

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

Analyse fonctionnelle de l'urotensine II

par
Alexandre Brkovic

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Martin G. Sirois
Institut de Cardiologie de Montréal

Directeur de recherche

Alain Fournier
INRS-Institut Armand-Frappier

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, le docteur Alain Fournier, qui m'a offert de judicieux conseils et un soutien constant tout au long de mon projet de Maîtrise.

J'aimerais également remercier l'ensemble des membres du laboratoire, plus spécifiquement, Myriam Létourneau, Steve Bourgault et Philippe Lampron pour leur contribution à la réalisation de mon projet de recherche.

Dans un dernier temps, je remercie l'INRS-Institut Armand-Frappier et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour leur soutien financier.

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Remerciements..... | ii |
| Table des matières | iii |
| Abréviations | iv |
| Liste des Figures..... | iv |
| Liste des Tableaux..... | v |
| Sommaire | vi |
| Hypothèses et objectifs du projet de recherche | ix |
| Revue de la littérature..... | 1 |
| 1.0 Historique..... | 1 |
| 1.1 Le rôle physiologique de l'UT-II chez les poissons | 3 |
| 1.2 L'UT-II: un puissant vasoconstricteur..... | 4 |
| 1.3 Découverte de l'urotensine II humaine..... | 8 |
| 1.4 Le récepteur de l'UT-II humain, GPR14..... | 10 |
| 1.5 Les effets biologiques de l'UT-II chez les mammifères..... | 15 |
| 1.6 Les effets biologiques de l'UT-II chez l'humain..... | 22 |
| 1.7 Hypothèses sur le mode d'action de l'UT-II | 26 |
| 1.8 Physiopathologies..... | 32 |
| 1.9 Étude structure-activité | 34 |
| Article A | 46 |
| Article B | 54 |
| Discussion et Conclusion..... | 107 |
| Bibliographie | 117 |

Abréviations

UT-II, urotensine II; hUT-II, urotensine II humaine; GUT-II, urotensine II de gobie; CGRP, calcitonin gene-related peptide; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; GLP-1, glucagon-like peptide; THS, thyrotrophine; TRH, thyrolibérine; Emax, efficacité maximale; RIA, radioimmunoassay; moxLDL, middle oxidized low density lipoprotein; VSMC, vascular smooth muscle cell; NOE, effet nucléaire Overhauser; SRIF, somatostatine.

Liste des Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Le système neuro-uropysaire du poisson téléostéen..... | 2 |
| Figure 2 : Courbe concentration-réponse non cumulative de l'urotensine II de gobie sur un segment d'aorte thoracique de rat..... | 6 |
| Figure 3 : Courbe concentration-réponse cumulative de l'urotensine II humaine sur l'aorte thoracique de rat..... | 6 |
| Figure 4 : Représentation schématique du précurseur de l'ADN complète de l'urotensine II humaine..... | 9 |
| Figure 5 : Modèle de la structure du récepteur de l'urotensine II..... | 11 |
| Figure 6 : Densité relative de la liaison de l'[¹²⁵ I]-urotensine II sur différents tissus de rat et d'humain..... | 13 |
| Figure 7 : Éléments de la cascade impliqués dans la constriction tonique de l'aorte thoracique proximale de l'aorte de rat induite par l'urotensine II humaine..... | 14 |
| Figure 8 : Représentation simplifiée du squelette de carbone de l'urotensine II de gobie par modélisation moléculaire..... | 36 |
| Figure 9 : Structure primaire de A) l'urotensine II humaine B) de la somatostatine 1-14 C) de la somatostatine 1-28..... | 39 |
| Figure 10 : A) Structure du plus puissant agoniste non peptidique de la somatostatine B) Structure primaire du tripeptide Phe ⁷ -Trp ⁸ -Lys ⁹ présent au niveau de la somatostatine et de l'urotensine II..... | 40 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I : Structure primaire de l'urotensine II chez différentes espèces animales..... | 7 |
| Tableau II : Profil de vasoconstriction de l'urotensine-II humaine chez différents mammifères..... | 17 |
| Tableau III : Classification des réponses <i>in vitro</i> observées à partir de segments vasculaires de rat en présence d'urotensine II humaine..... | 18 |
| Tableau IV : Résumé de l'action <i>in vitro</i> de l'urotensine II humaine sur différents vaisseaux sanguins humains..... | 24 |
| Tableau V : Comparaison de la structure des antagonistes des récepteurs SST ₂ et GPR14 avec celle de l'urotensine II(4-11)..... | 42 |

Sommaire

L'urotensine II (UT-II) de gobie, un peptide de 12 acides aminés, a été initialement isolée à partir de l'urophyse de poisson. Chez les poissons, elle agit à titre d'agent hypertenseur, de spasmogène des muscles lisses et de modulateur du système endocrinien, mais son action ne se limite pas aux poissons. Jusqu'à présent, son action la plus surprenante a été observée sur le système artériel des mammifères, où il est décrit fréquemment comme le plus puissant agent vasoconstricteur. Toutefois, la puissance et l'efficacité de l'UT-II varient considérablement en fonction du tissu examiné, de l'individu et de l'espèce. La puissance de l'UT-II, soit à titre d'agent vasodilatateur ou vasoconstricteur, suggère fortement que l'UT-II soit un modulateur de l'homéostasie cardiovasculaire. De plus, la vaste distribution du récepteur de l'UT-II, nommé GPR14, introduit la possibilité que l'UT-II agisse à titre d'hormone circulante. Toutefois, sa présence dans la moelle épinière et le tronc cérébral suggère également que l'UT-II soit un neuromodulateur.

Néanmoins, ces observations supportent l'hypothèse voulant que l'UT-II soit impliquée dans des physiopathologies telles que l'hypertension ou l'artériosclérose. Ainsi, le développement d'un antagoniste de l'UT-II serait un outil pharmacologique et thérapeutique de choix dans le traitement de certaines maladies cardiovasculaires. L'élaboration d'un tel antagoniste requiert cependant au préalable des études structure-activité afin de cibler les résidus essentiels à la liaison et l'activation du récepteur GPR14. Par conséquent, en se basant sur les études structure-activité réalisées sur la somatostatine, un peptide possédant d'importantes similitudes structurales avec l'UT-II, notre laboratoire a réalisé en collaboration avec un groupe d'Aventis Pharma Inc. une analyse fonctionnelle des résidus de l'UT-II.

Le premier article comporte une étude structure-activité aboutissant au développement d'un modèle pharmacophore à trois points et à la découverte des premiers antagonistes non peptidiques de l'hUT-II. Suite à l'analyse fonctionnelle

des résidus de l'UT-II, les chaînes latérales des résidus Trp⁷, Lys⁸ et Tyr⁹ ont été identifiées comme nécessaires à la reconnaissance du ligand par le récepteur et à son activation. Par la suite, des études de résonance magnétique nucléaire et de modélisation moléculaire ont été réalisées sur ce tripeptide afin d'évaluer l'espace tridimensionnel et la charge des chaînes latérales de chacun de ses résidus. L'utilisation des données recueillies a permis d'élaborer un modèle pharmacophore à trois points qui à son tour a permis le criblage virtuel d'une banque de composés afin de cibler des molécules comportant les caractéristiques du modèle. Ainsi, un certain nombre de composés ont été sélectionnés et testés pour leur pouvoir antagoniste, dont le composé S6716 qui possède un IC₅₀ de 300 nM.

Le deuxième article, pour lequel ma participation est majeure, renferme une étude exhaustive de la relation entre chacun des acides aminés de l'UT-II et sa puissante activité agoniste. On y retrouve également une analyse de la relation entre l'affinité de liaison avec le récepteur et la structure primaire du peptide. Ainsi, 41 analogues de l'UT-II ont été synthétisés selon une approche de synthèse systématique. La substitution à tour de rôle des acides aminés par une alanine a démontré clairement la contribution mineure du segment N-terminal et l'importance du tripeptide Trp⁷-Lys⁸-Tyr⁹, où uniquement des modifications mineures en position 9 sont tolérées. En accord avec les résultats de Itoh *et al.* (1987), le segment 4-11 de l'hUT-II est la séquence minimale afin de maintenir l'activité contractile et l'affinité envers GPR14. De plus, plusieurs observations suggèrent que la chaîne latérale de la lysine forme un lien électrostatique avec le résidu acide de GPR14. Ainsi, en accord avec l'étude précédente, l'hexapeptide cyclique contient donc les pharmacophores de l'UT-II. D'un autre côté, la modification des résidus cystines révèle l'importance de la présence du pont disulfure et en particulier le rôle de sa dimension. Notre étude a également souligné l'importance d'utiliser plusieurs essais en concomitance afin de réaliser une étude structure-activité valide. En effet, à titre d'exemple, les essais de la mobilisation calcique ont montré que lorsque utilisés seuls, ils peuvent engendrer des conclusions invalides.

Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Le processus de découverte d'un antagoniste est généralement ardu, parce qu'il implique la synthèse d'un grand nombre de composés. Or, le criblage virtuel d'une banque de composés est une approche innovatrice et rapide avec des rendements élevés. Cette approche consiste à développer un modèle tridimensionnel possédant les caractéristiques géométriques et chimiques du ligand. Par la suite, ce modèle permet de cribler virtuellement une banque de composés et de sélectionner des molécules en fonction de leur similitude avec le modèle. Dans un dernier temps, l'activité antagoniste des composés retenus est mesurée.

L'objectif initial de mon projet de recherche consistait à réaliser une étude structure-activité des résidus de l'UT-II afin de cibler les acides aminés cruciaux. Les résultats obtenus de cette étude serviront par la suite à développer le modèle pharmacophore pour le criblage virtuel. La première étape consiste à effectuer la délétion successive des acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale qui permet de délimiter la portion biologiquement active. Une fois la séquence minimale déterminée, il convient de cibler les chaînes latérales des résidus impliquées dans l'interaction ligand-récepteur. Afin de réaliser cet objectif, l'Ala-scan dans lequel on remplace successivement chaque acide aminé avec une alanine et la délétion d'un résidu sont deux approches complémentaires, qui permettent d'évaluer l'importance de la fonction chimique portée par le résidu et sa localisation.

Après avoir complété l'objectif initial, nous avons décidé de poursuivre l'étude structure-activité en portant notre attention sur l'hexapeptide cyclique. Les deux cystéines en position 5 et 10 de l'UT-II forment un pont disulfure entre elles, ce qui limite l'orientation des chaînes latérales des résidus Phe⁶, Trp⁷, Lys⁸ et Tyr⁹. Or, l'objectif suivant consistait à évaluer la contribution du pont disulfure et la dimension du cycle à l'activité biologique de l'UT-II. À cet effet, les cystéines

ont été substituées à tour de rôle par des homocystéines, qui augmentent la grandeur du pont disulfure par deux carbones, et des cystéines dont la chaîne latérale est porteuse d'une fonction acétamidométhyle, empêchant ainsi la formation d'un lien covalent entre les deux acides aminés. De plus, afin d'évaluer l'hypothèse de Grieco *et al.* (2001), qui suggère la présence d'un phénomène d'oxydoréduction entre les cystéines et le récepteur, les cystéines ont été remplacées par des phénylalanines.

Suite à l'obtention des résultats de l'objectif initial, les résidus Phe⁶, Trp⁷, Lys⁸ et Tyr⁹ sont apparus essentiels à l'activité biologique de l'UT-II. L'analyse qualitative de ces résidus permet de s'apercevoir que trois résidus parmi les quatre sont aromatiques. Ainsi, nous avons évalué l'importance de l'aromaticité de ces résidus versus la charge portée. De plus, la lysine-8 de l'UT-II est soupçonnée de participer à une liaison électrostatique avec le résidu Asp-130 de GPR14. Par conséquent, la substitution de la Lys⁸ par une ornithine, qui possède un carbone de moins sur sa chaîne latérale ou par une arginine dont la basicité est de beaucoup supérieure, a généré deux analogues permettant d'établir l'importance de la charge et de la longueur de la chaîne latérale du résidu à la position 8.

Finalement, le dernier objectif consistait à déterminer si les résidus 6 à 9 forment un coude de type β . Afin d'y parvenir, la séquence des acides aminés 6 à 9 a été optimisée en fonction de la présence d'un β -turn. En se basant sur l'algorithme de Chou et Fasman, qui repose sur la fréquence d'apparition des acides aminés dans une structure secondaire, nous avons favorisé la formation d'un coude β en introduisant des résidus reconnus comme d'excellents inducteurs de coude.

Revue de la littérature

1.0 Historique

Plusieurs peptides bioactifs chez les mammifères ont été initialement identifiés à partir d'organes de poissons qui ne possèdent pas de contrepartie chez les mammifères. Cette approche, appelée phylogénique, consiste à repérer l'existence de peptides régulateurs chez les mammifères au travers d'espèces moins évoluées. Par exemple, l'urotensine I (UT-I) et l'urotensine II (UT-II) ont été isolées de l'urophyse de poisson, la stanniocalcine et le «glucagon-like peptide» (GLP-1) ont été respectivement extraits des corpuscules de Stannius et du corps de Brockman (Conlon, 2000). L'urophyse est un organe riche en composés aux actions pharmacologiques diverses. Afin de classer les nombreuses substances présentes dans l'urophyse de poisson, Bern et Lederis (1969) ont postulé l'existence d'une famille des urotensines et ils ont réparti les composés en sous-groupes en fonction de leur activité biologique chez les poissons et les mammifères. Ainsi, urotensine I signifiait tout agent hypotenseur extrait de l'urophyse agissant sur les mammifères, tandis que le terme urotensine II définissait une substance isolée de l'urophyse possédant une action constrictrice sur les muscles lisses de poisson. L'urotensine III définissait toute molécule capable d'engendrer un mouvement de Na⁺. Finalement, une substance comportant une activité hydro-osmotique était répertoriée sous le terme urotensine IV (Bern et Lederis, 1969). Évidemment, cette classification résultait du manque de pureté des extraits urophysaires, qui devaient posséder plusieurs agents actifs à la fois. Les termes urotensine I et II, vestiges de la précédente classification, sont d'usage courant et représentent deux substances distinctes.

L'urotensine I, un peptide de 31 acides aminés chez la truite, est impliquée dans la régulation de la synthèse des glucocorticoïdes, mais dont l'action principale est la vasorelaxation des muscles lisses chez les poissons (Mimassi *et al.*, 2000). À ce jour, plusieurs chercheurs suggèrent, en se basant sur la similitude structurale entre l'urotensine I et le facteur de libération de la

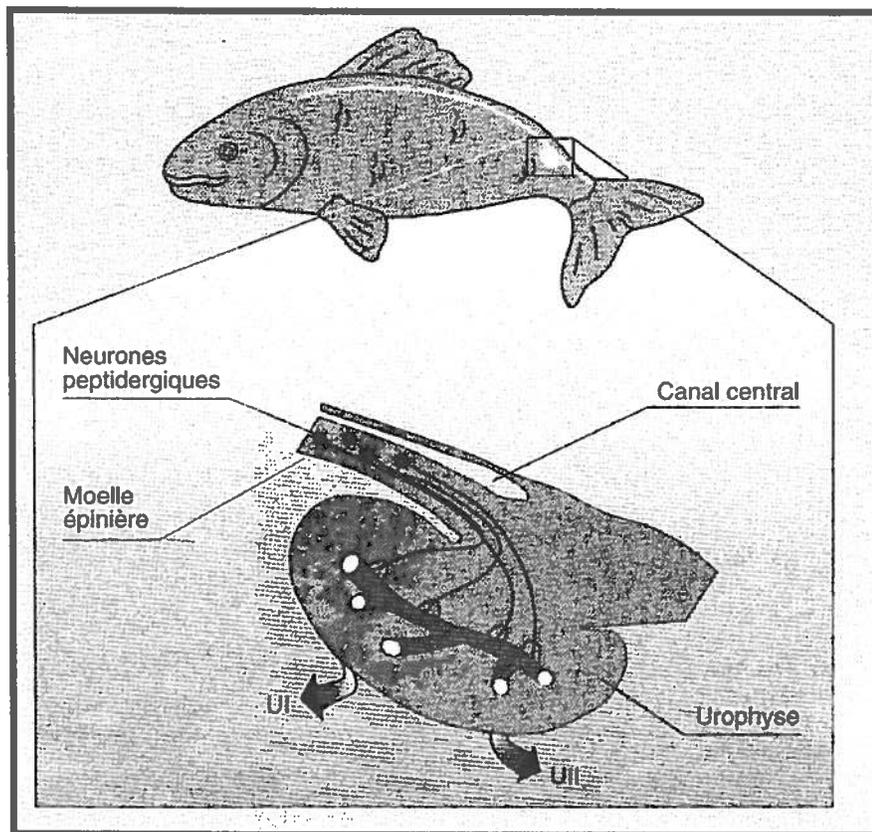


Figure 1 : La plupart des espèces de poissons possèdent une population unique de cellules neurosécrétrices localisées dans la région postérieure de la moelle épinière, appelée le système neurosécréteur caudal. Ce système comprend les cellules de Dahlgren dont les axones non-myélinisés forment un réseau se terminant dans une région sécrétoire diffuse pour les élasmobranches et les chondrostéens ou dans un organe neurohumoral pour les téléostéens, identifié comme l'urophyse (Bern *et al.*, 1985). Figure extraite de Vaudry *et al.*, 2000.

corticotropine, que ce dernier serait l'homologue de l'urotensine I chez les mammifères (Conlon, 2000).

Outre la similitude étymologique, les urotensines I et II ne partagent aucune ressemblance tant au niveau de leurs fonctions biologiques que de leur structure primaire. L'urotensine II a été isolée pour la première fois à partir de l'uropyge de *Gillichthys mirabilis*, le gobie, un petit poisson de la famille Gobiidae (Pearson *et al.*, 1980). Ce poisson téléostéen possède une série de neurones neurosécréteurs, à l'extrémité de la moelle épinière, dont les axones sont projetés dans un organe richement vascularisé, l'uropyge (figure 1). Durant de nombreuses années l'urotensine II a été considérée comme un produit exclusif aux poissons téléostéens, mais des études subséquentes ont révélé l'existence de ce peptide au travers d'espèces de poisson plus anciennes démontrant une vaste distribution parmi les ostéichthyens. Ainsi, différentes formes structurales ont été découvertes chez d'autres espèces de poisson dont le «white sucker», *Castostomus commersoni*, la carpe, *Cyprinus carpio*, le flet, *Platichthys flesus*, la roussette, *Scyliorhinus canicula*, la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, etc. (Conlon *et al.*, 1992). De plus, la purification de l'urotensine II à partir du cerveau de *Lampetra fluviatilis* et de *Petromyzon marinus* suggère que l'urotensine II a probablement été incorporée tôt dans l'évolution du système neurophysiologique des vertébrés (Waugh *et al.*, 1995).

1.1 Le rôle physiologique de l'UT-II chez les poissons

Composée de 12 acides aminés, l'UT-II de gobie (GUT-II) possède un pont disulfure entre les résidus 6 et 11 et est sécrétée suite à la stimulation des neurones peptidergiques. Toutefois, le rôle physiologique de l'UT-II chez les poissons reste encore nébuleux à ce jour. *Grosso modo*, l'UT-II est un peptide multifonctionnel qui agit principalement sur les muscles lisses. Ainsi, l'injection de GUT-II chez la roussette, un poisson, engendre une puissante réponse hypertensive et provoque la contraction des artères branchiales (Hazon, Bjening

et Conlon, 1993). L'urotensine II possède aussi une action spasmogène sur les muscles lisses non-vasculaires de poisson, tels ceux de l'urètre et du rectum de truite (Lederis, 1970; Zelnik et Lederis, 1973), de l'oviducte (Bern *et al.*, 1985) et des canaux spermatiques de gobie (Berlind, 1972). En fait, l'ensemble du système intestinal est très sensible à l'UT-II, et par conséquent, on a longtemps utilisé le rectum de truite comme modèle biologique pour la mesure de contractions. Dernièrement, l'UT-II est un agent régulateur des fonctions endocrines et métaboliques, dont la stéroïdogénèse, la lipolyse et le relargage de prolactine (Conlon, 2000).

Plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant afin d'expliquer le rôle physiologique de l'urotensine II. L'hypothèse la plus convaincante, mais qui toutefois ne permet pas d'englober l'ensemble des actions biologiques de l'UT-II décrites ci-dessus, est basée sur le mouvement d'ions au travers de la membrane épithéliale et sur son action vasoconstrictrice. Ces deux actions pharmacologiques, en synergie, modifient indirectement la composition en fluide de l'organisme, suggérant que l'urotensine II participe à l'osmorégulation. De plus, cette hypothèse est supportée par le drainage direct des produits de l'uropyse dans le système veineux rénal-portal assurant ainsi l'acheminement direct de l'urotensine II aux reins, un organe majeur de l'osmorégulation (Bern, 1985).

1.2 L'UT-II: un puissant vasoconstricteur

L'action myorelaxante de l'GUT-II sur le muscle anococcygéen de la souris indique que ses effets ne se limitent pas seulement aux poissons, mais également aux mammifères (Gibson *et al.*, 1984). Similairement, GUT-II est aussi un puissant agent vasoconstricteur de l'aorte de lapin (Gibson *et al.*, 1984). Toutefois, son action la plus surprenante chez les mammifères se produit sur l'aorte thoracique proximale de rat, où l'UT-II induit une puissante constriction. En fait, l'urotensine II de gobie est à ce jour le plus puissant agent vasoconstricteur

chez les mammifères et l'aorte thoracique de rat est le tissu vasculaire de référence pour démontrer cet effet (Itoh *et al.*, 1986).

Son action vasoconstrictrice sur l'aorte de rat est la résultante des composantes toniques et phasiques (figure 2). À de faibles concentrations de GUT-II, on observe une augmentation stable et régulière du tonus (composante tonique), tandis qu'à des concentrations plus élevées, une forte contraction se développe rapidement accompagnée d'un mouvement d'oscillation (composante phasique). Par conséquent, l'intervalle entre le EC₅₀, concentration où l'on observe 50% de la contraction maximale, et la concentration à laquelle la contraction est maximale est très petit (figure 3) (Gibson *et al.*, 1987). L'utilisation de la nitrendipine, un agent bloqueur des canaux calciques voltage-dépendant, réduit de façon importante la constriction induite par l'ajout d'UT-II. L'ajout de nitrendipine inhibe complètement la composante phasique (Gibson *et al.*, 1988). Par contre, la composante tonique est partiellement inhibée par ce même agent (Rossowski *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent fortement que la composante phasique implique l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendant. Cependant, la composante tonique ne semble pas uniquement être médiée par l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendant. D'un autre côté, l'absence de Ca²⁺ dans le milieu physiologique bloque la composante phasique, tandis que l'ajout d'EGTA inhibe les deux composantes de la contraction empêchant la vasoconstriction de l'aorte de rat. Bref, l'action vasoconstrictrice de l'urotensine II de gobie serait médiée par l'entrée massive de calcium extracellulaire et la libération de calcium intracellulaire (Gibson *et al.*, 1987; Rossowski *et al.*, 2002).

Cependant, *in vivo*, l'action de l'urotensine II se complexifie. Contrairement à son action vasoconstrictrice sur l'aorte de rat, l'UT-II est un agent hypotenseur. En effet, suite à l'injection intrapéritonéale de GUT-II, on observe une baisse importante de la pression diastolique suivie d'un réflexe de tachycardie sans toutefois modifier la pression systolique (Gibson *et al.*, 1986). Comme il sera

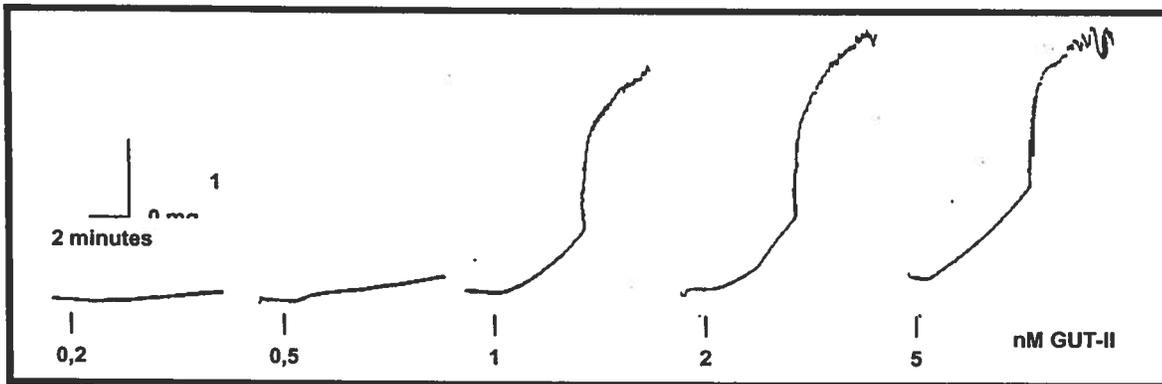


Figure 2 : Courbe concentration-réponse non cumulative de l'UT-II sur un segment d'aorte thoracique de rat. De 0,2 à 0,5 nM, l'injection de GUT-II génère une contraction faible et régulière, tandis qu'à des concentrations de 1, 2 et 5 nM de GUT-II, la contraction engendrée produit des oscillations. Ces dernières sont également présentes dans les courbes concentration-réponse cumulatives. Figure extraite et modifiée de Gibson, 1987.

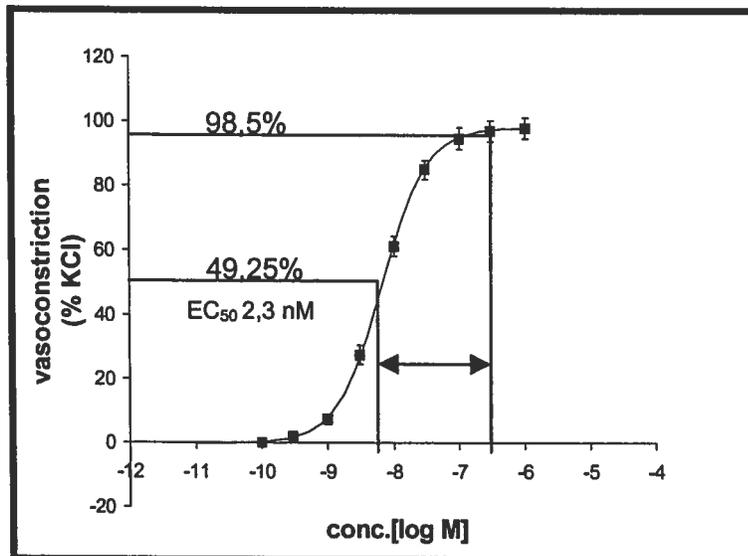


Figure 3 : Courbe concentration-réponse cumulative de l'hUT-II sur l'aorte thoracique de rat (n=9). La réponse obtenue est normalisée en fonction de la contraction obtenue avec 80 mM de KCl.

expliqué, l'UT-II possède une puissante action vasodilatatrice sur certains lits vasculaires du rat.

L'action de l'UT-II sur le rat a été un point tournant dans la recherche sur l'urotensine II. Ce peptide isolé à partir d'un organe de poisson possédait une puissante action sur un mammifère. Jusqu'à ce jour, on croyait que l'activité biologique de l'urotensine II était limitée au poisson, mais les résultats obtenus à partir du rat venaient s'opposer à cette hypothèse et, sans pouvoir le confirmer, introduisait la possibilité de l'existence de l'urotensine II chez les mammifères. Durant cette même période, l'urotensine II a été isolée et caractérisée à partir du mollusque, *Aplysia californica* (Gonzales *et al.*,1992) et de la grenouille verte d'Europe, *Rana ridibunda* (Conlon *et al.*,1992).

Tableau I : Structure primaire de l'UT-II chez différentes espèces animales.

| ESPÈCES | SÉQUENCE ¹ | ESPÈCES | SÉQUENCE ¹ |
|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| humain | ETPD-CFWKYCV | carpe B ² | GGNTTE-CFWKYCV |
| grenouille | AGNLSE-CFWKYCV | carpe C ² | GSNTE-CFWKYCV |
| porc A ² | GTPSE-CFWKYCV | carpe D ² | GNGAD-CFWKYCI |
| porc B ² | GPPSE-CFWKYCV | flet | GNTTE-CFWKYCV |
| rat | QHGTAPE-CFWKYCI | esturgeon | GSTSE-CFWKYCV |
| souris | QHGAPE-CFWKYCI | «Skate» | NNFSD-CFWKYCV |
| gobie | HGTAD-CFWKYCV | «Paddlefish» | GSTSE-CFWKYCV |
| truite | GGNSE-CFWKYCV | roussette | NNFSD-CFWKYCV |
| sangsue A ² | GSGAE-CFWKYCV | <i>Petromyzon</i> | NNFSD-CFWKYCV |
| sangsue B ² | GSGTE-CFWKYCV | <i>Lampetra</i> | NNFSD-CFWKYCV |
| carpe A ² | GNGAD-CFWKYCV | | |

¹(Conlon, 2000)

² Chez le porc, la sangsue et la carpe, il existe plusieurs formes de l'urotensine II.

Similairement à l'action biologique de l'urotensine II chez les poissons, l'UT-II de grenouille provoque la contraction de certains muscles lisses de la grenouille et produit un effet spasmodique sur l'urètre et l'iléum. De plus, chez la grenouille, l'injection intraartérielle d'UT-II entraîne une chute rapide et soutenue du débit cardiaque accompagnée d'une augmentation de la résistance vasculaire produisant ainsi aucun changement au niveau de la pression artérielle (Yano *et al.*, 1995).

1.3 Découverte de l'urotensine II humaine

En 1998, la découverte fortuite d'une sonde exprimée dans le GenBank EST (expressed sequence tag) a permis de démontrer pour la première fois l'existence de l'urotensine II chez l'humain. Cette sonde possède des similarités avec l'UT-II de grenouille et dérive d'une librairie d'ADNc construite à partir d'une tumeur de côlon. Une amorce a été déduite à partir de la EST et celle-ci a servi de point de départ à une réaction de RT-PCR produisant une séquence de 269-pb provenant de la tumeur de côlon. Cette séquence radioactive pouvait maintenant servir à hybrider l'ARN poly(A) d'une série de 50 tissus humains. C'est l'ARN de la moelle épinière qui a montré le taux d'hybridation le plus élevé et, par conséquent, ce tissu a été utilisé pour isoler le précurseur de l'ADNc de l'urotensine II (Coulouarn *et al.*, 1998). La structure primaire déduite à partir de la prépro-hUT-II est composée de 124 acides aminés. L'organisation de la séquence déduite de l'urotensine II humaine est similaire à celle observée chez la grenouille et la carpe, *i.e.* tous les précurseurs sont composés d'un peptide signal en N-terminal, d'un peptide encadré au niveau de la portion N-terminale, d'un site de clivage basique(Lys/Arg-Lys-Arg) et de la séquence de l'urotensine II localisée dans l'extrémité C-terminale de chaque précurseur (figure 4) (Coulouarn *et al.*, 1998).

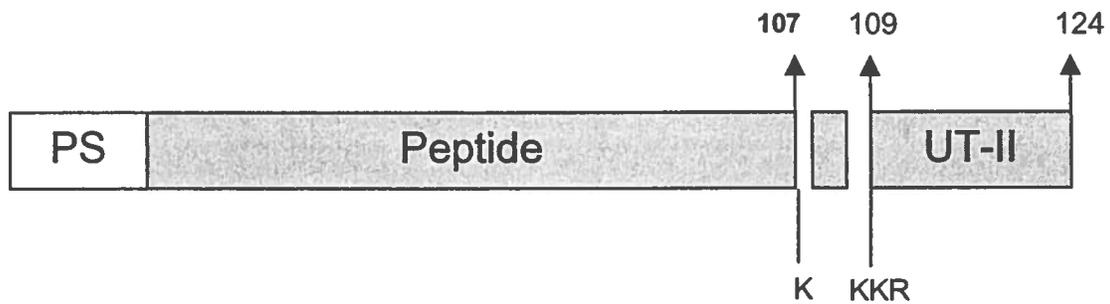


Figure 4 : Représentation schématique du précurseur de l'ADN complémentaire de l'hUT-II. La structure primaire du peptide en N-terminal varie grandement d'une espèce à l'autre, ce qui suggère que l'UT-II serait le seul peptide issu du précurseur. Le triplet d'acides aminés basiques (K, Lysine; R, Arginine) constitue un site de clivage favorable à l'action enzymatique des prohormones-convertases. PS: peptide signal. Figure extraite et modifiée de Vaudry *et al.*, 1999.

