (**5**, [Pep⁴]URP, Pep = (phenylethynyl)phenylalanine), these two derivatives represent the first allosteric modulators of the urotensinergic system. More recently, we demonstrated that the Tyr⁶ residue represents a complex switch in URP that integrate receptor-binding and agonism-defining determinants.(Billard, Letourneau et al. 2017) Notably, this study helped us identify [Pep⁶]URP (**6**) as a biased UT agonist exhibiting that is able to reduce URP-maximal contraction without reducing UII-mediated vasoconstriction. While several studies, including ours, have investigated

the role of the intracyclic Trp, Tyr, but also Lys residues, limited data are available regarding the specific role played by the phenylalanine residue and its physico-chemical characteristics in UT recognition and activation.(Leprince et al., 2008) Its replacement by an alanine, *i.e.* [Ala⁶]UII (**7**), [Ala³]URP (**8**) and [Ala⁶]UII₄₋₁₁ (**9**), or its D-enantiomer, *i.e.* [D-Phe⁶]UII (**10**) and [D-Phe³]URP (**11**), dramatically reduced the ability to induce aortic ring contraction.(Flohr et al., 2002, Chatenet et al., 2004) Using proteinogenic and non-proteinogenic residues, including cyclic amino acids, it was observed that the physico-chemical characteristics of the native phenylalanine was probably involved in the activation processes while its orientation was rather involved in UT recognition.(Chatenet et al., 2006) One of the most interesting and intriguing data of this SAR was the propensity of [Cha⁶]UII₄₋₁₁ (**12**) (Cha: cyclohexylalanine) to act as an antagonist while its corresponding URP analog, *i.e.* [Cha⁶]URP (**13**), behave as a weak and partial agonist.(Chatenet et al., 2006) Hence, depending on the N-terminal residue adjacent to the cyclic core, *i.e.* Asp vs Ala, the residue at position 6/3 in UII and URP seems to be differently involved in UT interaction and activation.

To further understand the role of the physico-chemical characteristics of this residue in UT binding and signaling, we substituted the Phe residue with para-inhered aromatics (Figure 1) in URP and to some extent in UII₄₋₁₁ and tested their ability to bind UT, to elicit rat aortic contraction and to activate the G_q, G₁₂, and β -arrestin 1 (β arr₁) signaling pathways. Our results suggest that Phe residue has a crucial involvement in the signaling texture of UT ligands, and that this position is also an access point to allosteric modulators.

Figure 1. Chemical structures of the different UII and URP analogs used in this study.



Results and Discussion

3.2. Binding Affinity of URP and related analogs.

For each peptide, a purity higher than 98% was observed by RP-HPLC analysis and their molecular weight, as monitored by MS analysis, was in accordance with theoretical values (Table 1).

Table 1. Amino acid sequences and analytical data of URP and its related analogs.

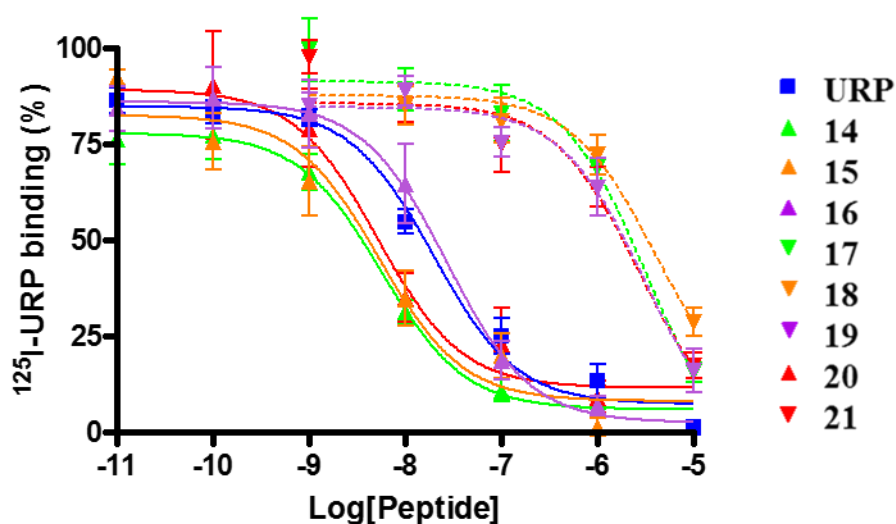
| <i>n</i> ^o | <i>Peptide</i> | <i>Sequence</i> | <i>Calculated</i> ^a | <i>Observed</i> ^b | <i>Purity</i> ^c |
|-----------------------|---|---|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 2 | URP | H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1017.43 | 1017.56 | 99 |
| 14 | [Phe(<i>pI</i>) ³]URP | H-Ala-[Cys- Phe(<i>pI</i>) -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1143.33 | 1143.52 | 98 |
| 15 | [Bip ³]URP | H-Ala-[Cys- Bip -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1093.46 | 1093.67 | 98 |
| 16 | [Pep ³]URP | H-Ala-[Cys- Pep -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1117.46 | 1117.67 | 99 |
| 17 | [D-Phe(<i>pI</i>) ³]URP | H-Ala-[Cys- Phe(<i>pI</i>) -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1143.33 | 1143.55 | 98 |
| 18 | [D-Bip ³]URP | H-Ala-[Cys- Bip -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1093.46 | 1093.90 | 99 |
| 19 | [D-Pep ³]URP | H-Ala-[Cys- Pep -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1117.46 | 1117.65 | 99 |
| 20 | [Phe(<i>pI</i>) ⁶]UII ₄₋₁₁ | H- Asp -[Cys- Phe(<i>pI</i>) -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1187.32 | 1187.34 | 99 |
| 21 | [D-Phe(<i>pI</i>) ⁶]UII ₄₋₁₁ | H- Asp -[Cys- Phe(<i>pI</i>) -Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH | 1187.32 | 1187.44 | 98 |

^aTheoretical monoisotopic molecular weight as calculated with ChemDraw Ultra 7.0.1. ^b*m/z* value assessed by MALDI-TOF-MS. D-Amino acids are indicated in bold italic letters. ^cPercentage of purity determined by high-performance liquid chromatography using the eluents A (H₂O with 0.1% TFA) and B (100% CH₃CN) with a gradient slope of 2% B/min, at a flow rate of 1 mL/min on a Vydac C₁₈ column. Detection at 229 nm.

As shown in Table 2, replacement of the Phe residue of URP with various hydrophobic L-substituents generated analogs (**14-16**) that retained a very good binding affinity toward UT (Figure 2). For instance, **16** (pIC₅₀ = 7.57 ± 0.19), which contains a bulkier side chain at position 3 compare to URP, binds UT with a potency that is similar to that observed for URP (pIC₅₀ = 7.71 ± 0.09). It therefore appears that no major sterical barrier in para of this residue is involved in its interaction with UT binding pocket. While aromaticity is crucial to retain a high binding affinity at hUT,(Chatenet, Dubessy et al. 2006) introduction of a biphenylalanine (**15**; pIC₅₀ = 8.27 ± 0.18, **P* ≤ 0.05) at position 3 in URP or *para*-iodo-phenylalanine in similar position in URP (**14**; pIC₅₀ = 8.25 ± 0.12, ***P* ≤ 0.01) and at position 6 in UII₄₋₁₁ (**20**; pIC₅₀ = 8.40 ± 0.22,

* $P \leq 0.05$) increased significantly the affinity of these analogs compared to **2**, therefore suggesting that the augmentation of the hydrophobic character in para is favorable for a good UT binding.

Figure 2. Representative displacement curves of various UII₄₋₁₁ and URP analogs using HEK-293-UT cells and ¹²⁵I-URP as a radioligand.



Data represent the mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments each performed in duplicates.

Conversely, introduction of a small polar hydroxyl group in para of the phenylalanine in UII, *i.e.* [Tyr⁶]UII, is known to produce a tenfold decrease in affinity.(Brkovic, Hattenberger et al. 2003) These results are therefore consistent with docking experiments, performed with the NMR structures of P5U (**22**) and Urantide, which revealed a close interaction of the Phe residue with two hydrophobic residues Val¹⁸⁴ and Met¹⁸⁸ of UT.(Grieco, Carotenuto et al. 2009) Hence, enhancing the hydrophobicity at the para position of the phenyl ring may improve these

interactions and thus UT binding. In contrast to their L-counterpart, analogs **17**, **18**, and **19** bind UT with a weak affinity ($pIC_{50} < 6$), which is in accordance with the very low binding of [D-Phe³]URP,(Chatenet, Dubessy et al. 2004) and [D-Phe⁶]UII.(Brkovic, Hattenberger et al. 2003) The loss of binding affinity may be the result of several non-exclusives parameters that includes 1) the perturbation of the peptide secondary structure making it unsuitable for proper binding and/or 2) the modification of the spatial arrangement of the phenyl-substituted side chain that prevents its proper interaction with intra- or intermolecular amino acids. Finally, it can be noticed that the presence of an aspartic acid adjacent to the disulfide bridge, like in **20** and **21**, has no particular impact on their binding propensity compared to **14** and **17**.

Table 2. Binding affinity and contractile activity of URP and related analogs.

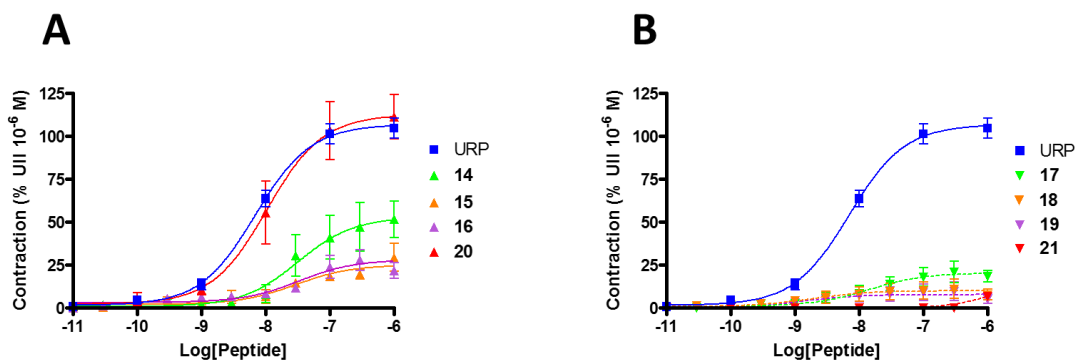
| n° | Binding | | Aortic ring contraction | | |
|-----------|---------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------|
| | n | pIC ₅₀ | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a |
| 2 | 5 | 7.71 ± 0.09 | 22 | 8.16 ± 0.08 | 107 ± 3 |
| 14 | 4 | 8.25 ± 0.12** | 3 | 7.50 ± 0.23** | 53 ± 5*** |
| 15 | 4 | 8.27 ± 0.18* | 3 | 7.54 ± 0.44* | 25 ± 3*** |
| 16 | 4 | 7.57 ± 0.19 | 4 | 7.49 ± 0.32** | 28 ± 3*** |
| 17 | 4 | < 6 | 3 | 7.86 ± 0.34 | 20 ± 2*** |
| 18 | 4 | < 6 | 3 | 8.72 ± 0.62 | 10 ± 2*** |
| 19 | 4 | < 6 | 3 | 8.87 ± 0.63 | 8 ± 1*** |
| 20 | 3 | 8.40 ± 0.22* | 3 | 7.98 ± 0.21 | 112 ± 6 |
| 21 | 4 | < 6 | 3 | < 5 | 49 % ^b |

^aThe maximum efficacy is expressed as a percentage of the KCl-induced contraction (40 mM) divided by the tissue-response induced by hUII (10⁻⁶ M). ^bMaximum efficacy at 10⁻⁵ M. All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using unpaired Student's t test, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, versus values obtained for URP. Each replicate (n) was conducted on tissue from different animal or on different cellular passage.

3.3. Vasocontractile action of URP and related analogs.

Each compound was then evaluated for its propensity to induce aortic ring contraction (Table 2). All L-substituted URP analogs (Figure 3A), *i.e.* **14** ($pEC_{50} = 7.50 \pm 0.23$, $**P \leq 0.01$), **15** ($pEC_{50} = 7.54 \pm 0.44$, $*P \leq 0.05$) and **16** ($pEC_{50} = 7.49 \pm 0.32$, $**P \leq 0.01$), were significantly less potent than their parent peptide ($pEC_{50} = 8.16 \pm 0.08$) but also appear to behave as partial agonists, their maximum efficacy ranging from 25 to 53% (Table 2). All D-substituted URP analogs exhibited a very low efficacy (between 10 and 20%) but a similar potency compared to URP (Figure 3B). While an increase in sterical hindrance at that position is not problematic for UT binding, this physico-chemical characteristic alters drastically their vasocontractile activity.

Figure 3. Representative concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of URP L-substituted analogs (A) or URP D-substituted analogs (B).



Efficacy is expressed as a percentage of the KCl-induced contraction (40 mM) divided by the tissue-response induced by hUII (10⁻⁶ M). Each replicate (n) was conducted on tissue from at least 3 different animals. Data represent the mean \pm S.E.M.

It is quite surprising that **17**, **18**, and **19**, which bind UT with low affinity, are potent partial agonist. Similar observation were previously reported and linked to interspecies variability since the human and rat UT isoform only share 75% of sequence homology.(Ames, Sarau et al. 1999) For instance, it was demonstrated that [Phe⁹]hUII, which also acted as a partial agonist in a rat aortic ring contraction assay, binds hUT with a greater affinity than rUT but triggers a better Ca²⁺ mobilization on rUT than on hUT.(Brkovic, Hattenberger et al. 2003) Also, [D-Phe⁶]hUII, which binds hUT with a better affinity than rUT, is 4 time more potent to activate Ca²⁺ mobilization on rUT than on hUT.(Brkovic, Hattenberger et al. 2003) Altogether, these results suggest that the binding site accommodating the phenylalanine residue of URP may differ in hUT and rUT. Accordingly, it was observed that the phenyl ring in UII was in a close relationships with Met¹⁸⁴ and Ile¹⁸⁸ of rUT while in hUT,(Ames, Sarau et al. 1999, Sainsily, 2013 #190) those residues are respectively replaced by a valine and a methionine.(Grieco, Carotenuto et al. 2009) To further support our assumption, it was reported that the low binding affinity for rUT compared to hUT of Palosuran (**4**), a potent UT antagonist, was correlated with a different interaction of its quinoline ring with the residue 184.(Kim, Li et al. 2010) Notably, the side chain of Met¹⁸⁴ in rUT has an unfavorable interaction with the quinoline ring of Palosuran, which is not present in hUT.(Kim, Li et al. 2010) Hence, these different analogs, whose residues at position 3 lie within the same environment as the quinoline ring of Palosuran, might have a beneficial interaction with rUT compare to hUT. Interestingly, **20** (pEC₅₀ = 7.98 ± 0.21, E_{max} = 112 ± 6) behave as a full agonist while its URP counterpart **14** acts as a partial agonist. The presence of an aspartic acid adjacent to the disulfide bridge, while having no impact on its binding profile, completely restore the contractile efficacy of **20** compared to its URP counterpart **14**. Once again, and as previously highlighted, (Chatenet, Letourneau et al. 2013, Brancaccio, Merlino et al. 2015, Billard, Letourneau et al. 2017) these results revealed the importance of the first residue adjacent to the

bridge in the biological activity of UT ligands. Notably, Asp⁴ in hUII is suspected to establish an ionic bond with Arg¹⁹³ of the extracellular loop 2 (EL2) of hUT.(Brancaccio, Merlino et al. 2015) Interestingly, the strict conservation of this residue in all UII isoform (Vaudry, Leprince et al. 2015)suggest that a similar interaction could still take place in UT isoforms. Hence, this complementary interaction (compared to URP) may locally modify the positioning of EL2 and TM4, which encompass the binding pocket of the phenylalanine residue, and facilitate UT activation. Finally, inversion of configuration of the para-substituted moiety at position 3 of **20**, *i.e.* **21**, dramatically reduced its contractile activity.

