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

Développement et Caractérisation d'Analogues du *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* à Potentiel Thérapeutique

Par
Doan, Ngoc Duc

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

Jury d'évaluation

Président du jury et Examinateur interne	Pr Nicolas Doucet INRS - Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Pr Éric Biron Faculté de pharmacie Université Laval
Examinateur externe	Pr Claude Lazure Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Université de Montréal
Directeur de recherche	Pr Alain Fournier INRS - Institut Armand-Frappier

©droits réservés de Ngoc Duc Doan, 2012

Kính tặng bố mẹ

To my parents

À mes parents

Résumé

Le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), un neuropeptide amidé existant sous deux isoformes équipotentes, fut initialement isolé sur la base de son activité hypophysiotrope. Impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques, ce neuropeptide exerce son action *via* l'activation de trois récepteurs de la famille B1 des récepteurs couplés aux protéines G dénommés PAC1, VPAC1 et VPAC2. Capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, le PACAP est principalement connu pour ses effets pro-différenciateurs et anti-apoptotiques sur divers types cellulaires de même que dans plusieurs modèles *in vivo*. Plus particulièrement, *in vitro*, ce dernier est capable, *via* l'activation de PAC1, de réduire considérablement la neurodégénérescence induite par certains agents neurotoxiques (H_2O_2, glutamate, éthanol, céramides, 1-méthyl-4-phénylpyridinium/MPP^+) tandis qu'*in vivo,* il procure un effet neuroprotecteur dans divers modèles pathologiques (ischémie cérébrale, Parkinson, Huntington, Alzheimer). De plus, en agissant sur son récepteur VPAC1, le PACAP est également capable de moduler la réponse inflammatoire associée à la plupart des maladies neurodégénératives, en inhibant la production de chimiokines et du NF*k*B. Des études *in vivo* chez les souris ont ainsi démontré que le PACAP pouvait agir comme un facteur de survie neuronal en limitant les processus inflammatoires. Pour résumer, de par sa capacité à stopper la cascade apoptotique *via* l'inhibition de la caspase-3, ainsi que de par son rôle crucial dans la modulation des processus inflammatoires, le PACAP possède un potentiel thérapeutique très significatif en agissant comme agent multifonctionnel dans l'amélioration de manifestations en lien avec des processus neurodégénératifs.

L'objectif initial de ce projet de recherche consistait à développer et caractériser des analogues sélectifs pour les récepteurs PAC1 et VPAC1 de façon à s'affranchir des effets indésirables causés par l'activation du récepteur VPAC2. Des modifications, nous permettant de moduler la structure secondaire et les interactions ioniques intra- et intermoléculaires, ont ainsi été introduites au niveau du domaine N-terminal du peptide afin de dégager des éléments clés de la reconnaissance et de l'activation de PAC1, VPAC1 et VPAC2. Les analogues ont été ensuite caractérisés par des tests de liaison et de mobilisation calcique sur des lignées cellulaires transfectées respectivement avec les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2. Des composés, présentant un profil pharmacologique amélioré, ont ensuite été évalués dans un modèle *in vitro* de la maladie Parkinson. Des éléments structuraux clés dans la reconnaissance de chaque récepteur ont ainsi été identifiés et deux analogues, présentant une sélectivité dominante pour les récepteurs PAC1 et VPAC1, *i.e.* [Ala^7]- et [Hyp^2]PACAP27, ont été testés pour leur capacité à protéger les neurones dopaminergiques SH-SY5Y contre la toxicité du métabolite MPP^+. Ces deux composés se sont ainsi montrés capables de bloquer, comme le PACAP, la toxicité induite

par la neurotoxine MPP^+ sur des cellules SH-SY5Y aussi bien dans des expériences de pré- que de co-traitement.