Chez l'humain, le précurseur de l'ADNc de l'hUT-II est localisé principalement dans la moelle épinière, le bulbe rachidien et à de faibles niveaux dans le rein, la rate, le petit intestin, le thymus, la prostate, la glande hypophysaire et la glande surrénale. De plus, des études complémentaires d'hybridation *in situ* utilisant un segment de moelle épinière ont démontré que l'ARN messager de l'UT-II est localisé principalement dans les motoneurones (Coulouarn *et al.*, 1998). Des études immunohistochimiques chez l'humain et le singe ont également montré la présence d'urotensine II au niveau des cardiomyocytes et d'artères coronariennes sclérosées avec une coloration marquée entre la couche des muscles lisses et la région riche en macrophage (Ames *et al.*, 1999). Évidemment, cette dernière information suggère que l'urotensine II serait impliquée dans des maladies cardiovasculaires telles que l'artériosclérose.

1.4 Le récepteur de l'UT-II humain, GPR14

Généralement, la découverte d'un nouveau peptide régulateur chez les mammifères s'inscrit dans une approche phylogénique, qui débute par l'identification d'une activité biologique associée à un extrait tissulaire autre que d'origine mammifère. Deuxièmement, on purifie et caractérise le composé actif de cet extrait. Dans un troisième temps, on localise le peptide dans les tissus humains à l'aide de techniques immunohistochimiques. Ensuite, on isole le peptide chez l'homme et on détermine son ADNc. Cinquièmement, on isole et caractérise les récepteurs du peptide. Finalement, on détermine le rôle du peptide dans la physiologie humaine (Conlon *et al.*, 2000). Grâce au projet génome humain, il a été possible de diminuer grandement le temps entre la découverte de l'UT-II chez l'humain et la découverte de son récepteur. En fait, il s'est écoulé à peine une année entre la découverte de hUT-II et son récepteur, GPR14 (Ames *et al.*, 1999). L'identification des ligands endogènes des récepteurs orphelins est un domaine de recherche où la compétition est très intense. Ainsi, à quelques mois d'intervalle, trois autres équipes de recherches ont identifié l'UT-II comme le ligand endogène de GPR14 (Mori *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999).

GPR14 est un récepteur à sept domaines transmembranaires composé de 389 acides aminés et qui possède plusieurs sites de N-glycosylation, de myristoylation et de phosphorylation (figure 5). La comparaison des structures primaires entre le récepteur humain et de rat révèle une homologie structurale de 75%. De plus, il existe une grande similarité entre le récepteur hGPR14 et les récepteurs de la somatostatine, plus particulièrement envers le récepteur SST2 qui partage 41% d'homologie avec GPR14 (Ames *et al.*, 1999). Par conséquent, les études structure-activité de la somatostatine sont des éléments pertinents pour l'analyse fonctionnelle des résidus de l'hUT-II tel que discuté dans la section analyse structure-activité de l'hUT-II.

Afin de localiser le récepteur dans l'organisme humain, le niveau d'expression de l'ARN messager du récepteur GPR14 a été mesuré dans différents homogénats tissulaires. Des taux d'expression élevés ont été détectés dans le coeur et le pancréas ainsi qu'à de plus faibles niveaux dans le thalamus, le girus occipital supérieur, la substance noire et l'urètre (Liu *et al.*, 1999). De plus, une étude quantitative de RT-PCR, qui permet de détecter des niveaux plus faibles d'ARNm, a révélé l'expression d'ARNm du récepteur GPR14 au niveau de cellules cardiaques provenant de l'oreillette et du ventricule, de cellules endothéliales originant de l'artère coronarienne et de la veine ombilicale, de cellules musculaires lisses provenant de l'aorte et de l'artère coronarienne (Ames *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que le niveau d'expression de l'ARNm du récepteur ne varie pas entre un vaisseau sanguin sain et un atteint d'artériosclérose, contrairement au taux d'UT-II qui semble augmenter dans les tissus sclérosés (Ames *et al.*, 1999).

Une étude de liaison utilisant de l' $[^{125}\text{I}]\text{-hUT-II}$ a montré que les muscles squelettiques et le cortex cérébral sont les tissus humains où la densité de récepteur est la plus élevée. Par contre, des niveaux très faibles ont été détectés dans le ventricule gauche et aucune liaison spécifique n'a été détectée au niveau des oreillettes et des vaisseaux sanguins en périphérie du coeur. Cette différence n'est pas surprenante puisque la méthode de RT-PCR utilisé par Ames *et al.* (1999) est très sensible. Chez le rat, les niveaux de radioactivité les plus élevés sont dans les ganglions dorsaux de la moelle épinière et dans les noyaux amblicus, tandis que l'aorte de rat a présenté une densité plutôt faible (figure 6) (Maguire *et al.*, 2000).

En gardant à l'esprit que l'UT-II est le plus puissant vasoconstricteur de l'aorte de rat, la faible densité de récepteur sur l'aorte de rat signifie que le récepteur possède une très grande affinité pour l'UT-II. Des études de liaison utilisant une sonde UT-II de gobie marquée radioactivement avec de l' $[^{125}\text{I}]\text{-hUT-II}$ ont montré que GPR14 possède une constante de dissociation de $0,43 \pm 0,01$ nM

et un Bmax de $447 \pm 58 \text{ fmol.mg}^{-1}$ de protéines. Les urotensines II humaine et de gobie ont déplacé le ligand radioactif avec une affinité similaire, soit $K_i=1,99 \pm 0,23$ et $2,06 \pm 0,29 \text{ nM}$, respectivement (Ames *et al.*, 1999). Le coefficient de Hill est de $0,8 \pm 0,1$ et de $0,9 \pm 0,1$ pour l'urotensine II de gobie et humaine, respectivement. Un coefficient de Hill similaire à 1 signifie la présence d'une seule population homogène de site de liaison et donc, qu'il est peu probable d'observer une coopérativité positive ou négative entre le ligand et son récepteur (Pelmont, 1995).

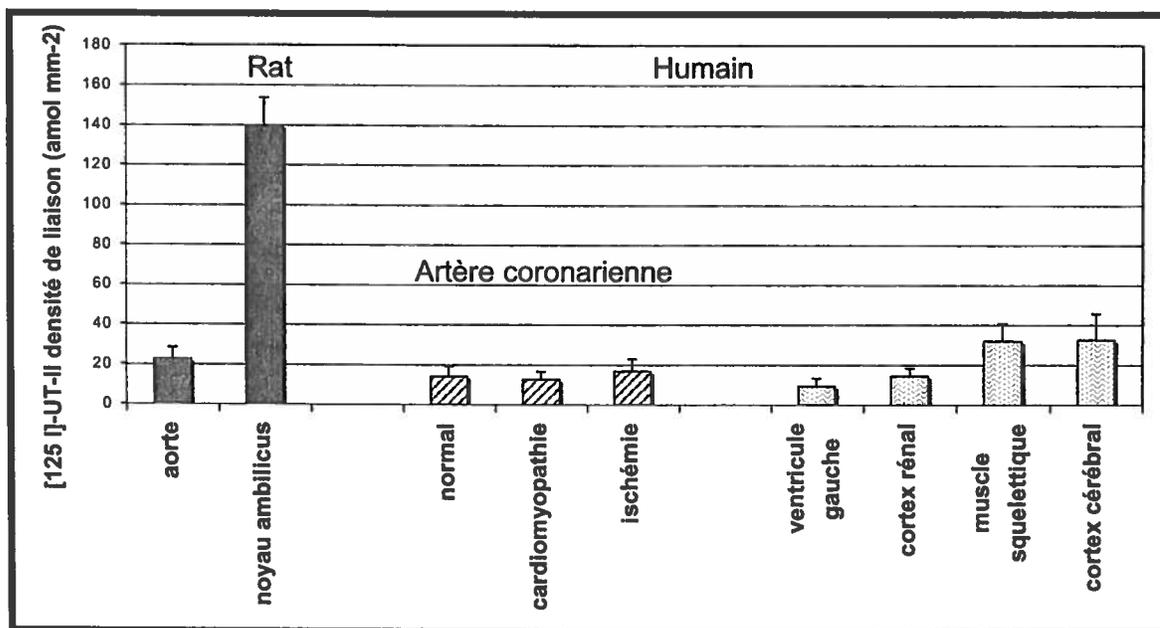


Figure 6 : Densité relative de la liaison de l' [¹²⁵I]-UT-II sur différents tissus de rat et d'humain. Figure extraite et modifiée de Ames *et al.*, 1999.

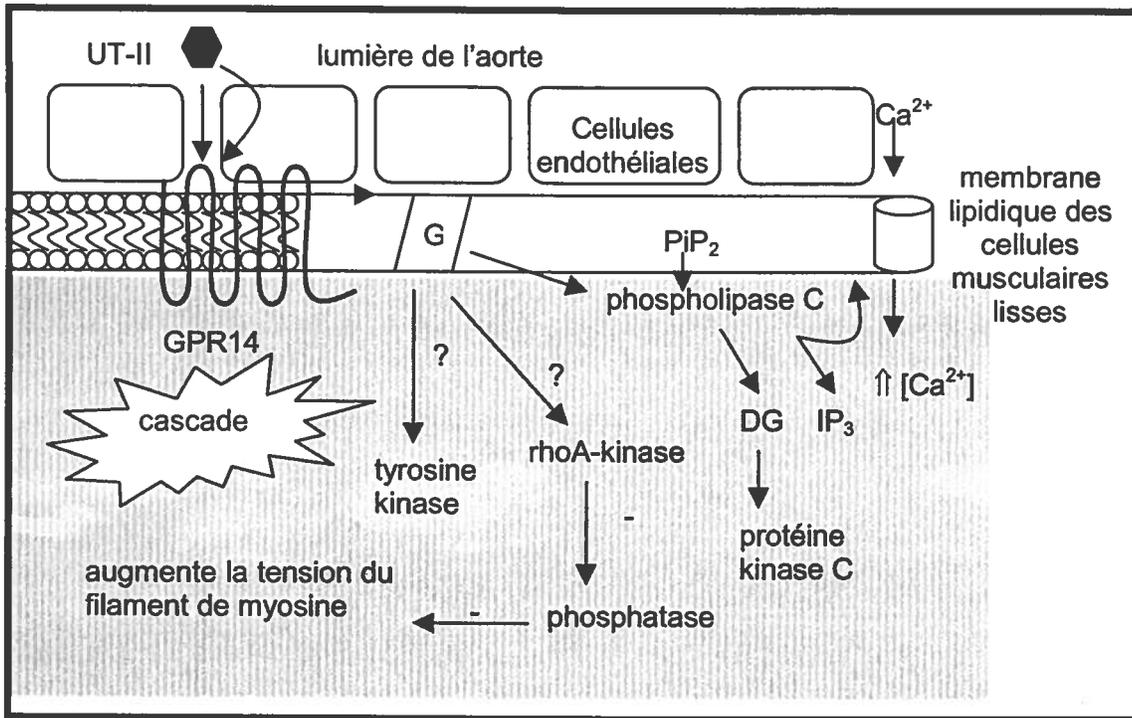


Figure 7: Éléments impliqués dans la constriction tonique de l'aorte thoracique proximale de rat induite par l'hUT-II. L'activation de GPR14 engendre une cascade aboutissant à l'augmentation de calcium intracellulaire et l'accroissement de la tension du filament de myosine. La rho-A kinase, probablement activée par la petite protéine G monomérique Rho, augmente la phosphorylation du filament de myosine en inhibant une phosphatase. PIP₂, phosphatidyl inositol phosphate, IP₃, inositol triphosphate, DG, diacylglycérol, G, protéine G trimérique.

La cascade suivant l'activation de GPR14 provoque l'entrée massive de calcium extracellulaire ainsi que la libération du calcium contenu dans les vésicules intracellulaires, ce qui cause une augmentation de 51% du calcium intracellulaire (Gibson *et al.*, 1988). Cependant, comme mentionné auparavant, l'UT-II induit une contraction avec une composante tonique et une composante phasique. Or, l'utilisation d'inhibiteurs de la cascade d'activation a révélé que la composante tonique de la contraction est médiée par le calcium, la protéine kinase C, la tyrosine kinase, la phospholipase C et la RhoA-kinase (Rossowski *et al.*, 2002). L'activation de la Rho-A kinase accroît la tension dans les filaments de myosine par l'entremise d'une phosphatase qui agit directement sur les filaments. Par contre, pour la composante phasique, le déplacement oscillatoire implique uniquement l'ouverture des canaux calciques, la cascade de la phospholipase C et de la protéine kinase C. Évidemment, plusieurs éléments de la cascade restent incomplets.

1.5 Les effets biologiques de l'UT-II chez les mammifères

Le système cardiovasculaire est modulé par la combinaison d'un contrôle neuronal direct et de l'activation de l'axe neurohumoral. Les principaux agents vasoactifs de l'axe neurohumoral sont l'angiotensine-II, l'endothéline-1 et la noradrénaline. Or, l'UT-II pourrait bientôt faire partie de cette liste. En effet, la présence du récepteur GPR14 au niveau du coeur et du réseau vasculaire implique qu'il s'agit d'organes cibles pour cette «hormone». Ainsi, la localisation du récepteur GPR14 et l'évaluation pharmacologique de l'urotensine II chez les mammifères suggèrent que l'UT-II serait impliquée dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire. Dans cette section, l'évaluation pharmacologique de l'UT-II chez les mammifères, qui présente un profil de vasoconstriction unique chez plusieurs de ces espèces, sera analysée afin d'évaluer son potentiel à moduler le système cardiovasculaire.

L'action de l'hUT-II sur le système vasculaire des mammifères est ambivalente, parfois elle engendre une puissante réponse vasoconstrictrice,

tandis que sur d'autres vaisseaux, elle est un agent vasodilatateur. Cependant, c'est son action vasoconstrictrice qui lui confère un intérêt particulier, puisque si l'UT-II est associée à une physiopathologie, le développement d'une molécule antagoniste serait un outil thérapeutique privilégié contre certaines maladies cardiovasculaires. Toutefois, l'activité vasoconstrictrice de l'UT-II varie considérablement d'une espèce à l'autre, et même, d'un vaisseau sanguin à l'autre. Afin d'évaluer les variations inter-espèces, Douglas *et al.* (2000) ont réalisé une étude exhaustive du profil vasoconstricteur de l'hUT-II, chez différents mammifères, et les principaux résultats ont été compilés dans le tableau II.

Chez le rat, les vaisseaux examinés montrent une réponse variable face à l'urotensine II et celle-ci peut se classer en quatre catégories; réfractaire (aucune vasoconstriction, ni vasodilatation n'est observée), constrictrice et dilatatrice, uniquement constrictrice ou dilatatrice (Bottrill *et al.*, 2000). De plus, l'intensité de la réponse fluctue en fonction de la présence de l'endothélium. En effet, l'action vasodilatatrice de l'hUT-II nécessite la présence de l'endothélium, tandis que l'action vasoconstrictrice sur certains tissus est soit indépendante de la présence d'endothélium ou pour d'autres tissus, atténuée en présence d'endothélium. Or, en plus de réduire au maximum la friction entre le sang et la surface interne des vaisseaux, les cellules endothéliales jouent également un rôle dans le maintien de l'homéostasie vasculaire en libérant de l'oxyde nitrique (NO) et de «l'endothelium-derived hyperpolarizing factor» (EDHF), deux agents aux capacités vasodilatatrices connues. Par conséquent, une réponse vasodilatatrice face à l'hUT-II signifie que le récepteur GPR14 est localisé en partie sur les cellules endothéliales et son activation provoque la libération de NO et/ou de EDHF. Toutefois, les mécanismes vasodilatateurs sous-jacents sont aussi variables d'un tissu à l'autre, c'est-à-dire la vasorelaxation des artères coronariennes est uniquement médiée par la libération d'oxyde nitrique (Richard *et al.*, 1994), tandis que le principal mécanisme de dilatation de l'artère mésentérique inférieure est la libération de l'EDHF (Bottrill *et al.*, 2000).

Tableau II: Profil de vasoconstriction de l'hUT-II chez différents mammifères.

| | <i>rat</i> | <i>souris</i> | <i>chien</i> | <i>porc domestique</i> | <i>singe marmoset</i> | <i>singe cynomolgus</i> |
|------------------------------|------------|---------------|--------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| tissus artériels | | | | | | |
| aorte thoracique | +++ | - | - | ±± | + | +++ |
| aorte abdominale | + | - | - | ± | ± | +++ |
| coronaire gauche circonflexe | | | +++ | - | | +++ |
| coronaire droite descendante | | | +++ | | | +++ |
| pulmonaire | | | - | ±± | | +++ |
| rénale | | | - | - | | +++ |
| mammaire | | | - | - | | +++ |
| fémorale | | | - | ± | - | +++ |
| basiliaire | | | - | | | +++ |
| carotide commune | ++ | | - | - | ± | +++ |
| mésentérique | | | - | ±± | ± | +++ |
| tissus veineux | | | | | | |
| pulmonaire | | | ± | | | ±± |
| saphène | | | - | - | | - |
| jugulaire | - | | - | | | - |

Tableau extrait et modifié de Douglas *et al.*, 2000.

Légende : +++ Réponse maximale (Rmax) > 75% de la réponse obtenue avec 60 mM de KCl
 ++ Rmax entre 25% et 75% de la réponse obtenue avec 60 mM de KCl
 + Rmax < 25% de la réponse obtenue avec 60 mM de KCl
 ±± Dilation et contraction > 25% de la réponse obtenue avec 60 mM de KCl
 ± Dilation et contraction < 25% de la réponse obtenue avec 60 mM de KCl
 - Aucune réponse

Tableau III: Classification des réponses *in vitro* observées à partir de segments vasculaires de rat en présence d'urotensine II humaine.

| Réponse | Tissus | Efficacité de l'hUT-II | Endothélium |
|---|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| réfractaire | aorte abdominale | - | indépendant |
| dilatatrice ¹ | artère mésentérique inférieure | +++ | dépendant |
| constrictrice | aorte thoracique | +++ | indépendant |
| constrictrice et dilatatrice ¹ | artère coronarienne gauche | ++ constrictrice ++ dilatatrice | amplifiée sans endothélium dépendant |

Tableau extrait et modifié de Douglas *et al.*, 2000.

¹ Afin d'exhiber l'action vasodilatatrice de l'urotensine II humaine, ces segments ont été précontractés par l'ajout de 5-hydroxytryptamine.

L'importante variation observée entre les préparations tissulaires *in vitro* chez le rat face à l'hUT-II signifie d'une part qu'il est impossible de prédire l'action prédominante pour un tissu et que d'autre part, les études *in vivo* sont absolument nécessaires afin d'établir l'action vasculaire globale de ce peptide. En effet, malgré la puissante activité vasoconstrictrice de l'UT-II sur l'aorte thoracique de rat, *in vivo*, ce peptide est un puissant hypotenseur. L'urotensine II induit une vasodilatation dose-dépendante de la région mésentérique et des lits capillaires du bassin ainsi qu'une tachycardie résultant probablement de l'activation des barorécepteurs (Gardiner *et al.*, 2001). En gardant à l'esprit que l'action vasodilatatrice de l'urotensine II sur l'artère mésentérique inférieure est médiée par l'endothélium et que l'hUT-II est un agent hypotenseur chez le rat *in vivo*, l'endothélium vasculaire est probablement un élément clé dans la réponse systémique face à l'urotensine II humaine.

Non seulement l'action de l'hUT-II varie en fonction de la préparation tissulaire, mais il existe une très grande variabilité inter-espèce. Le profil de

vasoconstriction de l'hUT-II démontre des fluctuations même entre deux espèces aussi proches que la souris et le rat. Malgré la présence d'UT-II endogène chez la souris, les segments aortiques de la souris sont réfractaires à l'ajout de l'hUT-II, tandis que l'hUT-II est un puissant vasoconstricteur de l'aorte thoracique de rat. Évidemment, ces variations compliquent l'établissement d'un modèle expérimental animal fiable. De plus, cette différence entre espèce est encore plus significative pour le chien (*Beagle*) qui démontre un profil de vasoconstriction unique. L'UT-II humaine agit sélectivement sur les artères coronaires gauches circonflexes et descendantes. Aucun des autres tissus tant artériels que veineux n'a réagi à l'hUT-II. De plus, entre les chiens, l'efficacité de la réponse obtenue est disparate d'un individu à l'autre. Par exemple, au niveau de l'artère coronaire gauche descendante, l'efficacité maximale chez un individu correspondait à 81% de la contraction obtenue avec 60 mM de KCl, tandis que pour un autre, l'efficacité maximale était de 409%. Cette variabilité intra-espèce est également présente chez le porc commun, mais à un autre niveau. L'UT-II humaine s'est avérée un puissant agent spasmogène de l'aorte thoracique, mais uniquement 50% des aortes de porcs ont répondu à l'hUT-II (Douglas *et al.*, 2000).

À l'opposé, chez le singe cynomolgus, un primate apparenté à l'homme, la variabilité inter-individu est négligeable. De plus, le profil de vasoconstriction de l'urotensine II est unique chez le singe puisque tous les vaisseaux artériels testés répondaient à l'hUT-II, tandis que les tissus veineux testés étaient réfractaires. Chez l'humain, la distribution du récepteur semble limitée aux vaisseaux artériels, ce qui suggère un profil de vasoconstriction similaire à celui du singe cynomolgus (Ames *et al.*, 1999). Par contre, chez le singe marmoset, une espèce plus éloignée de l'humain, l'action de l'hUT-II est plus sélective, puisque seulement l'aorte thoracique a réagi avec une contraction maximale de $18.9 \pm 5.2\%$ (Douglas *et al.*, 2000). Toutefois, les résultats d'une étude *in vivo* réalisée chez le singe anesthésié se sont avérés encore plus surprenants. L'injection intraveineuse d'une faible dose d'urotensine II humaine chez le singe a induit une forte vasoconstriction périphérique associée à une réduction marquée de la

contractilité cardiaque conduisant à la mort des animaux. L'administration intraveineuse de l'hUT-II produit un électrocardiogramme typique qui rappelle celui observé chez un patient atteint d'une ischémie du myocarde. La capacité d'augmenter la résistance périphérique en concomitance avec un dérèglement de la contractilité du myocarde distingue l'UT-II des autres peptides vasoactifs. Par exemple, chez le singe, l'injection intraveineuse d'ET-1 cause une augmentation de la pression contrairement à l'hUT-II qui ne provoque pas d'augmentation de la pression malgré un accroissement de 300% de la résistance périphérique (Ames *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2000).

Généralement, après avoir éliminé un peptide vasoconstricteur des baigns par des lavages, le temps nécessaire pour atteindre le tonus basal est inférieur à une heure. Toutefois, suite à l'ajout de l'hUT-II, le retour au tonus initial pour l'aorte thoracique et la carotide de singe cynomolgus requiert un temps minimal de 6 heures. La présence d'une sous-classe de récepteur de l'UT-II ou l'internalisation du récepteur avec le ligand expliquerait ce phénomène. Toutefois, ces hypothèses nécessitent d'être approfondies (Douglas *et al.*, 2000). Bref, l'analyse pharmacologique de l'hUT-II permet de conclure qu'il existe d'importantes différences intra-/inter-espèces. Les mécanismes sous-jacents à ces variations sont encore inconnus, mais ces variations ne semblent pas être le reflet de l'utilisation de l'hUT-II sur des tissus non humains, puisque comme discuté précédemment, les urotensines II de gobie et humaine possèdent approximativement la même affinité envers le récepteur humain GPR14 (Ames *et al.*, 1999). Deuxièmement, des études de structure-activité ont démontré que le segment (D/E[CFWKYC]V/I), une séquence invariable parmi toutes les isoformes de l'UT-II, est la séquence minimale afin de conserver l'activité totale sur l'aorte de rat (Itoh *et al.*, 1987).

Diverses explications peuvent être envisagées afin d'éclaircir ces différences régionales, individuelles et inter-espèces. Premièrement, il se peut que certaines espèces n'expriment que faiblement ou tout simplement pas du

tout le récepteur de l'urotensine II. Comme démontré par Itoh *et al.* (1987), de modestes changements dans la densité de récepteur affectent grandement la capacité vasoconstrictrice de l'aorte de rat. Deuxièmement, il est plausible que la population de récepteur soit dans un état réfractaire occasionné par la liaison *in situ* de l'UT-II. Cette liaison pseudo-irréversible posséderait une vitesse de dissociation très lente empêchant la liaison de l'UT-II exogène. Comme déjà mentionné, certains vaisseaux de primate requièrent de 6 à 8 heures afin de retourner au tonus basal suite à l'injection de l'hUT-II, appuyant ainsi l'hypothèse d'une liaison pseudo-irréversible pour certains lits vasculaires. De plus, l'occupation des récepteurs pourrait constituer un contrôle physiologique qui modulerait le potentiel de l'hUT-II à réguler le système vasculaire. Ainsi, ce mécanisme serait un outil de contrôle très utile afin de minimiser l'effet chronique de l'UT-II (Douglas *et al.*, 2000). Évidemment, d'autres mécanismes de contrôle tels que l'internalisation du récepteur et de son ligand, la désensibilisation du récepteur et la variation des mécanismes de signalisation sont toutes des explications valables pour expliquer les différences inter-espèces ou même inter-individuelles.

Les profils de vasoconstriction décrits ci-dessus sont uniques à l'UT-II, mais d'autres peptides vasoactifs présentent également des profils uniques. L'endothéline, un peptide libéré par l'endothélium vasculaire, possède trois classes de récepteurs chez les mammifères, ET_A et ET_B (Pollock, 2000). ET_A s'avère présent dans les muscles lisses vasculaires alors que ET_B se retrouve dans une vaste gamme de tissus dont le cerveau, les poumons et les reins (Doherty, 1992). Localisés sur les cellules musculaires lisses, les récepteurs ET_A sont responsable de la vasoconstriction, tandis que les récepteurs ET_B sont situés sur l'endothélium vasculaire et une fois activés, génèrent une vasodilatation (Pollock, 2000). Ainsi, l'existence d'un seul récepteur pour l'UT-II semble insuffisante pour expliquer le nombre grandissant de ses actions pharmacologiques. À ce jour, aucun autre récepteur n'a encore été identifié, mais nul doute que nous allons bientôt être fixés sur ce sujet. Néanmoins,

indépendamment de la présence d'un ou de plusieurs récepteurs, l'analyse de l'action pharmacologique de l'UT-II chez les différentes espèces met en évidence le potentiel de l'UT-II à moduler le système cardiovasculaire. Toutefois, à ce stade, il est difficile de déterminer si la production endogène d'UT-II est capable de moduler le système cardiovasculaire ou si la surproduction d'UT-II et/ou de son récepteur provoque l'apparition de maladies cardiovasculaires (Russell *et al.*, 2001).

Chez les mammifères, l'urotensine II possède également une influence sur le système endocrinien. En fait, l'injection d'UT-II dans le pancréas de rat provoque une diminution de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans, sans toutefois modifier le niveau de glucagon ou de somatostatine (Sylvestre *et al.*, 2001). De plus, chez le rat, l'injection d'UT-II provoque l'augmentation de la sécrétion de thyrotrophine (TSH) en concomitance avec une augmentation de prolactine suggérant le relargage de thyrolibérine (TRH) par l'hypothalamus. De plus, la localisation du récepteur GPR14 au niveau de l'hypothalamus est en accord avec l'influence de l'urotensine II sur le système endocrinien (Ames *et al.*, 1999). Bref, l'UT-II possède un large spectre d'activité chez les mammifères.

1.6 Les effets biologiques de l'UT-II chez l'humain

En se basant sur l'effondrement du système cardiovasculaire des primates non humains suite à l'injection d'une faible dose d'urotensine II, certains chercheurs ont suggéré que l'UT-II serait impliquée directement dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire chez l'humain. En effet, ceux-ci ont avancé l'hypothèse que l'hUT-II participerait au contrôle de la pression artérielle et de la contractilité cardiaque (Vaudry *et al.*, 2000). Cependant, en prenant en considération les différences inter-espèces observées jusqu'à présent, l'extrapolation du singe à l'homme semble plutôt prématurée. De plus, une barrière éthique se dresse devant les essais pharmacologiques *in vivo* chez l'humain rendant difficile l'identification du rôle systémique de l'hUT-II chez

l'homme. Toutefois, il est clair que l'étude pharmacologique de l'urotensine II chez l'humain est une condition *sine qua non* à l'identification du rôle physiologique de l'UT-II.

Le groupe de MacLean et coll. (2000) a été le premier à montrer l'action constrictrice de l'hUT-II au niveau de vaisseaux sanguins humains. Cependant, cette étude est peu concluante quant au potentiel vasoconstricteur de l'UT-II chez l'humain, puisque uniquement trois des dix segments adjacents obtenus d'une artère pulmonaire ont démontré de la vasoconstriction. De plus, la présence de L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine méthylester) a été nécessaire afin d'exhiber l'action constrictrice de l'UT-II. Le L-NAME inhibe la formation d'oxyde nitrique, un agent vasodilatateur libéré par les cellules endothéliales. Les auteurs ont suggéré que l'hUT-II entraînerait la libération de NO, qui par le fait même contrecarre l'activité vasoconstrictrice de l'hUT-II. Or, cette hypothèse a été confirmée en partie par ce même groupe de recherche, *i.e.* la vasodilatation est l'action prédominante de l'UT-II sur l'artère pulmonaire. L'UT-II humaine a induit une puissante dilatation des petites artères pulmonaires précontractées avec de l'endothéline, un puissant agent vasoconstricteur (Stirrat *et al.*, 2001). Ces résultats sont surprenants, puisque non seulement la libération de NO par les cellules endothéliales masque l'activité vasoconstrictrice de l'hUT-II, mais l'hUT-II induit une vasodilatation et non pas une vasoconstriction. Ces résultats contrastent également avec ceux obtenus chez le singe cynomolgus, où tous les vaisseaux artériels testés ont démontré une activité vasoconstrictrice.

Sur d'autres vaisseaux sanguins dénudés de leur endothélium, l'hUT-II a induit une puissante vasoconstriction (Maguire, Kuc et Davenport, 2000). À titre de comparaison, l'hUT-II est 50 fois plus puissante (EC₅₀) que l'endothéline, mais son efficacité (E_{max}) est moindre que celle obtenue avec l'endothéline. Parmi les vaisseaux exhibant une activité constrictrice, deux provenaient de tissus veineux, ce qui contraste encore une fois avec les résultats obtenus chez le singe où tous les tissus veineux testés étaient réfractaires à l'UT-II (Ames *et al.*, 1999). Cette différence illustre une fois de plus les difficultés reliées à l'extrapolation entre les

espèces. En fait, jusqu'à présent, outre les résultats obtenus par Maguire *et al.* (2000), la majorité des vaisseaux sanguins humains testés *in vitro* sont réfractaires à l'hUT-II, et par conséquent, ces résultats soulèvent un doute quant à l'implication de l'UT-II dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire (Tableau IV).