3.3. Vasocontractile antagonistic action against UII and URP

Considering that most of the peptides in this library retains a relatively low efficacy, we tested them as UT antagonists at a concentration of 10⁻⁶ M (with the exception of the full agonist **20** and the partial agonist **14**, whose efficacy was greater than 50%) (Table 3).

Table 3. Antagonistic contractile activities

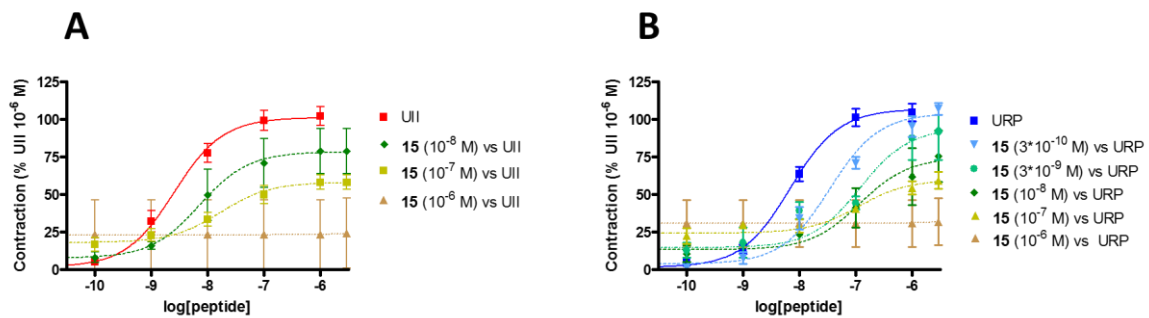
| n° | Aortic ring contraction hUII | | | Aortic ring contraction URP | | |
|--------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|
| | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a |
| No treatment | 19 | 8.59 ± 0.12 | 101 ± 4 | 22 | 8.16 ± 0.08 | 107 ± 3 |
| 14 | - | - | - | - | - | - |
| 15 | 3 | - ^c | 23 ± 23 ^b | 3 | - ^c | 31 ± 16 ^b |
| 16 | 4 | - ^c | 15 ± 6 ^b | 3 | - ^c | 25 ± 13 ^b |
| 17 | 5 | 8.49 ± 0.28 | 52 ± 4 ^{***} | 6 | 7.90 ± 0.23 | 100 ± 7 |
| 18 | 4 | 8.17 ± 0.25 | 95 ± 9 | 4 | 8.56 ± 0.38 | 91 ± 11 |
| 19 | 3 | 8.27 ± 0.09 | 100 ± 3 | 3 | 7.75 ± 0.12 | 104 ± 4 |
| 20 | - | - | - | - | - | - |
| 21 | 4 | 8.95 ± 0.10 | 95 ± 3 | 4 | 7.91 ± 0.23 | 107 ± 9 |

Aortic rings were pre-treated with different analogues at a concentration of 10⁻⁶ M for 30 minutes prior UII or URP treatment. ^aThe maximum efficacy is expressed as a percentage of the KCl-induced contraction (40 mM) divided by the tissue-response induced by hUII (10⁻⁶ M). ^bThese values reflect the basal contractile level induced by the pre-treatment of rat aortic rings with **15** or **16**. ^cNo subsequent contraction by hUII or URP is observed. All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using unpaired Student's t test, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, versus values obtained for UII or URP. Each replicate (n) was conducted on tissue from different animal.

Strikingly, **15** and **16**, which produce at 10⁻⁶M a small but non-negligible contraction, prevent UII- and URP-mediated contraction while their D-substituted counterpart, **18** and **19**, have no antagonistic activity. The antagonistic activity of **15** and **16** is consistent with their high UT binding affinity and relatively low contractile action. In order to gain a better insight into the antagonistic activity of **15**, which appears to bind UT with a higher affinity than **16**, we evaluated the impact of various concentrations on UII- and URP-mediated contraction (Table 4, Figure 4A and 4B). Figure 4 show that increasing the concentration of **15** induced a concentration-

dependent decrease of hUII and URP contractile efficiency. However, while a concentration-dependent decrease in potency is observed for UII, concentrations of 10^{-7} and 10^{-8} M of **15** led to a similar decrease in potency for URP, which prompted us to assess the activity of two lower concentrations of **15**, *i.e.* 3×10^{-9} and 3×10^{-10} M, on URP-mediated contraction only. Our results show that the observed decrease in potency noticed for URP only is saturable (Table 4), which is not compatible with classical competitive antagonism. Although their mechanism of action cannot be clearly assess, the ability of **15** and **16** to modulate the efficiency and potency of contraction induced by UII and URP may represent an allosteric mode of action or slow dissociation kinetics as previously reported.(Behm, Aiyar et al. 2010)

Figure 4. Representative concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of UII (A) or URP (B) following pre-treatments with various concentrations of 15.



Efficacy is expressed as a percentage of the KCl-induced contraction (40 mM) divided by the tissue-response induced by hUII (10^{-6} M). Each replicate (n) was conducted on tissue from at least 3 different animals. Data represent the mean \pm S.E.M.

Table 4. Antagonistic contractile activities of **15**

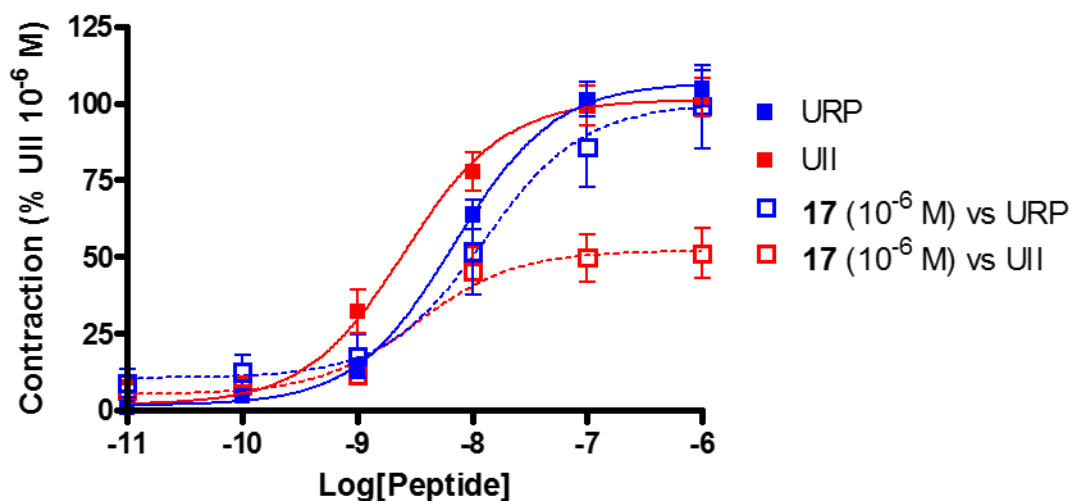
| n° | Aortic ring contraction hUII | | | Aortic ring contraction URP | | |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|
| | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a |
| No treatment | 19 | 8.59 ± 0.12 | 101 ± 4 | 22 | 8.16 ± 0.08 | 107 ± 3 |
| 15 (3*10 ⁻¹⁰ M) | - | - | - | 3 | 7.45 ± 0.11** | 104 ± 3 |
| 15 (3*10 ⁻⁹ M) | - | - | - | 3 | 6.92 ± 0.27*** | 94 ± 8 |
| 15 (10 ⁻⁸ M) | 4 | 8.14 ± 0.36 | 78 ± 7* | 3 | 6.93 ± 0.34*** | 75 ± 9** |
| 15 (10 ⁻⁷ M) | 4 | 7.78 ± 0.20** | 58 ± 2*** | 3 | 6.95 ± 0.20*** | 60 ± 3*** |
| 15 (10 ⁻⁶ M) | 3 | - ^c | 23 ± 23 ^b | 3 | - ^c | 31 ± 16 ^b |

Aortic rings were pre-treated with different analogues at a concentration of 10⁻⁶ M for 30 minutes prior UII or URP treatment. ^aThe maximum efficacy is expressed as a percentage of the KCl-induced contraction (40 mM) divided by the tissue-response induced by hUII (10⁻⁶ M). ^bThese values reflect the basal contractile level induced by the pre-treatment of rat aortic rings with **15**. ^cNo subsequent contraction by hUII or URP is observed. All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using unpaired Student's t test, **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, ****P* ≤ 0.001, versus values obtained for UII or URP. Each replicate (n) was conducted on tissue from different animals.

At the molecular level, and as mentioned earlier, the phenylalanine residue in UII and URP interacts with TM4 and EL2, two domains that are subject, in most class A GPCR, to major conformational changes upon ligand binding. Notably, and as reported for the angiotensin II type 1 receptors, (Unal, Jagannathan et al. 2010) after the initial interaction, the receptor will transition from an “open-state” to a “lid-state” in which the ligand is locked inside the binding pocket. (Nygard, Frimurer et al. 2009) Therefore, considering the proximity of the phenyl ring at position 3 with EL2 residues, and the loss of activity observed with para-substituted analogs, the antagonistic activity of **15** and **16** may be explained by the disruption/stabilization of crucial interaction within this portion that lock these ligands in a partially active state and block the access to UII and URP.

Interestingly, **17** was able to significantly reduce UII maximal effect ($E_{\max} = 52 \pm 4$) without affecting its potency or URP-mediated contraction, therefore acting as a probe-dependent antagonist (Table 3, Figure 5). This probe-dependent activity of **17**, which is not shared with the other D-analogs, is not easily explainable. However, and as recently reported with the probe-dependent antagonist [Pep⁶]URP, this probe-dependent effect, which suggests an allosteric mode of action, could involve UT oligomers (Billard et al., 2017). Interestingly, Palosuran, whose aromatic moiety also interacts with EL2, is able to abolish reductions in perfusion pressure (PP) induced by UII but has no influence on reductions in PP induced by URP in isolated rat hearts,(Prosser, Forster et al. 2008) therefore acting as a probe-dependent antagonist. These results suggest the importance of EL2 in the control of UT activation but also revealed that modification at position 3 in URP could open up new vista for the conception of potent antagonist and probe-dependent modulators.

Figure 5. Representative concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of URP or UII following a pre-treatment with 17 (10^{-6} M).



Efficacy is expressed as a percentage of the KCl-induced contraction (40 mM) divided by the tissue-response induced by hUII (10^{-6} M). Each replicate (n) was conducted on tissue from at least 3 different animals. Data represent the mean \pm S.E.M.

3.4. G_q , G_{12} and β_{arr1} activations.

Aortic contraction is a multi-causal event that involved several intracellular effectors. Considering the low contractile efficacy of URP compared to UII₄₋₁₁-substituted analogues, we hypothesized that the observed partial agonism could be the result of a signalling bias. Using BRET-based biosensor and a HEK-293 cell line stably expressing the human UT isoform (Table 5), we assessed the ability of each analog to activate G_q and G_{12} , two upstream effectors involved in UT-mediated aortic ring contraction, as well as β_{arr1} . (Segain, Rolli-Derkinderen et al. 2007, Brule, Perzo et al. 2014) Bias between G_q and G_{12} were calculated and referenced in Table 6.

Table 5. G-protein and β arr1 activation of URP and related analogs.

| n° | Gq activation | | | G ₁₂ activation | | | β arr1 activation | | |
|-----------|---------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------|
| | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a | n | pEC ₅₀ | E _{max} ^a |
| 2 | 6 | 8.44 ± 0.12 | 100 ± 3 | 12 | 7.04 ± 0.11 | 100 ± 4 | 1 3 | 6.84 ± 0.13 | 100 ± 5 |
| 14 | 5 | 7.97 ± 0.12* | 97 ± 4 | 10 | 7.32 ± 0.16 | 73 ± 4*** | 7 | 6.74 ± 0.19 | 101 ± 8 |
| 15 | 5 | 7.82 ± 0.10** | 91 ± 3 | 7 | 6.92 ± 0.25 | 80 ± 8* | 4 | 6.22 ± 0.27* | 76 ± 10* |
| 16 | 4 | 7.56 ± 0.10*** | 102 ± 4 | 6 | 6.83 ± 0.14 | 78 ± 4** | 4 | 6.12 ± 0.37* | 94 ± 17 |
| 17 | 5 | 7.27 ± 0.17*** | 87 ± 6 | 9 | 7.05 ± 0.15 | 68 ± 4 *** | 4 | 6.45 ± 0.27 | 99 ± 11 |
| 18 | 4 | 5.45 ± 0.12*** | 102 ± 11 | 6 | 6.18 ± 0.25** | 74 ± 9** | 4 | 5.94 ± 0.39* | 60 ± 13** |
| 19 | 4 | 6.21 ± 0.06*** | 101 ± 3 | 7 | 6.42 ± 0.24* | 72 ± 7** | 4 | 5.48 ± 0.53** | 36 ± 11** |
| 20 | 5 | 8.15 ± 0.13 | 100 ± 4 | 7 | 7.44 ± 0.17 | 94 ± 5 | 4 | 6.72 ± 0.28 | 104 ± 12 |
| 21 | 5 | 7.33 ± 0.08*** | 91 ± 3 | 7 | 6.91 ± 0.10 | 91 ± 4 | 4 | 6.46 ± 0.24 | 97 ± 10 |

^aThe maximum efficacy is expressed as a percentage of the activation induced by URP (10⁻⁵M). All values are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using unpaired Student's t test, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, versus values obtained for URP. Each replicate (n) was conducted on different cellular passage.

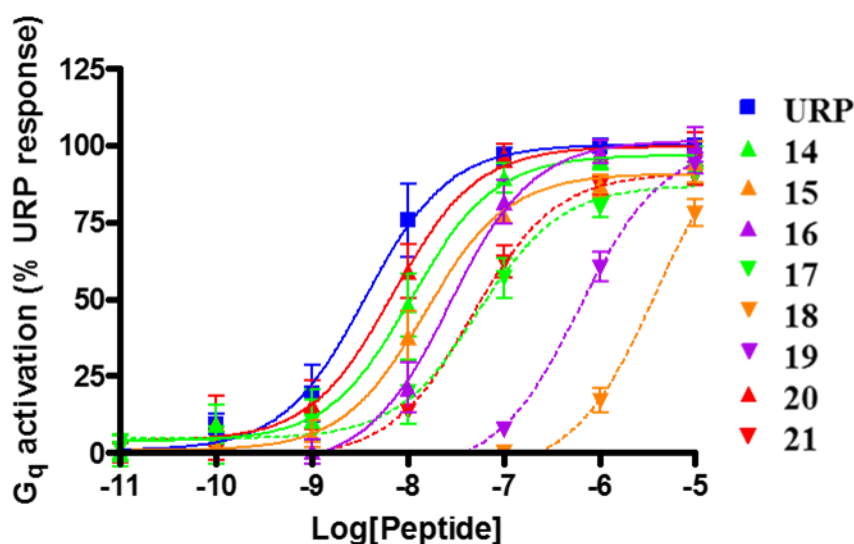
Table 6. Ligand bias of the different analogs

| n° | G ₁₂ /G _q | | G _q / β arr1 | | β arr1/G ₁₂ | |
|-----------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---|
| | $\Delta\Delta\log(\frac{\tau}{KA})^a$ | G ₁₂ bias ^b (G _q) ^c | $\Delta\Delta\log(\frac{\tau}{KA})^a$ | G _q bias ^b (β arr1) ^c | $\Delta\Delta\log(\frac{\tau}{KA})^a$ | β arr1 bias ^b (G ₁₂) ^c |
| 2 | 0.00 ± 0.06 | 1.0 (1.0) | 0.00±0.09 | 1.0 (1.0) | 0.00±0.09 | 1.0 (1.0) |
| 14 | -0.12 ± 0.06* | 0.8 (1.3) | -0.32 ± 0.09** | 0.5 (2.1) | 0.45 ± 0.09*** | 2.8 (0.4) |
| 15 | 0.15 ± 0.07 | 1.4 (0.7) | 0.45 ± 0.08*** | 2.8 (0.4) | -0.60 ± 0.09*** | 0.3 (3.9) |
| 16 | 0.24 ± 0.06** | 1.8 (0.6) | -0.03 ± 0.08 | 0.9 (1.1) | -0.22 ± 0.08* | 0.6 (1.6) |
| 17 | 0.89 ± 0.08*** | 7.8 (0.1) | -0.94 ± 0.09*** | 0.1 (8.6) | 0.04 ± 0.10 | 1.1 (0.9) |
| 18 | 1.70 ± 0.08*** | 50.0 (0.0) | -1.16 ± 0.17*** | 0.1 (14.4) | -0.54 ± 0.17* | 0.3 (3.5) |
| 19 | 1.08 ± 0.06*** | 12.1 (0.1) | -0.34 ± 0.11** | 0.5 (2.2) | -0.75 ± 0.10*** | 0.2 (5.6) |
| 20 | 0.22 ± 0.06** | 1.7 (0.6) | -0.10 ± 0.09 | 0.8 (1.2) | -0.13 ± 0.10 | 0.8 (1.3) |
| 21 | 0.64 ± 0.06*** | 4.3 (0.2) | -0.73 ± 0.07*** | 0.2 (5.3) | 0.09 ± 0.08 | 1.2 (0.8) |

^a $\Delta\Delta\log(\frac{\tau}{KA})$ is calculated using the Black-Leff operational model and URP was used as the reference (unbiased) ligand. ^bBias corresponding to $10^{\Delta\Delta\log(\frac{\tau}{KA})}$. ^cBias in favor of the pathway in denominator, corresponding to $1/10^{\Delta\Delta\log(\frac{\tau}{KA})}$.