Dans la deuxième partie de ce projet, nous avons évalué la capacité du PACAP et de ses dérivés à traverser la membrane plasmique. En effet, le PACAP possède des caractéristiques physico-chimiques, *i.e.* structure secondaire caractérisée par une hélice amphiphile et une forte anisotropie, qui n'est pas s'en rappeler certaines caractéristiques des protéines de transduction des souches virales, et notamment le peptide TAT du virus VIH. De plus, en utilisant des tests de liaison compétitive et de photomarquage, nous avons démontré la présence de récepteurs nucléaires du PACAP au niveau du système nerveux central, du foie, des testicules et du rein. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le PACAP pourrait agir de façon intracrine en traversant la membrane plasmique afin d'atteindre ses cibles intracellulaires. Nous avons donc mesuré la capacité de translocation du PACAP par cytométrie en flux et microscopie confocale sur des préparation cellulaires (CHO-K1, HEK 293 et HeLa) fixées ou vivantes. Nous avons ainsi démontré que le PACAP traverse la membrane plasmique en impliquant la translocation directe, l'endocytose dépendante de la clathrine et la macropinocytose. Nos résultats suggèrent également que le PACAP peut interagir avec des cibles intracellulaires. De plus, une fois à l'intérieur des cellules, le PACAP n'est pas entièrement dégradé par les enzymes intracellulaires et une quantité importante du peptide intact est également en mesure de sortir des cellules. Pour terminer, nous avons constaté que le PACAP est capable de stimuler la libération calcique et l'initiation de la transcription dans des noyaux cellulaires de testicules de rat. L'ensemble de ces observations soulève la possibilité que le PACAP soit en mesure de déclencher un cycle d'action intracrine conduisant à des effets puissants, de longue durée et ce, à de très faibles concentrations. Ces caractéristiques renforcent ainsi le potentiel thérapeutique du PACAP et d'analogues sélectifs.

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons démontré que le PACAP et ses dérivés peuvent être classés dans la famille restreinte des *cell-penetrating peptides* (CPP) endogènes. En effet, le PACAP27 et le PACAP38 biotinylés sont tous les deux capables de transporter efficacement la streptavidine (Strep) dans les compartiments intracellulaires. En particulier, l'efficacité du PACAP38 à livrer des « cargaisons », au moins pour la fluorescéine et la Strep, s'est avérée beaucoup plus élevée que celle du TAT, le plus étudié des CPPs à ce jour. Ces résultats laissent ainsi présager de nouvelles applications thérapeutiques pour le PACAP ou ses dérivés comme CPP pour le transport de molécules bioactives. De plus, étant un peptide endogène, le PACAP devrait être très utile dans la conception d'un CPP inoffensif en évitant de nombreux effets indésirables souvent associés avec les CPPs synthétiques ou viraux. Ainsi, le PACAP, en agissant à la fois comme un peptide endogène et un CPP, pourrait offrir une nouvelle stratégie pour la modulation d'événements intracellulaires.

Cependant, l'utilisation des isoformes natives du PACAP, comme transporteur peptidique, est entravée par ses activités pléiotropes associées à l'activation de ses différents récepteurs. Nous avons ainsi réussi à développer deux formes inactives du PACAP, *i.e.* PACAP(11-38) et [Arg^{17}]PACAP(11-38), se comportant comme des CPPs. Des études mécanistiques ont démontré que la translocation directe, l'endocytose dépendante des cavéoles ou la macropinocytose étaient impliquées dans l'internalisation de [Arg^{17}]PACAP(11-38). De plus, il semble que ce dernier soit capable de s'échapper des compartiments endosomaux/lysosomaux et de diffuser dans le cytosol. Ce dérivé a aussi été utilisé dans la livraison intracellulaire de diverses « cargaisons » telles qu'une petite molécule (fluorescéine), des peptides (Id1/3-PA7, JNKI-1), une protéine (Strep), et des polynucléotides (ribozyme, DNA). En particulier, son efficacité en tant qu'agent de transfection s'est avérée comparable à celle de la Lipofectamine 2000, tout en étant non toxique pour les cellules. Cette étude a ainsi non seulement mis en évidence un nouvel aspect de l'utilité du PACAP et de ses dérivés pour une application thérapeutique mais a aussi contribué à l'identification de nouveaux membres de la famille des CPPs. Par conséquent, des analogues inactifs du PACAP représenteraient probablement d'excellents vecteurs pour des usages *in vitro* et *in vivo* de transport moléculaire.