Tableau IV : Résumé de l'action *in vitro* de l'urotensine II humaine sur différents vaisseaux sanguins humains.

| | action de l'hUT-II | action de l'hUT-II |
|----------------------------|-----------------------------|---|
| système artériel | tissus avec endothélium | tissus sans endothélium ou en présence de NO |
| artère coronaire | n.d. | vasoconstriction ¹ |
| artère mammaire interne | réfractaire | réfractaire |
| artère mammaire | n.d. | vasoconstriction ¹ |
| artère radiale | n.d. | vasoconstriction ¹ |
| artère abdominale | vasodilatation ¹ | réfractaire |
| artère pulmonaire | vasodilatation ² | vasoconstriction ³ |
| petite artère sous cutanée | réfractaire ⁴ | réfractaire ⁴ |
| petite artère musculaire | réfractaire ⁴ | réfractaire ⁴ |
| système veineux | tissus avec endothélium | tissus sans endothélium ou en présence de NO |
| grande veine saphène | n.d. | vasoconstriction ¹ réfractaire ⁴ |
| veine ombilicale | n.d. | vasoconstriction ¹ |
| petite veine sous-cutanée | réfractaire ⁴ | réfractaire ⁴ |

¹ (Maguire, Kuc et Davenport, 2000), ² (Stirrat *et al.*, 2001), ³ (MacLean *et al.*, 2000), ⁴ (Hillier *et al.*, 2001)

L'action de l'hUT-II sur le muscle cardiaque est un élément tout aussi crucial dans le contrôle de l'homéostasie cardiovasculaire que la modulation du système vasculaire. La présence de GPR14 au niveau du myocarde, constitué principalement de cellules musculaires cardiaques, suggère que l'UT-II agirait sur ce dernier (Ames *et al.*, 1999). Le groupe de Russell *et al.* (2001) a évalué l'effet de l'UT-II sur des préparations tissulaires cardiaques provenant d'organes sains ou atteints de cardiomyopathie. L'UT-II humaine a induit une augmentation de la force contractile de l'oreillette et du ventricule droit sans modifier le temps nécessaire afin d'obtenir la contraction maximale ou le temps requis pour atteindre 50% de la relaxation maximale. En fait, il s'agit du plus puissant agent inotrope identifié à ce jour. La puissante action de l'hUT-II sur les préparations cardiaques suggère que la moindre variation dans la production de ce peptide ou dans l'expression de son récepteur pourrait altérer sensiblement la stabilité cardiaque. En effet, une forte expression de l'UT-II a été détectée dans les cardiomyocytes, et à un plus faible degré dans les cellules endothéliales, vasculaires et inflammatoires. Selon cette même étude, la présence de l'UT-II est proportionnelle à l'état de santé du cœur. Ainsi, l'UT-II n'a pas été détectée dans le cœur des individus sains, mais dans les cœurs affectés par une maladie en phase terminale, le taux d'UT-II y étant très élevé. Par conséquent, cette étude suggère que l'UT-II soit impliquée dans les maladies cardiaques.

Les discordances observées dans les préparations *in vitro* amplifient l'importance de l'étude vasculaire de ce peptide dans une situation *in vivo*. Malgré les terrifiants résultats obtenus chez le singe, neuf jeunes hommes en santé ont subi l'injection de doses d'urotensine II humaine via l'artère brachiale. L'administration de l'hUT-II a généré une diminution dose-dépendante du débit sanguin de l'avant-bras avec un seuil à $1 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$. Les doses injectées ont produit uniquement un effet local, puisque aucun changement n'a été observé dans le rythme cardiaque ou dans le débit sanguin de l'autre avant-bras (Böhm et Pernow, 2002). Toutefois, ce casse-tête initié par les études *in vitro* se complexifie davantage avec l'étude pharmacologique de ce peptide *in vivo* chez

l'humain, puisqu'une autre équipe, selon les mêmes conditions expérimentales (n=4), a démontré que l'UT-II ne possédait aucune action sur le débit sanguin de l'avant-bras et ce, en présence d'une infusion simultanée de NO. Ainsi, chacune des deux études *in vivo* appuie une partie des études *in vitro*, mais elles ne permettent pas de conclure quant au rôle physiologique de l'UT-II dans l'organisme humain. Cette disparité entre les résultats *in vivo* introduit la possibilité d'une très grande variation entre les humains testés comme initialement observée chez les autres espèces. Par conséquent, l'usage d'outils pharmacologiques, comme par exemple un antagoniste, doit être envisagé afin d'élucider le rôle de l'UT-II dans la physiologie humaine.

1.7 Hypothèses sur le mode d'action de l'UT-II

Une question fondamentale persiste toujours, comment l'hUT-II interagit avec son récepteur localisé sur les organes périphériques? Le fait que l'urotensine II soit essentiellement synthétisée au niveau des motoneurones alors que ses récepteurs sont localisés en périphérie constitue un véritable paradoxe. La controverse entourant l'UT-II s'étend également à son mode d'action, où deux hypothèses s'affrontent. La première suppose que l'hUT-II est une hormone, tandis que la seconde entrevoit plutôt un rôle de neuromodulateur et/ou neurotransmetteur. La première hypothèse décrit l'urotensine II comme une hormone circulante sécrétée dans le plasma à de faible taux se liant à son récepteur en périphérie. Ainsi, l'urotensine II agirait au même titre que l'endothéline, l'angiotensine II et la noradrénaline. Cette hypothèse est supportée par son profil de vasoconstriction, qui en plus d'être diversifié, présente une action systémique qui semble nécessiter la libération d'UT-II dans le plasma. Toutefois, la source d'urotensine II ou le lieu d'excrétion est obscur. Une étude d'immunolocalisation de l'UT-II réalisée par Ames et ses collègues (1999) a ciblé de manière diffuse le coeur et les conduits sanguins périphériques, tandis qu'aucune détection d'ARNm de l'UT-II n'a été observée dans des homogénats de tissus périphériques, incluant le coeur et l'aorte, par une analyse de type «dot-

blot». Utilisant des techniques similaires, Nothacker *et al.* (1999) ont obtenu des résultats similaires, à l'exception du rein où la présence de prépro ARNm a été détectée en grande quantité. Contrairement aux résultats précédents, Coulouarn *et al.* (1998) ont observé une distribution importante du précurseur de l'ARNm de l'UT-II dans plusieurs organes périphériques, incluant les surrénales, les reins et la rate. Ainsi, il y a divergence en fonction de la molécule étudiée. Néanmoins, parmi les sites de sécrétion envisageables, le rein est le seul site où l'expression de l'ARNm a été détectée en grande quantité. De plus, l'UT-II a été détectée dans l'urine de 42 individus (Matsushita *et al.*, 2002).

Généralement, les protéines endogènes de faible poids moléculaire ou les polypeptides excrétés dans l'urine sont considérés comme des molécules ayant échappées à la filtration glomérulaire ou ayant été sécrétées par les cellules tubulaires dans le lumen. Ainsi, une clairance urinaire de l'UT-II, supérieure à la filtration glomérulaire, signifierait une origine tubulaire pour ce peptide. Or, la clairance urinaire de l'UT-II excède légèrement celle de la créatine en assumant que la concentration plasmatique de l'UT-II est égale à 50 pg/ml. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'UT-II serait sécrétée au niveau tubulaire et réabsorbée plus loin dans la région distale du tubule rénal (Matsushita *et al.*, 2002). Les cellules du tubule rénal synthétisent et sécrètent plusieurs autres peptides vasoactifs, dont l'endothéline-1 (Ohta *et al.*, 1991), l'adrénomédulline (Sato *et al.*, 1998), l'ANP (atrial natriuretic peptide) (Marumo *et al.*, 1986), etc. De plus, les cellules LLCPK1, une lignée porcine de cellules épithéliales provenant du rein, sécrètent une quantité significative d'UT-II dans le milieu de culture (Matsushita *et al.*, 2002). Bref, ces éléments suggèrent que le site majeur de synthèse et de sécrétion d'UT-II serait le rein. Toutefois, il serait important de déterminer le taux de libération d'UT-II de la part du rein, un élément important de cette hypothèse.

En effet, cette information est cruciale, puisque, chez l'humain, l'utilisation d'un RIA (radioimmunoassay) spécifique à l'hUT-II n'a pas permis la détection de l'urotensine II dans le plasma indiquant ainsi que la concentration est inférieure à

50 pg/ml. Chez le poisson *Catostomus commersoni*, le taux d'UT-II dans le plasma est très faible, soit 30 pM (Kobayashi *et al.*, 1986). Or, il est probable que la faible concentration de l'hUT-II dans le plasma humain empêche sa détection. De plus, il est également possible que l'UT-II soit rapidement dégradée par les protéases du plasma ou bien que l'UT-II circule dans le plasma sous un précurseur plus volumineux et/ou sous une forme liée empêchant sa détection par un anticorps. Ceci expliquerait la détection de prépro-hUT-II dans plusieurs organes périphériques. Toutefois, avant de se perdre en conjectures, il conviendra de déterminer si l'UT-II agit bel et bien à titre d'hormone circulante, puisque certaines études suggèrent que l'UT-II serait plutôt une hormone paracrine et/ou autocrine.

En effet, Coulouarn *et al.* (1998) ont démontré la présence de préproUT-II dans plusieurs tissus périphériques tels que les glandes surrénales, les reins et la rate. Ainsi, la présence de préproUT-II dans les tissus périphériques suggère que l'UT-II serait synthétisée et sécrétée localement. Une étude portant sur l'exposition de rats à une hypoxie chronique semble confirmer cette hypothèse. Après une période de quatre semaines, les rats ont développé une hypertension pulmonaire et une hypertrophie du ventricule droit occasionnant une augmentation de 98% de l'UT-II dans l'oreillette gauche et de 33% dans le ventricule gauche, mais la concentration plasmatique d'UT-II est demeurée inchangée. Ainsi, la stabilité de la concentration plasmatique de l'UT-II malgré l'augmentation de la quantité d'UT-II dans le coeur suggère que l'UT-II agirait à titre d'hormone paracrine ou autocrine, plutôt qu'à titre d'hormone circulante (Zhang *et al.*, 2002).

La deuxième hypothèse, qui englobe plus adéquatement le spectre d'activités de l'hUT-II, repose sur une série d'évidences directes et indirectes. Premièrement, chez l'humain, l'ARNm de l'UT-II est exprimé majoritairement dans la moelle épinière et dans le tronc cérébral (Coulouarn *et al.*, 1998). De plus, chez la grenouille, l'UT-II a été caractérisée à partir d'extraits provenant de

la moelle épinière, indiquant par conséquent l'existence d'un processus de transcription et de maturation de l'UT-II propre à la moelle (Coulouarn *et al.*, 1999). Deuxièmement, des études d'immunolocalisation à partir de coupes transversales du tronc cérébral de rat ont localisé la présence de l'UT-II dans les noyaux trochléaires, trijumeaux, oculomoteurs externes, faciaux et moteurs dorsaux du nerf vague (Dun *et al.*, 2001). Chacun de ces noyaux, à l'exception du noyau du nerf vague, contient le corps cellulaire de neurones moteurs dont les terminaisons nerveuses innervent les muscles oculaires et faciaux, tandis que les nerfs vagues sont les seuls nerfs crâniens à s'étendre au-delà de la tête et du cou. La majorité des neurofibres motrices des nerfs vagues sont des efférents du parasympathique et par conséquent, ils régulent la fréquence cardiaque, la respiration et l'activité digestive. Troisièmement, une étude d'hybridation *in situ* de la moelle épinière de rat et d'humain a permis de cibler les neurones moteurs des cornes antérieures et latérales de la moelle épinière (Dun *et al.*, 2001). Les cornes latérales de la moelle épinière renferment les neurones moteurs du système nerveux autonome qui desservent les muscles lisses des viscères, le muscle cardiaque et les glandes (Marieb, 1993). Bref, la présence de l'UT-II dans le noyau du nerf vague et dans la corne latérale de la moelle épinière, deux composantes du système nerveux modulant l'homéostasie cardiovasculaire, appuie l'hypothèse voulant que l'UT-II soit un modulateur et/ou un neurotransmetteur du système nerveux et corrobore ses actions biologiques. Ainsi, l'urotensine II voyagerait le long de l'axone jusqu'à la synapse où elle induirait son action biologique en fonction de la présence de son récepteur.

Bien que plusieurs neuropeptides soient présents dans les motoneurones au cours de l'ontogénèse, l'expression de tous les peptides, à l'exception du CGRP (calcitonin gene-related peptide), s'arrête aux alentours de la naissance. L'urotensine II est le deuxième peptide à avoir été identifié dans les motoneurones tant au niveau du fœtus que de l'adulte. L'ARNm de l'UT-II a été détecté et localisé à l'extrémité caudale de la moelle épinière d'un embryon de rat âgé de dix jours. C'est précisément au dixième jour du développement

embryonnaire que les neurones entreprennent leur dernière mitose tout juste avant la différenciation motoneuronale (Phelps *et al.*, 1988). Il est plausible d'associer l'apparition de l'ARNm de l'UT-II avec la différenciation neuronale, mais le confinement de la molécule dans l'extrémité caudale, la région sacrée de la moelle épinière, suggère un rôle plus tardif dans le parachèvement du système nerveux. Après la différenciation neuronale, les neuroblastes forment des synapses chimiques entre elles et les neuroblastes qui n'ont pu établir les contacts synaptiques appropriés ou participer à la circulation des influx nerveux s'engagent dans une phase de mort cellulaire programmée qui débute à partir de l'extrémité rostrale vers l'extrémité caudale. Ainsi, la localisation spécifique de l'UT-II dans la partie sacrée suggère que l'UT-II serait impliquée dans la mort ou la survie des motoneurones de la portion sacrée. De plus, ce rôle additionnel pour l'urotensine II supporte des résultats surprenants concernant la mort ou la survie des neurones. Par exemple, la mort cellulaire programmée induit la perte approximative de 50% des neurones, tandis que ce taux atteint les 90% dans la portion sacrée, où est précisément localisée l'UT-II (Oppenheim *et al.*, 1989).

Outre la présence du CGRP et de l'UT-II dans les motoneurones des vertébrés adultes, ces deux neuropeptides partagent d'autres ressemblances. Chez l'humain, le récepteur CGRP₁ du CGRP et le récepteur GPR14 de l'UT-II sont tous les deux localisés au niveau des tissus cardiaques, cérébraux et vasculaires (Aiyar *et al.*, 1996; Ames *et al.*, 1999). L'activité biologique du CGRP est très diversifiée et inclue une vasodilatation des vaisseaux cérébraux et périphériques, une accélération du rythme cardiaque, la régulation du métabolisme du calcium, une réduction de la motilité intestinale, la régulation du métabolisme du glucose, une diminution de l'appétit et une diminution de la libération de l'hormone de croissance (Aiyar *et al.*, 1996). Comme mentionné ci-dessus, l'ARNm de l'UT-II a été détecté dans plusieurs motoneurones de la moelle épinière de rat. Étonnamment, suite à l'utilisation d'un deuxième marqueur spécifique à l'acétylcholine, la majorité des neurones moteurs déjà identifiés ont réagi positivement au marqueur de l'acétylcholine. Ainsi, il semble

que l'UT-II soit exclusivement contenue dans les neurones cholinergiques (Dun *et al.*, 2001). Or, il a été démontré que le CGRP est lui aussi contenu dans les neurones cholinergiques de la jonction neuromusculaire. Le CGRP est libéré dans la fente synaptique et agit tant sur le neurone présynaptique que sur le neurone postsynaptique. Au niveau présynaptique, il augmente la libération de l'acétylcholine, tandis que sur la membrane postsynaptique, il accroît le nombre de sous-unité α du récepteur nicotinique, reconnue pour être la seule sous-unité capable de lier l'acétylcholine. Ainsi, similairement au CGRP, l'hUT-II pourrait agir à titre de neuromodulateur à la jonction neuromusculaire et peut-être même à la synapse ganglionnaire. Cependant, il est possible que l'UT-II soit impliquée dans la régénération des neurones moteurs, comme proposé initialement pour le CGRP (Coulouarn *et al.*, 1998).

En conclusion, une hormone est définie comme une molécule sécrétée dans le sang et qui règle des fonctions physiologiques. Or, la faible concentration d'UT-II dans le plasma remet en question son titre d'hormone circulante (transmission endocrine) et suggère plutôt une transmission locale *i.e.* paracrine ou autocrine. Toutefois, l'absence d'un processus de maturation de l'hUT-II propre à chaque organe limite cette hypothèse, puisque le rein, le coeur et la moelle épinière sont les seuls organes où ce processus semble présent. À l'opposé, une série d'évidences confère à l'UT-II un rôle de neuromodulateur et/ou neurotransmetteur. La localisation de l'UT-II dans les noyaux cérébraux, dont certains sont associés au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire, lui confère un rôle plus étendu, incluant une action sur le système nerveux central et les muscles squelettiques. En prenant en considération que l'UT-II a été isolée à partir de l'uropyse des poissons, un rôle de modulateur ou de neurotransmetteur semble plus adéquat pour l'UT-II. Néanmoins, tout en étant un neuromodulateur, il est concevable que l'UT-II soit une hormone paracrine et/ou autocrine. Une telle hypothèse nécessite toutefois d'être approfondie.

1.8 Physiopathologies

Étant donné la nature de leurs actions physiologiques, les peptides vasoactifs sont associés à plusieurs pathologies du système cardiovasculaire. En effet, les peptides de la famille de l'endothéline, de l'angiotensine II et de la vasopressine sont impliqués dans des maladies cardiovasculaires caractérisées par un état de vasoconstriction excessif et/ou un dérèglement des cellules endothéliales. Par conséquent, l'action puissante de l'UT-II sur le système vasculaire suggère que ce peptide vasoactif soit également impliqué dans des maladies telles que l'artériosclérose, l'hypertension, les troubles rénaux, l'ischémie du myocarde, l'arythmie, etc.

Malgré que tous les vaisseaux soient vulnérables à l'artériosclérose, cette maladie affecte principalement l'aorte et les artères coronariennes. Caractérisés par une série de lésions appelées athéromes, les vaisseaux touchés présentent une série de dépôts lipidiques qui obstruent progressivement la lumière du vaisseau. Par la suite, il suffit d'un caillot ou de spasmes artériels pour bloquer complètement la lumière déjà rétrécie. Un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire peut alors survenir. Or, suite à une étude d'immunolocalisation, la présence de l'hUT-II a été détectée dans des artères coronariennes sclérosées entre la couche des muscles lisses et la région riche en macrophages (Ames *et al.*, 1999). Cependant, l'absence du récepteur de l'hUT-II dans les vaisseaux sclérosés implique que la participation de l'hUT-II dans cette pathologie soit indépendante de l'activation de son récepteur à sept domaines transmembranaires (Liu *et al.*, 1999). En fait, l'hUT-II interagit avec les moxLDL (middle oxidized low density lipoprotein) afin d'accroître la prolifération des VSMC (vascular smooth muscle cell) par le mécanisme c-Src/PKC/MAPK. Les moxLDL sont des facteurs de risque bien connus contribuant au développement de l'artériosclérose et de la formation de plaques. Toutefois, l'action combinée de la sérotonine et de l'UT-II induit une augmentation considérable de l'incorporation de [H^3]thymidine dans l'ADN des VSMC suggérant une augmentation de leur

prolifération (Watanabe *et al.*, 2001). Bref, il semble que l'UT-II interagirait indirectement et directement avec les VSMC afin de stimuler leur mitose. Or, la prolifération des VSMC est un événement important associé à l'artériosclérose et l'hypertension pulmonaire (Kereveur *et al.*, 2000). Par conséquent, l'urotensine II pourrait être un facteur de l'artériosclérose au même titre que le taux de cholestérol sanguin et le facteur de croissance dérivé des plaquettes.

Une basse pression artérielle, un débit cardiaque élevé et une basse résistance du système vasculaire sont des caractéristiques associées aux patients atteints d'hypertension portale et d'une cirrhose (Murray, Dawson et Sherlock, 1958). La circulation de ce type de patient présente une vasodilatation marquée dans le lit splanchnique et une vasoconstriction des vaisseaux de l'avant-bras et du rein. Ces désordres circulatoires entraînent le développement et la perpétuation de l'hypertension portale et des complications telles que la rétention de sodium et d'eau, l'effondrement du système hépatorénale et les hémorragies veineuses (Wong, Logan et Blendis, 1995). Or, la somatostatine et ses analogues octréoïdes produisent la vasoconstriction du lit splanchnique réduisant le gradient de pression du système veineux hépatique, le débit du flux sanguin portal et augmente l'index de résistance de l'artère mésentérique supérieure. Depuis quelques années, la somatostatine et ses analogues ont été utilisés comme traitement initial des hémorragies veineuses (D'Amico, Pagliaro et Bosch, 1999). Cependant, le mécanisme par lequel la somatostatine exerce son action vasoconstrictrice est encore inconnu. La somatostatine et l'urotensine II possède d'importantes similarités structurales (figure 8). De plus, la somatostatine est capable de se lier au récepteur de l'UT-II et de l'activer, mais avec un EC_{50} 30 000 fois plus élevé que celui de l'UT-II (3 μ M vs 0,1nM). Évidemment, cette concentration n'est pas de nature physiologique, mais elle se retrouve dans les concentrations plasmatiques estimées pour le traitement initial d'hémorragies veineuses. Or, plusieurs chercheurs soupçonnent que la somatostatine et ses analogues exerceraient leur action vasoconstrictrice sur le lit splanchnique via l'activation du récepteur GPR14 de l'UT-II (Newby et Jalan,

2000). Malgré l'absence de preuves directes, il y a plusieurs preuves circonstanciées qui suggèrent que la somatostatine se lie à GPR14. Par exemple, l'administration de la somatostatine afin de soigner les varices de l'œsophage des patients atteints d'une cirrhose, induit immédiatement la contraction sélective du volume de l'aorte central. Cette action sélective ressemble au profil de vasoconstriction de l'hUT-II observé chez les primates non humains. Évidemment, si cette hypothèse est confirmée, l'UT-II serait un outil thérapeutique beaucoup plus efficace que la somatostatine ou l'un ou l'autre de ses dérivés, puisque l'UT-II agirait directement sur son récepteur (Newby et Jalan, 2000).

Récemment, il a été démontré que certains peptides vasosactifs sont produits et sécrétés par des cellules tumorales. Par exemple, l'endothéline-1 est produite par une série de lignée cellulaire et cause la prolifération des lignées tumorales suite à une modulation paracrine (Takahashi *et al.*, 2000). Or, Takahashi *et al.* (2001) ont démontré la présence du récepteur de l'UT-II dans plusieurs lignées tumorales et la sécrétion de l'hUT-II par des cellules adrénocorticales cancéreuses SW13. Puisque l'UT-II induit la mobilisation de calcium intracellulaire, il est possible que l'hUT-II favorise à titre de facteur autocrinien ou paracrinien la croissance tumorale par la mobilisation de Ca^{2+} et/ou stimule l'angiogenèse, *i.e.* la croissance de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants.

1.9 Étude structure-activité

L'urotensine II humaine est un peptide de 11 acides aminés issu de l'action de deux prohormone-convertases sur un précurseur. La comparaison des structures primaires de l'UT-II montre que la séquence carboxy-terminale est conservée des poissons à l'homme. L'absence de similitude au niveau de la région amino-terminale suggère que l'urotensine II serait le seul peptide biologiquement actif produit du précurseur (Vaudry *et al.*, 1999). Évidemment, la

conservation de la séquence C-terminale au travers des espèces est la résultante de la pression évolutive. Par conséquent, il est plausible que ce segment joue un rôle essentiel. De plus, l'acide aminé en position 4 porte une charge négative introduite par un acide aspartique ou un acide glutamique en fonction de l'isoforme. Aussi, la position 11 est occupée par un acide aminé hydrophobe, la valine ou l'isoleucine. Bref, le nombre et la composition des acides aminés en N-terminal varient tandis que le segment 5-10 est identique d'une espèce à l'autre.

La présence d'un pont disulfure entre les cystéines 5 et 10 introduit de la rigidité dans le segment cyclique limitant ainsi le nombre de conformations possibles. De plus, la présence de trois acides aminés aromatiques parmi les quatre résidus endocycliques suggère qu'il y a un nombre limité de conformation tolérable afin d'éviter l'encombrement stérique. En effet, réalisée par modélisation moléculaire, la figure 8 montre la portion cyclique avec peu de variations et bien organisée, tandis que la portion N-terminale présente un ensemble de conformations reflétant sa mobilité. La projection des chaînes latérales des résidus hydrophobes Phe⁷, Trp⁸ et Val¹¹ montre que celles-ci se retrouvent toutes sur le même côté de la molécule suggérant la liaison à une poche hydrophobe du récepteur GPR14. L'absence de structure secondaire spécifique dans la portion N-terminale et la variation des résidus dans ce segment introduisent la possibilité que cette séquence soit accessoire à l'activité biologique de l'urotensine II. En effet, la délétion des quatre premiers résidus a généré un agoniste complet de l'UT-II sur l'aorte de rat, tandis que la délétion de la totalité du segment N-terminal a produit un agoniste partiel (Itoh *et al.*, 1987). Ainsi, la séquence minimale afin de maintenir l'activité biologique de l'hUT-II est la séquence 4-11.

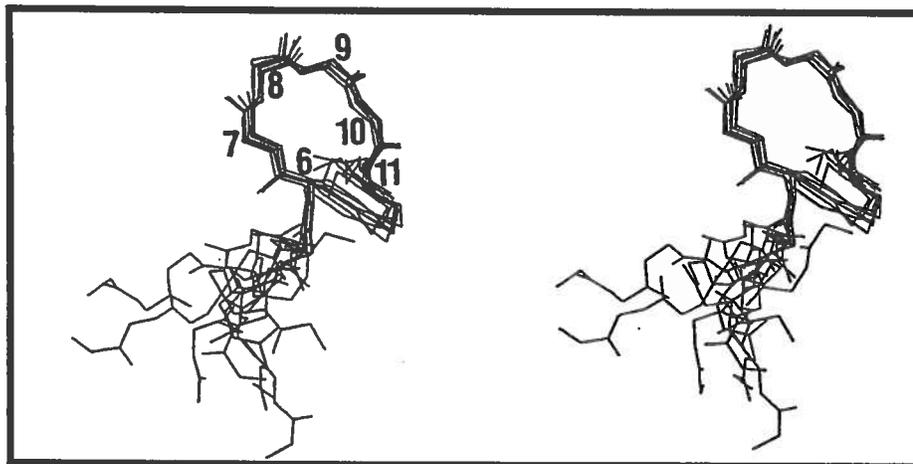


Figure 8: Représentation simplifiée du squelette de carbone de l'UT-II de gobie par modélisation moléculaire. L'emplacement des carbones est basé sur la minimisation des énergies, les angles dièdres, la longueur des liens et les valeurs de l'effet nucléaire Overhauser (NOE) inférieures à 20 Kcal/mol. Figure extraite de Bhaskaran *et al.*, 1994.

Pour certains peptides, tels que la somatostatine, l'introduction d'un groupement amide accroît la puissance et la spécificité de la molécule envers les sous-classes de récepteur (Janecka *et al.*, 2001). Toutefois, l'amidation de la séquence 4-11 de l'hUT-II à son extrémité carboxylique libre n'a eu aucun effet sur l'activité contractile du fragment (Rossowski *et al.*, 2002). L'amidation de l'urotensine II peut donc être utilisée afin d'augmenter la résistance face à la dégradation enzymatique, qui se produit rapidement dans le plasma humain.

Lorsque l'urotensine II a été caractérisée pour la première fois, plusieurs chercheurs ont immédiatement noté une similitude structurale avec la somatostatine (SRIF), un peptide multifonctionnel qui agit au niveau de l'estomac, du pancréas, de l'intestin grêle et de la vésicule biliaire (Marieb, 1997). Les deux peptides possèdent une région composée des acides aminés Phe, Trp et Lys suivie d'un résidu hydroxylé, soit une thréonine ou une tyrosine (figure 9). La somatostatine apparaît sous deux formes : un peptide de 14 acides aminés et un peptide de 28 résidus. Les deux peptides sont produits dans des proportions variables par différentes cellules sécrétrices et agissent à titre de neurotransmetteur, modulateur autocrine et/ou paracrine et principalement via la circulation afin de réguler les processus aussi divers que la sécrétion cellulaire, la neuromodulation, la contraction des muscles lisses, l'absorption des nutriments et la croissance cellulaire (Patel, 1999). Ce peptide est associé à plusieurs physiopathologies telles que, le diabète, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer, la maladie d'Huntington et le sida. Cependant, les recherches cliniques sur la somatostatine ont été moins fructueuses que prévu en raison de certains désavantages occasionnés par l'utilisation d'un composé peptidique, dont un temps de demi-vie très court et un manque de sélectivité envers les sous-types de récepteur. Afin de surmonter ces problèmes, un nombre considérable d'analogues et d'antagonistes ont été synthétisés. Puisque l'urotensine II partage des similarités structurales importantes avec la somatostatine, un survol des études de structure-activité de la somatostatine s'avère pertinent.