All analogs behave as full agonists of the G_q pathway albeit with variable potency (Table 5, Figure 6). While all L-substituted analogs retain a similar or better affinity for UT than URP, it is interesting to observe that the only compound that behaves as a full agonist in the aortic ring contraction, *i.e.* **20**, is also the only one that can trigger G_q activation (pEC₅₀ = 8.15 ± 0.13) with a similar potency than URP (pEC₅₀ = 8.44 ± 0.12). All the others are significantly less potent such as **16** (pEC₅₀ = 7.56 ± 0.10, ***P ≤ 0.001) or **18** (pEC₅₀ = 5.40 ± 0.10, ***P ≤ 0.001). In accordance with their lower binding affinity, D-substituted analogues appeared even less potent than their L-related analogs (Table 5). In line with our previous observation, it can be observed that increasing the bulkiness in para of the phenyl ring at position 3 in a URP form may reduce receptor flexibility and consequently negatively alter G_q activation.

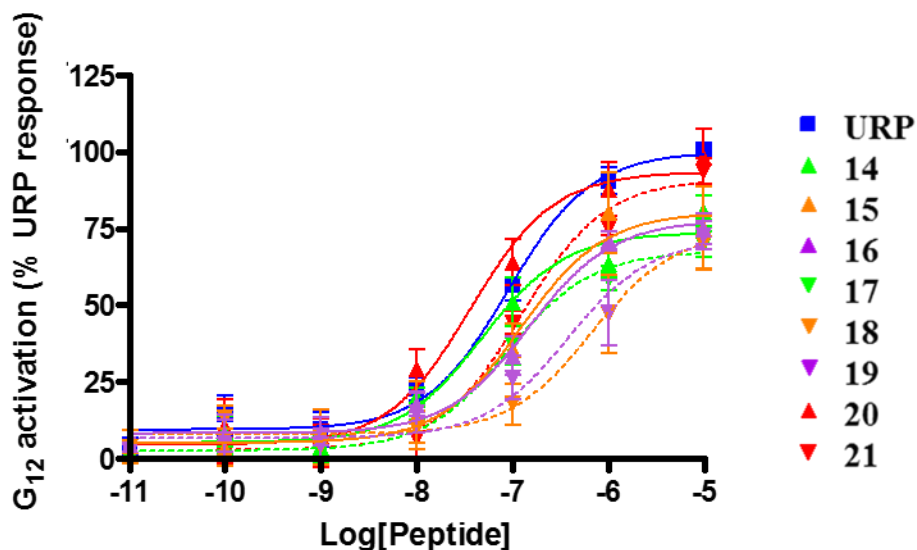
Figure 6. Agonistic properties of URP and related analogs on G_q activation using a BRET-based biosensor.



Efficacy is expressed as a percentage of the URP maximal response (10⁻⁵ M). Data represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments each performed in duplicates.

Regarding G₁₂ activation, except for **18** (pEC₅₀ = 6.18 ± 0.25) and **19** (pEC₅₀ = 6.42 ± 0.24), most of the analogs were able to activate G₁₂ (Figure 7, Table 5) with potencies similar to that of URP (pEC₅₀ = 7.04 ± 0.11). However, only UII₄₋₁₁-substituted analogs **20** (E_{max} = 94 ± 5) and **21** (E_{max} = 91 ± 4) retain a maximal efficacy similar to URP (E_{max} = 100 ± 4), with all URP-substituted analogs exhibiting a significantly lower efficacy such as **16** (E_{max} = 78 ± 4, **P ≤ 0.01) and **17** (E_{max} = 68 ± 4, ***P ≤ 0.001). Our results therefore show that substitution in para of phenyl ring in UII₄₋₁₁ and URP triggers a different pattern of recognition and activation for G₁₂, underlining the importance of the N-terminal domain/residues when designing ligands targeting specific UT conformation. However, considering that **14**, **15** and **16** retains similar potencies than URP increase of the size of the para substituent has no impact on G₁₂ activation potency. Interestingly, ratios of transduction coefficients of the two assayed pathways revealed that while L-analogues appears relatively unbiased (Table 6), all the D-substituted, and more specifically **17** (7.8, $\Delta\Delta\log\left(\frac{\tau}{KA}\right) = 0.89 \pm 0.08$, ***P ≤ 0.001) and **18** (50, $\Delta\Delta\log\left(\frac{\tau}{KA}\right) = 1.70 \pm 0.08$, ***P ≤ 0.001), are strongly biased toward G₁₂ activation compared to URP.

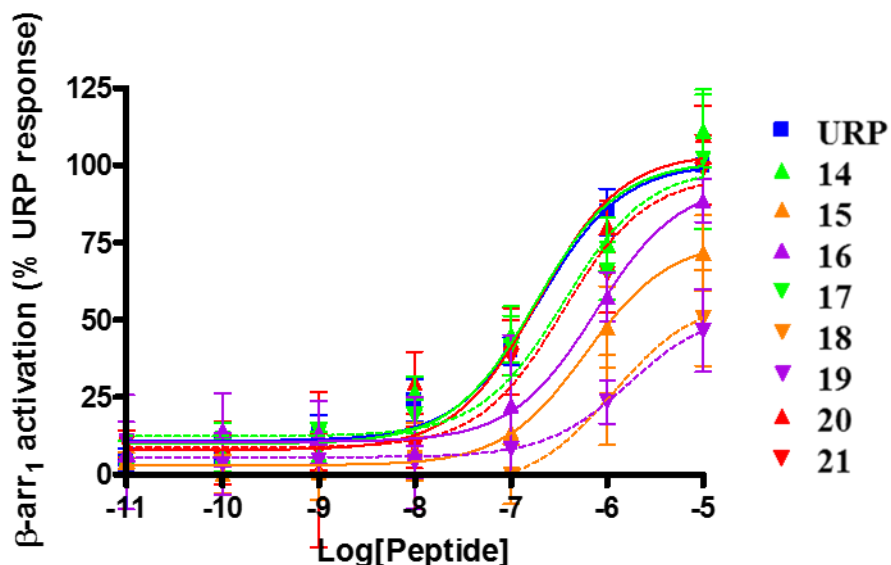
Figure 7. Agonistic properties of URP and related analogs on G₁₂ activation using a BRET-based biosensor.



Efficacy is expressed as a percentage of the URP maximal response (10⁻⁵ M). Data represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments each performed in duplicates.

Finally, evaluation of these different analogs on β_{arr1} (Figure 8, Table 5) revealed that they all behave as full (**14**, **16**, **17**, **20**, **21**) or partial (**15**, **18**, **19**) agonists. Also, since only the para-iodo substituted analogs **14** (pEC₅₀ = 6.74 ± 0.19) and **17** (pEC₅₀ = 6.45 ± 0.27) retain a potency similar to that of URP, while **15**, **16**, **18** and **19** are all significantly less potent than URP (Table 5 and Figure 8), augmentation of the sterical parameter but not the side chain orientation seems correlated with a decrease in β_{arr1} activation potency.

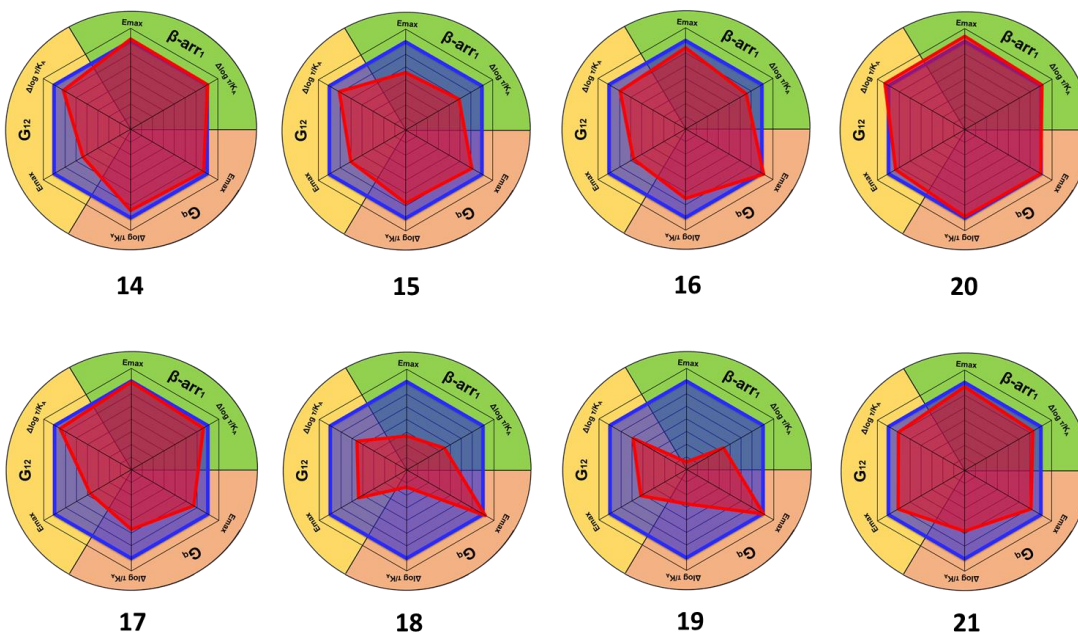
Figure 8. Agonistic properties of URP and related analogs on β arr1 activation using a BRET-based biosensor.



Efficacy is expressed as a percentage of the URP maximal response (10^{-5} M). Data represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments each performed in duplicates.

For global comparisons, transduction coefficients and maximal effects of the different analogs for the 3 different pathways were plotted in a radar graph (Figure 9). In those graphs, it can be seen that only **20** possesses an activation pattern similar to that of URP. Altogether, while L-analogs do not appear to induce a strong bias toward a particular pathways, inversion of configuration of the residue at the position 3 of URP strongly favor G_{12} and β arr1 activation over G_q stimulation (Table 5). For instance, bias analysis reveals that **17** and **21**, whose activation pattern differs only in their G_{12} maximal activation, appears unbiased between G_{12} and β arr1 (G_{12}/β arr1 ratio = 1.1 and 1.2, respectively) but biased toward G_{12} (G_{12}/G_q ratio = 7.8 and 4.3, respectively) and β arr1 (β arr1/ G_q ratio = 8.6 and 5.3, respectively) over G_q (Table 5). Altogether, the reduced ability of URP-based analogs modified at position 3 to stimulate G_{12} activation may reflect a reduced shift into UT active conformation following their binding.

Figure 9. Radar charts of the different functional activity $\Delta\log\left(\frac{\tau}{KA}\right)$ and E_{max} of the different analogs.



Activities of URP are presented in blue line while activities of analogs are presented in red line. For $\Delta\log\left(\frac{\tau}{KA}\right)$, each line represents a difference of 0.5. For E_{max} , each line represents a difference of 10.

Conclusion

The study highlights for the first time the crucial role of the Phe residue of URP in the activation process of UT and suggests that modification at this position could open up new avenue in the design of allosteric modulators of the urotensinergic system. This residue was, indeed, excluded from all previously described UT antagonist pharmacophore. (Maryanoff and Kinney 2010) In the present study, we notably demonstrate that $[D\text{-Phe}(pI)^3]$ URP (**17**) was able to significantly reduce U11 maximal effect without affecting URP-mediated contraction, while $[Bip^3]$ URP (**15**) presents at sub-nanomolar concentration a probe-dependent saturable competitive effect on URP only. The probe-dependent activity in the aortic ring contraction assay

suggests that these compounds act through lateral allostery, as recently hypothesized,(Billard, Iddir et al.) through UT homodimers. Also, we demonstrated the importance of the N-terminal domain of UII in UT activation. For instance, while [Phe(pI)³]URP (**14**) behave as a partial agonist in aortic contraction, its UII₄₋₁₁ counterpart [Phe(pI)⁶]UII₄₋₁₁ (**20**), with only differs by the presence of an aspartic acid at the N-terminus instead of an alanine, acted as a full agonist. Finally, this study and others, demonstrate the importance of evaluating UT antagonism against both endogenous ligands, *i.e.* UII and URP. We therefore believe that some UT ligands described in the literature have been mischaracterized since no investigation was performed against URP-mediated functions and that such missing information could shed some of the light regarding the failure of UT antagonists in preclinical studies.

Experimental section

Materials. The fluorenylmethyloxycarbamate- (Fmoc-) protected amino-acids, Fmoc-Val-Wang resin and (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) were purchased from Chem-Impex (Wood Dale, IL). Trifluoroacetic acid (TFA), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), diethyl ether, N,N-dimethylformamide (DMF), piperidine and dichloromethane (DCM) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON). Na¹²⁵I was purchased from Perkin-Elmer (Montreal, QC). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON).