L'ensemble de ces résultats démontre dans un premier temps, le potentiel très significatif du PACAP comme agent thérapeutique multifonctionnel pour stopper la progression de pathologies dégénératives, et dans un deuxième temps l'utilité du PACAP comme canevas pour la mise au point de nouveaux systèmes de transport pour inhiber ou activer des processus intracellulaires spécifiques.

Doan, Ngoc Duc

Pr Alain Fournier

Résumé en anglais

The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a 38-amino acid C-terminally α-amidated peptide, was first isolated from ovine hypothalamic extracts on the basis of its ability to stimulate adenylyl cyclase from rat anterior pituitary cells. This neuropeptide exerts pleiotropic actions *via* the activation of three different G protein-coupled receptors named PAC1, VPAC1 and VPAC2. Apart from its unique ability to cross the blood-brain barrier, PACAP is currently well known for its pro-differentiating and anti-apoptotic effects in various *in vitro* and *in vivo* models. For example, *via* the activation of PAC1 receptors, this peptide is able to reduce *in vitro* the neurodegeneration induced by neurotoxic agents, *i.e.* H_2O_2, glutamate, ethanol, ceramide, MPP^+, and provides a neuroprotective effect in various *in vivo* models (cerebral ischemia, Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's). Moreover, PACAP is also able to modulate the inflammatory response, associated with most of the neurodegenerative diseases, by inhibiting both chemokine production and NF*k*B binding through the specific activation of VPAC1 receptors. Moreover, *in vivo* studies suggested that PACAP could participate to the control of the immune system.

The initial objective of the research project was to develop selective PAC1/VPAC1 agonists that could promote neuronal survival and avoid non-desired effects caused by the activation of the VPAC2 receptors. To do so, chemical and structural modifications were incorporated in the N-terminal segment (region 1-7) of the peptide to identify key elements of the recognition and activation process of PAC1, VPAC1 and VPAC2. Peptide derivatives were pharmacologically characterized using a radioligand binding assay and an intracellular calcium mobilization assay, using three cell lines transfected with the PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptors, respectively. Analogs with an improved pharmacological profile were further evaluated in an *in vitro* model of Parkinson's disease (PD). Two compounds, [Ala^7]- and [Hyp^2]PACAP27, with an improved selectivity toward PAC1 and VPAC1, were identified and their propensity to protect dopaminergic neuroblastic cells (SH-SY5Y) against the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) was evaluated. Results showed that, in both pre- and co-treatment experiments, these two compounds were able to protect SH-SY5Y cells with similar efficacy to PACAP. These results open up new perspectives for the development of a promising peptide-based multifunctional drug for the treatment of PD.

In the second part of this project, we demonstrated the ability of PACAP and its derivatives to cross the cellular membrane. Indeed, PACAP possesses structural and physico-chemical characteristics, *i.e.* extended α-helix exhibiting basic residues that are often found in amphiphilic α-helical antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides (CPPs). First, using competitive

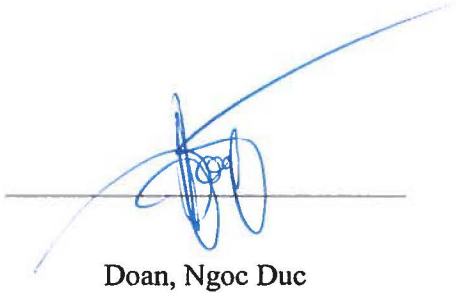
binding assay along with photolabeling experiments, we demonstrated the presence of nuclear receptors for PACAP in the rat brain, liver, testis and kidney. Using calcium and transcription initiation assays on nuclear fractions from rat testis, we found that PACAP is able to stimulate calcium release and to upregulate *de novo* DNA synthesis. We thus hypothesized that PACAP could act as an intracrine factor by crossing the plasma membrane in order to reach its intracellular targets. We therefore examined the ability of PACAP to translocate within the plasma membrane by using flow cytometry and confocal microscopy on fixed or living cells (CHO-K1, HEK 293 and HeLa). We succeeded to demonstrate the ability of PACAP to cross the plasma membrane *via* a receptor-independent mechanism. In addition, using specific inhibitors, we found that PACAP enters the intracellular compartment by direct translocation, clathrin-dependent endocytosis and macropinocytosis. Our results also revealed that PACAP might be available to interact with intracellular targets. In particular, once inside the cells, PACAP is not fully degraded by intracellular enzymes and a significant amount of intact peptide was able to exit the cells. These observations thus raise the possibility that PACAP is able to trigger a cycle of intracrine actions leading to potent and long-lasting effects, even at very low concentrations.