Tout d'abord, à l'exception du Trp-8, l'inversion de la chiralité des acides aminés de la somatostatine a généré une série d'analogues avec une puissance et une efficacité moindre que la molécule-mère. Par contre, la substitution de Trp⁸ par D-Trp⁸ a engendré un agoniste dont la capacité à inhiber la libération d'insuline *in vivo* s'est montrée 8 fois plus puissante que celle de la somatostatine. Ainsi, [D-Trp⁸]SRIF a été le premier analogue plus puissant que la molécule-mère. La grande puissance de cet analogue peut refléter une stabilisation d'une conformation plus active ou simplement provenir d'une plus

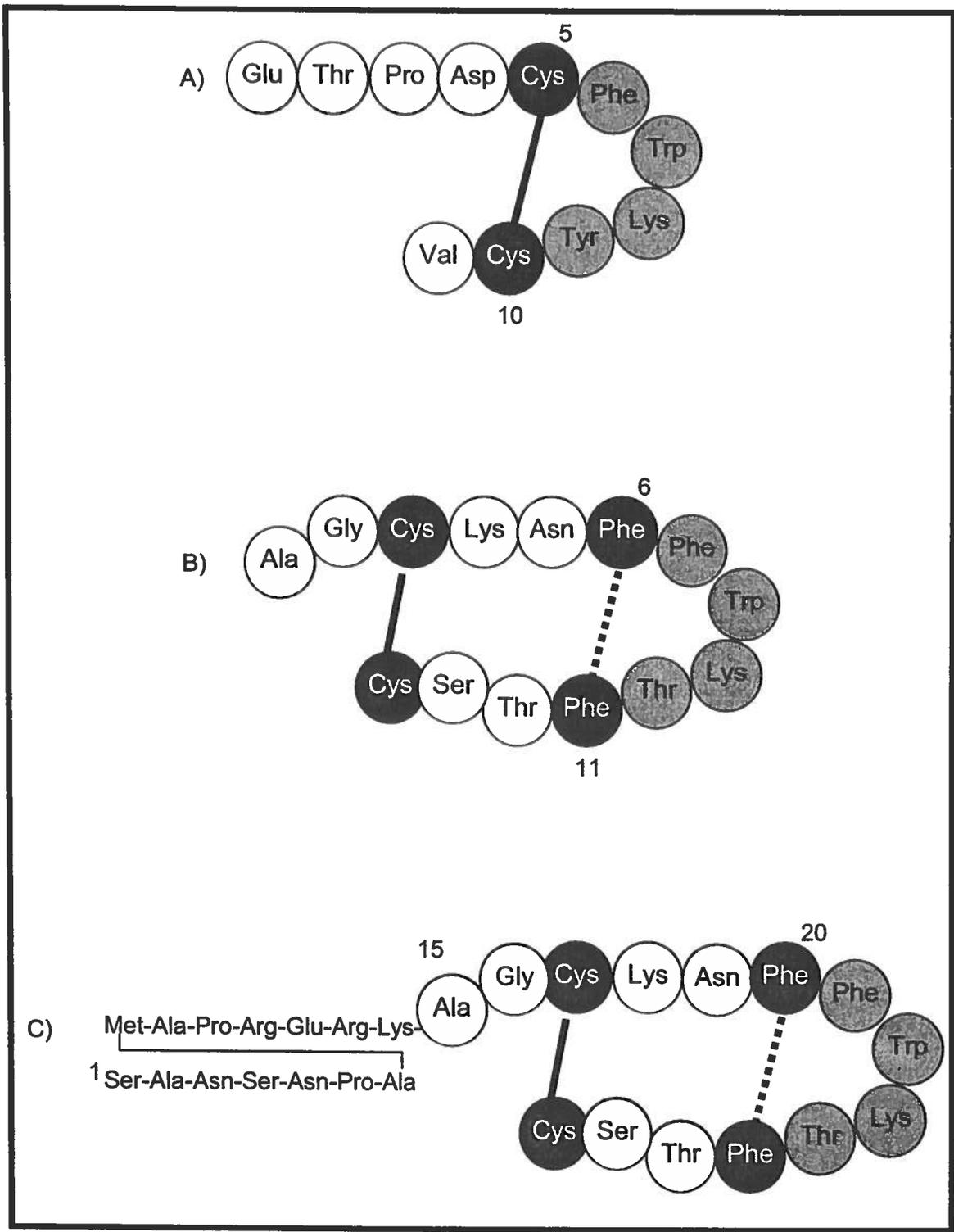


Figure 9 : Structure primaire de A) urotensine II humaine B) la somatostatine 1-14 C) somatostatine 1-28.

grande résistance à la dégradation enzymatique. L'approche «Ala-scan», qui consiste à remplacer à tour de rôle chacun des acides aminés par une alanine, a démontré que les résidus Gly², Lys⁴, Asn⁵, Thr¹⁰, Thr¹² et Ser¹³ sont modifiables, puisque l'activité biologique n'a pas été grandement affectée. Par contre, le remplacement des résidus Phe⁶, Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹ et Phe¹¹ par une alanine a généré une série de composés inactifs, ce qui suggère que ces acides aminés seraient cruciaux à l'activité biologique du peptide (Brown, Rivier et Vale, 1976). En effet, cyclo¹⁻⁶[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys] s'avère être le plus petit analogue actif de la somatostatine. Il contient la majorité des pharmacophores identifiés par l'Ala-scan (Vale *et al.*, 1979). Par conséquent, cette séquence semble être la portion biologiquement active de la somatostatine. De plus, cette séquence est bordée par deux phénylalanines qui interagissent ensemble afin de stabiliser l'orientation des chaînes latérales de la somatostatine lors de liaison avec le récepteur. Une analyse par résonance magnétique nucléaire a démontré que le segment Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹ et Thr¹⁰ forme un coude β de type II, qui est nécessaire pour maintenir l'activité biologique de la somatostatine (Freindinger *et al.*, 1984). En se basant sur ces informations, la stratégie générale afin de développer des agonistes de la somatostatine a consisté à conserver le noyau Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹ et Thr¹⁰ et à incorporer des contraintes cycliques telles que, l'introduction d'un pont disulfure ou un lien amide tout en conservant la structure secondaire (Patel, 1999). Ainsi, la substitution des résidus phénylalanines 7 et 10 par deux cystéines a généré un analogue cyclique plus puissant que la molécule-mère à titre d'inhibiteur du relargage d'hormone de croissance, d'insuline et de glucagon (Veber *et al.*, 1984). Toutefois, malgré la grande puissance des analogues peptidiques, la majorité de ces derniers sont incapables de franchir la barrière hémato-encéphalique.

Afin de contourner ce problème, plusieurs agonistes non peptidiques ont été développés à l'aide de la chimie combinatoire sur la base du tripeptide Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹. Le plus puissant de ces analogues, le composé NNC 26-9100, possède trois groupements aromatiques, dont deux hétéroaromatiques, imitant ainsi les chaînes latérales des résidus Phe⁷ et Trp⁸ (figure 10) (Ankersen *et al.*, 1998). Or, les trois résidus se retrouvent intégralement dans le noyau de l'urotensine II. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer le potentiel constricteur de ces composés sur l'aorte thoracique de rat, reconnue pour exprimer le récepteur de l'UT-II. Ainsi, la présence de constriction de la part de ces composés thérapeutiques, ce qui est fort possible, impliquerait que ces molécules soient non spécifiques aux récepteurs de la somatostatine et que leurs actions thérapeutiques pourraient provenir de l'activation du récepteur GPR14.

Au niveau des antagonistes de la somatostatine, il existe peu de composés et les plus puissants sont générés à partir de faibles agonistes en inversant la chiralité en position 5 et 6. Le plus puissant antagoniste est le composé PRL 2970, qui ressemble aux composés dans le tableau V. Étant donné la ressemblance entre l'UT-II et la somatostatine, la frontière qui délimite les agonistes et les antagonistes envers l'un ou l'autre des récepteurs semble très mince. En effet, Rossowski *et al.* (2002) ont criblé le récepteur GPR14 avec une série d'antagonistes de la somatostatine afin d'évaluer leur pouvoir antagoniste face à l'hUT-II. Grâce à cette méthode, les composés PRL-2882, PRL-2903 et PRL-2915 ont été les premiers antagonistes identifiés du récepteur GPR14 (IC₅₀ 3.1, 3.3 et 8.7 x10⁻⁶ M, respectivement). Toutefois, ces molécules dérivées d'analogues de la somatostatine sont non spécifiques au récepteur de l'UT-II (Rossowski *et al.*, 2002), et ceci illustre encore une fois l'importance de considérer les études de structure-activité de la somatostatine.

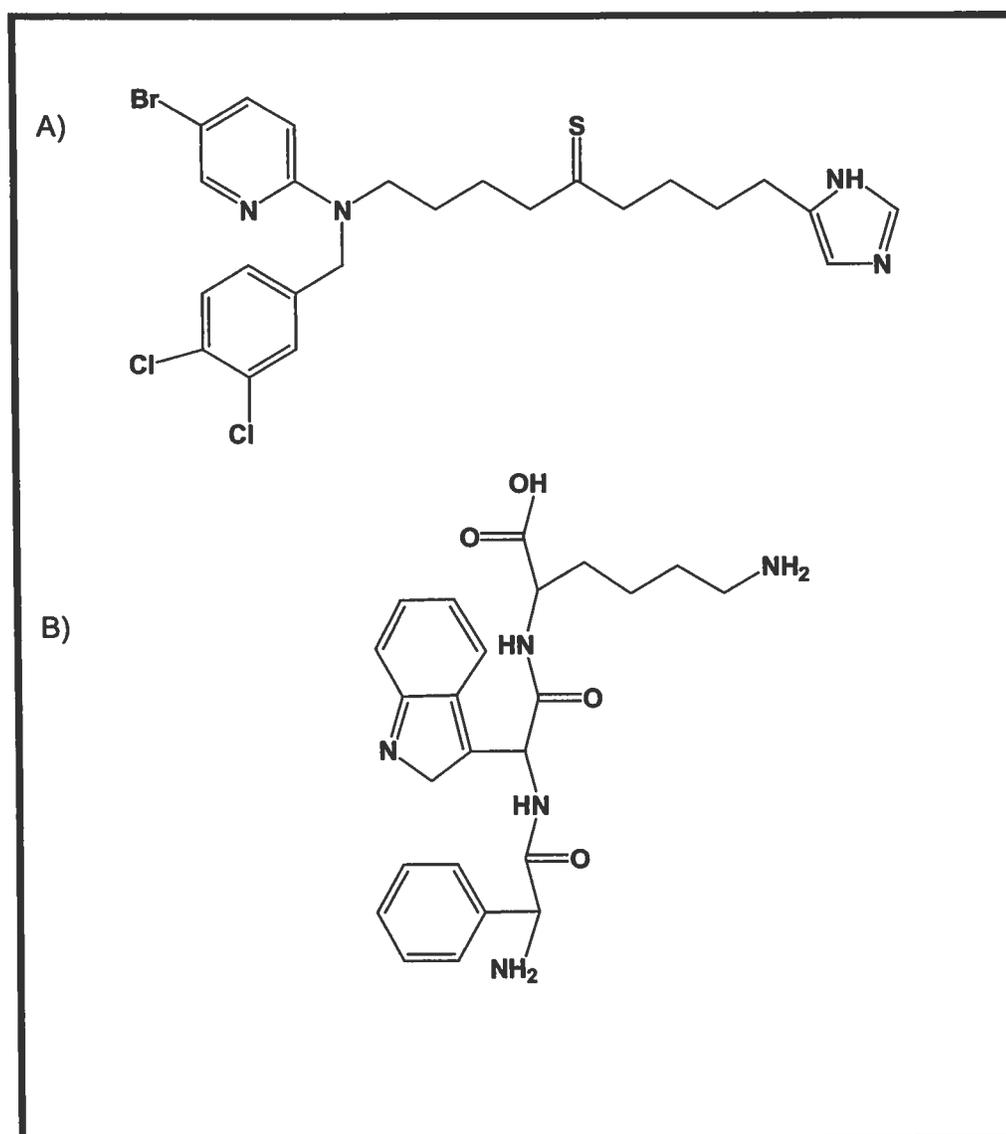


Figure 10 : A) Structure du plus puissant agoniste non peptidique de la somatostatine B) Structure primaire du tripeptide Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹ présent au niveau de la somatostatine et de l'UT-II. Figure extraite et modifiée de Janecka *et al.* 2001.

Tableau V : Comparaison de la structure des antagonistes des récepteurs SST₂ et GPR14 avec celle de UT-II(4-11).

| peptide | Séquence |
|--------------|---|
| PRL-2882 | 4Fpa ¹ -cyclo[D-Cys-3Pal ² -D-Trp-Lys-Val-Cys]Nal ³ -NH ₂ |
| PRL-2903 | 4Fpa-cyclo[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Tle ⁴ -Cys]Nal -NH ₂ |
| PRL-2915 | 4Cpa-cyclo[D-Cys-His-D-Trp-Lys-Tle-Cys]Nal -NH ₂ |
| UT-II (4-11) | Asp-cyclo[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val |

Tableau extrait et modifié de Coy *et al.*, 2002.

¹(Fpa) 4-fluorophénylalanine

²(Pal) 3-pyridylalanine

³(Nal) 3-(2-naphtyl)alanine

⁴(Tle) *tert*-leucine

La structure des antagonistes est très similaire au noyau cyclique de l'UT-II. En effet, composés de huit résidus, les antagonistes et le noyau 4-11 de l'hUT-II possèdent les acides aminés Trp et Lys et un pont disulfure entre les cystéines 2-7. Parmi toutes les molécules testées, uniquement les antagonistes spécifiques aux récepteurs SST₂ et SST₅ de la somatostatine ont été capables d'inhiber la contraction tonique de l'aorte de rat induite par l'hUT-II. À partir de ces résultats, Rossowski *et al.* (2002) ont conclu que les récepteurs SST₂, SST₅ et GPR14 présentent une topographie similaire et que les antagonistes découverts peuvent être utilisés afin de découvrir de nouveaux antagonistes plus puissants. Par conséquent, les études de structure-activité de la somatostatine avec ces deux récepteurs deviennent des éléments d'information à considérer avant d'entreprendre une étude de structure-activité de l'UT-II. Le récepteur SST₂ est composé de 356 acides aminés et partage une homologie structurale de 41% avec le récepteur GPR14 de l'UT-II. Kaupmann *et al.* (1995) ont postulé que le domaine de liaison du récepteur SST₂ est exclusivement contenu entre les domaines transmembranaires III à VII (DTM III et VII). Ce modèle prédit que les

résidus hydrophobes Phe⁷, Trp⁸ et Thr¹⁰ de la somatostatine interagissent avec les régions hydrophobes présentes dans les DTM IV et VII, en particulier avec le résidu Phe-294 du DTM VII favorisant ainsi l'interaction lipophile. De plus, l'acide aspartique-137 du TDM III forme une liaison électrostatique avec la Lys⁹ de la somatostatine (Strand et Hadcock, 1995; Kaupmann *et al.*, 1995). Puisque le récepteur GPR14 possède également un résidu aspartique à la même position, il est possible que l'acide aspartique interagisse directement avec la Lysine⁸ de l'hUT-II. Similairement, une série de résidus hydrophobes occupe le DTM VII de GPR14, dont la Phe-316, suggérant que le noyau hydrophobe de l'UT-II se lie à cette portion. En gardant à l'esprit que les antagonistes de la somatostatine sont dépourvus de l'extrémité N-terminale de la somatostatine, leur ressemblance au noyau de l'UT-II expliquerait leur capacité à antagoniser les récepteurs SST₂ et GPR14.

Toutefois, malgré les ressemblances structurales, la somatostatine et l'UT-II partagent peu de fonctions biologiques. L'UT-II humaine est incapable d'inhiber la sécrétion gastrique, la motilité intestinale, la sécrétion pancréatique et la libération de bile. Cependant, à des concentrations non physiologiques, la somatostatine est capable de provoquer une contraction du rectum de truite (EC₅₀ 3000 nM pour la somatostatine et 0.1 nM pour l'urotensine II humaine). De plus, lors de l'utilisation d'un anticorps spécifique à la somatostatine, il n'y a pas eu de réaction croisée entre l'urotensine II et le segment 6-11 de la somatostatine. À l'inverse, la somatostatine n'est pas liée lors d'un RIA spécifique à l'UT-II (McMaster et Lederis, 1983).

Le clonage du précurseur de l'urotensine II humaine et la comparaison avec son homologue de la somatostatine a permis de démontrer que les gènes codant pour ces deux peptides ne proviennent pas d'un gène ancestral commun. Ainsi, l'homologie structurale entre la séquence de l'urotensine II et celle de la somatostatine semble être le fruit du hasard (Coulouarn *et al.*, 1998). Indépendamment de l'origine de ces deux peptides, ces derniers possèdent des

similarités structurales indéniables qui peuvent servir de point de départ dans le développement d'un antagoniste.

Bref, au cours des dernières années, les découvertes sur l'urotensine II se sont succédées rapidement grâce aux nombreux outils de biologie moléculaire, mais il reste encore beaucoup de chemin à parcourir afin de résoudre les nombreuses énigmes qui entourent l'UT-II. Néanmoins, ce peptide incorporé tôt dans l'évolution des vertébrés démontre des actions biologiques diversifiées tant au niveau des poissons que des primates. Identifiée comme le plus puissant vasoconstricteur chez les mammifères, l'UT-II possède un profil de vasoconstriction unique qui suggère un rôle dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Cependant, son rôle physiologique dans le corps humain reste encore bien vague. *In vivo*, chez le rat, il agit comme hypotenseur, tandis que chez le singe, il provoque l'effondrement du système cardiovasculaire. Par conséquent, il devient difficile d'extrapoler le rôle systémique de l'UT-II à l'homme, où, *in vivo*, les rapports sont contradictoires. Le champ d'action de l'UT-II ne semble pas se limiter au système cardiovasculaire. En effet, la localisation de l'UT-II dans les neurones cholinergiques de la moelle épinière et la détection du récepteur dans le système nerveux central suggèrent que l'UT-II serait impliquée dans l'intégration du système nerveux moteur et sensitif ou dans la modulation du réseau vasculaire du système nerveux central.

Afin d'évaluer cette dernière hypothèse ou tout simplement pour définir son rôle physiologique, il serait intéressant de développer des souris «knock-out» pour le gène de l'UT-II, mais encore une fois, il serait difficile d'extrapoler à d'autres espèces. Puisque les études *in vivo* chez l'humain se sont avérées infructueuses, l'utilisation d'une molécule capable de lier le récepteur sans l'activer permettrait d'évaluer le rôle de l'UT-II *in situ*. Ainsi, le développement d'un antagoniste spécifique au récepteur GPR14 serait un outil de choix afin de comprendre le rôle physiologique de l'hUT-II et ainsi découvrir son potentiel thérapeutique. Évidemment, le développement d'un antagoniste nécessite au

préalable des études de structure-activité afin de déterminer les acides aminés clés pour la liaison et l'activation du récepteur GPR14.

À ce jour, il existe très peu d'études de structure-activité pertinente sur l'UT-II et ces dernières ont précédé la découverte de l'UT-II chez l'humain. Cyclo²⁻⁷[H-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH] est la séquence minimale afin de maintenir l'activité biologique de l'UT-II. Cette séquence comprend tous les acides animés conservés d'une espèce à l'autre. De plus, l'amidation de cette séquence n'a aucun impact sur la puissance ou l'efficacité de ce fragment. En fait, l'homologie structurale qui existe entre la somatostatine et l'hUT-II permet de soutirer plusieurs informations des nombreuses études de structure-activité de la somatostatine et de les appliquer à l'UT-II. Par exemple, la Lys-9 de la somatostatine forme une interaction ionique avec un résidu Asp du récepteur SST₂. Or, l'UT-II et son récepteur possèdent respectivement les deux mêmes résidus, ce qui permet d'envisager une interaction similaire entre l'UT-II et GPR14. Ainsi, en se basant sur ces informations, notre laboratoire, en collaboration avec Aventis Pharma, a réalisé l'analyse fonctionnelle des résidus de l'UT-II afin de développer un antagoniste.

Article A

Résumé

L'urotensine II (U-11), un puissant agent vasoactif, est un peptide cyclique composé de 11 acides aminés qui a récemment été identifié comme le ligand endogène du récepteur GPR14. Puisque l'UT-II est possiblement impliquée dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire et dans des physiopathologies, le développement d'un antagoniste non peptidique serait un outil pharmacologique sinon thérapeutique de choix. Nous avons réalisé une étude de structure-activité de l'UT-II, dans laquelle 25 analogues peptidiques ont été évalués sur des cellules CHO transfectées avec le récepteur GPR14. La mesure des variations de la concentration intracellulaire de calcium a été utilisée comme test biologique. La délétion successive des acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale et la substitution des acides aminés à tour de rôle par une alanine ont révélé que la séquence Trp⁷-Lys⁸-Tyr est une portion clé nécessaire à la reconnaissance et l'activation du récepteur. Ainsi, les chaînes latérales des acides aminés du segment WKY représentent des composantes chimiques cruciales, qui, dans une conformation adéquate, sont des prérequis à la liaison et à l'activation du récepteur. Afin de traduire l'information de la séquence WKY dans un modèle pharmacophore tridimensionnel à trois points, valable pour le criblage virtuel d'une banque de composé, nous avons évalué la structure en solution de l'UT-II par résonance magnétique nucléaire. Ainsi, à l'aide du modèle tridimensionnel, l'inventaire des composés de Aventis a été criblé virtuellement à la recherche de composés contenant 3 pôles possédant les caractéristiques chimiques et géométriques du modèle. Cette approche a permis d'identifier des composés actifs provenant de six différentes catégories de substances capables d'antagoniser l'activité biologique de l'UT-II *in vitro*. Le 1-(3-carbamimidoyl-benzyl)-4-méthyl-1H-indole-2-carboxylique (naphtalène-1-ylméthyl)amide s'est montré être le composé le plus puissant identifié par le criblage virtuel avec un IC₅₀ de 400 nM dans un essai fonctionnel d'imagerie fluorescente sur plaque. Il constitue l'un des premiers antagonistes non peptidiques de l'UT-II humaine à être décrit dans la littérature.

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

J Med Chem. 2002 Apr 25;45(9):1799-805.

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.

Flohr S(1), Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T.

Author information:

(1)Lead Generation Chemistry, Aventis Pharma Germany GmbH, Industriepark Hoechst, D-65926 Frankfurt am Main, Germany.

The vasoactive cyclic 11-amino acid peptide urotensin II (U-II) has recently been discovered as the endogenous ligand of the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. As U-II might be involved in the regulation of cardiovascular homeostasis and pathology, a nonpeptidic GPR14/U-II antagonist is of considerable basic and therapeutic interest. We have performed structure-activity relationship studies on U-II by investigating 25 peptide analogues to mobilize intracellular calcium in GPR14-transfected CHO cells, demonstrating that only the side chains of the residues Trp-7, Lys-8, and Tyr-9 are required for receptor recognition and activation. The solution structure of U-II derived by nuclear magnetic resonance has served as a structural template for a three-dimensional three point pharmacophore query for the virtual screening of the Aventis compound repository for nonpeptidic U-II receptor antagonists. Highly active lead compounds of six different scaffold classes could be identified, antagonizing the biological activity of U-II in vitro. The most potent compound identified by the virtual screening approach, 1-(3-carbamimidoyl-benzyl)-4-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid (naphthalen-1-ylmethyl)amide, reveals an IC(50) of 400 nM in a functional fluorometric imaging plate reader assay and constitutes a promising lead.

Article B

Résumé

L'urotensine II (UT-II : cyclo⁵⁻¹⁰[H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Trp-Tyr-Cys-Val-OH]) est un puissant agent vasoconstricteur chez les mammifères. Son profil de vasoconstriction unique suggère une implication dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Par conséquent, nous avons initié une étude de structure-activité de ce peptide, qui est caractérisé par un segment libre en N-terminal et un noyau cyclique fermé par un pont disulfure. Un total de 41 analogues ont été synthétisés afin d'effectuer l'analyse fonctionnelle des résidus de l'UT-II. L'activité agoniste de chacun des analogues a été évaluée sur des cellules CHO transfectées par le récepteur GPR14 de rat ou d'humain, en utilisant comme test biologique la mesure des variations de la concentration intracellulaire de calcium. L'activité a également été mesurée sur des préparations d'aorte thoracique de rat, un tissu reconnu pour exprimer le récepteur GPR14. En parallèle, l'affinité de la liaison a été déterminée sur des préparations de membranes de cellules HEK-13 contenant le récepteur de rat ou d'humain. Les résultats de l'affinité de liaison, des essais de mobilisation de calcium intracellulaire et des tests pharmacologiques ont démontré clairement la faible contribution de la portion N-terminale et le rôle essentiel du noyau cyclique à l'activité de l'UT-II. Plus précisément, les trois résidus de la portion cyclique, *i.e.* Trp-7, Lys-8 et Tyr-9, sont nécessaires pour la liaison et l'activation du récepteur. De plus, la faible activité agoniste des composés [Ala⁸]UT-II, [Orn⁸]UT-II et [Arg⁸]UT-II démontre que la longueur et la charge de la Lys-8 sont essentielles à l'activité biologique du peptide, suggérant par exemple que la Lys-8 interagit directement avec le récepteur. La présence du pont disulfure permet de stabiliser l'orientation des chaînes latérales des acides aminés endocycliques et par conséquent, cette structure est essentielle à l'activité biologique de l'UT-II. Par conséquent, le tripeptide, dont l'orientation des chaînes latérales est stabilisée par le pont disulfure, contient les pharmacophores pour le récepteur de l'UT-II.

**Functional and structural characterizations of
human and rat urotensin II receptors^a**

Alexandre Brkovic ¹, Elmut Hasenberg ², Evi Kostenis ² and Alain Fournier ¹

¹ Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire – Montréal , QC, Canada, H9R 1G6

² Disease Group Cardiovascular, Aventis Pharma Germany GmbH, Industriepark Hoechst, D-65926 Frankfurt am Main, Germany.

Financial supports were obtained from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). AF is "*Chercheur National*" from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ) and AB is the recipient of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Running Title : Structure-to-Function Studies of Urotensin II

Corresponding author :

Dr. Alain Fournier

Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides

Institut national de la recherche scientifique – Université du Québec

INRS Institut Armand-Frappier

245 boul. Hymus

Pointe-Claire (Montréal), QC, H9R 1G6

Canada

Telephone : (514) 630-8816

Fax : (514) 630-8850

Email : alain.fournier@inrs-iaf.uquebec.ca

Content:

number of text pages: 36

number of tables: 16

number of figures: 3

number of references: 27

number of words in the Abstract: 166

number of words in the Introduction: 724

number of words in the Discussion: 2160

ABBREVIATIONS: UT-II, urotensin II; FMOC, fluorenylmethyloxycarbonyl; TFA, trifluoroacetic acid; EDT, ethanedithiol; TIS, triisopropylsilane; RP-HPLC, reverse-phase high performance liquid chromatography; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption and ionization – time of flight.

Abstract

Urotensin II (UT-II : cyclo⁵⁻¹⁰[H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH]) is a potent vasoconstrictor in mammals and it is postulated that it plays a central role in cardiovascular homeostasis. Thus, we initiated a structure-to-function analysis of this peptide characterized by a N-terminal tail and a cyclic core formed through a disulfide bridging. A total of 41 analogs focusing on these characteristics were developed and evaluated using a binding assay on membranes from a stable HEK-293 cell line containing the human or rat UT-II receptor, a functional assay for Ca²⁺ mobilization on transiently transfected CHO-K1 cells with the human or rat UT-II receptor and, a rat thoracic aorta bioassay. Binding, functional and pharmacological data clearly demonstrated the minor contribution of the N-terminal segment and the essential role of the cyclic structure. More particularly, three residues within the loop *i.e.* Trp-7, Lys-8 and Tyr-9 are required for receptor recognition and activation. This 3-pole feature, kept by the disulfide bond in a correct spatial arrangement, appears as the key-pharmacophore for the UT-II receptor.

Urotensin II (UT-II), a potent mammalian vasoconstrictor, was first isolated and characterized from the *Gillichthys mirabilis* (goby) urophysis, a well-known neurohemal organ (Pearson et al., 1980). Subsequently, UT-II was characterized in other teleost fishes, amphibians, rodents and mammals. Recently, human cDNA was cloned and hUT-II appeared as an 11-amino acid peptide with cysteine residues in positions 5 and 10, forming a bridge through their side chains (Coulouarn et al., 1998). A comparison of the UT-II primary structures reveals a striking homology among species. In fact, from fish to man, evolution favored the conservation of residues 5 to 10, while the N-terminal segment varied in length and composition. In addition, position 4 is occupied by the acidic residue Asp or Glu, whereas position 11 is characterized by the presence of the hydrophobic residue Val or Ile.

So far, the most striking effects of UT-II are observed in the cardiovascular arterial system, where it is frequently identified as the most potent vasoconstrictor ever described. However, using tissues from several species and many types of blood vessels, Douglas et al. (2000a) carried out an extensive study on the vasoconstrictor activity of human UT-II (hUT-II) and their investigation revealed that both potency and efficacy vary significantly between species, individuals and vessels. As such, hUT-II was described as the most potent vasoconstricting compound on the rat thoracic aorta but in mouse, whatever the vessels tested, no vasoconstriction was recorded. Similarly, hUT-II was shown to be a selective vasoconstrictor of the canine coronary arteries. In contrast to the selectivity observed in dogs, hUT-II is a potent vasoconstrictor of all non-human primate arteries (Douglas et al., 2000b). Thus, after a parenteral administration, hUT-II provokes in monkeys a complex response resulting in a fatal cardiovascular collapse. Interestingly, monkey electrocardiogram was reminiscent of patients with myocardial ischaemia (Ames et al., 1999). Human vessels react differently to hUT-II: radial, coronary and mammary arteries, as well as the saphenous and umbilical veins exhibited a strong vasoconstriction upon

treatment with hUT-II (Maguire et al., 2000), while the abdominal and small pulmonary arteries showed a potent vasodilation (Stirrat et al., 2001).

The huge potency of hUT-II, as a vasoconstrictor or vasodilator, strongly suggests a key-role of this peptide in the cardiovascular homeostasis. Nevertheless, its complex distribution also puts forward additional biological functions and it is believed that UT-II may act as a neuromodulator and/or a circulating hormone. For instance, in rat, UT-II immunoreactivity is found abundantly in the cholinergic neurones of the brainstem and the spinal cord, suggesting a possible neuromodulator role for UT-II (Dun et al., 2001). On the other hand, the wide distribution of the so-called GPR14, the hUT-II receptor, in the heart, smooth muscle cells, skeletal muscles and CNS also suggests that UT-II could be a circulating hormone (Maguire et al., 2000).

These observations are well-matched with the hypothesis that UT-II might be involved in various diseases, including cardiovascular pathologies such as hypertension and arteriosclerosis. Thus, the UT-II biological system exhibits a remarkable potential for the development of novel therapeutic strategies, and especially of those related to the treatment of cardiovascular diseases. Such developments require a precise knowledge of the pharmacophoric elements within UT-II essential for the affinity and the activity of this peptide. So far, not much information about the structural and chemical requirements of the UT-II receptor is yet available. Nonetheless, because of its resemblance to somatostatin (SS), it is conceivable that some of the critical structural features already described for SS are shared with UT-II. Accordingly, both peptides contain the tripeptide Phe, Trp, Lys followed by the hydroxylated residue Thr or Tyr. Moreover, it was demonstrated in SS that an interaction between the aromatic moieties of residues Phe-5 and Phe-10 stabilizes the orientation of residues Phe-6, Trp-7, Lys-9 and Thr-10. Similarly, the disulfide bridge in UT-II would act in a similar manner. Structure-activity relationship (SAR) studies of SS already showed that these pharmacophoric features are essential for the SS

biological activity (Janecka et al., 2001). Furthermore, previous fish UT-II (Itoh et al., 1987) and human UT-II (Flohr et al., 2002; Kinney et al., 2001, 2002) SAR studies showed that the highly conserved C-terminal segment CFWKYCV is the minimal sequence required to maintain a high potency. Therefore, we initiated a SAR study of the human and rat urotensin-II, by targeting the essential structural features already pinpointed in the somatostatin and fish urotensin-II molecules.

Materials and Methods

Reagents and solvents

The following Fmoc-protected amino acids were purchased from Chem-Impex International (Wood Dale, IL) : Ala, Cys(Trt), His(Trt), Phe, Trp, Lys(Boc), Tyr(tBu), Asp(OtBu), Glu(OtBu), Pro, Gln(Trt), Thr(tBu), Arg(Pbf), Orn(Boc), HomoCys(Trt), Cys(Acm) and D-Trp. Biograde TFA was obtained from Halocarbon (River Edge, NJ). Diisopropylethylamine was from Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Wang resin and BOP were purchased from Albatross Chemical (Montreal, QC).

Basal ISCOVE medium and fetal calf serum (FCS) were from Biochrom, (Berlin, Germany). The GC-melt PCR-kit as well as the human and rat genomic DNA were purchased from Clontech (Palo Alto, CA). The pEAK8 mammalian episomal expression vector and the selection marker puromycin were from Edge Biosystems (Gaithersburg, MD). Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM), L-glutamine, HEPES, LipofectAMINE reagent and penicillin-streptomycin were from GIBCO BRL (Rockville, MD). The pCDNA3.1(+) mammalian expression vector was from Invitrogen (Carlsbad, CA). The calcium-sensitive fluorescence dye Fluo-4 and Pluronic F-127 were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Flashplates PLUS and monoiodinated human [¹²⁵I-Tyr⁹]-urotensin II for radioligand binding assays were from NEN (Boston, MA). Gentamicine, the transfection reagent FuGene 6 and Complete Protease Inhibitor were purchased from Roche (Basel, Switzerland). Bacitracin, EDTA-disodium salt, probenecid, MgCl₂, NaCl and sucrose were obtained from Sigma (St.-Louis, MO).