Peptide Synthesis. Peptides were prepared by solid-phase peptide synthesis using a Fmoc protection strategy and a commercially available Fmoc-Val-Wang resin (0.62 meq/g). All reactions were conducted under a nitrogen atmosphere. Fmoc deprotection was achieved with 20% piperidine in DMF for 15 min. Washes were performed with DMF (2x), MeOH (2x) and DCM (2x). Couplings of the Fmoc-protected amino-acids (3-equivalent excess based on the original resin substitution) were mediated by BOP (3 eq) and N,N-diisopropylethylamine (DIEA; 6 eq) in DMF for approximately 1 h. Completion of the coupling and deprotection steps was monitored with the qualitative Kaiser test. The phenylacetylenyl side chain was introduced on Boc-[L/D-Phe(pI)⁶]URP peptidyl-resins using the Sonogashira cross-coupling reaction and a previously reported procedure.(Chatenet, Letourneau et al. 2013) Briefly, a solution of DMF/DCM (50/50) is added to the peptidyl-resin (1 eq) and the mixture was degassed in the reactor with nitrogen 15 min prior to the reaction. Then, phenylacetylene (3 eq), Bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (PdCl₂(PPh₃)₂; 0.1 eq), copper iodide (CuI; 0.1 eq), tricyclohexylphosphine (0.2 eq) and triethylamine (3 eq) were added into the reaction vessel and the reaction mixture was then agitated through nitrogen bubbling overnight at room temperature (RT). The resin was then washed with DMF (2x), 0.1 M diethyldithiocarbamate in DMF (2x, 5 min) in order to remove the excess of Pd-catalyst, DMF (2x), MeOH (2x), and DCM (2x). All peptides were cleaved from their solid support with concomitant side-chain deprotection by exposing the peptidyl-resin to a mixture of trifluoroacetic acid containing water (2.5%), 1,2-ethanedithiol (2.5%) and triisopropylsilane (1%) for 3 h at RT. The filtrate was evaporated and the crude peptide was precipitated with diethylether. In most cases, disulfide bridge formation was achieved through the iodine oxidation method as previously described (Chatenet, Folch et al. 2013). However, for alkyne-containing peptides, cyclization was induced by dissolving the crude peptide in an aqueous solution of acetonitrile (50/50; v/v) at a concentration of 1 mg/mL. Then,

the pH was raised to 8 with a diluted solution of ammonium hydroxide prior to the addition of potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$; 2 eq). The mixture was stirred for 3 h and the pH was then adjusted to 3.5 with acetic acid. Purification of peptides was achieved by RP-HPLC using a X-Terra-Prep MS[©] C₁₈ column and a linear gradient of 0-100% eluant B (50 % acetonitrile in 0.06% water) over 2 h. Peptide homogeneity was evaluated by analytical RP-HPLC (C₁₈ CSC-Kromasil column and a linear gradient of 0-60 % of ACN over 30 min) and MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE, Foster City, CA) in linear mode using α -cyanohydroxycinnamic acid as matrix. Fractions containing the desired products and exhibiting a purity above 95 % were pooled, lyophilized and stored at -20°C until use.

Aortic ring contraction experiments. Adult male Sprague-Dawley rats (Charles-Rivers, Saint-Constant, Qc, Canada) weighting 250–300 g were housed in cages under controlled illumination (12:12h 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-Institut Armand-Frappier*. As previously described,(Chatenet, Letourneau et al. 2013) 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-Henseleit buffer. Eighty microliter of a 2.5 M potassium chloride solution (40 mM final concentration) was used to evaluate the 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 ($3 \cdot 10^{-11}$ 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. Antagonistic activity was evaluated by exposing first the aortic ring to the peptide for 30 min, to ensure that the peptide reached equilibrium and that no agonistic effect is observed, (Rossowski, Cheng et al. 2002) and then adding cumulative concentration of hUII or URP (10^{-11} - $3 \cdot 10^{-6}$ 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 3-22 animals.

Radioligand Binding Assay. Synthetic URP was radiolabeled with $Na^{125}I$ using the previously reported chloramine T technique. (Chatenet, Dubessy et al. 2004) Iodinated ^{125}I -URP was purified on a C_{18} cartridge, collected and stored at $-20^{\circ}C$ until use. Competitive binding experiments were performed using a stable HEK-293-UT cell line stably expressing the human UT isoform. (Billard, Letourneau et al. 2017) Cells plated in 96-well plate at a density of 10,000 cells/well were incubated on ice and for 2 h with increasing concentration of various peptides (10^{-11} to 10^{-5} M) in the presence of ^{125}I -URP (0.05 nM). Non-specific binding was established by exposing cells to 10^{-5} M URP. Cells were washed twice with cold binding buffer then lysed with a solution of sodium hydroxide (1 M). Cell-bound radioactivity was quantified using a γ -counter. Results were expressed as a percentage of the specific binding of ^{125}I -URP obtained in the absence of competitive ligands.

G_q, G₁₂ and β-arrestin 1 activation assays. HEK-293-UT cells were grown in DMEM culture media supplemented with 10% foetal bovine serum and G418 (400 µg/mL). Passages were performed when cells reached 80% of confluency. First, a transfection mix (1 mL) was prepared in OptiMEM by adding 2.5 µg of a G_q-polycistronic, 0.5 µg of a G₁₂-polycistronic or 0.05 µg of a β-arrestin 1-polycistronic BRET biosensor supplemented with a sufficient amount of pBlue Script expression vector (in order to reach 7.5 µg of DNA) and 15 µL of TransIT reagent.(Breton, Sauvageau et al. 2010) After 30 min, this mixture was added to a premixed suspension of 1.5x10⁶ HEK-293-UT cells in DMEM culture media supplemented with 2.5% foetal bovine serum without antibiotics. Cells were then plated in 96-well plates at a density of 15,000 cells/well. Sixteen hour post-transfection, medium was replaced with DMEM supplemented with 5% FBS, penicillin-streptomycin (100 U/mL) and G418 (400 µg/mL) and cell growth was resumed for another 24 h. Cells were washed with 120 µL PBS solution supplemented with 0.1 % of glucose, and then incubated with 80 µL of this solution for 2 h at 37° C. Next, 10 µl of a 1/20 dilution (diluted before use) of coelenterazine 400A (stock at 1 mM in ethanol) in Krebs and 10 µl of the 10x appropriate concentration of peptide were added, and the luminescence was evaluated with 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 signals were monitored for 5 min after co-addition of coelenterazine 400A and ligands. 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 URP (10⁻⁵M).

Statistical analysis. Aortic contraction assays, binding experiments and G-protein activation 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 dose-response fits with variable slope and one-site competition functions were used to determine EC₅₀ and IC₅₀, respectively. Bias between G_q, G₁₂ and β arr₁ pathways was determined using the ratios of transduction coefficients.(Kenakin and Christopoulos 2013) Statistical comparisons were analyzed by the Student's t-test, and differences were considered significant where * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: david.chatenet@iaf.inrs.ca

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

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

Abbreviations

ACN, acetonitrile; Bip, biphenylalanine; Boc, tert-butoxycarbonyl; BOP, (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; Cha, cyclohexyl-alanine; DCM, dichloromethane; DIEA, N,N-diisopropylethylamine; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMF, dimethylformamide; FBS, foetal bovine serum; Fmoc, Fluorenylmethyloxycarbamate; GFP10, green fluorescent protein 10; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK-293 cells, Human Embryonic Kidney 293 cells; $K_3[Fe(CN)_6]$, potassium ferricyanide; MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight; NMR, nuclear magnetic resonance; $PdCl_2(PPh_3)_2$, Bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride; Pep, (phenylethynyl)-phenylalanine; Phe(pI), para-iodo-phenylalanine; PP, perfusion pressure; RlucII, *Renilla* luciferase II; RP-HPLC, Reverse phase-high performance liquid chromatography; SAR, structure-activity relationship; UII, Urotensin II; URP, Urotensin II-related peptide; UT, urotensin II receptors.

References

- 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**(6750): 282-286.
- Behm, D. J., N. V. Aiyar, A. R. Olzinski, J. J. McAtee, M. A. Hilfiker, J. W. Dodson, S. E. Dowdell, G. Z. Wang, K. B. Goodman, C. A. Sehon, M. R. Harpel, R. N. Willette, M. J. Neeb, C. A. Leach and S. A. Douglas (2010). "GSK1562590, a slowly dissociating urotensin-II receptor antagonist, exhibits prolonged pharmacodynamic activity ex vivo." *Br J Pharmacol* **161**(1): 207-228.
- Billard, É., M. Iddir, H. Nassour, L. Lee-Gosselin, M. Pujol de Molliens and D. Chatenet (2018). "New directions for urotensin II receptor ligands." *Peptide Science* **0**(0): 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*.

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**(5): 392-399.

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**(12): 4037-4046.

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**(3): 1200-1209.

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**(12): 5148-5162.

Chatenet, D., C. Dubessy, C. Boularan, 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**(24): 7234-7238.

Chatenet, D., C. Dubessy, J. Leprince, C. Boularan, 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**(10): 1819-1830.

Chatenet, D., B. Folch, D. Feytens, M. Letourneau, D. Tourwe, N. Doucet and A. Fournier (2013). "Development and pharmacological characterization of conformationally constrained urotensin II-related peptide agonists." *J Med Chem* **56**(23): 9612-9622.

Chatenet, D., M. Letourneau, Q. T. Nguyen, N. D. Doan, J. Dupuis and A. Fournier (2013). "Discovery of new antagonists aimed at discriminating U11 and URP-mediated biological activities: insight into U11 and URP receptor activation." *Br J Pharmacol* **168**(4): 807-821.

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**(5): 608-615.

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**(1): 243-257.

Flohr, S., M. Kurz, E. Kostenis, A. Brkovich, A. Fournier and T. Klabunde (2002). "Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II." *J Med Chem* **45**(9): 1799-1805.

Grieco, P., A. Carotenuto, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, L. Auriemma, M. Sala, C. Marcozzi, R. d'Emmanuele di Villa Bianca, D. Brancaccio, P. Rovero, P. Santicoli, S. Meini, C. A. Maggi and E. Novellino (2009). "New insight into the binding mode of peptide ligands at Urotensin-II receptor: structure-activity relationships study on P5U and urantide." *J Med Chem* **52**(13): 3927-3940.

Hirose, T., K. Takahashi, N. Mori, T. Nakayama, M. Kikuya, T. Ohkubo, M. Kohzaki, 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**(6): 1124-1129.

Jani, P. P., H. Narayan and L. L. Ng (2013). "The differential extraction and immunoluminometric assay of Urotensin II and Urotensin-related peptide in heart failure." *Peptides* **40**: 72-76.

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**(1): 113-124.

Kenakin, T. and A. Christopoulos (2013). "Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact." *Nat Rev Drug Discov* **12**(3): 205-216.

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**(9): 1594-1608.

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**(2): 77-88.

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**(5): 658-673.

Liu, Q., S. S. Pong, Z. Zeng, Q. Zhang, A. D. Howard, D. L. Williams, Jr., M. Davidoff, R. Wang, C. P. Austin, T. P. McDonald, C. Bai, S. R. George, J. F. Evans and C. T. Caskey (1999). "Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14." *Biochem Biophys Res Commun* **266**(1): 174-178.

Maryanoff, B. E. and W. A. Kinney (2010). "Urotensin-II receptor modulators as potential drugs." *J Med Chem* **53**(7): 2695-2708.

Merlino, F., S. Di Maro, A. Munaim Yousif, M. Caraglia and P. Grieco (2013). "Urotensin-II Ligands: An Overview from Peptide to Nonpeptide Structures." *J Amino Acids* **2013**: 979016.

Mori, M., T. Sugo, M. Abe, Y. Shimomura, M. Kurihara, C. Kitada, K. Kikuchi, Y. Shintani, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura and M. Fujino (1999). "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)." *Biochem Biophys Res Commun* **265**(1): 123-129.

Nothacker, H. P., Z. Wang, A. M. McNeill, Y. Saito, S. Merten, B. O'Dowd, S. P. Duckles and O. Civelli (1999). "Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction." *Nat Cell Biol* **1**(6): 383-385.

Nygaard, R., T. M. Frimurer, B. Holst, M. M. Rosenkilde and T. W. Schwartz (2009). "Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures." *Trends Pharmacol Sci* **30**(5): 249-259.

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**(5): 770-777.

Rossowski, W. J., B. L. Cheng, J. E. Taylor, R. Datta and D. H. Coy (2002). "Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* **438**(3): 159-170.

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**(2): 901-909.

Unal, H., R. Jagannathan, M. B. Bhat and S. S. Karnik (2010). "Ligand-specific conformation of extracellular loop-2 in the angiotensin II type 1 receptor." *J Biol Chem* **285**(21): 16341-16350.

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**(1): 214-258.

Troisième partie : Discussion

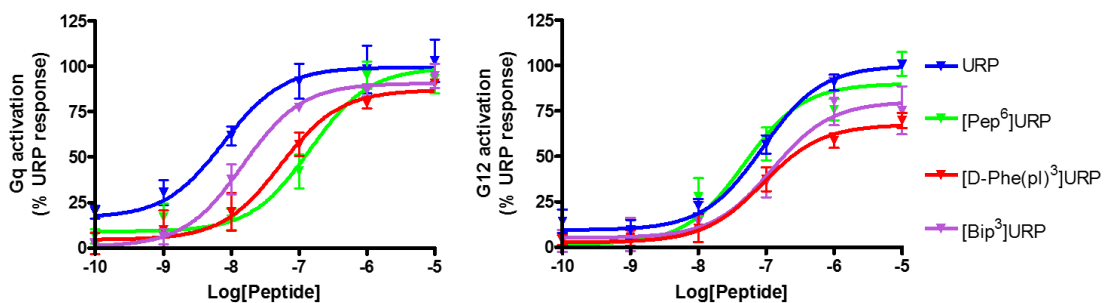
i. Préambule

Bien que possédant une portion cyclique commune, l'UII et l'URP, loin d'être redondant, ont démontré une sélectivité fonctionnelle au niveau de leur activation d'UT qui pourrait se refléter par une implication distincte de ces deux peptides dans des conditions pathologiques. Au cours de ces dernières années, notre laboratoire s'est concentré sur l'étude des facteurs physico-chimiques et/ou structuraux présents dans UII et URP pouvant moduler la signalisation intracellulaire associée à l'activation d'UT. Des travaux antérieurs, concernant la substitution du résidu Trp⁴ de l'URP, ont conduit à l'identification et la caractérisation de l'UC et de l'UCA, deux ligands capables de discriminer les activités contractiles de l'UII de l'URP *ex vivo* mais également *in vivo* (Chatenet, Nguyen et al. 2012, Chatenet, Letourneau et al. 2013). En appliquant la même stratégie que pour le Trp⁴ (substitution par une phénylalanine para-substituée), nous avons réalisé des études de RSA au niveau des deux autres résidus aromatiques intracycliques Phe³ et Tyr⁶ de l'URP avec comme objectif de mettre en évidence des paramètres physico-chimiques et/ou structuraux impliqués dans l'activation spécifique de certaines voies de signalisation.

Nous avons ainsi montré que les positions 3 et 6 permettaient d'accéder à des ligands biaisés défavorisant l'activation de G_q, et avons identifié trois ligands [D-Phe(pI)³]URP, [Bip³]URP et [Pep⁶]URP qui se sont révélés capables de discriminer les activités d'UII et d'URP. Cependant, chacun de ces ligands possède un profil particulier. [Pep⁶]URP et [D-Phe(pI)³]URP, bien qu'étant tous deux des agonistes biaisés en faveur de G₁₂ par rapport à G_q, agissent comme

des faibles agonistes pour G_q . En revanche, alors que $[\text{Pep}^6]\text{URP}$ est un agoniste complet pour G_{12} , le composé $[\text{D-Phe}(\text{pI})^3]\text{URP}$ présente, quant à lui, une activation partielle de cette même voie. Ces deux ligands ont également un profil de contraction radicalement différents : d'une part, $[\text{Pep}^6]\text{URP}$ est un agoniste faible mais complet alors que $[\text{D-Phe}(\text{pI})^3]\text{URP}$ est un agoniste puissant mais partiel ($E_{\text{max}} = 20 \pm 2 \%$). D'autre part, utilisé comme antagoniste à une concentration ne provoquant pas de contraction, $[\text{Pep}^6]\text{URP}$ est capable de réduire la puissance contractile d'UII sans altérer son efficacité alors qu'il peut diminuer de manière significative la puissance et l'efficacité de l'URP. Pour sa part, $[\text{D-Phe}(\text{pI})^3]$ provoque une réduction de l'efficacité de contraction de l'UII sans affecter l'URP. Pour finir, $[\text{Pep}^6]\text{URP}$ possède une affinité semblable à URP alors que $[\text{D-Phe}(\text{pI})^3]\text{URP}$ possède une très faible affinité. $[\text{Bip}^3]\text{URP}$, quant à lui, n'est pas biaisé pour les voies étudiées mais ce dernier active globalement moins chacune des voies testées. Liant UT à haute affinité, il semble agir comme un antagoniste non-compétitif et il peut entraîner des effets *probe-dependent* au niveau des réponses contractiles de l'UII et de l'URP. Les courbes d'activation de G_q et G_{12} sont reprises dans la figure ci-dessous (Figure 17).