Peptide Synthesis and cleavage

The peptides hUT-II(5-10), hUT-II(2-11), hUT-II(3-11), hUT-II(4-11), hUT-II(1-10), [Ala⁵]hUT-II, [D-Phe⁶]hUT-II, [D-Lys⁸]hUT-II, [D-Tyr⁹]hUT-II, [des-Phe⁶]hUT-II, [des-Trp⁷]hUT-II, [des-Lys⁸]hUT-II, [des-Tyr⁹]hUT-II, [des-Lys⁸,Val¹¹]hUT-II and [des-Tyr⁹,Val¹¹]hUT-II were custom-designed and

purchased from EMC Microcollections (Tübingen, Germany). All the other analogues were synthesized using a solid phase procedure based on a Fmoc chemistry/BOP coupling strategy designed for a home-made manual multireactor synthesizer. Wang resin was used as the solid support and each coupling step was monitored using a ninhydrin test. Cleavage from the resin was achieved with a mixture of TFA:EDT:TIS:phenol:water (50ml/g 80:5:5:5:5 v/v) for 2 hours. After TFA evaporation, peptides were precipitated and washed using diethyl ether. Crude peptides were dried and kept at -20°C until purification.

Peptide purification and characterization

About 700 mg of the crude material was dissolved in water before being injected onto a RP-HPLC Jupiter C₁₈ (15 µm; 300Å) column (250 x 21.20 mm) (Phenomenex, Torrance, CA). The purification step was carried out using a Waters Prep 590 pump system connected to a Waters Model 441 absorbance detector. The flow rate was fixed at 40 ml/min and the peptide was eluted with a solvent gradient of 0 to 40% solvent B where solvent A is aqueous NH₄OH 0.05% and solvent B is CH₃CN 40% in NH₄OH 0.05%. Fractions homogeneity was evaluated using analytical RP-HPLC with a Jupiter C₁₈ (5 µm; 300 Å) column (250 x 4.60 mm) (Phenomenex, Torrance, CA) connected to a Beckman 128 solvent module coupled to a Beckman 168 PDA detector. The flow rate was at 1.0 ml/min and the elution of the peptide was carried out with a linear gradient of 20 to 60% B where A was TFA 0.06% and B was CH₃CN 40% in aqueous TFA 0.06%. Aliquots of 20 µl were injected and analyzed. Homogeneous fractions were pooled, lyophilized and then analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager DE spectrometer – Applied Biosystems, Foster City, CA). The laser was set at 337 nm and an acceleration voltage of 25 kV was applied. The compound α -cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as a matrix for peptide inclusion and ionization. The purified peptide precursor with the right mass was cyclized using K₃Fe(CN)₆ as an oxidant. Thus, each peptide was dissolved in water at a concentration of 0.5 mg/ml and 20 eq. of oxidant was added. After one hour, the

reaction mixture was injected onto a preparative column and, as described above, purified using HPLC. The final pure peptides were characterized by analytical HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry.

Biological activity study

All peptides were tested pharmacologically using the rat thoracic aorta preparation. Sprague-Dawley male rats from Charles River (St-Constant, QC), weighing 250-300g, were anesthetized with Somnotol™ (pentobarbital-MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON) and killed by exsanguination. The thoracic aorta was quickly removed and placed in oxygenated Krebs-Henseleit buffer (118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 1.18 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 22.2 mM glucose, pH 7.2) at 37°C. Aorta were cleaned of their connective tissues and cut into rings of ~4 mm. Rings were suspended in 5 ml oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂) bioassay vessels and maintained at 37°C. The tissues were allowed to equilibrate for 1 h under a resting tension of 1 g before being exposed to 60 mM KCl for normalization. Mechanical responses were recorded isometrically on a Grass 7D polygraph equipped with force-displacement transducers. All peptides were dissolved in water. Concentrations of 1.0 x 10⁻¹⁰ M to 1.0 x 10⁻⁵ M of hUT-II or analogues were used to establish the concentration-response curves.

All results were normalized as a percentage of the contraction obtained with KCl 60 mM. The EC₅₀ are expressed as mean ± s.e.m. and the *n* values refer to the number of rats. Differences between data were tested for significance by the Student's *t*-test for unpaired samples. Values of *p* < 0.05 were considered as significant.

Cloning of human and rat urotensin-II receptor

As the putative human urotensin II receptor sequence is intronless, we cloned this protein from human genomic DNA via polymerase chain reaction (PCR). PCR conditions, established to amplify the human GPR14 sequence

were 94°C, 10 min followed by 35 cycles of 94°C, 1 min, 60°C, 1 min, 72°C and 2 min using the GC-melt kit. Primers designed to amplify the coding sequence contained a *Bam*HI site in the forward, and a *Xba*I-site in the reverse primer, respectively. The urotensin receptor coding region, flanked by *Bam*HI/*Xba*I sites, was cloned into the pCDNA3.1(+) mammalian expression vector and sequenced in both directions. For generation of stable cell lines, the human UT-II receptor coding sequence flanked by a 5' *Eco*RI site and a 3' *Eco*RV site was cloned into the mammalian episomal expression vector pEAK8.

The rat UT-II receptor coding sequence flanked by a 5' *Eco*RI and 3' *Not*I site was amplified via PCR from rat kidney cDNA and cloned into the mammalian pEAK8 expression vector. Sequences of all urotensin II receptor expressing plasmids were verified by dideoxy sequencing in both directions.

Cell culture and transfection

CHO K1-cells were grown in basal ISCOVE medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, penicillin-streptomycin (10 000 IU/ml – 10 000 µg/ml), 25 mg/ml gentamicin, at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Cells were transiently transfected with the UT-II-receptor cDNAs using the LipofectAMINE™ reagent according to the manufacturer's protocol. After 18-24 h following the transfection, cells were splitted into black-wall 96-well plates at a density of 50 000 cells per well and cultured for an additional 18-24 h period before being used in the functional FlipR-assay.

Fluorescence plate imaging reader (FLIPR) assay

Cells were stained in 96-well plates for 1 h (37°C, 5% CO₂) with 100 µl of PBS (without Ca²⁺, Mg²⁺ and NaHCO₃) containing 4 µM of the fluorescent calcium indicator Fluo-4, 0.22% Pluronic F-127 in DMSO, 2.5 mM probenecid, 1 mM EGTA and 1% FCS. Cells were then washed three times with PBS (without Ca²⁺, Mg²⁺ and NaHCO₃) containing 1 mM EDTA, 0.5 mM MgCl₂ and 2.5 mM probenecid. After the final wash, 100 µl residual volume remained on the cells. Peptides were aliquoted as 2X solutions in 96-well plates and transferred by the instrument from the ligand plate to the cell plate. Fluorescence was recorded with the fluorometric imaging plate reader FlipR™, (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) over a period of 3 minutes. Fluorescence was recorded simultaneously in all wells in 3-second intervals during the first minute and in 10-second intervals during the last two minutes. Fluorescence data were generated in duplicate and repeated for at least 3 times. Data were analyzed by non-linear curve fitting using GraphPad Prism version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Generation of stable human and rat UT-II receptor expressing cell lines

For the generation of stable cell lines expressing the human and rat urotensin II receptor, HEK293 cells were transfected with human- and rat-pEAK8 constructs using the FuGene 6 transfection reagent according to the supplier's protocol. Two days after transfection, cells were selected in DMEM, supplemented with 10% fetal calf serum, 20 mM HEPES, penicillin-streptomycin (10 000 IU/ml – 10 000 µg/ml) and 1 µg/ml puromycin for a period of ~4 weeks (37°C, 5% CO₂, 95% relative humidity). Functional activity of the urotensin II receptor-expressing cell population was verified with a FlipR assay, recording urotensin II-mediated intracellular Ca²⁺ release, as described above.

Membrane preparation and radioligand binding assays

HEK293 cells stably expressing human or rat urotensin II receptor were cultured up to 80% confluency in DMEM, supplemented with 10% fetal calf serum, 20 mM HEPES, penicillin-streptomycin (10 000 IU/ml – 10 000 µg/ml) and

1 µg/ml puromycin (37°C, 5% CO₂, 95% relative humidity). Cells were washed once with ice-cold PBS and a second time with PBS containing the Protease Inhibitor Cocktail (Complete™). Cells were scraped off and spun down gently. The pellet was resuspended in a buffer containing 5mM HEPES, 1 mM EDTA-disodium salt and the cocktail of protease inhibitors Complete™ and then incubated on ice for 15 minutes. Cells were pelleted again and dounced in a homogenizer (Unit F8B, Constant cell disruption systems, Honiley, Warwickshire, UK). The supernatant and dounced pellet were combined and spun at 50 000 g (Beckman Avanti J251, Fullerton CA). The cell membrane pellet was resuspended in a buffer consisting of 20 mM HEPES, 1 mM EDTA-disodium salt, 150 mM NaCl and 10% sucrose. Membrane aliquots were stored at -80°C. One day prior to the binding assay, membranes were thawed, pelleted and resuspended in the assay buffer consisting of 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-disodium salt, 160 µg/ml bacitracin and Complete Protease Inhibitor (2 tablets/100 ml).

Membranes were distributed into 96-well wheatgerm-agglutinin Flashplates PLUS, incubated overnight for adsorption and then, the Flashplates PLUS were washed twice with the assay buffer. For equilibrium binding assays, 0.2 nM human [¹²⁵I-Tyr⁹]urotensin II (initial specific activity 2200 Ci/mmol) was incubated with the indicated amounts of cold inhibitors during 4 h and radioactivity counted in a 1450 Microbeta Wallac Jet (Wallac, Turku, Finland). Nonspecific binding was determined in the presence of 10 µM human UT-II and corresponded to 40% of the total binding for membranes expressing the human urotensin II receptor, and to 8% of the total binding for membranes expressing the rat urotensin II receptor. The binding of [¹²⁵I-Tyr⁹]urotensin II was characterized by a K_D of 1.66 nM and a B_{max} of 1.1 pmol/mg protein for human UT-II receptor-expressing membranes, and a K_D of 1.23 nM and B_{max} of 3.7 pmol/mg protein for rat UT-II receptor-expressing membranes. Data analysis was performed with GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Pharmacological studies

A series of 41 analogues (Table 1) were developed and initially we evaluated their biological activity, using the rat thoracic aorta paradigm (Figure 1 – A to F). The focus was first applied on peptide compounds containing exocyclic modifications (Table 2) and their contractile activity was measured using the rat thoracic aorta bioassay. Thus, the fragments obtained by shortening the N-terminal segment of hUT-II, such as hUT-II(2-11), hUT-II(3-11), hUT-II(4-11), hUT-II(5-11) and hUT-II(5-10) appeared as partial agonists with EC₅₀ values of 3.3×10^{-9} M, 2.8×10^{-10} M, 3.0×10^{-8} M, 6.8×10^{-7} and 1.5×10^{-6} M, respectively. Interestingly, hUT-II(3-11) was 10 times more potent than the whole molecule (0.28 nM vs 3.3 nM for hUT-II). In addition, the removal of valine-11 (compounds 2 and 7), led to an important loss of activity as compared to the parent molecule. The Ala-scan series related to the exocyclic amino acid residues of hUT-II showed that most derivatives are potent analogues of hUT-II. Only the substitution of valine-11 gave rise to a 50-fold decrease in potency, accompanied with a reduced efficacy. On the other hand, an analogue with a tetra-alanine N-terminal segment (compound 31: [Ala^{1,2,3,4}]hUT-II) or with the C-terminal carboxylic function transformed into an amidated form (compound 27) were partial agonists with an efficacy about half that of hUT-II but with EC₅₀ values close to that of the parent molecule.

Endocyclic and ring transformations of hUT-II were also studied using the rat thoracic aorta bioassay (Table 3 and 4). So far, except for [Ala⁶]hUT-II (compound 13) which was a weak agonist, all alanine substitutions of the endocyclic amino acids led to inactive peptides. Similarly, the successive deletion or the inversion of chirality of the endocyclic residues also exhibited, in most cases, a detrimental effect on the biological activity. One exception though with [D-Trp⁷]hUT-II (compound 23) which showed a significant but weak effect (EC₅₀) on the aorta. Substitutions with isofunctional residues were carried out at various positions. For instance, lysine-9 was replaced with arginine (compound 32) and

this analogue was only 20 times less potent than hUT-II. However, when the lysine-9 side chain was shortened by a distance equivalent to a methylene group, as obtained with ornithine-9, the new analogue exhibited a complete loss of constricting activity. The role of the Phe-6 and Tyr-9 side chains were also investigated (compounds 35 and 36) using another aromatic residue for the substitution. Potent analogues with only a 10-fold decrease in activity were produced with this alteration.

Ring modifications were introduced in a few analogues. The results showed that an increase of the ring size (compound 37) caused a 100-fold decrease in activity while linearization and substitution of the sulfhydryl moiety with acetamidomethyl groups (compound 34) gave a weakly active analogue.

Binding assays on human and rat receptors

[¹²⁵I-Tyr⁹]hUT-II was used as a probe for evaluating the binding characteristics of the peptides on the human (Fig. 2 – A to C; Tables 5, 7 and 9) and rat (Fig. 3 – A to C; Tables 6, 8 and 10) UT-II receptors. As in the rat thoracic aorta bioassay, human and rat UT-II exhibited very similar potencies in the binding experiments. The magnitude of binding for both isoforms was superior on the human than on the rat receptor. Successive N-terminal deletions (Tables 5 and 6 – compounds 3 to 6) had only minor effects on the binding properties on both receptor types. Surprisingly, an exception was observed with hUT-II(5-11) (compound 6) on the rat receptor since no binding was measured although this peptide appeared as a weak agonist on the rat thoracic aorta. The removal of valine-11 in the whole molecule (compound 7) or in the hUT-II(5-11) fragment (compound 2) led to molecules with poor affinities for the human and rat receptors. On the other hand, the substitution of residue 11 with alanine (compound 17) exhibited a 30-fold decrease on the rat receptor affinity and a 10-fold reduction of binding on the human receptor. All peptides with any other Ala substitution in the exocyclic segment of UT-II (compounds 8 to 11), and even

[Ala^{1,2,3,4}]hUT-II (compound 31), appeared as very potent ligand of the UT-II receptors. Similarly, the C-terminal carboxylic function can be replaced with a neutral amide group without losing affinity for both human and rat receptors. Except for hUT-II(5-11) (compound 6) that did not attach to the rat receptor but appeared as equipotent to hUT-II in binding to the human receptor, all compounds containing exocyclic modifications exhibited a Hill slope close to -1 thus signifying the presence of a single subtype of UT-II receptor.

Endocyclic modifications confirmed the key role of the residues 6 to 9 of hUT-II (Tables 7 and 8). Successive deletions, inversion of amino acid configuration or Ala substitutions gave rise to detrimental effects on the binding properties related to the human or rat UT-II receptors. A few alterations were rather well tolerated as seen with the replacement of Tyr-9 with Phe (compound 35) or the substitution of Phe-6 with Tyr (compound 36). So far, both compounds exhibited very significant affinity for the UT-II receptors.

Poor affinities were usually measured with peptide analogues containing cysteinyl modifications. Nevertheless, the cyclic compound [HomoCys⁵⁻¹⁰]hUT-II (compound 37) was described as a 100-fold weaker agonist than the parent molecule (EC_{50} : 348 ± 23 vs. 3.3 ± 0.3) in the rat thoracic bioassay. Strikingly, this analogue showed no significant affinity for the rat receptor expressed in the HEK293 cell line but appeared well recognized by the human UT-II receptor with an affinity about 100-fold lower than that of hUT-II.

Functional FlipR assay on Ca²⁺ mobilization

Using the functional FlipR-assay, the effects of exocyclic, endocyclic and ring modifications on Ca²⁺ mobilization were measured on transfected CHO-K1 cells expressing the human (Tables 11, 13 and 15) or rat (Tables 12, 14 and 16) UT-II receptors. In contrast to the biological and binding results obtained with some exocyclic-altered analogues, the functional data showed that such modifications had in most cases only little effects on Ca²⁺ mobilization. In fact,

EC₅₀ values ranged from 1.8 to 193 nM with the human receptor while it was between 0.24 to 735 nM with the rat receptor preparation. When endocyclic substitutions or mutations were introduced in hUT-II, the absence of Ca²⁺ mobilization was as expected, frequently encountered. However, some transformations had little detrimental impacts on the calcium assay. This was particularly noticeable with the inversion of configuration of Trp-7 (compound 23), the substitution of Tyr-9 with Phe (compound 35) and the substitution of Phe-6 with Tyr (compound 36). These analogues, as observed with the two other paradigms, retained on Ca²⁺ mobilization a very large activity. Surprisingly, analogues containing respectively a histidine residue at position 7 (compound 28) or an ornithine moiety substituting Lys-8 (compound 33), still exhibited a very significant potency in promoting calcium movements in the transfected cells. Similarly, the weak rat thoracic aorta agonist [HomoCys⁵⁻¹⁰]hUT-II (compound 37) appeared as a very potent agonist on Ca²⁺ mobilization in CHO-K1 cells.

Discussion

Three series of urotensin II analogues were designed to elucidate the role of the exocyclic, endocyclic and ring-related amino acids in three different paradigms *i.e.* the rat thoracic aorta bioassay, binding assays with HEK293 cells expressing the human or rat UT-II receptor and functional assays on Ca^{2+} mobilization using CHO-K1 cells expressing the human or rat UT-II receptor. First, a stepwise truncation as well as an alanine scan of the exocyclic residues of human UT-II were carried out and the corresponding derivatives were tested in the various assays. Modifications encountered with the rat UT-II sequence and the amidation of the C-terminus were also analyzed. The data revealed obvious disparities depending of the assay or the species and therefore pinpointed the possibility of a multiplicity of binding sites and actions. Thus, the Ca^{2+} mobilization assay, whether carried out with the human or rat receptor (Tables 11 and 12 – compounds 2 to 6) suggested, in agreement with the report of Itoh et al. (1987), that the highly conserved C-terminal part of hUT-II contains the pharmacophoric elements for giving potent agonists. However, the contractile effects evaluated in the rat thoracic aorta and the binding values measured with the human and rat receptors showed that hUT-II(5-11) (compound 6) and hUT-II(5-10) (compound 2) were weak ligands or agonists. In the rat aorta bioassay, hUT-II(5-11) and hUT-II(5-10), were respectively 200-fold and 450-fold less potent than the parent molecule and their affinity was poor towards the rat receptor. In contrast, while compound 6 exhibited in the human receptor binding assay an affinity identical to that of hUT-II, compound 2 was more than 40 times less potent. The structure of the cyclic core of urotensin II is similar to that of other peptides such as somatostatin (SS) (Rohrer et al., 1998), vasopressin (VP) (Manning et al., 1999) and melanin-concentrating hormone (MCH) (Lebl et al., 1989; Audinot et al., 2001). Therefore, it is not excluded that some UT-II analogues and fragments might interact with receptors other than GPR14. As a matter of fact, although SS itself is not recognized by the UT-II receptor, Coy and coll. (Coy et al., 2000; Rossowski et al., 2002) screened a series of SS ligands in the rat aorta bioassay and for competitive binding in a rat preparation. They

discovered that several analogues have moderate affinity for GRR14 and were able to block UT-II induced phasic contractions in rat thoracic aorta rings. Moreover, some analogues were inhibitors of the phasic but not tonic contractions produced by UT-II. Coy and coll. concluded that their data support the suggestion that UT-II receptor and SS type 2/5 receptors display similar surface topologies. Therefore, it is conceivable that more than one binding site could be involved in the urotensin II bioactivity. This hypothesis would explain how peptides such as hUT-II(5-11) and hUT-II(5-10) are potent modulators of Ca^{2+} mobilization and are able to induce a contraction of the rat aorta, without showing any significant affinity for the rat GPR14 expressed in HEK293 cells. So far, the data collected with the Ca^{2+} mobilization assay in CHO-K1 cells, for the series of compounds containing exocyclic modifications, did not appear as sufficient by itself for discriminating the GPR14 receptor and evaluating the potency of UT-II analogues.

Nevertheless, the rat aorta pharmacological assay and the binding studies, showed correlations allowing a specific identification of key pharmacophores. The successive truncation of the N-terminal segment of hUT-II, up to Pro-3 inclusively to give hUT-II(4-11) (compound 5) led to very potent and efficacious analogues in both assays whereas, the removal of the next residue, Asp-4, produced the fragment CFWKYCV that appeared in the rat preparations, contrarily to what was described before by Itoh et al. (1987), a much weaker ligand and agonist than UT-II. That divergence might come from the absence in the Itoh's study of a normalization procedure of the biological responses, for example by using the KCl-induced contraction as a reference. As suggested by Perkins et al. (1990), the presence of a kind of "capping" of the C-terminal heptapeptide appears as a useful feature for obtaining potent peptides, as demonstrated with compounds 3 to 5, 38, 8 to 11, 31 and rat UT-II. Whether one amino acid or a short segment of residues is linked to the C-terminal heptapeptide, and apparently whatever the substitution is (see compounds 30 and 31), an effective analogue can be obtained in such conditions. This strategy was utilized by a few groups (Kinney et al.,

2001, 2002; Grieco et al., 2001), including us (Flohr et al., 2002), by acetylating the N-terminal function of some UT-II fragments and analogues. In contrast, as shown with hUT-II(1-10) (compound 7) and [Ala¹¹]hUT-II (compound 17), the valine residue would play an important role in activity and affinity. It is yet unclear if it is the aliphatic-hydrophobic nature of this residue that is responsible for the effects on binding and contractile action. Nevertheless, this amino acid is highly conserved throughout species and the rare substitution observed for instance in the rat or a sub-species of carp is made with the isofunctional residue isoleucine (Conlon, 2000). Finally, it was demonstrated that the C-terminal negative charge of UT-II is not important for the GPR14 receptor since its amidation (compound 27) did not significantly alter the affinity and biological activity of the UT-II ligand. In agreement with this data, Rossowski et al. (2002) observed that amidation of the C-terminal fragment 4-11 of hUT-II gave a potent vasoconstrictor peptide in the isolated rat thoracic aorta.

Endocyclic modifications revealed the major role played by the Phe⁶-Trp⁷-Lys⁸-Tyr⁹ segment of hUT-II. All assays (Tables 3, 7, 8 13 and 14), including the Ca²⁺ mobilization paradigm, showed that deletions or substitutions in the cyclic core of the peptide gave rise frequently to a severe loss of activity and affinity and, as reported before (Flohr et al., 2002), this is particularly evident with the amino acid triade WKY. In fact, the successive substitution with Ala of the residues forming the endocyclic tetrapeptide led in most cases to the abolition of the contractile activity in the rat thoracic aorta. An exception though was noticed with the evolutionarily highly conserved Phe-6 since [Ala⁶]hUT-II retained some biological activity in the rat aorta. Again, in this particular instance, care must be taken when interpreting the function of Phe-6 since the related analogue (compound 13) was a potent activator of Ca²⁺ mobilization but a ligand binding poorly or even not recognized by the GPR14 receptors. In agreement with these results, Phe-6 can be replaced with Tyr without losing much activity nor affinity. Moreover, in accord with our data, Kinney et al. (2002) also described a potent analogue obtained by substituting in the goby UT-II, the residue Phe-6 with

alanine. However, in this work, no other functional or binding data were reported for this peptide. Finally, single deletion within the peptide ring (compounds 18 to 21) also showed the importance of these amino acids, with unequivocal detrimental effects observed following the withdrawal of Trp-7, Lys-8 or Tyr-9.

To explore the importance of the correct conformation of the message sequence, we switched the chirality of the amino acids found in the cyclic part of hUT-II (compounds 22 to 25). The incorporation of the corresponding D-residues caused a dramatic decrease of the agonistic activities and binding affinities, except for Trp-7. The corresponding analogue [D-Trp⁷]hUT-II exhibited significant activity and affinities thus suggesting that the orientation is central but not critical as it was with the three other endocyclic residues. For instance, as suggested for somatostatin, it is well known that amino acids with D-configuration support the formation of β -turn type structures resulting in conformationally restricted peptides (Freidinger et al., 1984). Our previous NMR studies (Flohr et al., 2002) demonstrated, using the cyclic hexapeptide Ac-CFwKYC-NH₂, that the introduction of a D-Trp residue in position $i + 1$ gave a structure characterized by a distorted β -II' turn, leading to a distinct orientation of the Tyr-9 side chain, as compared to that found in UT-II. This molecular arrangement contrasts with the conformation suggested by NMR studies carried out in dimethyl sulfoxide or water for hUT-II (Flohr et al., 2002) and telostean fish UT-II (Bhaskaran et al., 1994). These reports rather described UT-II as a molecule with no classical turn structure or intramolecular hydrogen bond in the ring arrangement. Nevertheless, we tried to favor the stabilization of an intramolecular β -turn conformation by introducing, according to the Chou-Fasman parameters (Chou and Fasman, 1978), a Pro moiety at position $i + 1$ (compound 41) or a sequential rearrangement of the endocyclic residues (compound 40). Although the $\langle P_i \rangle$ parameter of these analogues was close to 1 and their respective p_i value largely above the theoretical threshold limit of 0.75×10^{-4} (1.3×10^{-4} and 1.6×10^{-4} for [Lys⁷,Tyr⁸,Trp⁹]hUT-II and [Pro⁷]hUT-II, respectively) thus suggesting a strong

probability of β -turn structure, both compounds were inactive in the biological and binding assays.

A few other alterations were also investigated. In occurrence, a histidine residue, an amino acid showing or not aromaticity depending of the pH, was introduced in position 7 in replacement of Trp (compound 28). This analogue was a weak agonist and ligand but, as for many compounds of our series, a potent activator of Ca^{2+} mobilization. In another experiment, lysine-8 was replaced with the isofunctional amino acids Arg and Orn and it was observed that the rat thoracic aorta was very sensitive to those alterations since $[\text{Arg}^8]\text{hUT-II}$ was 20-fold less potent than the parent molecule and $[\text{Om}^8]\text{hUT-II}$ was inactive. As concluded before (Flohr et al., 2002), it seems that the position and the distance of the positive ionizable feature, in relation to the two hydrophobic – aromatic poles formed by Trp-7 and Tyr-9, are key characteristics of UT-II ligands. In fact, it is believed that Lys-9 of somatostatin-14 interacts directly with Asp-122 found in the TM3 of the SSTR2 receptor (Strnad and Hadcock, 1995) or with Asp-130 located in the TM3 of the SSTR4 receptor (Marchese et al., 1995). It is likely that Lys-8 of UT-II would be involved in a similar interaction with GPR14, probably with the Asp-130 residue positioned in the TM3 of the receptor. On the other hand, we showed with $[\text{Phe}^9]\text{hUT-II}$ (compound 35) and $[\text{Ala}^9]\text{hUT-II}$ (compound 16) that the Tyr-9 residue can be substituted with another amino acid, as long as the aromatic nature is conserved. By introducing all these data in the development of a 3-point pharmacophore concept we were able, using a strategy of virtual screening of the Aventis compound repository, to identify S6716, a non peptidic antagonist of the GPR14 receptor.

In the third series of compounds of our study, we explored the impact of modifications of the ring-related amino acids (Tables 4, 9, 10, 15 and 16). It was observed that the linearization of hUT-II, as in the analogues 12 and 34, caused a major but not absolute loss of affinity and activity. Nevertheless, a peptide containing a Phe pair (compound 39), designed in order to mimic the π - π overlap

of the Phe aromatic rings observed in somatostatin, did not exhibit any significant binding nor activity. Neither did compound 26, a dimer obtained after the oxidation of the mono-Cys¹⁰ peptide, [Ala⁵]hUT-II. As demonstrated with [HomoCys⁵⁻¹⁰]hUT-II, an analogue with a disulfide-bridged ring containing two extra methylene moieties (compound 37), even the ring size appears as a critical feature since this analogue was about 100 times less active than UT-II in the rat thoracic aorta assay. Similar conclusions were reached by Grieco et al. (2001) after exploring the ring size and structure of hUT-II analogues containing a lactam bridge. Interestingly, and as frequently observed with the analogues of the three series, the affinity of compound 37 was very significant in only one of the two binding paradigms. In this case, [HomoCys⁵⁻¹⁰]hUT-II was only about 100-fold less potent than the parent molecule towards the human receptor whereas it showed no affinity for rat GPR14. Since both receptors are expressed in the same cell type and therefore are in the same membrane environment, it can be concluded that the rat and human GPR14 receptors possess distinct behaviors towards their ligands.

In summary, our exhaustive SAR studies revealed the role of the various amino acids of UT-II in aorta contraction and human – rat receptor affinity, and more particularly, of the peptide triade WKY that appeared as the essential part of the physiological ligand. They also brought us to suggest, on the basis of the frequent discrepancies and lack of relationship between the results of the rat aorta paradigm and the Ca²⁺ mobilization functional assay, that the bioactivities of some UT-II analogues might be mediated through more than one receptor/binding site, however not necessarily related to GPR14. Such an hypothesis has been also postulated previously by Coy et al. (2000) after observing a clear dichotomy between the phasic and tonic rat aorta contractions induced with UT-II. Consequently, functional screening of UT-II and its analogues, using uniquely a Ca²⁺ mobilization assay developed with transfected CHO-K1 cells expressing the human or rat GPR14 receptor, might lead to invalid SAR conclusions.

Acknowledgments

We thank Myriam Létourneau and Steve Bourgault for their technical assistance.

References

Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Alyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu W-S, Glover GL, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DWP, Ohlstein EH, Bergsma DK and Douglas SA (1999) Human Urotensin II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**:282-286.

Audinot V, Beauverger P, Lahaye C, Suply T, Rodriguez M, Ouvry C, Lamamy V, Imbert J, Rique H, Nahon JL, Galizzi JP, Canet E, Levens N, Fauchère JL and Boutin JA (2001) Structure-activity relationship studies of melanin-concentrating hormone (MCH)-related peptide ligands at SLC-1, the human MCH receptor. *J Biol Chem* **276**:13554-13562.

Bhaskaran R, Arunkumar AI and Yu C (1994) NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of urotensin II. *Biochim Biophys Acta* **1199**:115-122.

Chou PY and Fasman GD (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem* **47**:251-276.

Conlon JM (2000) Singular contributions of fish neuroendocrinology to mammalian regulatory peptide research. *Regul Pept* **93**:3-12.

Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA and Vaudry H (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:15803-15808.

Coy DH, Rossowski WJ, Cheng BL, Hocart SJ and Taylor JE (2000) Novel urotensin II (UII) antagonists point to multiple receptor involvement in UII bioactivity. *Regul Pept* **94**:48 (Abstracts of REGPEP 2000: The 13th international Symposium on regulatory peptides).

Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH, Willette RN (2000a) Differential vasoconstrictor activity of human urotensin II in vascular tissue isolated from rat, mouse, dog, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* **131**: 1262-1274.

Douglas SA, Ashton DJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ohlstein DH, Ruffolo MR, Ohlstein EH, Aiyar NV and Willette RN (2000b) Human Urotensin-II is a potent vasoactive peptide : pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate. *J Cardiovasc Pharmacol* **26**:163-166.

Dun SL, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK and Dun NJ (2001) Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* **305**:9-12.

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

Freidinger RM, Perlow DS, Randall WC, Saperstein R, Arison BH and Veber DF (1984) Conformational modifications of cyclic hexapeptide somatostatin analogs. *Int J Pept Protein Res* **23**:142-150.

Grieco P, Patacchini R, Carotenuto A, Maggi CA, Novellino E and Rovero P (2001) Design, synthesis and conformational analysis of human urotensin II (U-II)

analogues with lactam bridge. *Peptides: The Wave of the Future* (Lebl M and Houghten RA eds) pp630-631, American Peptide Society, San Diego and Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Itoh H, Itoh Y, Rivier J and Lederis K (1987) Contraction of the major artery segments of the rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am J Physiol* **252**:361-366.

Janecka A, Zubrzycka M and Janecki T (2001) Somatostatin analogs. *J Peptide Res* **58**:91-107.

Kinney WA, Almond Jr HR, Maryanoff BE, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Cho DS, Everson AM, Feinstein MA and Leung PA (2001) Structure-function study of the urotensin-II peptide: Elucidation of features required for potent agonist activity. *Abstracts of Papers. 222nd American Chemical Society National Meeting, Chicago.*

Kinney WA, Almond Jr HR, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Cho DS, Everson AM, Feinstein MA, Leung PA and Maryanoff BE (2002) Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew Chem Int Edit* in press.