Figure 17 : Activation de G_q et G_{12} des modulateurs allostériques décrits.



L'ensemble de nos résultats nous permet de tirer plusieurs observations. D'une part la modulation d'une voie de signalisation particulière ne semble pas être sous le contrôle d'un seul résidu puisque des modifications introduites à différentes positions dans la séquence de l'URP peuvent conduire à un même biais. D'autre part, la modification à une position n'a pas seulement un impact « discret » sur la sélection d'une protéine G (G_{12} par rapport à G_q), mais un impact global sur l'interaction d'UT avec potentiellement tous ces partenaires (au moins les protéines G et les β -arrestines). Pour finir, nous avons mis en évidence un lien entre l'activité agoniste contractile différente de l'URP et sa signalisation G_q/G_{12} altérée sur la lignée rénale embryonnaire humaine HEK293-UT.

Dans la suite de ce document, nous remettrons nos résultats publiés mais également ceux récemment obtenus dans une perspective plus globale. Nous proposerons alors la synthèse et l'évaluation de nouveaux composés. Nous discuterons enfin des moyens à mettre en œuvre pour réduire l'inconnue concernant le biais inter-espèce.

ii. Impact conformationnel du résidu Tyr⁶ de l'URP

Préalablement à nos résultats, et tel que mentionné dans l'introduction, Carotenuto et al. ont posé comme hypothèse que la conformation du résidu tyrosine dans l'UII₄₋₁₁ pourrait avoir un impact crucial pour expliquer le passage d'un agoniste vers un antagoniste (Carotenuto, Auriemma et al. 2014). Ils ont notamment décrit qu'une conformation g^- semblait définir un caractère agoniste en contraction, alors que la conformation trans était un élément commun pour les antagonistes étudiés.

Au cours de notre étude, nous avons montré que si la conformation du groupement Tyr⁶ de l'URP semblait avoir un impact sur le profil contractile, cela pouvait provenir d'une capacité altérée à activer la protéine G_q. En effet, si l'on considère que les activités agonistes partielles observées pour cette protéine suite à l'activation de UT par l'urantide (Brule, Perzo et al. 2014), dont la chaîne latérale de la tyrosine adopte majoritairement une conformation trans (Brancaccio, Limatola et al. 2014), ou encore [Tic(OH)⁶]URP, dont la chaîne Tic(OH) est principalement contrainte en conformation g⁺, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'orientation g⁻ du résidu tyrosine de l'UII et de l'URP pourrait être privilégiée lors de l'activation de G_q.

Afin d'étayer cette proposition, nous allons affiner notre discussion initiale à la lumière de nos plus récents résultats. En collaboration avec l'équipe du Pr. Grieco de l'université de Naples, nous avons réalisé l'évaluation pharmacologique d'une librairie de dérivés mono-N-Méthylés de l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁. Ces composés ont été préparés sur phase solide selon un protocole présenté dans la littérature (Biron, Chatterjee et al. 2006), et leur activité a été évalué en utilisant les méthodes présentées dans ce manuscrit. Dans le tableau ci-dessous vous sont présenté les affinités de liaison, les activités contractiles et les puissances d'activation de G_q des dérivés N-Me-Tyr^{6/9} et N-Me-Cys^{7/10} de l'UII, de l'UII₄₋₁₁ et de l'URP (données non-publiées, tableau 2).

Tableau 2 : Activités biologiques des N-Me-Tyr et N-Me-Cys adjacents.

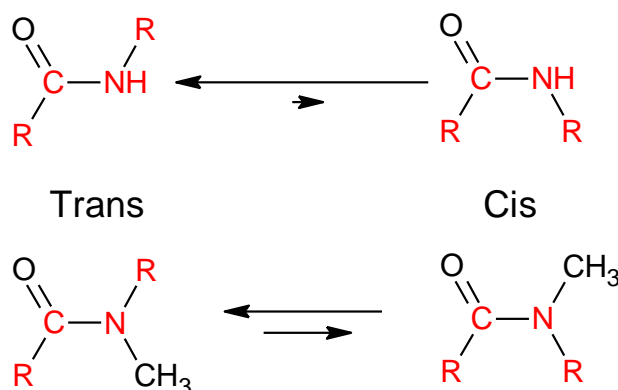
| Peptide | Affinité | Contraction aortique | | Activation de Gq |
|--|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | pK _i ^a | pEC ₅₀ ^b | E _{max} ^c | pEC ₅₀ ^b |
| UII | 8.11 ± 0.07 | 8.52 ± 0.11 | 102 ± 4 | 8.52 ± 0.09 |
| URP | 8.20 ± 0.12 | 8.11 ± 0.06 | 116 ± 4 | 8.57 ± 0.08 |
| UII ₄₋₁₁ | 8.34 ± 0.04 | 8.28 ± 0.12 | 100 ± 4 | 8.73 ± 0.14 |
| [N-Me-Tyr ⁹]UII | 5.67 ± 0.48*** | 71% @ 10 μM | | Non déterminé |
| [N-Me-Tyr ⁶]URP | 5.27 ± 0.84*** | 16% @ 10 μM | | Non déterminé |
| [N-Me-Tyr ⁹]UII ₄₋₁₁ | < 5 | 44% @ 10 μM | | Non déterminé |
| [N-Me-Cys ¹⁰]UII | 7.64 ± 0.15* | 7.61 ± 0.10** | 105 ± 3 | 8.57 ± 0.05 |
| [N-Me-Cys ⁷]URP | 8.45 ± 0.15 | 8.02 ± 0.49 | 44 ± 6*** | 8.28 ± 0.10 |
| [N-Me-Cys ¹⁰]UII ₄₋₁₁ | 8.28 ± 0.12 | 8.31 ± 0.08 | 95 ± 5 | 8.33 ± 0.15 |
| [Tic(OH) ⁶]URP | 6.11±0.11** | 6.53±0.20*** | 52±5*** | 7.00±0.24** |

^apK_i: -logK_i; ^bpEC₅₀: -log EC₅₀; ^cl'efficacité maximale est exprimée en tant que pourcentage de la contraction induite par du KCl (40 mM) divisée par la réponse du tissu à l'UII. Les tests statistiques sont réalisés en utilisant un test de Student, par rapport aux valeurs obtenues pour les peptides de références dont sont issus les N-Méthylations.

La N-méthylation du résidu Tyr entraîne une perte majeure d'activité et d'affinité, et ce dans chacun des isoformes. Or, dans l'URP, différentes études RMN ont souligné le rôle crucial joué par le proton amine de Tyr⁶ : l'établissement d'une liaison hydrogène avec le carbonyle de Phe³ permet le repliement en β-turn de la portion intracyclique (Brancaccio, Merlino et al. 2015), alors que l'établissement d'une liaison hydrogène avec le carbonyle de Trp⁴ permet le repliement en γ-turn (Chatenet, Dubessy et al. 2004). En plus de supprimer le caractère donneur de liaison hydrogène, on peut s'attendre à ce que la N-Méthylation entraîne une gêne stérique avec les carbonyles précédemment mentionnés. La N-Méthylation est également reconnue pour favoriser

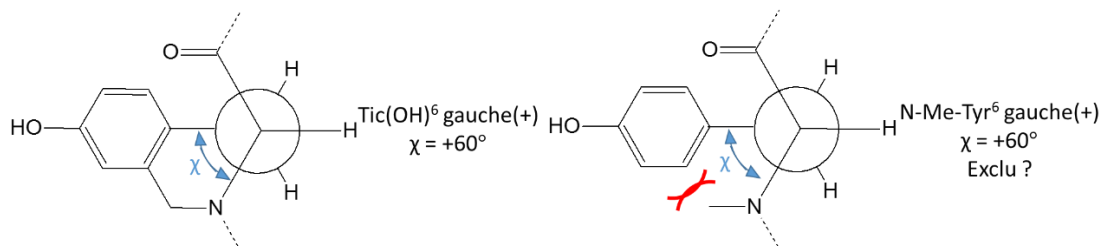
la conformation cis de l'amide du lien peptidique contrairement à la conformation trans habituellement rencontrée (Figure 18), (Farahani, Honarparvar et al. 2014) : on s'attend donc à voir une déstabilisation de la conformation de l'amide entre Lys⁵ et N-Me-Tyr⁶ par rapport à celle de l'URP. Ainsi, l'ensemble de ces facteurs indiquent que le profil pharmacologique de [N-Me-Tyr⁶]URP semble être lié à la disruption de la structure secondaire.

Figure 18 : Équilibre cis-trans. Alors que la conformation trans de l'amide est privilégiée dans la liaison peptidique (haut de l'image), la N-méthylation tend à favoriser la conformation cis (bas de l'image).



Toutefois, on notera que la N-méthylation du résidu Tyr conduit à une plus grande perte d'activité contractile comparé au dérivé [Tic(OH)⁶]URP (Tableau 2). Ainsi, alors que les observations faites pour [N-Me-Tyr⁶]URP sont également valables pour [Tic(OH)⁶]URP, la contrainte conformationnelle de ce dernier semble restaurer une certaine capacité à interagir avec UT par rapport au premier. En effet, alors que la chaîne latérale du Tic(OH) est principalement contrainte en g⁺, nous nous attendons à ce que la N-méthylation défavorise une telle conformation en raison d'une gêne stérique (Figure 19). Ces données suggèrent à nouveau l'importance de la conformation de la Tyrosine dans l'activité des ligands.

Figure 19 : Comparaison des conformations potentielles du résidu Tic(OH)⁶ et N-Me-Tyr⁶.
Tic(OH) : 7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline.



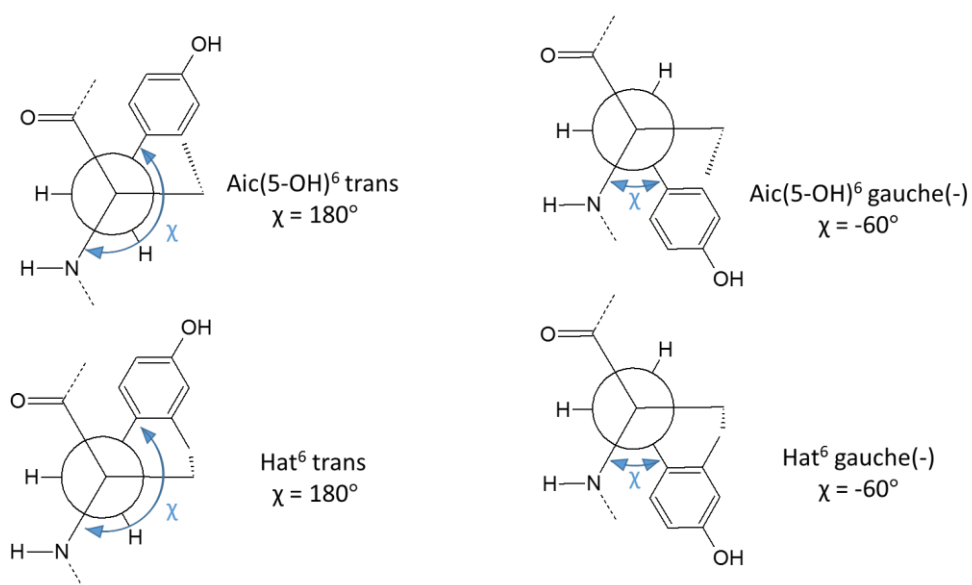
La N-méthylation du résidu Cys adjacent à la tyrosine a conduit à des résultats beaucoup plus variables selon les peptides. L'affinité conservée montre que l'hydrogène de l'amide dans ce résidu ne semble pas engagé dans une quelconque liaison intramoléculaire cruciale pour la stabilisation du peptide dans aucun des isoformes (Tableau 2). En revanche, la N-méthylation du résidu Cys de l'URP mais pas de l'UII ni de l'UII₄₁₁ entraîne une perte d'efficacité de contraction (E_{\max} [N-Me-Cys⁷]URP = 44 ± 6 ; E_{\max} [N-Me-Cys¹⁰]UII = 105 ± 3). En considérant que cette modification puisse avoir un impact sur le positionnement de la chaîne latérale adjacente, le groupement N-Méthyle pouvant hypothétiquement repousser la chaîne latérale de Tyr⁶ par gêne stérique, ou au contraire l'attirer par contact hydrophobe, cette modification suggère que la chaîne latérale de Tyr⁶ présente des exigences conformationnelles spécifiques à l'URP.

L'hypothèse proposée dans l'article s'appuyait sur les structures RMN de dérivés de l'UII₄₋₁₁ : à l'instar de ce dernier la conformation du résidu Tyr⁶ de l'URP en g⁻ semblait conduire à une activité agoniste, alors que la conformation trans semblait conduire à une activité antagoniste. Il est utile de rappeler que le composé [Tyr(mI)⁶]URP agit comme un agoniste faible (Chatenet, Dubessy et al. 2004), alors que son paralogue [Tyr(mI)⁹]UII₄₋₁₁ est un

superagoniste (Labarrere, Chatenet et al. 2003). Ainsi, à la lumière de ces nouveaux résultats, nous proposons que les exigences conformationnelles du résidu Tyr⁶ de l'URP sont différentes de celles de l'UII et de l'UII₄₋₁₁.

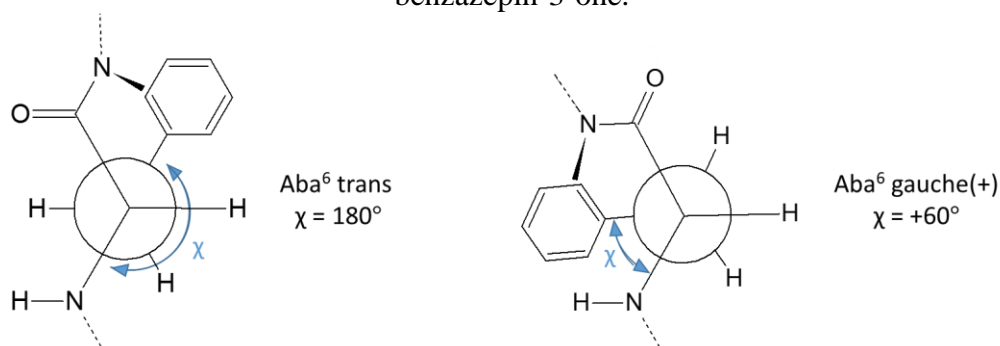
En regard de l'activité de [Pep⁶]URP, l'exploration systématique de cette position par des sondes conformationnelles pourrait représenter une voie prometteuse dans la conception de ligands biaisés et/ou de modulateurs allostériques. Quelques analogues ont été synthétisés et évalués dans le passé (Batuwangala, Camarda et al. 2009). [Tic(OH)⁹]UII₄₋₁₁ est un agoniste calcique très faible, toutefois ce comportement, comme nous l'avons mentionné, peut être relié à une perte d'affinité telle que celle mesurée pour les ligands N-Me-Tyr et le dérivé [Tic(OH)⁶]URP. Les résidus [Aic⁹]UII₄₋₁₁ et [Hat⁹]UII₄₋₁₁ ont également été caractérisés, et ont été déclarés peu attractifs considérant leur absence d'activité calcique. Or, en lumière de l'information exposée dans le développement précédant, nous sommes confiants dans le fait que ces analogues puissent au contraire fournir des renseignements cruciaux à condition d'être plus amplement caractérisés, car ils pourraient agir en tant que ligands biaisés et/ou antagonistes en accord avec les hypothèses avancées. En effet, ces résidus sont contraints *via* la substitution de leur carbone α . On ne s'attend donc pas à voir la perte d'affinité causée par la substitution de l'amine, dont la suppression du proton lui ôte son caractère donneur de liaison hydrogène. Pour ces ligands, la chaîne latérale ne peut adopter que les configurations g^- et $trans$ uniquement (Figure 20), ce qui nous permettrait de comprendre l'impact que la conformation g^+ pourrait avoir dans l'activité.