Lebl M, Hruby VJ, Castrucci A and Hadley ME (1989) Melanin concentrating hormone analogues: Contraction of the cyclic structure. *Life Sci* **44**:451-457.

Maguire JJ, Kuc RE and Davenport AP (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II : receptor localization un human tissues and comparison of the vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* **131**:441-446.

Manning M, Stoev S, Cheng LL, Wo NC and Chan WY (1999) Synthesis and structure-activity investigation of novel vasopressin hypotensive peptide agonists. *J Pept Sci* **5** :472-490.

Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HHQ, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui L-C, Shi X, Gregor P, George SR, O'Dowd BF and Docherty JM (1995) Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* **29** :335-344.

Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind IL, Barkley M, Nishioka RS and Bern HA (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:5021-5024.

Perkins TD, Bansal S and Barlow DJ (1990) Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone urotensin II. *Biochem Soc Trans* **18**:918-919.

Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, Berk SC, Hutchins SM, Shen D-M, Xiong Y, Hayes EC, Parmar RM, Foor F, Mitra SW, Degrado SJ, Shu M, Klopp JM, Cai S-J, Blake A, Chan WWS, Pasternak A, Yang L, Patchett AA, Smith RG, Chapman KT and Schaeffer JM (1998) Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* **282**:737-740.

Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R and Coy DH (2002) Human urotensin II-induced aorta contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* **438** :159-170.

Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M and MacLean MR (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**:H925-H928.

Strand J and Hadcock JR (1995) Identification of a critical aspartate residue in transmembrane domain three necessary for the binding of somatostatin to the somatostatin receptor SSTR2.

Footnotes

Financial supports were obtained from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). AF is “*Chercheur National*” from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ) and AB is the recipient of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Corresponding author :

Dr. Alain Fournier

Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides

Institut national de la recherche scientifique – Université du Québec

INRS Institut Armand-Frappier

245 boul. Hymus

Pointe-Claire (Montréal), QC, H9R 1G6

Canada

Telephone : (514) 630-8816

Fax : (514) 630-8850

Email : alain.fournier@inrs-iaf.quebec.ca

Numbered footnotes

¹ Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire – Montréal , QC, Canada, H9R 1G6

² Disease Group Cardiovascular, Aventis Pharma Germany GmbH, Industriepark Hoechst, D-65926 Frankfurt am Main, Germany.

Table 1. Structure and molecular weight of the various analogues and fragments of urotensin II.

| Peptide | Structure ^a | Mr [g/mol] | Peptide | Structure ^a | Mr [g/mol] |
|---------|------------------------|------------|---------|---|------------|
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 1389 | 22 | ETPDCfWKYCV | 1389 |
| 2 | CFWKYC | 847 | 23 | ETPDCFwKYCV | 1389 |
| 3 | TPDCFWKYCV | 1260 | 24 | ETPDCFWkYCV | 1389 |
| 4 | PDCFWKYCV | 1158 | 25 | ETPDCFWKyCV | 1389 |
| 5 | DCFWKYCV | 1061 | 26 | (ETPDAFWKYCV) ₂ ^b | 2715 |
| 6 | CFWKYCV | 946 | 27 | ETPDCFWKYCV-NH ₂ | 1397 |
| 7 | ETPDCFWKYC | 1290 | 28 | ETPDCFHKYCV | 1339 |
| 8 | ATPDCFWKYCV | 1331 | 29 | ETPDCAFWKYCV | 1461 |
| 9 | EAPDCFWKYCV | 1359 | 30 | QHGTAPECFWKYCI (rUT-II) | 1661 |
| 10 | ETADCFWKYCV | 1363 | 31 | AAAACFWKYCV | 1230 |
| 11 | ETPACFWKYCV | 1345 | 32 | ETPDCFWRYCV | 1445 |
| 12 | ETPDAFWKYCV | 1359 | 33 | ETPDCFWKOrnCV | 1374 |
| 13 | ETPDCAWKYCV | 1313 | 34 | ETPDC(Acm)FWKYC(Acm)V ^c | 1561 |
| 14 | ETPDCFAKYCV | 1274 | 35 | ETPDCFWKFCV | 1401 |
| 15 | ETPDCFWAYCV | 1331,5 | 36 | ETPDCYWKYCV | 1404 |
| 16 | ETPDCFWKACV | 1297 | 37 | ETPDHcyFWKYHcyV | 1416 |
| 17 | ETPDCFWKYCA | 1361 | 38 | ECFWKYCV | 1075 |
| 18 | ETPDCWKYCV | 1241 | 39 | ETPDFFWKYFV | 1478 |
| 19 | ETPDCFKYCV | 1202 | 40 | ETPDCFKYWCV | 1388 |
| 20 | ETPDCFWYCV | 1260 | 41 | ETPDCFPKYCV | 1299 |
| 21 | ETPDCFWKCV | 1225 | | | |

^a Unless otherwise stated, all peptides exhibit free N- and C-terminus. Unless otherwise stated, all peptides containing cysteines or homocysteines are cyclic.

^b Dimer obtained through a disulfide bridge.

^c Linear hUT-II analogue with an acetamidomethyl group on the cysteine side-chains.

Table 2: Effects of exocyclic modifications in UT-II on the rat thoracic aorta.

| Peptide | Structure | Rat thoracic aorta bioassay | | |
|---------|-----------------------------|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^a | E _{max} ± SEM [%] ^b | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 3.3 ± 0.3 | 98 ± 3 | 12 |
| 30 | QHGTAPECFWKYCI (rUT-II) | 2.0 ± 0.2 | 48 ± 2 | 8 |
| 2 | CFWKYC | 1500 ± 200 | 61 ± 8 | 10 |
| 3 | TPDCFWKYCV | 3.3 ± 0.3 | 49 ± 1 | 7 |
| 4 | PDCFWKYCV | 0.28 ± 0.04 | 37 ± 2 | 5 |
| 5 | DCFWKYCV | 30 ± 3 | 67 ± 3 | 7 |
| 6 | CFWKYCV | 680 ± 50 | 31 ± 2 | 6 |
| 7 | ETPDCFWKYC | 1900 ± 300 | 65 ± 2 | 8 |
| 38 | ECFWKYCV | 10 ± 1 | 81 ± 2 | 10 |
| 8 | ATPDCFWKYCV | 3.0 ± 0.1 | 106 ± 3 | 12 |
| 9 | EAPDCFWKYCV | 3.0 ± 0.2 | 99 ± 4 | 8 |
| 10 | ETADCFWKYCV | 13.0 ± 0.2 | 93 ± 13 | 6 |
| 11 | ETPACFWKYCV | 9.3 ± 0.6 | 69 ± 4 | 10 |
| 17 | ETPDCFWKYCA | 160 ± 15 | 62 ± 8 | 5 |
| 31 | AAAACFWKYCV | 6.0 ± 0.6 | 44 ± 5 | 10 |
| 27 | ETPDCFWKYCV-NH ₂ | 2.0 ± 0.2 | 48 ± 2 | 8 |

^a Concentration producing 50% of the maximum effect.

^b Percentage of efficacy as compared to the value obtained with 60 mM KCl.

^c Number of animals.

Table 3: Effects of endocyclic modifications in UT-II on the rat thoracic aorta.

| Peptide | Structure | Rat thoracic aorta bioassay | | |
|---------|----------------------|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^a | E _{max} ± SEM [%] ^b | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 3.3 ± 0.3 | 98 ± 3 | 12 |
| 13 | ETPDCAWKYCV | 1900 ± 300 | 67 ± 12 | 4 |
| 14 | ETPDCFAKYCV | >10 000 | nd | 4 |
| 15 | ETPDCFWAYCV | >10 000 | nd | 4 |
| 16 | ETPDCFWKACV | >10 000 | nd | 4 |
| 18 | ETPDC-WKYCV | >1000 | nd | 4 |
| 19 | ETPDCF-KYCV | >10 000 | nd | 4 |
| 20 | ETPDCFW-YCV | >10 000 | nd | 3 |
| 21 | ETPDCFWK-CV | >10 000 | nd | 4 |
| 22 | ETPDCfWKYCV | >1000 | nd | 6 |
| 23 | ETPDCFwKYCV | 170 ± 50 | 37 ± 3 | 8 |
| 24 | ETPDCFWkYCV | >10 000 | nd | 4 |
| 25 | ETPDCFWKyCV | >10 000 | nd | 4 |
| 28 | ETPDCFHKYCV | 2600 ± 420 | 52 ± 13 | 6 |
| 32 | ETPDCFWRYCV | 69 ± 15 | 64 ± 14 | 8 |
| 33 | ETPDCFWOrnYCV | >10 000 | nd | 4 |
| 35 | ETPDCFWKFCV | 35 ± 2 | 64 ± 14 | 8 |
| 36 | ETPDCYWKYCV | 40 ± 4 | 83 ± 5 | 9 |
| 41 | ETPDCFPKYCV | >10 000 | 69 ± 3 | 4 |
| 29 | ETPDCAFWKYCV | 2660 ± 1300 | 34 ± 4 | 7 |
| 40 | ETPDCFKYWCV | >10 000 | nd | 5 |

^{a, b, c} As in Table 2.

Table 4: Effects of ring modifications in UT-II on the rat thoracic aorta.

| Peptide | Structure | Rat aorta bioassay | | |
|---------|---|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^a | E _{max} ± SEM [%] ^b | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 3.3 ± 0.3 | 98 ± 3 | 12 |
| 12 | ETPDAFWKYCV | > 1000 | nd | 5 |
| 34 | ETPDC(Acm)FWKYC(Acm)V | 603 ± 7 | 64 ± 7 | 8 |
| 39 | ETPDFFWKYFV | >10 000 | nd | 3 |
| 37 | ETPDHcyFWKYHcyV | 348 ± 23 | 95 ± 6 | 8 |
| 26 | (ETPDAFWKYCV) ₂ ^d | >10 000 | nd | 3 |

^{a, b, c} As in Table 2.

^d Dimer obtained through a disulfide bridge.

Table 5: Effects of exocyclic modifications in UT-II on the binding of [¹²⁵I]-Tyr⁹hUT-II on the human UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Human UT-II receptor | | |
|---------|-----------------------------|--|------------------|----------------|
| | | IC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | Hill slope ± SEM | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 14 ± 6 | -1.11 ± 0.26 | 4 |
| 30 | QHGTAPECFWKYCI | 16 ± 5 | -0.76 ± 0.06 | 3 |
| 2 | CFWKYC | 605 ± 187 | -0.90 ± 0.06 | 3 |
| 3 | TPDCFWKYCV | 31 ± 19 | -0.97 ± 0.11 | 3 |
| 4 | PDCFWKYCV | 5.2 ± 1.4 | -0.95 ± 0.11 | 3 |
| 5 | DCFWKYCV | 5.1 ± 0.5 | -0.68 ± 0.13 | 4 |
| 6 | CFWKYCV | 15 ± 8 | -0.51 ± 0.04 | 3 |
| 7 | ETPDCFWKYC | > 10 000 | nd | 3 |
| 38 | ECFWKYCV | 3.0 ± 0.9 | -0.78 ± 0.14 | 3 |
| 8 | ATPDCFWKYCV | 19 ± 6 | -0.91 ± 0.47 | 4 |
| 9 | EAPDCFWKYCV | 6.2 ± 2.9 | -1.15 ± 0.30 | 3 |
| 10 | ETADCFWKYCV | 14 ± 6 | -0.54 ± 0.05 | 4 |
| 11 | ETPACFWKYCV | 13 ± 4 | -0.80 ± 0.18 | 5 |
| 17 | ETPDCFWKYCA | 195 ± 33 | -1.19 ± 0.28 | 4 |
| 31 | AAAACFWKYCV | 8.3 ± 2.1 | -1.39 ± 0.39 | 3 |
| 27 | ETPDCFWKYCV-NH ₂ | 11 ± 5 | -0.81 ± 0.13 | 4 |

^a Binding assay using membranes isolated from a stable HEK293 cell line expressing the human UT-II receptor.

^b Concentration producing a 50% inhibition of binding.

^c Number of experiments made in triplicate.

Table 6: Effects of exocyclic modifications in UT-II on the binding of [¹²⁵I]-Tyr⁹hUT-II on the rat UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Rat UT-II receptor | | |
|---------|-----------------------------|--|------------------|----------------|
| | | IC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | Hill slope ± SEM | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 73 ± 20 | -1.04 ± 0.06 | 4 |
| 30 | QHGTAPECFWKYCI (rUT-II) | 32 ± 9 | -1.09 ± 0.05 | 3 |
| 2 | CFWKYC | 5279 ± 489 | -1.1 ± 0.03 | 3 |
| 3 | TPDCFWKYCV | 73 ± 20 | -1.04 ± 0.06 | 4 |
| 4 | PDCFWKYCV | 32 ± 9 | -1.09 ± 0.05 | 3 |
| 5 | DCFWKYCV | 15 ± 4 | -1.26 ± 0.21 | 4 |
| 6 | CFWKYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 7 | ETPDCFWKYC | 3100 ± 473 | -0.87 ± 0.03 | 4 |
| 38 | ECFWKYCV | 60 ± 34 | -0.77 ± 0.24 | 3 |
| 8 | ATPDCFWKYCV | 35 ± 9 | -0.97 ± 0.03 | 4 |
| 9 | EAPDCFWKYCV | 60 ± 35 | -0.75 ± 0.08 | 3 |
| 10 | ETADCFWKYCV | 76 ± 32 | -0.70 ± 0.08 | 3 |
| 11 | ETPACFWKYCV | 22 ± 6 | -1.11 ± 0.05 | 3 |
| 17 | ETPDCFWKYCA | 1994 ± 629 | -1.22 ± 0.17 | 4 |
| 31 | AAAACFWKYCV | 36 ± 5 | -1.29 ± 0.11 | 3 |
| 27 | ETPDCFWKYCV-NH ₂ | 36 ± 4 | -0.98 ± 0.09 | 3 |

^a Binding assay using membranes isolated from a stable HEK293 cell line expressing the rat UT-II receptor.

^b Concentration producing a 50% inhibition of binding.

^c Number of experiments made in triplicate.

Table 7: Effects of endocyclic modifications in UT-II on the binding of [¹²⁵I]-Tyr⁹]hUT-II on the human UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Human UT-II receptor | | |
|---------|----------------------|--|------------------|----------------|
| | | IC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | Hill slope ± SEM | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 14 ± 6 | -1.11 ± 0.26 | 4 |
| 13 | ETPDCAWKYCV | 1989 ± 621 | -0.25 ± 0.01 | 5 |
| 14 | ETPDCFAKYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 15 | ETPDCFWAYCV | 5020 ± 2311 | -0.58 ± 0.09 | 3 |
| 16 | ETPDCFWKACV | > 10 000 | nd | 3 |
| 18 | ETPDC-WKYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 19 | ETPDCF-KYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 20 | ETPDCFW-YCV | 5794 ± 2270 | -1.21 ± 0.53 | 3 |
| 21 | ETPDCFWK-CV | > 10 000 | nd | 3 |
| 22 | ETPDCfWKYCV | 7615 ± 709 | -0.88 ± 0.06 | 3 |
| 23 | ETPDCFwKYCV | 1047 ± 9 | -0.93 ± 0.21 | 3 |
| 24 | ETPDCFWkYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 25 | ETPDCFWKyCV | 2562 ± 264 | -1.55 ± 0.21 | 3 |
| 28 | ETPDCFHKYCV | 5761 ± 490 | -1.32 ± 0.06 | 3 |
| 32 | ETPDCFWRYCV | 780 ± 212 | -1.04 ± 0.08 | 5 |
| 33 | ETPDCFWOrnYCV | 967 ± 122 | -1.25 ± 0.28 | 3 |
| 35 | ETPDCFWKFCV | 4.6 ± 2.9 | -0.87 ± 0.16 | 3 |
| 36 | ETPDCYWKYCV | 214 ± 79 | -1.14 ± 0.17 | 4 |
| 41 | ETPDCFPKYCV | > 10 000 | nd | 4 |
| 29 | ETPDCAFWKYCV | > 10 000 | -1,13 ± 0,38 | 4 |
| 40 | ETPDCFKYWCV | > 10 000 | nd | 4 |

^{a, b, c} As in Table 5.

Table 8: Effects of endocyclic modifications in UT-II on the binding of [¹²⁵I]-Tyr⁹]hUT-II on the rat UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Rat UT-II receptor | | |
|---------|----------------------|--|------------------|----------------|
| | | IC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | Hill slope ± SEM | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 73 ± 20 | -1.04 ± 0.06 | 4 |
| 13 | ETPDCAWKYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 14 | ETPDCFAKYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 15 | ETPDCFWAYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 16 | ETPDCFWKACV | > 10 000 | nd | 3 |
| 18 | ETPDC-WKYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 19 | ETPDCF-KYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 20 | ETPDCFW-YCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 21 | ETPDCFWK-CV | > 10 000 | nd | 3 |
| 22 | ETPDCfWKYCV | > 10 000 | -0.72 ± 0.12 | 3 |
| 23 | ETPDCFwKYCV | 3531 ± 517 | -1.04 ± 0.05 | 3 |
| 24 | ETPDCFWkYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 25 | ETPDCFWKyCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 28 | ETPDCFHKYCV | > 10 000 | -0.86 ± 0.24 | 3 |
| 32 | ETPDCFWRYCV | 3559 ± 300 | -0.89 ± 0.05 | 3 |
| 33 | ETPDCFWOrnYCV | 4657 ± 629 | -1.96 ± 0.76 | 3 |
| 35 | ETPDCFWKFCV | 756 ± 133 | -0.92 ± 0.04 | 3 |
| 36 | ETPDCYWKYCV | 169 ± 13 | -0.91 ± 0.04 | 3 |
| 41 | ETPDCFPKYCV | > 10 000 | nd | 5 |
| 29 | ETPDCAFWKYCV | > 10 000 | -0.45 ± 0.08 | 4 |
| 40 | ETPDCFKYWCV | > 10 000 | nd | 5 |

^{a, b, c} As in Table 6.

Table 9: Effects of ring modifications in UT-II on the binding of [¹²⁵I-Tyr⁹]hUT-II on the human UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Human UT-II receptor | | |
|---------|---|--|------------------|----------------|
| | | IC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | Hill slope ± SEM | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 14 ± 6 | -1.11 ± 0.26 | 4 |
| 12 | ETPDAFWKYCV | 4309 ± 1526 | -1.00 ± 0.19 | 3 |
| 34 | ETPDC(Acm)FWKYC(Acm)V | 1832 ± 557 | -1.04 ± 0.13 | 5 |
| 39 | ETPDFFWKYFV | 3258 ± 993 | -0.96 ± 0.19 | 5 |
| 37 | ETPDHcyFWKYHcyV | 1481 ± 210 | -0.79 ± 0.11 | 5 |
| 26 | (ETPDAFWKYCV) ₂ ^d | > 10 000 | nd | 3 |

^{a, b, c} As in Table 5.

^d Dimer obtained through a disulfide bridge.

Table 10: Effects of ring modifications in UT-II on the binding of [¹²⁵I-Tyr⁹]hUT-II on the rat UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Rat UT-II receptor | | |
|---------|---|--|------------------|----------------|
| | | IC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | Hill slope ± SEM | n ^c |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 73 ± 20 | -1.04 ± 0.06 | 4 |
| 12 | ETPDAFWKYCV | > 10 000 | nd | 3 |
| 34 | ETPDC(Acm)FWKYC(Acm)V | > 10 000 | nd | 3 |
| 39 | ETPDDFWKYFV | > 10 000 | nd | 4 |
| 37 | ETPDHcyFWKYHcyV | > 10 000 | nd | 5 |
| 26 | (ETPDAFWKYCV) ₂ ^d | > 10 000 | nd | 3 |

^{a, b, c} As in Table 6.

^d Dimer obtained through a disulfide bridge.

Table 11: Effects of exocyclic modifications in UT-II on Ca²⁺ mobilization following activation of the human UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Human UT-II receptor | | |
|---------|-----------------------------|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | E _{max} ± SEM [%] ^c | n ^d |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 2.5 ± 0.2 | 100 | 17 |
| 30 | QHGTAPECFWKYCI (rUT-II) | 16 ± 2 | 118 ± 9 | 6 |
| 2 | CFWKYC | 2.3 ± 1.1 | 95 ± 7 | 4 |
| 3 | TPDCFWKYCV | 2.4 ± 0.1 | 103 ± 4 | 3 |
| 4 | PDCFWKYCV | 3.6 ± 0.6 | 100 ± 6 | 3 |
| 5 | DCFWKYCV | 3.0 ± 0.9 | 102 ± 5 | 4 |
| 6 | CFWKYCV | 1.8 ± 0.3 | 106 ± 4 | 6 |
| 7 | ETPDCFWKYC | 1.8 ± 0.1 | 99 ± 4 | 4 |
| 38 | ECFWKYCV | 44 ± 9 | 105 ± 4 | 4 |
| 8 | ATPDCFWKYCV | 1.8 ± 0.3 | 101 ± 2 | 6 |
| 9 | EAPDCFWKYCV | 3.3 ± 0.8 | 101 ± 1 | 5 |
| 10 | ETADCFWKYCV | 1.9 ± 0.8 | 102 ± 3 | 4 |
| 11 | ETPACFWKYCV | 2.7 ± 0.5 | 101 ± 3 | 8 |
| 17 | ETPDCFWKYCA | 3.2 ± 0.3 | 99 ± 2 | 3 |
| 31 | AAAACFWKYCV | 193 ± 28 | 147 ± 27 | 4 |
| 27 | ETPDCFWKYCV-NH ₂ | 117 ± 21 | 133 ± 56 | 3 |

^a Functional FlipR-assay on Ca²⁺ mobilization using transiently transfected CHO-K1 cells expressing the human UT-II receptor.

^b Concentration producing 50% of the maximal effect.

^c Percentage of efficacy as compared to the value obtained with human UT-II.

^d Number of experiments made in duplicate.

Table 12: Effects of exocyclic modifications in UT-II on Ca²⁺ mobilization following activation of the rat UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Rat UT-II receptor | | |
|---------|-----------------------------|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | E _{max} ± SEM [%] ^c | n ^d |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 1.5 ± 0.1 | 100 | 3 |
| 30 | QHGTAPECFWKYCI (rUT-II) | 12 ± 1 | 96 ± 3 | 5 |
| 2 | CFWKYC | 10 ± 1 | 92 ± 10 | 5 |
| 3 | TPDCFWKYCV | 1.0 ± 0.1 | 92 ± 3 | 3 |
| 4 | PDCFWKYCV | 2.1 ± 0.4 | 97 ± 20 | 3 |
| 5 | DCFWKYCV | 0.24 ± 0.04 | 106 ± 10 | 4 |
| 6 | CFWKYCV | 4 ± 1 | 104 ± 9 | 6 |
| 7 | ETPDCFWKYC | 5.4 ± 0.5 | 66 ± 10 | 3 |
| 38 | ECFWKYCV | 10 ± 2 | 91 ± 8 | 4 |
| 8 | ATPDCFWKYCV | 0.8 ± 0.2 | 84 ± 8 | 7 |
| 9 | EAPDCFWKYCV | 1.4 ± 0.3 | 107 ± 14 | 7 |
| 10 | ETADCFWKYCV | 1.5 ± 0.1 | 99 ± 15 | 3 |
| 11 | ETPACFWKYCV | 1.8 ± 0.2 | 98 ± 16 | 3 |
| 17 | ETPDCFWKYCA | 0.7 ± 0.2 | 88 ± 6 | 4 |
| 31 | AAAACFWKYCV | 735 ± 343 | 99 ± 8 | 4 |
| 27 | ETPDCFWKYCV-NH ₂ | 5 ± 2 | 94 ± 9 | 3 |

^a Functional FlipR-assay on Ca²⁺ mobilization using transiently transfected CHO-K1 cells expressing the rat UT-II receptor.

^b Concentration producing 50% of the maximal effect.

^c Percentage of efficacy as compared to the value obtained with human UT-II.

^d Number of experiments made in duplicate.

Table 13: Effects of endocyclic modifications in UT-II on Ca²⁺ mobilization following activation of the human UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Human UT-II receptor | | |
|---------|----------------------|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | E _{max} ± SEM [%] ^c | n ^d |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 2.5 ± 0.2 | 100 | 17 |
| 13 | ETPDCAWKYCV | 5.7 ± 0.3 | 98 ± 1 | 5 |
| 14 | ETPDCFAKYCV | 1303 ± 98 | 45 ± 2 | 7 |
| 15 | ETPDCFWAYCV | 14 800 ± 800 | 10.2 ± 0.1 | 5 |
| 16 | ETPDCFWKACV | 193 ± 9 | 75 ± 3 | 3 |
| 18 | ETPDC-WKYCV | 53 ± 2 | 67 ± 1 | 4 |
| 19 | ETPDCF-KYCV | >10 000 | nd | 5 |
| 20 | ETPDCFW-YCV | >10 000 | nd | 5 |
| 21 | ETPDCFWK-CV | >10 000 | nd | 4 |
| 22 | ETPDCfWKYCV | 1003 ± 98 | 87 ± 1 | 3 |
| 23 | ETPDCFwKYCV | 4 ± 1 | 98 ± 3 | 4 |
| 24 | ETPDCFWkYCV | >10 000 | nd | 3 |
| 25 | ETPDCFWKyCV | >10 000 | nd | 4 |
| 28 | ETPDCFHKYCV | 19 ± 3 | 84 ± 1 | 4 |
| 32 | ETPDCFWRYCV | 13 ± 1 | 103 ± 10 | 6 |
| 33 | ETPDCFWOrnYCV | 17 ± 3 | 107 ± 14 | 3 |
| 35 | ETPDCFWKFCV | 39 ± 9 | 122 ± 5 | 7 |
| 36 | ETPDCYWKYCV | 6 ± 1 | 150 ± 14 | 5 |
| 41 | ETPDCFPKYCV | >10 000 | nd | 8 |
| 29 | ETPDCAFWKYCV | 3298 ± 1034 | 33 ± 3 | 5 |
| 40 | ETPDCFKYWCV | >10 000 | nd | 6 |

^{a, b, c, d} As in Table 11.

Table 14: Effects of endocyclic modifications in UT-II on Ca²⁺ mobilization following activation of the rat UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Rat UT-II receptor | | |
|---------|----------------------|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | E _{max} ± SEM [%] ^c | n ^d |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 1.5 ± 0.1 | 100 | 3 |
| 13 | ETPDCAWKYCV | 5 ± 2 | 75 ± 5 | 4 |
| 14 | ETPDCFAKYCV | 906 ± 92 | 67 ± 9 | 6 |
| 15 | ETPDCFWAYCV | >10 000 | nd | 4 |
| 16 | ETPDCFWKACV | 180 ± 48 | 78 ± 7 | 4 |
| 18 | ETPDC-WKYCV | 438 ± 83 | 69 ± 4 | 4 |
| 19 | ETPDCF-KYCV | >10 000 | nd | 3 |
| 20 | ETPDCFW-YCV | >10 000 | nd | 6 |
| 21 | ETPDCFWK-CV | >10 000 | nd | 4 |
| 22 | ETPDCfWKYCV | 245 ± 46 | 73 ± 11 | 3 |
| 23 | ETPDCFwKYCV | 3 ± 1 | 79 ± 11 | 4 |
| 24 | ETPDCFWkYCV | 385 ± 75 | 47 ± 3 | 3 |
| 25 | ETPDCFWKyCV | >10 000 | nd | 6 |
| 28 | ETPDCFHKYCV | 8 ± 5 | 78 ± 7 | 4 |
| 32 | ETPDCFWRYCV | 1.4 ± 0.2 | 97 ± 13 | 3 |
| 33 | ETPDCFWOrnYCV | 14 ± 3 | 80 ± 2 | 3 |
| 35 | ETPDCFWKFCV | 1.2 ± 0.1 | 91 ± 10 | 5 |
| 36 | ETPDCYWKYCV | 0.10 ± 0.01 | 75 ± 9 | 3 |
| 41 | ETPDCFPKYCV | 1752 ± 238 | 75 ± 6 | 8 |
| 29 | ETPDCAFWKYCV | 999 ± 151 | 51 ± 4 | 7 |
| 40 | ETPDCFKYWCV | 1226 ± 199 | 46 ± 3 | 4 |

^{a, b, c, d} As in Table 12.

Table 15: Effects of ring modifications in UT-II on Ca²⁺ mobilization following activation of the human UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Human UT-II receptor | | |
|---------|---|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | E _{max} ± SEM [%] ^c | n ^d |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 2.5 ± 0.2 | 100 | 17 |
| 12 | ETPDAFWKYCV | 233 ± 16 | 96 ± 4 | 3 |
| 34 | ETPDC(Acm)FWKYC(Acm)V | 1165 ± 101 | 71 ± 7 | 3 |
| 39 | ETPDFFWKYFV | 189 ± 10 | 116 ± 7 | 4 |
| 37 | ETPDHcyFWKYHcyV | 5 ± 1 | 104 ± 4 | 4 |
| 26 | (ETPDAFWKYCV) ₂ ^e | >10 000 | nd | 3 |

^{a, b, c, d} As in Table 11.

^e Dimer obtained through a disulfide bridge.

Table 16: Effects of ring modifications in UT-II on Ca²⁺ mobilization following activation of the rat UT-II receptor.^a

| Peptide | Structure | Rat UT-II receptor | | |
|---------|---|--|---|----------------|
| | | EC ₅₀ ± SEM [nM] ^b | E _{max} ± SEM [%] ^c | n ^d |
| 1 | ETPDCFWKYCV (hUT-II) | 1.5 ± 0.1 | 100 | 3 |
| 12 | ETPDAFWKYCV | 687 ± 226 | 93 ± 12 | 8 |
| 34 | ETPDC(Acm)FWKYC(Acm)V | 274 ± 100 | 86 ± 9 | 3 |
| 39 | ETPDFFWKYFV | 107 ± 2 | 75 ± 5 | 3 |
| 37 | ETPDHcyFWKYHcyV | 0.7 ± 0.1 | 85 ± 3 | 3 |
| 26 | (ETPDAFWKYCV) ₂ ^e | >10 000 | nd | 3 |

^{a, b, c, d} As in Table 12.

^e Dimer obtained through a disulfide bridge.

Legends for Figures

Fig. 1. Concentration-response curves obtained with rat thoracic aorta rings after adding cumulative concentrations of hUT-II and its analogues containing (A – B) exocyclic modifications; (C – D) endocyclic modifications and (E – F) ring modifications. Data represent mean \pm SEM and $n = 5$ to 10 animals.

Fig. 2. Inhibition of the [125 I-Tyr⁹]hUT-II binding to the human GPR14 receptor. Panel A illustrates the effect of some deletions of amino acids in hUT-II : ■, hUT-II; □, hUT-II(5-10) (compound 2); ▲, hUT-II(4-11) (compound 5); Δ, [Glu⁴]hUT-II(5-11) (compound 38). Panel B illustrates the effect of some single substitutions using Ala : ■, hUT-II, □, [Ala¹]hUT-II (compound 8); ▲, [Ala²]hUT-II (compound 9); Δ, [Ala³]hUT-II (compound 10); ▼, [Ala¹¹]hUT-II (compound 17). Panel C illustrates the effect measured with some ring-altered hUT-II derivatives : ■, hUT-II; □, [Ala⁵]hUT-II (compound 12); ▲, [Cys(Acm)^{5,10}]hUT-II (compound 34); Δ, [Phe^{5,10}]hUT-II (compound 39). All experiments were performed in duplicates and repeated at least 3 times in independent experiments. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments, each performed in duplicates.