Figure 20 : Conformations permises aux résidus Aic(5-OH) et Hat. Aic(5-OH) : acide 2-amino-5-hydroxy-indan-2-carboxylique, Hat : acide 2-amino-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene-2-carboxylique.



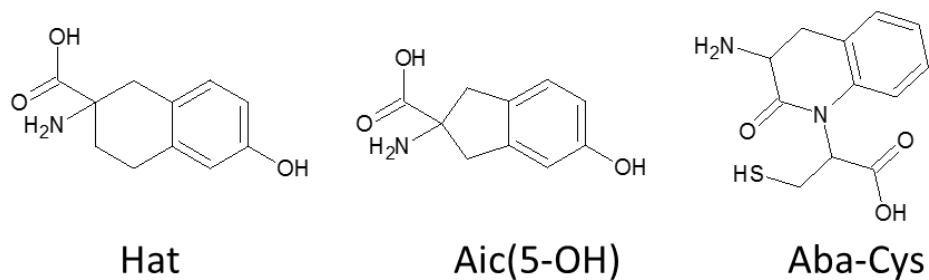
Enfin, la N-méthylation du résidu Cys situé du côté C-terminal n'a conduit à aucune perte d'affinité que ce soit dans l'UII, l'UII₄₋₁₁ ou l'URP, ce qui indique que le proton amide peut être remplacé et ainsi servir de point d'ancrage pour contraindre le résidu Tyr, en introduisant un résidu de type Aba (Figure 21), pour lequel la chaîne latérale ne peut adopter que les conformation trans et g⁺.

Figure 21 : Conformations permises du résidu Aba. Aba : 4-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-benzazepin-3-one.



Les résidus Aic et Hat sont commercialement disponibles. En revanche le résidu Aba-Cys devra être synthétisé d'après un protocole présenté dans la littérature (Van Rompaey, Van den Eynde et al. 2003). Chacune de ces modifications (Figure 22) nous permettra d'explorer l'espace conformationnel autour de cette position et définir les exigences pour chacun des peptides UII, URP et UII₄₋₁₁.

Figure 22 : Substitutions proposées du résidu Tyr. Acide 2-amino-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene-2-carboxylique (Hat), acide 2-amino-5-hydroxy-indan-2-carboxylique (Aic(5-OH)) et Cys-Aba (Aba = 4-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-benzazepin-3-one)



iii. Comportement du résidu Phe³ de l'URP

Comme précédemment présenté, le résidu phénylalanine a reçu très peu d'attention au cours des quinze dernières années. Les premières RSA ont notamment démontré que [Ala⁶]UII était capable d'induire une mobilisation calcique avec une puissance comparable à l'UII (Flohr, Kurz et al. 2002). Ce résidu fut donc initialement exclu du pharmacophore initial (Flohr, Kurz et al. 2002) mais également de tous les pharmacophores ultérieurs (Maryanoff, Kinney, 2010). Pourtant la modification de ce résidu par une alanine, bien que permettant une stimulation calcique, engendre un composé incapable de provoquer la contraction aortique (Brkovic, Hattenberger et al. 2003). De plus, sa substitution par une cyclohexylalanine dans l'UII₄₋₁₁ permet l'accès à une activité antagoniste puisque [Cha⁶]UII₄₋₁₁ est capable de bloquer la contraction induite par hUII, la réponse sur l'URP étant malheureusement indisponible (Chatenet, Dubessy et al. 2006). Nous avons ainsi choisi d'étudier cette position plus en détail puisque l'activité à cette position est dépendante de l'extrémité N-ter, [Cha³]URP étant un agoniste partiel faible (Chatenet, Dubessy et al. 2006).

Au cours de cette étude, centré autour de ce résidu dans l'URP nous avons pu observer que le résidu adjacent au cycle faisait partie intégrante de l'interaction récepteur-ligand. Ainsi, nous avons pu constater que [Phe(pI)³]URP est un agoniste partiel, alors que [Phe(pI)⁶]UII₄₋₁₁ agit comme un agoniste complet. Nous avons aussi noté que [D-Phe(pI)³]URP est un agoniste partiel très peu efficace, agissant comme modulateur allostérique capable de réduire l'efficacité de l'UII mais pas celle de l'URP, alors que [D-Phe(pI)⁶]UII₄₋₁₁ ne possède aucune activité contractile. Nous avons également démontré, et ce en complément de notre précédente étude, que la différence d'activité contractile était également lié à une signalisation différente au niveau de

la protéine G_{12} , puisque tous les analogues substitués en para de la phénylalanine de l'URP se sont révélés incapables d'atteindre une activation maximale de cette protéine (agonistes partiels). Alors que la configuration (L) de la phénylalanine fut décrite comme cruciale pour l'activité (Brkovic, Hattenberger et al. 2003, Chatenet, Dubessy et al. 2004), nous avons constaté au cours de cette étude qu'à la fois [D-Phe(pI)⁶]UII₄₋₁₁ et [D-Phe(pI)³]URP était tous deux capables d'activer G_{12} et β_{arr1} avec une puissance similaire à l'URP, quoique paradoxalement retenant des affinités très faibles.

Puisque les tests de liaisons et de BRET ont été réalisés sur une lignée exprimant hUT, la variabilité inter-espèce n'est pas incriminée dans cette disparité. Une hypothèse probable expliquant ces résultats pourrait être reliée à un biais cinétique (Klein Herenbrink, Sykes et al. 2016, Lane, May et al. 2017). En effet, alors que le test de compétition est réalisé après un temps d'incubation important (2 heures), les tests de BRET sont réalisés après 5 minutes. Or, l'affinité d'un ligand est dépendante de sa constante d'association K_{on} et de dissociation K_{off} . Ainsi, ces ligands pourraient faire preuve d'une association aisée au récepteur, mais une dissociation à brève échéance, qui se traduirait par une affinité très faible, quoiqu'une activation des effecteurs possible. En outre l'instabilité du complexe ligand-récepteur pourrait refléter l'inaptitude à entraîner une contraction efficace pour les composés [D-Phe(pI)⁶]UII₄₋₁₁ et [D-Phe(pI)³]URP. Toutefois, en considérant l'activité modulateur allostérique en contraction aortique de [D-Phe(pI)³]URP, une autre possibilité peut expliquer ces résultats : dans la mesure où ce ligand retient une structure similaire avec l'URP, nous avons émis l'hypothèse que cette action pourrait s'exercer via un phénomène d'allostérie latérale, en considérant qu'UT puisse s'homodimériser. La fixation à un protomère peut en effet par phénomène d'allostérie latérale modifier les propriétés du site de fixation au second protomère. Ces phénomènes ne sont pas pris en compte

dans l'expérience de compétition, où les sites de fixations sont assimilés à une unique population. Or si la fixation de [D-Phe(pI)³]URP aux deux protomères est défavorisée par coopérativité négative, alors une grande portion de ces sites ne serait pas occupé et ne présenterait pas de compétition par rapport au ligand radiomarqué, ce qui expliquerait la faible affinité mesurée.

Une découverte également intéressante concernant cette série vient de l'identification d'activité antagoniste de nature différente selon la forme peptidique employée, et ainsi la reconnaissance de microdomaines différents d'UT. [Cha⁶]UII₄₋₁₁ semble agir en tant qu'antagoniste compétitif, présentant un déplacement typique de la courbe concentration-réponse de l'UII (l'activité antagoniste par rapport à l'URP n'a pas été testé) de manière concentration-dépendante (Chatenet, Dubessy et al. 2006). En revanche, [D-Phe(pI)³]URP, [Bip³]URP et potentiellement [Pep³]URP, agissent selon un mécanisme non-compétitifs, présentant un affaïssement concentration-dépendant de l'effet maximal de contraction.

Certes l'augmentation de l'hydrophobicité au niveau de ce résidu semble être un dénominateur commun entre tous ces composés décrits, toutefois ce paramètre ne peut à lui seul expliquer ces différentes activités antagonistes puisque par exemple [4-tert-butyl-Phe⁶]UII₄₋₁₁, qui certes possède une empreinte stérique différente, est un agoniste puissant et complet (Chatenet, Dubessy et al. 2006). De plus, il ne faut pas oublier que [Cha⁶]UII₄₋₁₁ et [Cha³]URP, qui ne diffèrent que par un acide aminé, présentent des activités biologiques distinctes. Il semble donc vain de déterminer des exigences globales menant à un antagonisme. Dans le cas de l'UII₄₋₁₁, l'absence d'aromaticité n'est pas non plus un déterminant permettant d'expliquer l'activité antagoniste du composé analogues puisque [Leu⁶]UII₄₋₁₁ est un agoniste faible dépourvu d'activité antagoniste, alors que [Cha⁶]UII₄₋₁₁ est un antagoniste (Chatenet, Dubessy et al. 2006). Toutefois, en comparant ces deux composés, il est impossible d'exclure que la taille de la chaîne

latérale soit un paramètre déterminant. Incidemment, on doit noter que le composé [BzThi⁶]UII₄₋₁₁ retient une affinité identique avec l'UII₄₋₁₁ mais une réduction de deux ordres logarithmiques en puissance contractile. Or, dans le cas de la substitution de la tyrosine de l'URP, avec [Pep⁶]URP, une dichotomie très similaire a été observée entre affinité et contractilité. Ainsi, à la lumière de ces résultats, il est permis de supposer qu'à des concentrations faibles n'activant pas la contraction ce composé puisse se lier à des conformations d'UT de manière privilégiées, et puisse faire preuve d'activité allostérique latérale particulière. En revanche dans le cas de l'URP, l'augmentation du paramètre stérique en para de Phe³ entraîne un déclin de l'efficacité de contraction, et donne lieu à une activité antagoniste. Dans tous les cas, l'accès à des activités atypiques consécutive à la substitution du résidu Phe par des résidus phényles para-substitués semble indiquer que le résidu Phe³ de l'URP joue un rôle important dans la liaison et l'activation d'UT.

Ainsi que pour le résidu Tyrosine, il nous semble bon de discuter les activités de la librairie des N-Méthylations successives de l'UII, l'URP et l'UII₄₋₁₁, dont nous présentons les affinités, activités contractiles et puissances d'activation de Gq des N-Me-Phe et N-Me-Trp adjacents (données non-publiées, Tableau 3).

Tableau 3 : Activités biologiques des N-Me-Phe et N-Me-Trp adjacents.

| Peptide | Affinité | Contraction aortique | | Activation de Gq |
|---|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | pK _i ^a | pEC ₅₀ ^b | E _{max} ^c | pEC ₅₀ ^b |
| UII | 8.11 ± 0.07 | 8.52 ± 0.11 | 102 ± 4 | 8.52 ± 0.09 |
| URP | 8.20 ± 0.12 | 8.11 ± 0.06 | 116 ± 4 | 8.57 ± 0.08 |
| UII ₄₋₁₁ | 8.34 ± 0.04 | 8.28 ± 0.12 | 100 ± 4 | 8.73 ± 0.14 |
| [N-Me-Phe ⁶]UII | 6.09 ± 0.20*** | 6.70 ± 0.30*** | 96 ± 10 | 7.65 ± 0.05*** |
| [N-Me-Phe ³]URP | 6.61 ± 0.06*** | 51% @ 10 μM | | 6.98 ± 0.17*** |
| [N-Me-Phe ⁶]UII ₄₋₁₁ | 6.64 ± 0.10*** | 6.26 ± 0.09*** | 98 ± 5 | 7.73 ± 0.13** |
| [N-Me-Trp ⁷]UII | 7.69 ± 0.09* | 8.24 ± 0.42 | 97 ± 10 | 8.25 ± 0.08 |
| [N-Me-Trp ⁴]URP | 8.66 ± 0.13* | 7.08 ± 0.45*** | 35 ± 5*** | 7.86 ± 0.15*** |
| [N-Me-Trp ⁷]UII ₄₋₁₁ | 8.76 ± 0.07* | 8.47 ± 0.09 | 105 ± 5 | 8.44 ± 0.17 |

^apK_i: -logK_i; ^bpEC₅₀: -log EC₅₀; ^cl'efficacité maximale est exprimée en tant que pourcentage de la contraction induite par du KCl (40 mM) divisée par la réponse du tissu à l'UII. Les tests statistiques sont réalisés en utilisant un test de Student, par rapport aux valeurs obtenues pour les peptides de références dont sont issus les N-Méthylations.

Comme pour la Tyrosine, la N-méthylation de la Phénylalanine conduit à une perte d'affinité. Les raisons pouvant expliquer ce résultat sont similaires à celles apportées précédemment pour Tyr⁶. Ainsi, dans l'URP comme l'UII si le proton de l'amine de Tyr⁶ établit une liaison hydrogène avec le carbonyle de Phe³ responsable de la structuration en β-turn le proton de l'amine de Phe³ établit également une liaison hydrogène avec le carbonyle de Tyr⁶ qui vient renforcer cette structure (Carotenuto, Grieco et al. 2004, Brancaccio, Merlino et al. 2015). Cette dernière interaction est rompue par la N-méthylation de Phe³, et la déstructuration est de

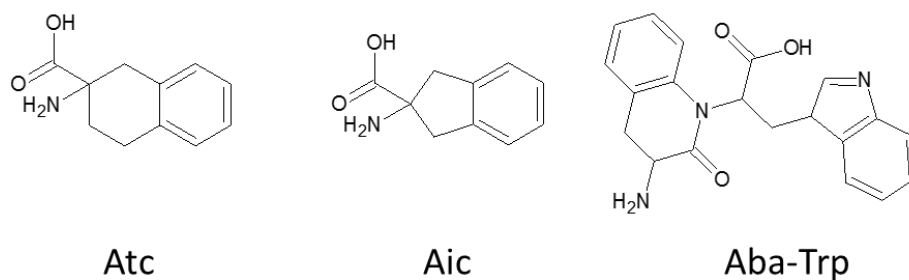
plus renforcée par la gêne stérique du groupement méthyle. En outre la N-méthylation pourrait déstabiliser l'équilibre cis-trans de l'amide reliant Cys² et Phe³. Toutefois, on notera que [N-Me-Phe³]URP, tout en retenant une affinité similaire à [N-Me-Phe⁶]UII₄₋₁₁, présente une puissance d'activation de la contraction aortique et de Gq très inférieures à [N-Me-Phe⁶]UII₄₋₁₁, soulignant à nouveau un impact potentiellement différent du résidu N-terminal sur le récepteur. La N-méthylation du tryptophane n'a en revanche qu'un faible impact sur l'affinité, mais conduit à une activité contractile partielle pour l'URP seulement. Or, à l'inverse de Phe³, le proton de l'amine de Trp⁴ dans l'URP n'est pas engagé dans une quelconque liaison hydrogène intramoléculaire (Brancaccio, Merlino et al. 2015). De plus, la suppression du proton de l'amine de Trp⁴ dans [Tpi⁴]URP et [Tiq⁴]URP conduit à deux agonistes complets (Chatenet, Folch et al. 2013). Le caractère agoniste partiel en contraction de [N-Me-Trp⁴]URP n'est donc pas lié à la rupture d'une éventuelle interaction intermoléculaire. Ainsi, nous proposons que le profil de ce composé vienne d'une gêne stérique entre le groupement N-méthyle et les chaînes latérales de N-Me-Trp⁴ et/ou Phe³, qui modifierait les conformations de ces dernières par rapport à l'URP. On s'attend ainsi à ce que la conformation trans de la chaîne latérale de N-Me-Trp⁴ soit favorisée afin de réduire l'interaction entre le cycle indole et le N-méthyl, et que la conformation trans de Phe³ soit au contraire défavorisée afin de réduire l'interaction entre le cycle phényle et le N-méthyl du résidu adjacent.