Fig. 3. Inhibition of the [125 I-Tyr⁹]hUT-II binding to the rat GPR14 receptor. Panel A illustrates the effect of some deletions of amino acids in hUT-II : ■, hUT-II; □, hUT-II(5-10) (compound 2); ▲, hUT-II(2-11) (compound 3); ◆, hUT-II(3-11) (compound 4); ▼, hUT-II(4-11) (compound 5); ▽, hUT-II(1-10) (compound 7); Δ, [Glu⁴]hUT-II(5-11) (compound 38). Panel B illustrates the effect of some substitutions using Ala : ■, hUT-II, □, [Ala¹]hUT-II (compound 8); ▲, [Ala²]hUT-II (compound 9); Δ, [Ala³]hUT-II (compound 10); ▼, [Ala⁴]hUT-II (compound 11); ◆, [Ala^{1,2,3,4}]hUT-II (compound 31). Panel C illustrates the effect measured with some ring-altered hUT-II derivatives : ■, hUT-II; □, [Ala⁵]hUT-II (compound 12); ▲, [Cys(Acm)^{5,10}]hUT-II (compound 34); Δ, [Phe^{5,10}]hUT-II (compound 39). All experiments were performed in duplicates and repeated at least 3 times in

independent experiments. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments, each performed in duplicates.

Figure 1

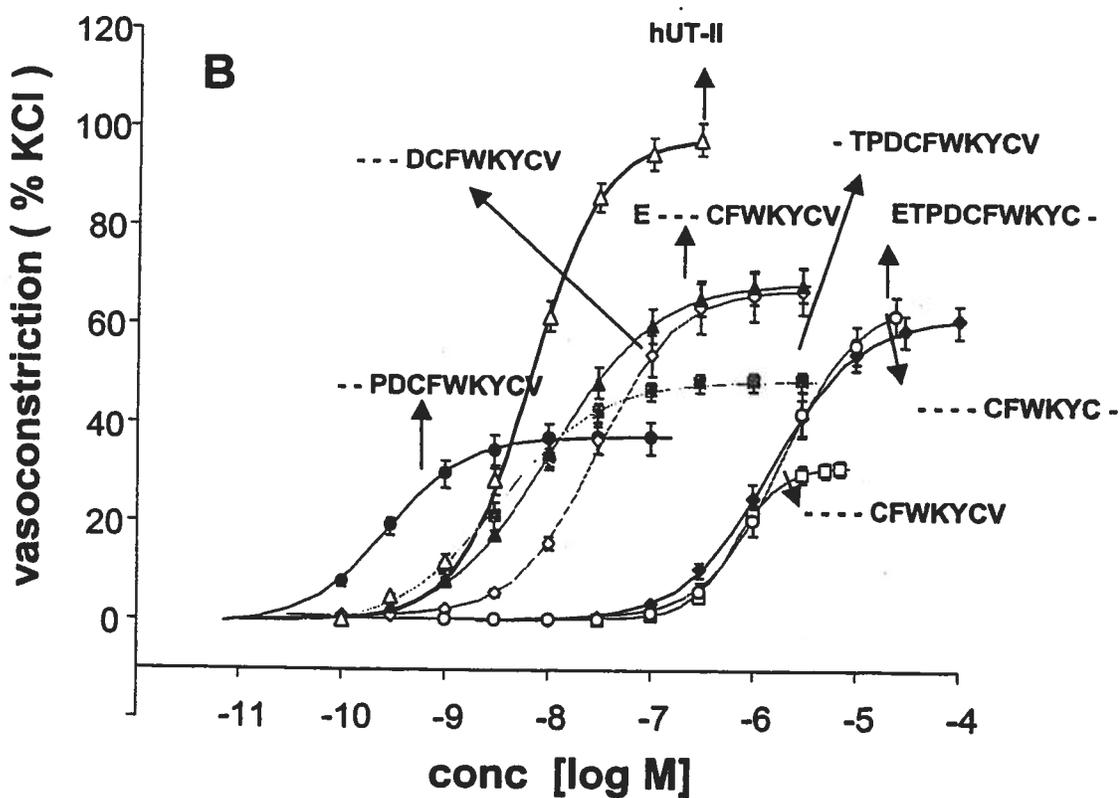
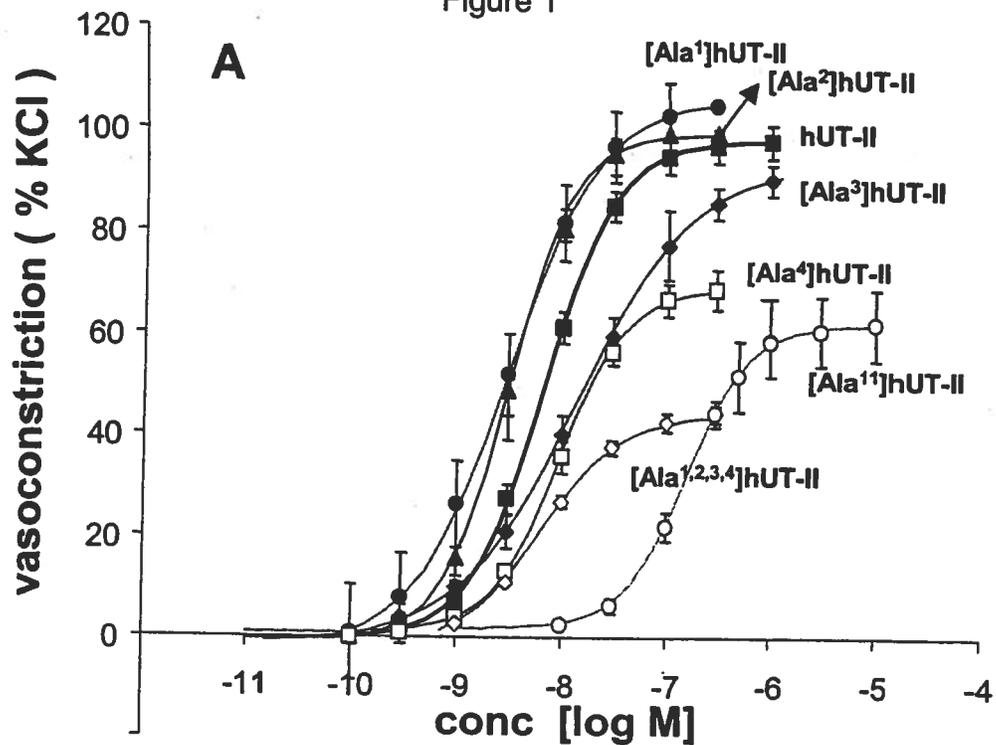


Figure 1

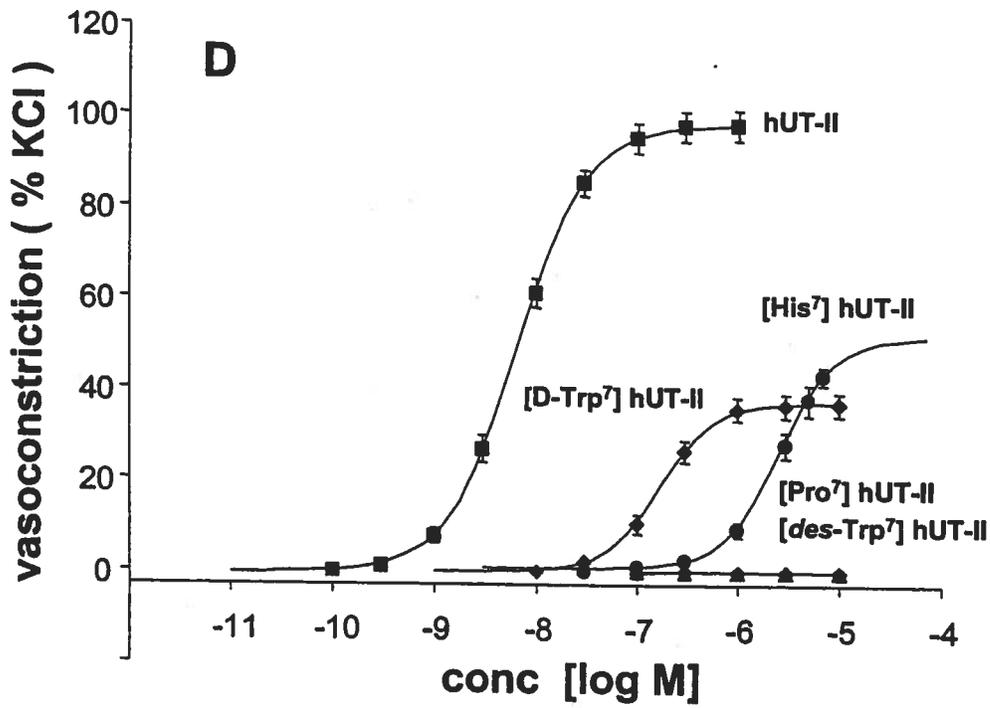
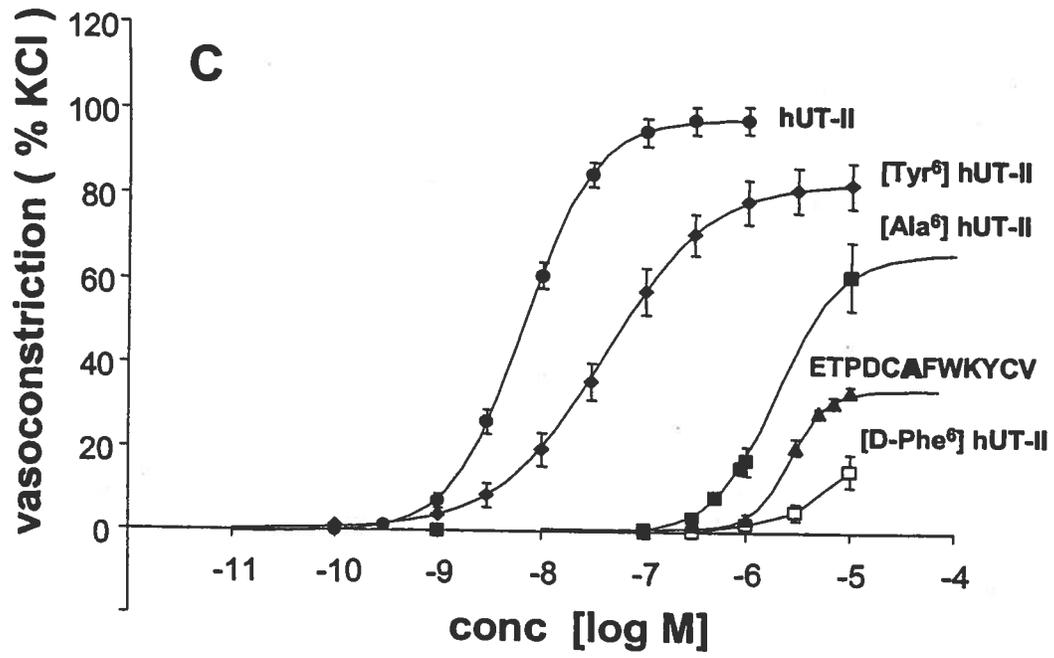


Figure 1

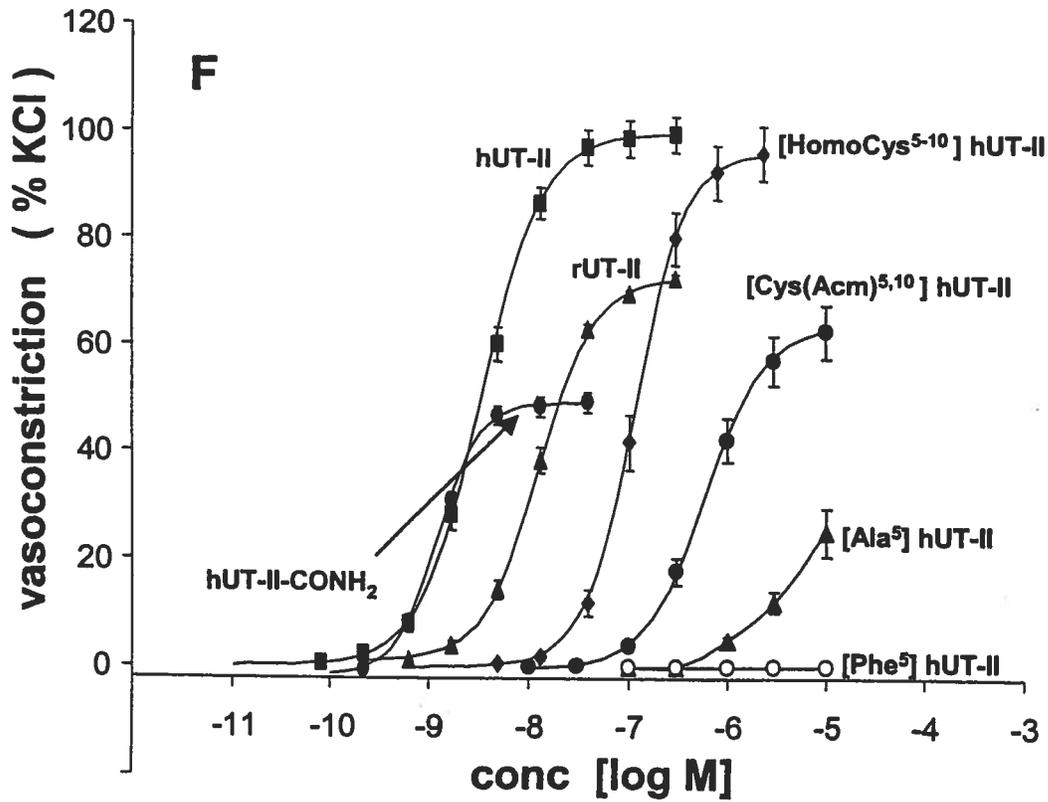
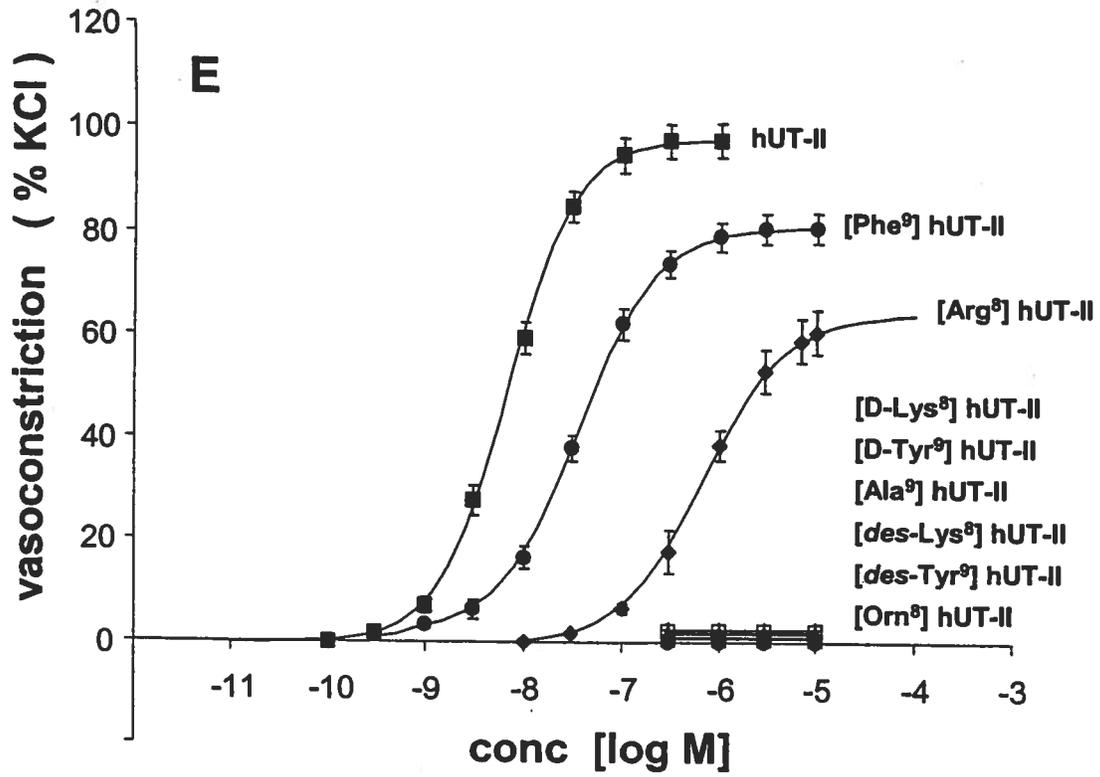


Figure 2

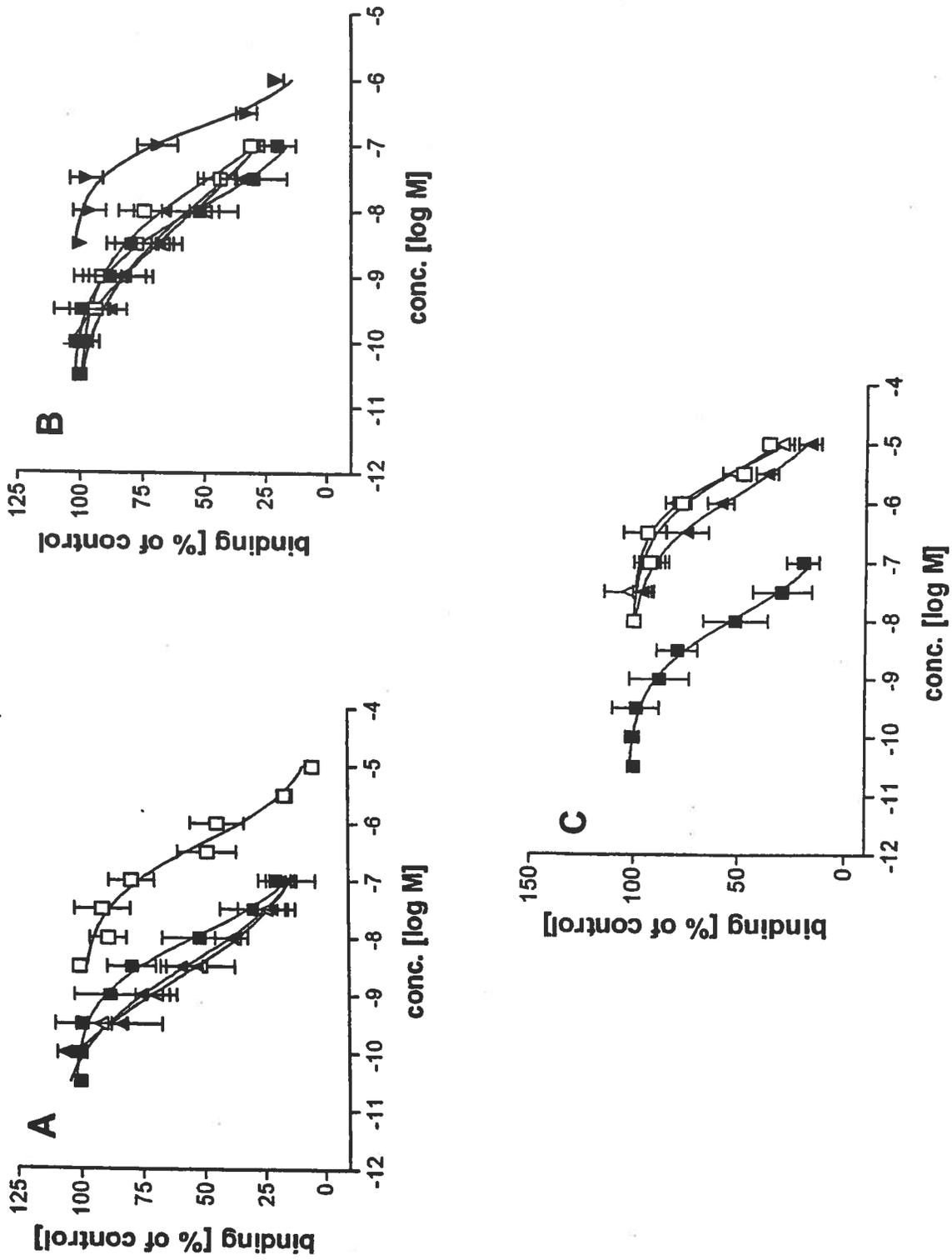
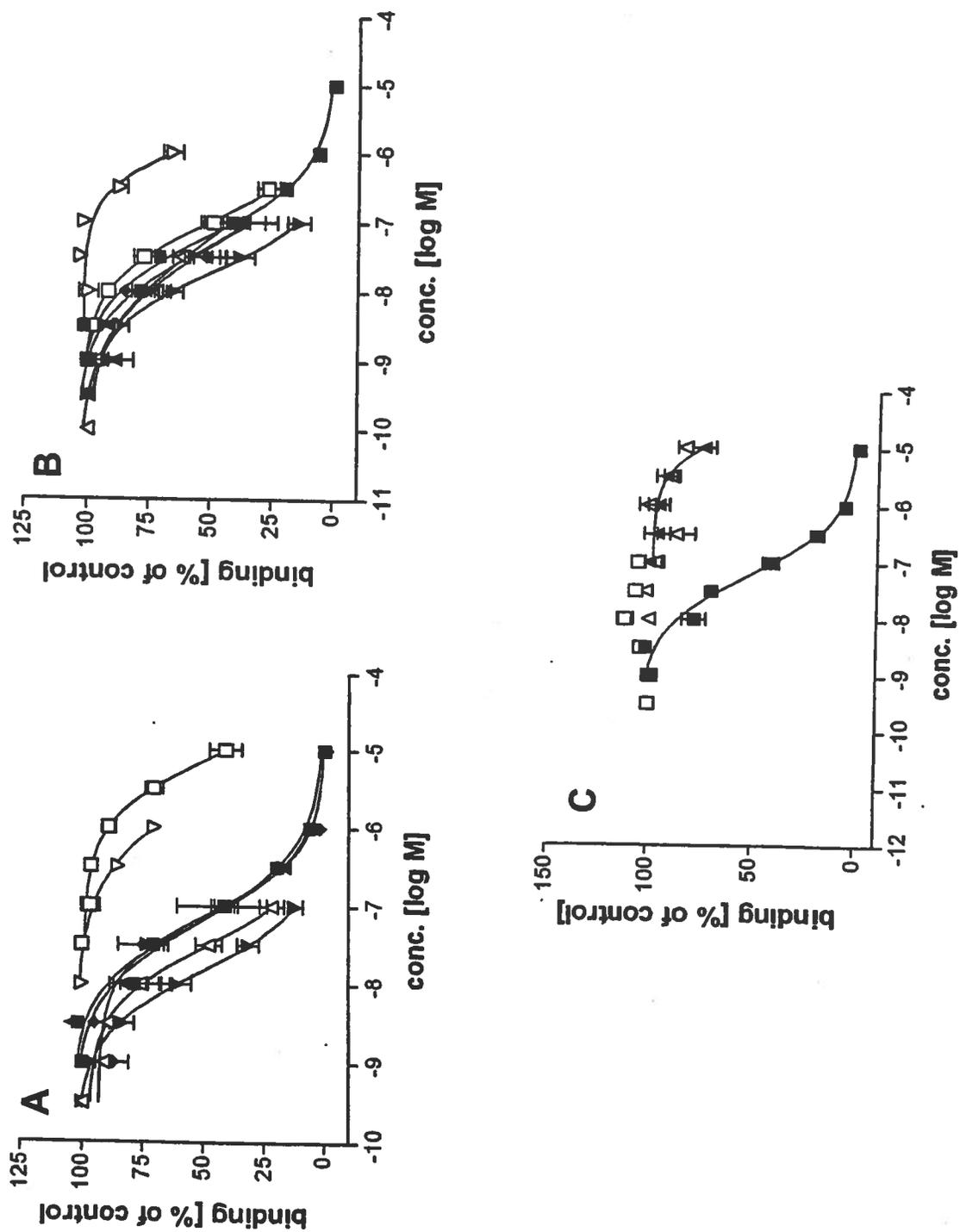


Figure 3



Discussion et Conclusion

L'analyse fonctionnelle des résidus de l'UT-II est une étape essentielle dans le développement d'un antagoniste, une molécule capable de lier le récepteur mais inapte à l'activer. A priori, l'antagoniste est un outil pharmacologique de choix afin de comprendre le rôle physiologique de l'UT-II, lequel reste pour l'instant inconnu. De plus, puisque l'UT-II est soupçonnée d'être associée à des physiopathologies, la molécule antagoniste a le potentiel de faciliter le développement d'un composé aux propriétés thérapeutiques. Jusqu'à maintenant, il y a eu que peu d'études de structure-activité de l'UT-II et dans les faits, elles ont généralement précédé la découverte de l'UT-II chez l'humain. Par conséquent, il devenait essentiel d'identifier les pharmacophores de ce peptide afin de mettre en évidence les groupements participant à la liaison et l'activation du récepteur. Une fois cette étape réalisée, il faut ensuite procéder à l'élaboration d'un modèle servant à générer une série de structures potentiellement antagonistes. Dans cette optique, nous avons évalué 41 analogues dans trois essais différents, *i.e.* la contraction de l'aorte de rat, la mobilisation calcique dans des cellules CHO-K1 exprimant de manière transitoire le récepteur humain ou de rat et une étude de liaison réalisée sur des cellules HEK293 exprimant le récepteur humain ou de rat. Basés sur une approche systématique, les analogues conçus visaient comme principal objectif de déterminer le rôle des résidus endocycliques et exocycliques ainsi que les acides aminés impliqués dans la formation du pont disulfure. L'approche systématique consiste à modifier à tour de rôle chacun des acides aminés selon une stratégie établie, tandis que l'approche concertée s'oriente sur la sélection d'un résidu en particulier et à son remplacement par des structures chimiques favorisant la compréhension des propriétés physico-chimiques.

L'appréciation de la contribution du segment peptidique N-terminal et l'identification de la séquence minimale nécessaire pour maintenir l'activité biologique ont été réalisées selon l'approche systématique. La délétion successive des acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale jusqu'à ne

conserver que la portion cyclique a permis d'évaluer la contribution de ces acides aminés à l'activité contractile. De plus, la substitution à tour de rôle des résidus de la portion N-terminale, par une alanine, a permis de déterminer l'importance de la nature chimique de la chaîne latérale portée par chacun des résidus. Le choix d'une alanine repose sur sa capacité de former un lien amide trans et de maintenir une certaine rigidité.

La substitution à tour de rôle des acides aminés Glu-Thr-Pro-Asp par une alanine a eu peu ou pas d'impact sur l'activité biologique et sur l'affinité envers le récepteur. En effet, le EC_{50} des analogues [Ala¹]hUT-II, [Ala²]hUT-II, [Ala³]hUT-II et [Ala⁴]hUT-II, qui correspond à la concentration à laquelle on observe 50% de la contraction maximale ou du plateau, est très similaire à celui de la molécule-mère. Par conséquent, le maintien de la puissance malgré ces substitutions signifie que les chaînes latérales des résidus Glu et Asp sont modifiables. Ainsi, ces dernières ne participeraient pas à la formation d'une interaction ionique avec les résidus polaires du récepteur, un type de liaison fréquemment observé à l'intérieur des cavités du récepteur, où la force du lien augmente considérablement en absence d'eau (Horton *et al.*, 1997).

Étant donné que la portion cyclique de l'UT-II est conservée d'une espèce à l'autre, la délétion successive des acides aminés a débuté à partir de l'extrémité N-terminale. L'activité vasoconstrictrice de l'UT-II a été peu affectée jusqu'à la délétion du résidu Asp-4, où la puissance a diminué grandement. En accord avec les résultats obtenus par Itoh *et al.* (1987), cyclo²⁻⁸[H-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH]) est la séquence minimale pour maintenir l'activité vasoconstrictrice de l'UT-II. Ainsi, la présence des trois premiers résidus semblerait purement accessoire et ceux-ci n'interagiraient pas avec le récepteur. Les analogues tronqués hUT-II(5-11) et hUT-II(5-10) ont induit une puissante mobilisation du calcium intracellulaire et généré une activité contractile significative. Par contre, ces deux analogues ont démontré peu d'affinité envers rGPR14 et hGPR14. Les résultats démontrent des divergences en fonction de

l'essai et du récepteur exprimé suggérant la possibilité d'une multiplicité des récepteurs et des actions. Le noyau de l'UT-II partage plusieurs ressemblances structurales avec la vasopressine (VP) (Manning *et al.*, 1999), la «melanin-concentrating hormone» (MCH) (Lebl *et al.*, 1989) et plus particulièrement, la somatostatine (SS) (Rohrer *et al.*, 1998). Par conséquent, il est possible que certains analogues ou fragments de l'hUT-II interagissent avec un récepteur autre que GPR14. En effet, bien que la somatostatine soit incapable d'activer le récepteur GPR14, le groupe de Rossowski *et al.* (2002) ont criblé des préparations d'aorte de rat avec des analogues tronqués de la somatostatine. Parmi les composés évalués, plusieurs avaient la capacité d'inhiber la contraction phasique de l'aorte de rat induite par l'hUT-II. De plus, la majeure partie des antagonistes sont des antagonistes spécifiques des récepteurs 2 et 5 de la somatostatine (SST₂ et SST₅). Ainsi, ils ont suggéré que les récepteurs GPR14, SST₂ et SST₅ possèdent des similarités topographiques. Cette hypothèse permet d'expliquer l'absence d'affinité de la part des analogues tronqués, malgré une puissante activité agoniste sur l'essai de mobilisation de calcium intracellulaire.

La présence d'au moins un résidu en position N-terminale de l'heptapeptide est une condition *sine qua non* à l'obtention d'analogue puissant. En effet, tous les analogues présentant une acylation de la fonction aminée terminale, et ce, peu importe la nature du résidu, sont de puissants analogues possédant un EC₅₀ similaire à celui de la molécule-mère. Cette stratégie a été utilisée par plusieurs groupes (Rossowski *et al.*, 2002; Kinney *et al.*, 2001) et notre groupe (Flohr *et al.*, 2002) afin d'obtenir de puissants analogues tronqués, dont le groupement N-terminal libre est porteur d'une fonction acétyle. Il est plausible que l'acylation stabilise la molécule au niveau du récepteur et ainsi, permette l'orientation adéquate des chaînes latérales de la portion biologiquement active. Une telle hypothèse a été également émise pour le résidu en N-terminal de l'octapeptide de la somatostatine, un analogue puissant (Janecka, Zubrzycka et Janecki, 2001).

La position 11, occupée par une valine, semble être un élément important à l'activité biologique. La substitution par une alanine ou la délétion de la Val-11 a entraîné une perte importante de l'activité agoniste et de l'affinité. La valine n'est pas toujours conservée d'une espèce à l'autre. Toutefois, cette position est toujours occupée par un acide aminé hydrophobe, soit la valine ou l'isoleucine dont les propriétés physico-chimiques sont très similaires. À ce stade, il est difficile d'affirmer avec certitude si c'est la nature hydrophobe de la chaîne aliphatique qui est responsable de l'activité biologique. Par contre, il est possible de conclure que la fonction carboxylique libre n'est pas responsable de l'activité biologique ou de l'affinité, puisque l'amidation de cette fonction a généré un analogue tout aussi puissant que la molécule-mère. Au niveau des récepteurs peptidiques, il est fréquent d'observer des poches hydrophobes qui facilitent l'interaction ligand-récepteur. Par exemple, les domaines transmembranaires III (DTM3) et IV (DTM4) du récepteur SST₂, qui sont très similaires à ceux de hGPR14, se replient pour former un environnement hydrophobe favorable à la liaison du noyau hydrophobe de la somatostatine (Kaupmann *et al.*, 1989). Ainsi, similairement à la somatostatine, la région hydrophobe de l'hUT-II, composée des acides aminés Phe-6, Tyr-9 et Val-11 s'associerait à une poche hydrophobe du récepteur.

Les modifications apportées aux acides aminés endocycliques ont eu un effet désastreux sur l'activité agoniste et l'affinité envers le récepteur. Les trois essais, incluant la mobilisation du calcium intracellulaire, ont démontré que la substitution ou la délétion de ces résidus n'est pas tolérée, à l'exception de Phe-6 pour lequel les résultats sont plus nuancés. En effet, la substitution de Trp-7, Lys-8 ou Tyr-9 par une alanine a généré une série d'analogues inactifs sans aucune affinité envers le récepteur de rat ou d'humain. De plus, suite à des études de structure-activité réalisées sur la somatostatine, le noyau Phe-Phe-Trp-Lys-Trp-Tyr-Phe a été identifié comme la portion biologiquement active de la somatostatine (Vale *et al.*, 1979). Cette analogie structurale renforce la vision de l'importance des acides aminés 5-10 de l'UT-II et ce segment peut maintenant servir de modèle simplifié pour de futures études structure-fonction.

L'aromaticité est une caractéristique importante du noyau cyclique de l'UT-II, où trois résidus endocycliques sur quatre sont aromatiques entraînant inévitablement une organisation tridimensionnelle du noyau. L'aromaticité, l'hydrophobicité, la charge, les liens ioniques et hydrogènes sont tous des facteurs qui gouvernent l'interaction ligand-récepteur. Par conséquent, utilisant l'approche concertée, nous avons évalué l'importance de l'aromaticité du noyau de l'hUT-II en remplaçant les acides aminés aromatiques par des résidus isofonctionnels. La substitution de la phénylalanine par une tyrosine ou celle de la tyrosine par une phénylalanine a généré deux puissants analogues démontrant la nécessité de conserver le caractère aromatique des positions 6 et 9 de l'urotensine II humaine. Ces résultats seront d'une grande utilité dans le développement d'un nouveau modèle pharmacophore, où la présence d'une fonction phénolate sur le troisième pharmacophore (position 9 de l'hUT-II) n'est pas requise. De plus, afin d'évaluer la contribution du Trp-7, ce dernier a été remplacé par un autre résidu aromatique, l'histidine. Cet analogue s'est avéré n'être qu'un faible agoniste et ligand, mais comme plusieurs analogues, un puissant activateur de la mobilisation de calcium.

Dans une autre expérience, nous avons introduit une arginine et une ornithine en position 8 qui est naturellement occupée par une lysine. La chaîne latérale de l'arginine est beaucoup plus basique (pKa de 12 pour l'arginine vs 10,5 pour la lysine) et plus longue, tandis que l'ornithine possède comme unique différence un groupement méthylène en moins. L'essai pharmacologique a montré que l'urotensine II est très sensible à ces modifications, puisque [Arg⁸]hUT-II était 20 fois moins puissant que la molécule-mère et [Orn⁸]hUT-II était inactif. Par conséquent, il semble que la charge, la distance et la position du groupement chargé positivement soient des caractéristiques structurales cruciales de la position 8 de l'hUT-II. En fait, la Lys-9 de la somatostatine-14 interagit directement avec le résidu Asp-122 du troisième domaine transmembranaire du récepteur SST₂ (Strand et Hadcock, 1995) ou le résidu Asp-130 du troisième domaine transmembranaire du récepteur SST₄ (Marchese *et al.*, 1995). Or, le récepteur GPR14 possède également un résidu Asp en

position 130, ce qui, en gardant à l'esprit les résultats obtenus, permet d'envisager une interaction similaire entre la Lys-8 et le résidu Asp-130 du récepteur GPR14. De plus, la force de la liaison ionique est déterminée selon la loi de Coulomb, où la distance entre les deux charges est cruciale. Toutefois, il y a également d'autres paramètres tels la géométrie de l'interaction, le degré d'exposition au solvant et l'effet des résidus environnants. Ainsi, le raccourcissement de la chaîne expliquerait la perte d'activité engendrée par l'introduction d'une Orn. En effet, la distance étant un facteur important, l'éloignement des charges aurait diminué considérablement la force du lien ionique.

Les structures secondaires jouent un rôle très important dans l'activité biologique de plusieurs peptides. Par exemple, le coude β , formé de quatre résidus, permet le repliement adéquat de la molécule et ainsi, stabilise l'orientation des chaînes latérales des acides aminés. L'incorporation d'un acide aminé de configuration D est reconnue pour supporter la formation d'un coude β . En effet, l'introduction d'un tryptophane de configuration D en position 8 de la somatostatine a généré un super-agoniste, une molécule plus puissante que la molécule-mère (Brown, Rivier et Vale, 1975). Au niveau de l'hUT-II, la substitution des acides aminés endocycliques par leur homologue de configuration D a eu un effet néfaste sur l'activité vasoconstrictrice, à l'exception du Trp-7. L'analogue [D-Trp⁷]hUT-II a démontré une activité biologique significative suggérant que son orientation serait importante, mais sans être cruciale telle qu'observée pour les trois autres résidus. L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) en condition aqueuse de l'hexapeptide Ac-CFwKYC-NH₂, dans lequel un tryptophane de configuration D a été inséré en position i+1, révèle la présence d'un coude β -II tordu. Toutefois, l'analyse par RMN de l'hUT-II et de poisson, solubilisée respectivement dans l'H₂O et le diméthylsulfoxyde, a démontré l'absence de structure secondaire classique (Bhaskaran *et al.*, 1994; Flohr *et al.*, 2002). Néanmoins, en se basant sur l'algorithme de Chou et Fasman, nous avons favorisé la présence d'un coude β intramoléculaire. Dans cette optique, l'introduction d'une proline en position i+1 et

un réarrangement séquentiel des acides aminés endocycliques a généré deux analogues affichant une forte probabilité de former un coude β . Malgré notre hypothèse, aucun des deux analogues n'a induit une vasoconstriction ou démontré de l'affinité envers les récepteurs.

Le dernier objectif consistait à évaluer la contribution du pont disulfure à l'activité et à l'affinité de l'hUT-II. Deux analogues linéaires ont été synthétisés, le premier, par l'ajout de groupements acétamidométhyles sur les extrémités sulfhydryles, et le deuxième, par la substitution de la Cys-5 par une alanine. Sans être inactifs, les deux analogues ont présenté une faible activité et affinité. Ainsi, le pont disulfure contribue à maintenir l'orientation des chaînes latérales des acides aminés de la portion biologiquement active. Étonnamment, Grieco *et al.* (2001) ont substitué le pont disulfure par des ponts lactames de différentes longueurs, et aucun des analogues générés n'a démontré d'activité biologique significative. Puisque la distance et l'orientation des chaînes latérales des résidus Trp⁷, Lys⁸ et Tyr⁹ devaient être similaires à celles de la molécule-mère, ils ont émis l'hypothèse que les résidus cystéines participent à un phénomène d'oxydoréduction avec le récepteur. Afin de poursuivre notre analyse, les deux cystéines ont été substituées par des phénylalanines dans le but d'imiter l'interaction π - π des phénylalanines de la somatostatine. L'analogue linéaire [Phe^{5,10}]hUT-II n'a démontré aucune activité contractile ni d'affinité. Le manque d'activité de la part de [Phe^{5,10}]hUT-II supporte l'hypothèse de Grieco, mais pourrait être le résultat de la déstabilisation du noyau central de l'UT-II. En effet, comme démontré par la faible activité vasoconstrictrice de [Orn⁸]hUT-II, une légère modification est suffisante pour engendrer un composé inactif. Ainsi, l'introduction d'un pont lactame peut avoir déstabilisé le noyau et par conséquent, le manque d'activité ne serait pas lié à l'absence d'une réaction rédox entre l'UT-II et le récepteur. Finalement, les deux cystéines ont été remplacées par des homocystéines, qui, une fois oxydées, ont formé un pont disulfure dont la longueur était augmentée de deux méthylènes. Il est apparu que la longueur du pont disulfure est critique à l'activité et à l'affinité de l'hUT-II, puisque l'analogue

[HomoCys⁵⁻¹⁰]hUT-II n'a provoqué qu'une faible vasoconstriction et démontré qu'une faible affinité envers le récepteur humain et même aucune affinité pour le récepteur de rat.

Puisque les récepteurs humains et de rat sont exprimés dans les mêmes cellules et les mêmes conditions, il semble que ces deux récepteurs possèdent un comportement distinct envers leur ligand. Par exemple, le peptide [HomoCys⁵⁻¹⁰]hUT-II montre une affinité différente envers chacun des récepteurs. En fait, il s'agit de la première étude démontrant que les isoformes de GPR14 présentent une spécificité au niveau des ligands. Toutefois, au niveau des ligands endogènes, l'UT-II de gobie, de grenouille et de porc partagent une affinité similaire envers le récepteur de rat (Liu *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999). Ces résultats sont en accord avec nos résultats, où l'UT-II humaine et de rat possèdent une activité agoniste et une affinité semblable sur les récepteurs humain et de rat. En prenant en considération que la portion biologiquement active est le segment invariable (D/E-CFWKYC-I/V) et que le segment N-terminal est accessoire, il est plausible que les récepteurs soient incapables de distinguer les isoformes de l'UT-II. Néanmoins, les deux récepteurs partagent une homologie structurale de 75% (Ames *et al.*, 1999), et comme démontré avec plusieurs analogues de l'hUT-II, les récepteurs de rat et d'humain réagissent différemment en fonction du ligand. Par conséquent, lors du développement de molécules thérapeutiques, il sera crucial d'établir un modèle pharmacologique valable utilisant le récepteur humain.

L'analyse fonctionnelle des résidus de l'hUT-II nous a permis d'identifier la contribution biologique de plusieurs acides aminés. De plus, elle a mis en évidence les divergences et les fréquentes disparités entre l'essai pharmacologique sur l'aorte de rat et l'essai de mobilisation du calcium intracellulaire suggérant que l'activité biologique de certains analogues serait médiée par l'intermédiaire de plus d'un site de liaison ou récepteur et pas nécessairement via le récepteur GPR14. Cette hypothèse a été également émise

par Coy *et al.* (1998) après avoir observé une différence marquée entre la contraction phasique et tonique de l'aorte thoracique de rat. Par conséquent, une étude de structure-activité basée uniquement sur l'essai de mobilisation calcique risque d'entraîner des conclusions invalides.

Malgré les divergences observées entre les trois types d'essais, ces derniers ont tous ciblé les pharmacophores du tripeptide WKY. Ainsi, les chaînes latérales des acides aminés du segment WKY représentent des composantes chimiques cruciales, qui, dans une conformation adéquate, sont des prérequis à la liaison et à l'activation du récepteur. Afin d'établir un modèle tridimensionnel valable, nous avons évalué par RMN l'organisation structurale de l'hUT-II en solution aqueuse. En accord avec les résultats de Bhaskaran *et al.* (1994), aucune structure secondaire classique ou pont hydrogène ne semble être présent dans l'hUT-II. Les résultats obtenus par RMN ont permis de positionner le tripeptide dans un environnement tridimensionnel. Par la suite, le modèle à trois points a servi pour faire le criblage virtuel de l'inventaire des composés non-peptidiques de Aventis. Ainsi, 500 composés ont été ciblés dont 10 ont été capable d'inhiber la mobilisation de calcium avec des valeurs de IC_{50} variant de 400 nM à 7 μ M, ce qui représente un pourcentage de succès de 2%. Le composé S6716, le plus puissant des 10 antagonistes, possède un groupement benzamide substitué sur le noyau indole imitant la charge positive de la Lys-8. Récemment, Marriott *et al.* (1999) ont réussi à cibler de nouveaux antagonistes de l'acétylcholine en se basant sur un modèle tridimensionnel dérivant d'antagonistes connus du récepteur muscarinique M3. Toutefois, nous avons réalisé la première application d'un criblage virtuel en se basant uniquement sur des études de structure-activité et de résonance magnétique nucléaire. Ainsi, le criblage virtuel est une méthode efficace et rapide pour identifier de nouveaux antagonistes non-peptidiques. Cette étude révèle également que le succès d'un criblage virtuel dépend grandement de la qualité du modèle pharmacophore utilisé pour la recherche des composés chimiques dans un inventaire. Comparativement aux antagonistes peptidiques, les antagonistes non-

peptidiques sont beaucoup plus résistants à l'action des peptidases. Ainsi, les antagonistes découverts pourront être utilisés afin d'identifier le rôle physiologique de l'UT-II. L'injection des antagonistes permettra d'apprécier le rôle de l'UT-II à des concentrations physiologiques.

À partir des travaux effectués dans le cadre de ma maîtrise, les points suivants ont été retenus;

- L'analogue tronqué hUT-II(4-11) est aussi puissant que la molécule mère. Par conséquent, les études subséquentes pourraient être effectuées à partir de ce peptide.
- La partie N-terminal de l'hUT-II, à l'exception du résidu Asp-4, est accessoire à l'activité vasoconstrictrice de l'hUT-II et à son affinité envers le récepteur GPR14 du rat et de l'humain. Le segment 4-11 est la portion biologiquement active de l'urotensine humaine.
- La présence du pont disulfure est cruciale à l'activité de l'hUT-II. De plus, la dimension du cycle est essentielle à l'affinité et à l'activité de l'hUT-II.
- L'absence d'activité constrictrice de la part des analogues tronqués hUT-II(5-11) et hUT-II(5-10) malgré une forte affinité envers le récepteur GPR14 du rat et de l'humain suggère que l'hUT-II possède plusieurs sites de liaison.
- Le criblage virtuel d'une banque de composés à partir d'études structure-activité et d'études de résonance magnétique nucléaire est une méthode efficace afin d'identifier les antagonistes de l'hUT-II.
- Grâce à la méthode du criblage virtuel, le composé S6716 a été identifié comme le premier antagoniste non peptidique de l'hUT-II. Cette molécule peut maintenant servir de modèle afin de développer une nouvelle série d'antagonistes.

Bibliographie

AMES R.S., H.M. Sarau, J.K. Chambers, R.N. Willette, N.V. Alyar, A.M. Romanic, C.S. Loudon, J.J. Foley, C.F. Sauermelch, R.W. Coatney, Z. Ao, J. Disa, S.D. Homes, J.M. Stadel, J.D. Martin, W-S. Liu, G.L. Glover, S. Wilson, De. McMulty, Ce. Ellis, Na. Elshourbagy, U. Shabon, J.J.Trill, W.P.H. Bouglas, E.H. Ohlstein, D.K. Bergsma et S.A. Douglas. 1999. «Human Urotensin II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14». Nature, vol. 401, p. 282-286.

ANKERSON M., M. Crider, S. Liu, B. Ho, H.S. Andersen et C. Stidsen. 1998. «Synthesis and biological activities of potent peptidomimetics selective for somatostatin receptor subtype 2». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 120, p. 1368-1373.

AIYAR N., K. Rand, N. Elshourbagy, Z. Zeng, J. Adamou, D. Bergsma et Y. Li. 1996. «A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide». The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 11325-11329.

BHASKARAN R., Al. Arunkumar et Y. Chin. 1993. «NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of Urotensin II». Biochemistry and Biophysical Acta, vol. 1199, p. 115-122.

BERLIND, A. 1972. «Teleost caudal neurosecretory system: Sperm duct contraction induced by urophysial material». Journal of Endocrinology, vol. 52, p. 567-574.

BERN H.A. et K. Lederis. 1969. «A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts». Journal of Endocrinology, vol. 45, p. xi-xii.

BERN, H.A. 1985. «The exclusive urophysis-Twenty-five years in pursuit of caudal neurohormones». American Zoology, vol. 25, p. 763-769.

BERN H.A., D. Pearson, B.A. Larson et R.S. Nishioka. 1985. «Neurohormones from fish tails : the caudal neurosecretory system». Recent Progress in Hormonal Research, vol. 41, p. 533-551.

BÖHM F. et J. Pernow. 2002. «Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo». British Journal of Pharmacology, vol. 135, p. 25-27.

BOTRILL F.E., S.A. Douglas, C.R. Hiley et R. Wiley. 2000. «Humain urotensin-II is an endothelium-dependant vasodilator in rat small arteries». British Journal of Pharmacology, vol. 130, p. 1865-1870.

BROWN M., J. Rivier et W. Vale. 1976. «Somatostatin analogs with selected biologic activities». Metabolic Clinical Experimentation, vol. 25, p. 1501-1503.

CONLON M, F. O'harte, D. Smith, R. Balment et N. Hazon. 1992. «Purification and characterization of Urotensin II and Parvalbumin from an Elasmobranch Fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish)». Neuroendocrinology, vol. 55, p. 230-235.

CONLON, J.M. 2000. «Singular contributions of fish neuroendocrinology to mammalian regulatory peptide research». Regulatory Peptides, vol. 93, p. 3-12.

COULOUARN Y., I. Lihmann, S. Jegou, Y. Anouar, H. Tostivint, J.C. Beauvillain, J.M. Conlon, H.A. Bern et H. Vaudry. 1998. «Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 95, p. 15803-15808.

COULOUARN Y., S. Jégou, H. Tostivint, H. Vaudry et I. Lihmann. 1999. «Cloning, sequence analysis and tissue distribution of mouse and rat urotensin II precursors». FEBS Letters, vol. 457, p. 28-32.

COY D.H., W.J. Rossowski, B.L. Cheng, S.J. Hocart et Taylor J.E. 2000. «Novel urotensin II (UII) antagonists point to multiple receptor involvement in UII bioactivity». Regulatory Peptides, vol. 94, p. 48-54.

D'AMICO G., L. Pagliaro et J. Bosch. 1999. «Pharmacological treatment of portal hypertension : an evidence based approach». Seminar Liver Disease, vol. 19, p. 475-505.

DOUGLAS S.A., D.J. Ashton, C.F. Sauermelch, R.W. Coatney, D.H. Ohlstein, M.R. Ruffolo, E.H. Ohlstein, N.V. Aiyar et R.N. Willette. 2000. «Human Urotensin-II is a potent vasoactive peptide : pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26, p.163-166.

DUN S.L., G.C. Brailoiu, J. Yang, J.K. Chang et N.J. Dun. 2001. «Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat». Neuroscience Letters, vol. 305, p. 9-12.

FREIDINGER R.M., D. Perlow, W.C. Randall et D.H. Veber. 1984. «Conformational modifications of cyclic hexapeptide somatostatin analogs». International Journal of Peptide and Protein, vol. 23, p.142-150.

GARDINER S.M., J.E. March, P.A. Kemp, A.P. Davenport et T. Bennett. 2001. «Depressor and regionally selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats». British Journal of Pharmacology, vol. 132, p.1625-1629.

GIBSON A., H.A. Bern, M. Ginsburg et J.H. Botting. 1984. «Neuropeptide-induced contraction and relaxation of the mouse anococcygeus muscle». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 81, p. 625-629.

GIBSON A., P. Wallace et H.A. Bern. 1986. «Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats». General and Comparative Endocrinology, Vol. 64, p. 435-439.

GIBSON, A. 1987. «Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips». British Journal of Pharmacology, vol. 91, p. 205-212.

GIBSON A., S. Conyers et H.A. Bern. 1988. «The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta». Journal of Pharmacy and Pharmacology, p. 40, vol. 893-895.

GONZALEZ G.C., M. Martinez-Padron, K. Lederis et K. Lukowiak. 1992. «Distribution and coexistence of urotensin I and urotensin II peptides in the cerebral ganglia of *Aplysia californica*». Peptides, vol. 13, p. 695-703.

GRIECO P., R. Patacchini, A. Carotenuto, C.A. Maggi, E. Novellino et Rovero P. 2001. «Design, synthesis and conformational analysis of human urotensin II (U-II) analogues with lactam bridge». In Actes du colloques Peptides: The Wave of the Future (Lebl M & Houghten RA eds) (American Peptide Society, San Diego, 7 au 12 juin 2001) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands p. 630-631.

HAZON N., C. Bjenning et J.M. Conlon. 1993. «Cardiovascular effects of dogfish urotensin II in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*». American Journal of Physiology, vol. 265, p. 573-576.

HILLIER C., C. Berry, M.C. Petrie, P.J. O'Dwyer, C. Hamilton et A. Brown. 2001. «Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber». Circulation, vol. 103, p. 1378-1381.

HORTON R., L. Moran, R. Ochs, D. Rawn et K. Scrimgeour. 1994. «Structure tridimensionnelle et rôle des protéines». Chap. In Principes de biochimie, p. 79-121, DeBoeck Université.

ITOH H., K. Lederis et J. Rivier. 1986. «Fish neuropeptide urotensin II contracts rat aorta, segments in vitro». British Journal of Pharmacology, vol. 88, p. 311-315.

ITOH H., Y. Itoh, J. Rivier et K. Lederis. 1987. «Contraction of the major artery segments of the rat by fish neuropeptide urotensin II». American Journal of Physiology, vol. 252, p. 361-366.

JANECKA A., M. Zubrzycka et T. Janecki. 2001. «Somatostatin analogs». Journal of Peptide Research, vol. 58, p.91-107.

KAUPMANN K., C. Bruns, F. Raulf, H.P. Weber, H. Mattes et H. Lubbert. 1995. «Two amino acids, located in transmembrane domains Vi and VII, determine de selectivity of the peptide agonist SMS201-995 for the SSTR2 somatostatine receptor». Journal of the European Molecular Biology Organization, vol. 14, p.727-735.

KINNEY WA, H.R. Almond, B.E. Maryanoff, J. Qi, C.E. Smith, R.J. Santulli, L. de Garavilla, P. Andrade-Gordon, D.S. Cho, A.M. Everson, M.A. Feinstein et P.A. Leung. 2001. «Structure-function study of the urotensin-II peptide: Elucidation of features required for potent agonist activity». In Compte rendu des présentations. 222nd American Chemical Society National Meeting, Chicago, p.29-30.

KOBAYASHI Y., K. Lederis, J. Rivier, D. Ko, D. McMaster et P. Poulin. 1986. «Radioimmunoassays for fish tail neuropeptides: II. Development of a specific and sensitive assay ofr and the occurrence of immunoreactive urotensin II in the central nervous system and blood of *Catostomus commersoni*». Journal of Pharmacological Methods, vol. 15, p. 321-333.

LEBL M., V.J. Hruby, A. Castrucci et M.E. Hadley. 1989. «Melanin concentrating hormone analogues: Contraction of the cyclic structure». Life Science, vol. 44, p. 451-457.

LEDERIS, K. 1970. «Teleost urophysis II. Biological characterization of the bladder-contracting activity». General and Comparative Endocrinology, Vol.14, p. 427-437.

LIU Q., SS. Pong, Z. Zeng, Q. Zhang, AD. Howard, DL. Williams, M. Davidoff, R. Wang, CP. Austin, TP. McDonald, C. Bai, SR. George, JF. Evans et CT. Caskey. 1999. «Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 266, p. 174-178.

MACLEAN M.R., D. Alexander, A. Stirrat, M. Gallagher, S.A. Douglas, E.H. Ohlstein, I. Morecroft et K. Pollard. 2000. «Contractile responses to human urotensin-II in rat and pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat». British Journal of Pharmacology, vol. 130, p. 201-204.

MAGUIRE J.J., Re. Kuc et A.P. Davenport. 2000. «Orphan-receptor ligand human urotensin II : receptor localization in human tissues and comparison of the vasoconstrictor responses with endothelin-1». British Journal of Pharmacology, vol. 131, p. 441-446.

MANNING M., S. Stoev, L.L. Cheng, N.C. Wo et W.Y. Chan. 1999. «Synthesis and structure-activity investigation of novel vasopressin hypotensive peptide agonists». Journal of Peptide Science, vol. 5, p. 472-490.

MARIEB, Elaine. 1993. «Le système nerveux autonome». Chap. In Anatomie et physiologie humaines, p.457-475. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc.

MARCHESE A., M. Heiber, T. Nguyen, H.H.Q. Heng, V.R. Saldivia, R. Cheng, P.M Murphy, L-C. Tsui, X. Shi, P. Gregor, S.R. George, B.F. O'Dowd et J.M. Docherty. 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, vol. 29, p. 335-344.

MARRIOTT D.P., I.G. Dougall, P. Meghani, Y. Liu et D.R. Flower. 1999. «Lead generation using pharmacophore mapping and three-dimensional database searching : Application to muscarinic M₃ receptor antagonists». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 42, p. 3210-3216.

MARUMO F., H. Sakamoto, K. Ando, T. Ishigami et M. Kawakami. 1986. «A highly sensitive radioimmunoassay of atrial natriuretic peptide (ANP) in human plasma and urine». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 137, p. 231-236.

MATSUSCHITA M., M. Shichiri, T. Imai, M. Iwashina, H. Tanaka, N. Takasu et Y. Hirata. 2002. «Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues». Journal of Hypertension, vol. 19, p. 2815-2190.

MCMASTER D. et K. Lederis. 1983. «Isolation and amino acid sequence of two urotensin II peptides from *Catostomus commersoni* urophyses». Peptides, vol. 4, p. 367-373.

MIMASSI F., F. Shabazzi, J. Jensen, D. Mabin, J.M. Conlon et J.C. LeMevel. 2000. «Cardiovascular actions of centrally and peripherally administered trout urotensin I in the trout». American Journal of Physiology, vol. 279, p. R484-487.

MORI M., T. Sugo, M. Abe, Y. Shimomura, M. Kurihara, C. Kitada, K. Kikuchi, Y. Shintani, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura et M. Fujino. 1999. «Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR(GPR14)». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 265, p. 123-129.

MURRAY J.F., A.M. Dawson, S. Sherlock. 1958. «Circulatory changes in chronic liver disease». American Journal of Medicine, vol. 32, p. 358-367.

NEWBY D.E. et R. Jalan. 2000. «Urotensin II: better than somatostatin for portal hypertension?». Hepatology, vol. 5, p. 1201-1202.

NOTHACKER H.P., Z. Wang, A.M. McNeil, Y. Saito, S. Merten, B. O'Dowd, S.P. Duckels et O. Civelli. 1999. «Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction». Nature Cell Biology, vol. 1, p. 383-385.

OHTA K., Y. Hirata, M. Shichiri, K. Kanno, T. Emori, K. Tomita et F. Marumo. 1991. «Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease». Kidney International, vol. 39, p. 307-311.

OPPENHEIM R.W., T. Cole et D. Prevet. 1989. «Early regional variations in motoneuron numbers arise by differential proliferation in the chick embryo spinal cord». Development Biology, vol. 133, p. 468-474.

PATEL, Y. 1999. «Somatostatin and its receptor family». Frontiers in Neuroendocrinology, vol. 20, p. 157-198.

PEARSON D., J.E. Shively, B.R. Clark, I.L. Geschwind, M. Barkley, R.S. Nishioka et H.A. Bern. 1980. «Urotensin II : a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 77, p. 5021-5024.

PELMONT, Jean. 1995. «Activité Enzymatique». Chap. In. Enzymes, p.291-316. Presses Universitaires de Grenoble.

PHEPLS P.E., R.P. Barber et J.E. Vaughn. 1988. «Generation patterns of four groups of cholinergic neurons in rat cervical spinal cord : a combined tritiated thymidine autoradiographic and choline acetyltransferase immunocytochemical study». Journal of Comparative Neurology, vol. 273, p. 459-472.

POLLOCK, D. 2000. «Endothelin receptor subtypes and tissue distribution». Chap. In Endothelin, p.1-19.

RICHARD V., J.P. Henry et C. Thuillez. 1994. «Is guanidino succinate a precursor for nitric oxide synthesis in rat vascular tissue?». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol.24, p.50-54.

ROHRER S.P., E.T. Birzin, R.T. Mosley, S.C. Berk, S.M. Hutchins, D-M. Shen, Y. Xiong, E.C. Hayes, R.M. Parmar, F. Foor, S.W. Mitra, S.J. Degrado, M. Shu, J.M. Klopp, S-J. Cai, A. Blake, W.W.S. Chan, A. Pasternak, L. Yang, A.A. Patchett, R.G. Smith, K.T. Chapman et J.M. Schaeffer. 1998. «Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry». Science, vol. 282, p. 737-740.

ROSSOWSKI W.J., B.L. Cheng, J.E. Taylor, R. Datta et D.H. Coy. 2002. «Human urotensin II-induced aorta contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists». European Journal of Pharmacology, vol. 438, p. 159-170.

RUSSELL F.D., P. Molenaar et D.M. O'Brien. 2001. «Cardiostimulant effects of urotensin II in human heart in vitro». British Journal of Pharmacology, vol. 132, p. 5-9.

SATO K., T. Imai, M. Iwashina, M. Marumo et Y. Hirata. «Secretion of adrenomedullin by renal tubular cell lines». Nephron, Vol. 78, p. 9-14.

SYLVESTRE R.A., J. Rodriguez-Gallardo, E.M. Egido et J. Marco. 2001. «Inhibition of insulin release by urotensin-II, a study on the perfused rat pancreas». Hormones and Metabolic Research, vol. 33, p. 379-381.

STIRRAT A., M. Gallagher, S.A. Douglas, E.H. Ohlstein, C. Berry, A. Kirk, M. Richardson et M.R. MacLean. 2001. «Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries». American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, vol. 280, p. H925-H928.

STRAND J. et J.R. Hadcock. 1995. «Characterization of SST₂; somatostatin receptor». Biochemical and Biophysical Research Communication, vol. 216, p. 913-915.

TAKAHASHI K., K. Totsune, O. Murakami et S. Shibahara. 2001. «Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells». Peptides, vol. 22, p. 1175-1179.

VALE W., M. Brown, C. Rivier, M. Perrin et J. Rivier. 1979. «Development and applications of analogs of LRF and somatostatin». Brain Research, vol. 45, p.71-88.

VAUDRY H., Y.Coulouarn, I. Lihrmann, S. Jegou, Y. Anouar, H. Tostivint, J.C. Beauvillain, J.M. Conlon et H.A. Bern. 1999. «L'urotensine II : de l'urophyse des poissons aux motoneurones humains». Médecine-Science, vol. 15, p. 709-712.

VAUDRY H., Y.Coulouarn, I. Lihrmann, S. Jegou, Y. Anouar, H. Tostivint et J.C. Beauvillain. 2002. «Deux neuropeptides orphelins trouvent enfin leur récepteur». Médecine-Science, vol. 16, p. 426-430.

VEBER D., R. Saperstein, R. Nutt, R. Friedinger, S. Brady, P. Curley, D. Perlow, W. Palveda, J. Gerich, L. Hall, L. Mandarino, E. Cordes et R. Hirschmann. 1984. «A superactive cyclic hexapeptide analog of somatostatin». Life Science, vol. 34, p. 1371-1378.

WATANABE T., R. Pakala, T. Katagiri et CR. Benidict. 2001. «Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation». Journal of Hypertension, vol. 19, p. 2191-2196.

WAUGH D., J. Yourson, S.D. Mims. S. Sower et J.M. Colon. 1995. «Urotensin II from river lamprey (*Lampetra fluviatilis*), the sea lamprey (*Pertomyzon marinus*), and the paddlefish (*Polyodon spathula*)». General and Comparative Endocrinology, Vol.99, p. 323-332.

WONG F., A. Logan et L. Blendis. 1995. «Systemic haemodynamic, forearm vascular, renal, and humoral responses to sustained cardiopulmonary baroreceptor deactivation in well-compensated cirrhosis». Hepatology, vol. 21, p. 717-724.

YANO K., J.W. Hicks, H. Vaudry et J.M. Conlon. 1995. «Cardiovascular actions of frog urotensin II in the frog, *Rana catesbeiana*». General and Comparative Endocrinology, Vol. 97, p.103-110.

ZHANG Y., J. Li, J. Cao, J. Chen, J. Yang, Z. Zhang, J. Du et C. Tang. 2002. «Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin II and its functional receptors in rat myocardium». Heart Vessels, vol. 16, p. 64-68.

ZELNIK P.R. et K. Lederis. 1973. «Chromatographic separation of urotensins». General and Comparative Endocrinology, Vol. 20, p.392-400.