En considérant le profil contractile similaire de [N-Me-Trp⁴]URP et [Phe(pI)³]URP, qui sont deux agonistes partiels de puissance similaire, il est ainsi permis d'envisager que la substitution en para de la phénylalanine ait un impact sur l'orientation de la chaîne latérale de ce résidu, paramètre qui serait important dans l'URP uniquement, puisque [N-Me-Trp⁷]UII₄₋₁₁ et [Phe(pI)⁶]UII₄₋₁₁ sont des agonistes complets en contraction. Ainsi, alors que [Bip³]URP mais

également [D-Phe(pI)³]URP, dont la configuration est inversée, agissent tous deux en tant que modulateurs allostériques, la substitution de Phe³ par des analogues contraint permettrait potentiellement de définir les exigences structurales pour la phénylalanine afin de conduire à des modulateurs allostériques.

L'unique résidu contraint introduit par substitution du résidu Phe est [Oic⁶]UII₄₋₁₁, pour lequel la conformation trans de la chaîne latérale est interdite. Ce composé ne retient aucune liaison ni activité contractile (Chatenet, Dubessy et al. 2006). Or pour ce résidu, l'amide de la chaîne peptidique est substituée : nous pouvons relier son activité à celle de [N-Me-Tyr⁶]UII₄₋₁₁, qui dénote une perte majeure d'affinité. Ainsi, la contrainte de ce résidu par substitution du proton amide semble à exclure. En revanche, la N-méthylation du résidu Trp n'a conduit à aucune perte d'affinité que ce soit dans l'UII, l'UII₄₋₁₁ ou l'URP, ce qui indique que le proton amide de ce résidu peut servir de point d'ancrage pour contraindre le résidu Phe. Ainsi, à l'instar des substitutions proposées pour le résidu Tyr, la substitution de Phe par des résidus Aic, Atc et Aba (figure 23) dans l'URP, l'UII et l'UII₄₋₁₁ pourrait nous renseigner sur les exigences conformationnelles de ces peptides, et potentiellement fournir des antagonistes atypiques.

Figure 23 : Substitutions proposées du résidu Phe. Acide 2-amino-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene-2-carboxylique (Atc), acide 2-amino-indan-2-carboxylique (Aic) et Aba-Trp (Aba = 4-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-benzazepin-3-one)



iv. Variabilité inter-espèce et effets observés

Les tests de BRET et de liaison sont réalisés sur une lignée cellulaire HEK-293 exprimant le récepteur hUT de manière stable, qui a été mise au point lors de ce doctorat. Or, deux problèmes majeurs émergent de ces tests. D'une part cette lignée n'exhibe pas un phénotype représentatif des pathologies ciblées, HEK-293 étant dérivé de cellules rénales embryonnaires et d'autre part, puisque le récepteur est surexprimé, les résultats obtenus doivent être pris avec du recul car ils ne sont pas représentatifs de leur action dans un contexte natif. Afin de palier à ce deuxième points, nous avons recours au test de contraction aortique, qui quant à lui évalue la réponse biologique globale d'un tissu dont l'expression protéique/la signalisation n'a pas été altérée, et permet ainsi une certaine prédiction de l'effet pharmacologique pouvant être obtenue *in-vivo*. Toutefois, dans la mesure où nous visons la découverte de thérapies pour la médecine humaine, l'utilisation de tissus de rat présente un problème de variabilité inter-espèce. Certes, la variabilité inter-espèce n'est pas un problème systématique, en considérant que l'UCA agit en tant que modulateur allostérique tant sur l'aorte de rat, que sur l'aorte de singe cynomolgus (Chatenet, Letourneau et al. 2013). Toutefois, rUT et hUT partageant 75 % d'homologie (Ames, Sarau et al. 1999), la fixation et le comportement de certains composés peuvent varier drastiquement d'un récepteur à l'autre, à l'instar de [Phe⁹]UII, qui est plus de 100 fois plus affin pour hUT ($pK_i = 4.0 \pm 2.5$) que pour rUT ($pK_i = 663 \pm 114$) (Brkovic, Hattenberger et al. 2003). Cette différence de site liaison entre rUT et hUT a également été soulignée par modélisation moléculaire dans le cas du Palosuran (Kim, Li et al. 2010).

Ainsi, afin de pouvoir « traduire » l'effet contractile obtenu à l'aide du test de contraction d'aorte de rat, et pouvoir estimer au mieux l'impact de la variabilité inter-espèce, les tests *in-cellulo* devraient, au moins pour les composés au profil contractile atypique, être à l'avenir évalués sur une lignée transfectée avec rUT et hUT. En ce sens, les lignées de myoblaste cardiaque de rat H9c2 ou de fibroblaste aortique humain T/G HA-VSMC pourraient servir de lignées de choix pour les tests. En effet, ces lignées présentent des réponses similaires aux cardiomyocytes néonataux et adultes aux stimuli hypertrophiques et apoptotiques, expriment des phénotypes stables pendant plusieurs passages et sont aisément transfectables (Johns, Ao et al. 2004). Celles-ci n'exprimant pas le récepteur UT, les lignées natives pourront donc servir de contrôles négatifs aux tests pharmacologiques afin de s'assurer que l'effet des ligands employés soit spécifique d'UT.

v. Conclusion.

Le système urotensinergique, grâce à ses actions puissantes et pléiotropes dans le système cardiovasculaire, est intimement impliqué dans l'étiologie de diverses maladies cardiovasculaires. Bien que des efforts considérables de R & D aient été faits au cours de la dernière décennie, un succès limité a été obtenu, partiellement dû à une compréhension insuffisante de la pharmacologie du système urotensinergique, notamment en ce qui concerne la sélectivité fonctionnelle des ligands endogènes UII et URP.

UII et l'URP se liant à l'UT selon différents mécanismes moléculaires, chacune de ces structures doit être considérée comme des entités distinctes. Au cours de ce doctorat, nous nous sommes appliqués à modifier les résidus intracycliques Phe³ et Tyr⁶ de l'URP. Quoique ces

derniers soient communs avec l'UII, leurs substitutions ont permis de révéler des déterminants structuraux propres à l'URP seulement.

La substitution en para de Tyr⁶ ainsi que la contrainte de sa chaîne latérale a un impact négatif à la fois sur l'activation de la contraction aortique et l'activation de la protéine Gq mais pas G12. En outre le composé [Pep⁶]URP agit comme un modulateur allostérique capable de réduire la puissance et l'efficacité contractile d'URP tout en n'affectant pas l'efficacité d'UII. L'augmentation de l'hydrophobicité de Phe³ est favorable à la liaison mais l'accroissement du paramètre stérique en para du cycle entraîne une perte d'efficacité de contraction ainsi que d'activation de G12 dans l'URP et non dans l'UII₄₋₁₁. Cette perte d'efficacité est corrélée avec une activité antagoniste contractile non compétitive. En outre l'inversion de configuration est délétère pour l'affinité et l'activité contractile, quoique [D-Phe(pI)³]URP mais pas [D-Phe(pI)⁶]UII₄₋₁₁ agit comme un modulateur allostérique. Dans l'ensemble, notre étude souligne pour la première fois le rôle crucial des résidus Phe³ et Tyr⁶ de l'URP dans le processus d'activation d'UT et démontre que ces positions sont de nouvelles voies d'accès dans la conception des modulateurs allostériques du système urotensinergique.

Deux points expérimentaux essentiels ont participé à ces découvertes. D'une part, l'activité antagoniste a été évaluée systématiquement contre les deux hormones endogènes. Selon nous, aucune compréhension solide du système urotensinergique ne pourra advenir sans cela. En outre, le concept général d'antagonisme est souvent trompeur, étant donné que la plupart des ligands décrits en tant qu'antagonistes peuvent également être des ligands polarisés ou des agonistes inverses pour des voies choisies. Par exemple, Urantide, un antagoniste bien connu de l'UT, n'a pas réussi à recruter β -arrestine mais a favorisé l'activation de Gi, Gq et Go, agissant

ainsi comme agoniste. Ainsi, nous avons choisi de réaliser une évaluation pharmacologique multimodale des composés synthétisés.

Nous sommes confiants que la possibilité de diriger la signalisation d'UT avec un ligand biaisé ou un modulateur allostérique ouvrira de nouvelles opportunités pour développer des médicaments plus sélectifs / efficaces pour les maladies cardiovasculaires en permettant un meilleur contrôle des voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie sous-jacente, limitant ainsi les effets secondaires.

Bibliographie :

- 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. Sauermeier, 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**(6750): 282-286.
- Bandholtz, S., S. Erdmann, J. L. von Hacht, S. Exner, G. Krause, G. Kleinau and C. Grotzinger (2016). "Urolinin: The First Linear Peptidic Urotensin-II Receptor Agonist." *J Med Chem*.
- Batuwangala, M., V. Camarda, J. McDonald, E. Marzola, D. G. Lambert, L. L. Ng, G. Calo, D. Regoli, C. Trapella, R. Guerrini and S. Salvadori (2009). "Structure-activity relationship study on Tyr9 of urotensin-II(4-11): identification of a partial agonist of the UT receptor." *Peptides* **30**(6): 1130-1136.
- Behm, D. J., S. M. Harrison, Z. Ao, K. Maniscalco, S. J. Pickering, E. V. Grau, T. N. Woods, R. W. Coatney, C. P. Doe, R. N. Willette, D. G. Johns and S. A. Douglas (2003). "Deletion of the UT receptor gene results in the selective loss of urotensin-II contractile activity in aortae isolated from UT receptor knockout mice." *Br J Pharmacol* **139**(2): 464-472.
- Bern, H. A. and K. Lederis (1969). "A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts." *J Endocrinol* **45**(1): Suppl:xi-xii.
- Bhaskaran, R., A. I. Arunkumar and C. Yu (1994). "NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of urotensin II." *Biochim Biophys Acta* **1199**(2): 115-122.
- Biron, E., J. Chatterjee and H. Kessler (2006). "Optimized selective N-methylation of peptides on solid support." *J Pept Sci* **12**(3): 213-219.
- Bottrill, F. E., S. A. Douglas, C. R. Hiley and R. White (2000). "Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries." *Br J Pharmacol* **130**(8): 1865-1870.
- Brancaccio, D., A. Limatola, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, E. Novellino, P. Grieco and A. Carotenuto (2014). "Urantide conformation and interaction with the urotensin-II receptor." *Arch Pharm (Weinheim)* **347**(3): 185-192.
- 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**(5): 392-399.
- Brazeau, P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier and R. Guillemin (1973). "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone." *Science* **179**(4068): 77-79.
- 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**(3): 1200-1209.
- 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**(12): 5148-5162.
- Buchanan, F. G., D. L. Gordon, P. Matta, Q. Shi, L. M. Matrisian and R. N. DuBois (2006). "Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1492-1497.
- Camarda, V., R. Guerrini, E. Kostenis, A. Rizzi, G. Calo, A. Hattenberger, M. Zucchini, S. Salvadori and D. Regoli (2002). "A new ligand for the urotensin II receptor." *Br. J. Pharmacol.* **137**(3): 311-314.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(1): 50-83.

Carotenuto, A., L. Auriemma, F. Merlino, A. Limatola, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, R. di Villa Bianca, D. Brancaccio, P. Santicioli, S. Meini, C. A. Maggi, E. Novellino and P. Grieco (2013). "New insight into the binding mode of peptides at urotensin-II receptor by Trp-constrained analogues of P5U and urantide." J Pept Sci **19**(5): 293-300.

Carotenuto, A., L. Auriemma, F. Merlino, A. M. Yousif, D. Marasco, A. Limatola, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, P. Santicioli, S. Meini, C. A. Maggi, E. Novellino and P. Grieco (2014). "Lead optimization of P5U and urantide: discovery of novel potent ligands at the urotensin-II receptor." J Med Chem **57**(14): 5965-5974.

Carotenuto, A., P. Grieco, P. Campiglia, E. Novellino and P. Rovero (2004). "Unraveling the active conformation of urotensin II." J Med Chem **47**(7): 1652-1661.

Castel, H., M. Diallo, D. Chatenet, J. Leprince, L. Desrues, M. T. Schouft, M. Fontaine, C. Dubessy, I. Lihrmann, E. Scalbert, M. Malagon, H. Vaudry, M. C. Tonon and P. Gandolfo (2006). "Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes." J Neurochem **99**(2): 582-595.

Chan, W. Y., D. L. McKinzie, S. Bose, S. N. Mitchell, J. M. Witkin, R. C. Thompson, A. Christopoulos, S. Lazareno, N. J. Birdsall, F. P. Bymaster and C. C. Felder (2008). "Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(31): 10978-10983.

Chatenet, D., C. Dubessy, C. Boullaran, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, I. Lihrmann, 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**(24): 7234-7238.

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. Lihrmann, P. Pacaud and H. Vaudry (2004). "Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide." Peptides **25**(10): 1819-1830.

Chatenet, D., B. Folch, D. Feytens, M. Letourneau, D. Tourwe, N. Doucet and A. Fournier (2013). "Development and pharmacological characterization of conformationally constrained urotensin II-related peptide agonists." J Med Chem **56**(23): 9612-9622.

Chatenet, D., M. Letourneau, Q. T. Nguyen, N. D. Doan, J. Dupuis and A. Fournier (2013). "Discovery of new antagonists aimed at discriminating U11 and URP-mediated biological activities: insight into U11 and URP receptor activation." Br J Pharmacol **168**(4): 807-821.

Chatenet, D., Q.-T. Nguyen, M. Letourneau, J. Dupuis and A. Fournier (2012). "Urocontrin, a novel UT receptor ligand with a unique pharmacological profile." Biochemical Pharmacology **83**(5): 608-615.

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**(5): 608-615.

Chatenet, D., T.-T. M. Nguyen, M. Letourneau and A. Fournier (2012). "Update on the urotensinergic system: new trends in receptor localization, activation, and drug design." Frontiers in endocrinology **3**: 174-174.

Chen, Y. H., M. W. Zhao, W. Z. Yao, Y. Z. Pang and C. S. Tang (2004). "The signal transduction pathway in the proliferation of airway smooth muscle cells induced by urotensin II." Chin Med J (Engl) **117**(1): 37-41.

Cherezov, V. and M. Caffrey (2007). "Membrane protein crystallization in lipidic mesophases. A mechanism study using X-ray microdiffraction." Faraday Discuss **136**: 195-212; discussion 213-129.

Clozel, M., C. Binkert, M. Birker-Robaczewska, C. Boukhadra, S. S. Ding, W. Fischli, P. Hess, B. Mathys, K. Morrison, C. Muller, C. Muller, O. Nayler, C. Qiu, M. Rey, M. W. Scherz, J. Velker, T. Weller, J. F. Xi and P. Ziltener (2004). "Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System." J Pharmacol Exp Ther **311**(1): 204-212.

Cramer, H., K. Schmenger, K. Heinrich, A. Horstmeyer, H. Boning, A. Breit, A. Piiper, K. Lundstrom, W. Muller-Esterl and C. Schroeder (2001). "Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q." Eur J Biochem **268**(20): 5449-5459.

del Sol, A., C. J. Tsai, B. Ma and R. Nussinov (2009). "The origin of allosteric functional modulation: multiple pre-existing pathways." Structure **17**(8): 1042-1050.

di Villa Bianca, R., E. Mitidieri, E. Donnarumma, F. Fusco, N. Longo, G. D. Rosa, E. Novellino, P. Grieco, V. Mirone, G. Cirino and R. Sorrentino (2015). "A new therapeutic approach to erectile dysfunction: urotensin-II receptor high affinity agonist ligands." Asian J Androl **17**(1): 81-85.

Djordjevic, T., R. S. BelAiba, S. Bonello, J. Pfeilschifter, J. Hess and A. Grolach (2005). "Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(3): 519-525.

Djordjevic, T. and A. Grolach (2007). "Urotensin-II in the lung: a matter for vascular remodelling and pulmonary hypertension?" Thromb Haemost **98**(5): 952-962.

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**(1): 243-257.

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**(2): 361-374.

Elshourbagy, N. A., S. A. Douglas, U. Shabon, S. Harrison, G. Duddy, J. L. Sechler, Z. Ao, B. E. Maleeff, D. Naselsky, J. Disa and N. V. Aiyar (2002). "Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey." Br J Pharmacol **136**(1): 9-22.

Engelhardt, S. and F. Rochais (2007). "G proteins: more than transducers of receptor-generated signals?" Circ Res **100**(8): 1109-1111.

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**(4): 577-589.

Farahani, M. D., B. Honarparvar, F. Albericio, G. E. Maguire, T. Govender, P. I. Arvidsson and H. G. Kruger (2014). "Proline N-oxides: modulators of the 3D conformation of linear peptides through "NO-turns"." Org Biomol Chem **12**(25): 4479-4490.

Flohr, S., M. Kurz, E. Kostenis, A. Brkovich, A. Fournier and T. Klabunde (2002). "Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II." Journal of Medicinal Chemistry **45**(9): 1799-1805.

Flohr, S., M. Kurz, E. Kostenis, A. Brkovich, A. Fournier and T. Klabunde (2002). "Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II." J Med Chem **45**(9): 1799-1805.

Foister, S., L. L. Taylor, J. J. Feng, W. L. Chen, A. Lin, F. C. Cheng, A. B. Smith, 3rd and R. Hirschmann (2006). "Design and synthesis of potent cystine-free cyclic hexapeptide agonists at the human urotensin receptor." Org Lett **8**(9): 1799-1802.

Garland, S. L. (2013). "Are GPCRs still a source of new targets?" J Biomol Screen **18**(9): 947-966.

Gibson, A. (1987). "Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips." Br J Pharmacol **91**(1): 205-212.

Grieco, P., A. Carotenuto, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, L. Auriemma, M. Sala, C. Marcozzi, R. d'Emmanuele di Villa Bianca, D. Brancaccio, P. Rovero, P. Santicioli, S. Meini, C. A. Maggi and E. Novellino (2009). "New insight into the binding mode of peptide ligands at Urotensin-II receptor: structure-activity relationships study on P5U and urantide." *J Med Chem* **52**(13): 3927-3940.

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**(20): 4391-4394.

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**(12): 3731-3739.

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**(2): 85-90.

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**(2): 85-90.

Haensele, E., N. Mele, M. Miljak, C. M. Read, D. C. Whitley, L. Banting, C. Delepee, J. Sopkova-de Oliveira Santos, A. Lepailleur, R. Bureau, J. W. Essex and T. Clark (2017). "Conformation and Dynamics of Human Urotensin II and Urotensin Related Peptide in Aqueous Solution." *J Chem Inf Model* **57**(2): 298-310.

Hongfang, J., B. Cong, B. Zhao, C. Zhang, X. Liu, W. Zhou, Y. Shi, C. Tang and D. Junbao (2006). "Effects of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary vascular structural remodeling." *Life Sci* **78**(12): 1299-1309.

Jaconi, M., C. Bony, S. M. Richards, A. Terzic, S. Arnaudeau, G. Vassort and M. Puceat (2000). "Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking." *Mol Biol Cell* **11**(5): 1845-1858.

Jani, P. P., H. Narayan and L. L. Ng (2013). "The differential extraction and immunoluminometric assay of Urotensin II and Urotensin-related peptide in heart failure." *Peptides* **40**: 72-76.

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**(1): 113-124.

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**(4): 238-250.

Jones, K. A., J. A. Tamm, D. A. Craig, D. Ph, W. Yao and R. Panico (2000). "Signal transduction by GABA(B) receptor heterodimers." *Neuropsychopharmacology* **23**(4 Suppl): S41-49.

Kang, D. S., X. Tian and J. L. Benovic (2014). "Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **27**: 63-71.

Katritch, V., G. Fenalti, E. E. Abola, B. L. Roth, V. Cherezov and R. C. Stevens (2014). "Allosteric sodium in class A GPCR signaling." *Trends Biochem Sci* **39**(5): 233-244.

Kenakin, T. (2005). "New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism." *Nat Rev Drug Discov* **4**(11): 919-927.

Kenakin, T. (2007). "Allosteric theory: taking therapeutic advantage of the malleable nature of GPCRs." *Curr Neuropharmacol* **5**(3): 149-156.

Kenakin, T. (2017). "Signaling bias in drug discovery." *Expert Opin Drug Discov* **12**(4): 321-333.

Kenakin, T. and A. Christopoulos (2013). "Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact." *Nat Rev Drug Discov* **12**(3): 205-216.

Kenakin, T. and L. J. Miller (2010). "Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery." *Pharmacol Rev* **62**(2): 265-304.

Kenakin, T. P. (2012). "Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery." Br J Pharmacol **165**(6): 1659-1669.

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**(9): 1594-1608.

Kinney, W. A., H. R. Almond Jr, J. Qi, C. E. Smith, R. J. Santulli, L. de Garavilla, P. Andrade-Gordon, D. S. Cho, A. M. Everson, M. A. Feinstein, P. A. Leung and B. E. Maryanoff (2002). "Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model." Angew Chem Int Ed Engl **41**(16): 2940-2944.

Klein Herenbrink, C., D. A. Sykes, P. Donthamsetti, M. Canals, T. Coudrat, J. Shonberg, P. J. Scammells, B. Capuano, P. M. Sexton, S. J. Charlton, J. A. Javitch, A. Christopoulos and J. R. Lane (2016). "The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs." Nat Commun **7**: 10842.

Knight, J. A., C. Smith, N. Toohey, M. T. Klein and M. Teitler (2009). "Pharmacological analysis of the novel, rapid, and potent inactivation of the human 5-Hydroxytryptamine₇ receptor by risperidone, 9-OH-Risperidone, and other inactivating antagonists." Mol Pharmacol **75**(2): 374-380.

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**(2): 77-88.

Lane, J. R., L. T. May, R. G. Parton, P. M. Sexton and A. Christopoulos (2017). "A kinetic view of GPCR allostery and biased agonism." Nat Chem Biol **13**(9): 929-937.

Lee, S. P., C. H. So, A. J. Rashid, G. Varghese, R. Cheng, A. J. Lanca, B. F. O'Dowd and S. R. George (2004). "Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal." J Biol Chem **279**(34): 35671-35678.

Lefkowitz, R. J., K. L. Pierce and L. M. Luttrell (2002). "Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity." Mol Pharmacol **62**(5): 971-974.

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**(5): 658-673.

Lescot, E., J. Sopkova-de Oliveira Santos, C. Dubessy, H. Oulyadi, A. Lesnard, H. Vaudry, R. Bureau and S. Rault (2007). "Definition of new pharmacophores for nonpeptide antagonists of human urotensin-II. Comparison with the 3D-structure of human urotensin-II and URP." J Chem Inf Model **47**(2): 602-612.

Li, X. D., Y. J. Yang, Y. J. Geng, J. L. Zhao, H. T. Zhang, Y. T. Cheng and Y. L. Wu (2012). "Phosphorylation of endothelial NOS contributes to simvastatin protection against myocardial no-reflow and infarction in reperfused swine hearts: partially via the PKA signaling pathway." Acta Pharmacol Sin **33**(7): 879-887.

Liu, Q., S. S. Pong, Z. Zeng, Q. Zhang, A. D. Howard, D. L. Williams, Jr., M. Davidoff, R. Wang, C. P. Austin, T. P. McDonald, C. Bai, S. R. George, J. F. Evans and C. T. Caskey (1999). "Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14." Biochem Biophys Res Commun **266**(1): 174-178.

MacLean, M. R., D. Alexander, A. Stirrat, M. Gallagher, S. A. Douglas, E. H. Ohlstein, I. Morecroft and K. Pollard (2000). "Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat." Br J Pharmacol **130**(2): 201-204.

Maguire, J. J., R. E. Kuc and A. P. Davenport (2000). "Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1." Br J Pharmacol **131**(3): 441-446.

Maguire, J. J., R. E. Kuc, M. J. Kleinz and A. P. Davenport (2008). "Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function." Peptides **29**(5): 735-742.

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

Marchant, J. S. and C. W. Taylor (1997). "Cooperative activation of IP3 receptors by sequential binding of IP3 and Ca²⁺ safeguards against spontaneous activity." Curr Biol **7**(7): 510-518.

Marchese, A., M. Heiber, T. Nguyen, H. H. Heng, V. R. Saldivia, R. Cheng, P. M. Murphy, L. C. Tsui, X. Shi, P. Gregor and et al. (1995). "Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors." Genomics **29**(2): 335-344.

Maryanoff, B. E. and W. A. Kinney (2010). "Urotensin-II receptor modulators as potential drugs." J Med Chem **53**(7): 2695-2708.

Matsushita, M., M. Shichiri, N. Fukai, N. Ozawa, T. Yoshimoto, N. Takasu and Y. Hirata (2003). "Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1." Endocrinology **144**(5): 1825-1831.

Matsushita, M., M. Shichiri, T. Imai, M. Iwashina, H. Tanaka, N. Takasu and Y. Hirata (2001). "Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues." J Hypertens **19**(12): 2185-2190.

Mei, Y., H. Jin, W. Tian, H. Wang, H. Wang, Y. Zhao, Z. Zhang and F. Meng (2011). "Urantide alleviates monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in Wistar rats." Pulm Pharmacol Ther **24**(4): 386-393.

Millar, R. P. and C. L. Newton (2010). "The year in G protein-coupled receptor research." Mol Endocrinol **24**(1): 261-274.

Monod, J., J. Wyman and J. P. Changeux (1965). "On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model." J Mol Biol **12**: 88-118.

Moreno, J. L., P. Miranda-Azpiazu, A. Garcia-Bea, J. Younkin, M. Cui, A. Kozlenkov, A. Ben-Ezra, G. Voloudakis, A. K. Fakira, L. Baki, Y. Ge, A. Georgakopoulos, J. A. Moron, G. Milligan, J. F. Lopez-Gimenez, N. K. Robakis, D. E. Logothetis, J. J. Meana and J. Gonzalez-Maeso (2016). "Allosteric signaling through an mGlu2 and 5-HT2A heteromeric receptor complex and its potential contribution to schizophrenia." Sci Signal **9**(410): ra5.

Mori, M., T. Sugo, M. Abe, Y. Shimomura, M. Kurihara, C. Kitada, K. Kikuchi, Y. Shintani, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura and M. Fujino (1999). "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)." Biochem Biophys Res Commun **265**(1): 123-129.

Mosi, R. M., V. Anastassova, J. Cox, M. C. Darkes, S. R. Idzan, J. Labrecque, G. Lau, K. L. Nelson, K. Patel, Z. Santucci, R. S. Wong, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, D. Huskens, D. Schols and S. P. Fricker (2012). "The molecular pharmacology of AMD11070: an orally bioavailable CXCR4 HIV entry inhibitor." Biochem Pharmacol **83**(4): 472-479.

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**(9): 2445-2458.

Nothacker, H. P., Z. Wang, A. M. McNeill, Y. Saito, S. Merten, B. O'Dowd, S. P. Duckles and O. Civelli (1999). "Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction." Nat Cell Biol **1**(6): 383-385.

Nygaard, R., T. M. Frimurer, B. Holst, M. M. Rosenkilde and T. W. Schwartz (2009). "Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures." Trends Pharmacol Sci **30**(5): 249-259.

Onan, D., R. D. Hannan and W. G. Thomas (2004). "Urotensin II: the old kid in town." Trends Endocrinol Metab **15**(4): 175-182.

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**(9): 2344-2354.

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**(7): 1155-1158.

Paysant, J., A. Rupin, S. Simonet, J. N. Fabiani and T. J. Verbeuren (2001). "Comparison of the contractile responses of human coronary bypass grafts and monkey arteries to human urotensin-II." Fundam Clin Pharmacol **15**(4): 227-231.

Pearson, D., J. E. Shively, B. R. Clark, Geschwind, H. 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**(8): 5021-5024.

Peeters, M. C., G. J. van Westen, D. Guo, L. E. Wisse, C. E. Muller, M. W. Beukers and A. P. Ijzerman (2011). "GPCR structure and activation: an essential role for the first extracellular loop in activating the adenosine A2B receptor." FASEB J **25**(2): 632-643.

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.

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**(5): 770-777.

Proulx, C. D., B. J. Holleran, P. Lavigne, E. Escher, G. Guillemette and R. Leduc (2008). "Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor." Peptides **29**(5): 691-699.

Ritter, S. L. and R. A. Hall (2009). "Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(12): 819-830.

Roettger, B. F., D. Ghanekar, R. Rao, C. Toledo, J. Yingling, D. Pinon and L. J. Miller (1997). "Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor." Mol Pharmacol **51**(3): 357-362.

Ross, B., K. McKendy and A. Giaid (2010). "Role of urotensin II in health and disease." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **298**(5): R1156-1172.

Rossowski, W. J., B. L. Cheng, J. E. Taylor, R. Datta and D. H. Coy (2002). "Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists." Eur J Pharmacol **438**(3): 159-170.

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**(1): 5-9.

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**(2): 265-271.

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**(11): 1102-1104.

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**(2): 901-909.

Spengler, D., C. Waeber, C. Pantaloni, F. Holsboer, J. Bockaert, P. H. Seeburg and L. Journot (1993). "Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor." Nature **365**(6442): 170-175.

Stirrat, A., M. Gallagher, S. A. Douglas, E. H. Ohlstein, C. Berry, A. Kirk, M. Richardson and M. R. MacLean (2001). "Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(2): H925-928.

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**(3): 860-868.

Suzuki, N., S. Nakamura, H. Mano and T. Kozasa (2003). "Galpho 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(2): 733-738.

Tasaki, K., M. Hori, H. Ozaki, H. Karaki and I. Wakabayashi (2004). "Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta." J Pharmacol Sci **94**(4): 376-383.

Teitler, M. and M. T. Klein (2012). "A new approach for studying GPCR dimers: drug-induced inactivation and reactivation to reveal GPCR dimer function in vitro, in primary culture, and in vivo." Pharmacol Ther **133**(2): 205-217.

Teitler, M., N. Toohey, J. A. Knight, M. T. Klein and C. Smith (2010). "Clozapine and other competitive antagonists reactivate risperidone-inactivated h5-HT7 receptors: radioligand binding and functional evidence for GPCR homodimer protomer interactions." Psychopharmacology (Berl) **212**(4): 687-697.

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**(4): 2893-2900.

Thompson, G. L., M. Canals and D. P. Poole (2014). "Biological redundancy of endogenous GPCR ligands in the gut and the potential for endogenous functional selectivity." Front Pharmacol **5**: 262.

Tobin, A. B., A. J. Butcher and K. C. Kong (2008). "Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling." Trends Pharmacol Sci **29**(8): 413-420.

Tohgo, A., E. W. Choy, D. Gesty-Palmer, K. L. Pierce, S. Laporte, R. H. Oakley, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and L. M. Luttrell (2003). "The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation." J Biol Chem **278**(8): 6258-6267.

Tohgo, A., K. L. Pierce, E. W. Choy, R. J. Lefkowitz and L. M. Luttrell (2002). "beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation." J Biol Chem **277**(11): 9429-9436.

Tsai, C. J., A. del Sol and R. Nussinov (2008). "Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play." J Mol Biol **378**(1): 1-11.

Van Rompaey, K., I. Van den Eynde, N. De Kimpe and D. Tourwe (2003). "A versatile synthesis of 2-substituted 4-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-benzazepine-3-ones." Tetrahedron **59**(24): 4421-4432.

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**(1): 214-258.

Whalen, E. J., S. Rajagopal and R. J. Lefkowitz (2011). "Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists." Trends Mol Med **17**(3): 126-139.

Whorton, M. R., M. P. Bokoch, S. G. Rasmussen, B. Huang, R. N. Zare, B. Kobilka and R. K. Sunahara (2007). "A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7682-7687.