In the last part of this study, we demonstrated that PACAP could be classified in the small group of endogenous cell-penetrating peptides. As a matter of fact, biotinylated PACAP38 and PACAP27 were both able to effectively deliver streptavidin (Strep) to intracellular compartments. In particular, the efficiency of PACAP38 to deliver cargoes, at least for Strep and fluorescein, is much higher than that of TAT, one of the most studied and most used CPPs. These findings suggest new therapeutic applications for PACAP and its derivatives as peptide vectors for the delivery of various molecules. In addition, as an endogenous peptide, PACAP and its derivatives could be very useful in the design of a safe CPP not showing the side-effects associated with synthetic or virus-derived CPPs, such as immune responses or cellular toxicity. In particular, being a bioactive CPP, PACAP also offers a new strategy for the modulation of intracellular events.

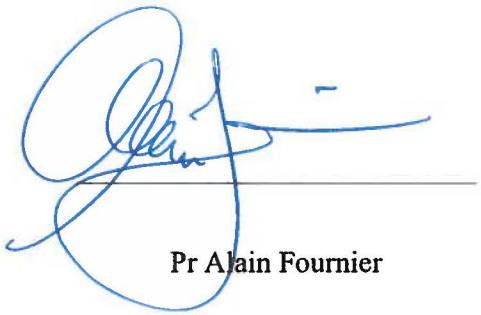
However, the use of native PACAP as a peptide vector could be limited by its pleiotropic activities through the activation of its receptors. To overcome this, we then developed two shorter and inactive derivatives of PACAP, *i.e.* PACAP(11-38) and [Arg^{17}]PACAP(11-38). Uptake mechanism studies demonstrated that direct translocation, caveolae-dependent endocytosis and macropinocytosis were involved in the internalization of [Arg^{17}]PACAP(11–38). More importantly, it seemed that this derivative is able to escape from the endosomal/lysosomal compartments. This derivative were then used for the intracellular delivery of various cargoes such as a small molecule (fluorescein), peptides (Id1/3-PA7, JNKI-1), a protein (Strep) and polynucleotides (ribozyme, DNA). Especially, its effectiveness as a

transfection agent was comparable to Lipofectamine 2000, while being non-toxic for cells. This study has not only showed a new aspect of the usefulness of PACAP and its derivatives for therapeutic application, but also contributed to the identification of new members of the CPP family. As such, inactive analogues of PACAP could be excellent vectors for drug delivery *in vitro* and *in vivo*.

Taken together, these results demonstrate the high potential of PACAP as a multifunctional therapeutic agent not only to stop the progression of degenerative diseases but also as a tool for the development of new transport system for inhibiting specific intracellular processes.



Doan, Ngoc Duc



Pr Alain Fournier

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, le professeur Alain Fournier, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ces travaux de recherche au sein de son groupe, ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée, ses nombreux encouragements et finalement pour toutes les connaissances transmises pendant ces 7 dernières années.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP) et plus spécifiquement, David, Myriam et Steve pour leur support et leur contribution significative à la réalisation de mon projet de recherche. Je considère sincèrement que notre laboratoire est non seulement un lieu où se développent de nouvelles idées, mais également l'équivalent d'une petite famille où nous partageons plusieurs petites choses de la vie.

J'aimerais aussi exprimer toute ma reconnaissance envers ma famille et mes amis pour leur amour et leur soutien.

Finalement, je remercie la Fondation Armand-Frappier et la Fondation des Maladies du Cœur du Canada pour leur soutien financier.

Liste des articles

Liste des articles inclus dans ma thèse

1. Ngoc-Duc Doan, Steve Bourgault, Agnieszka Dejda, Myriam Létourneau, Michel Detheux, David Vaudry, Hubert Vaudry, David Chatenet, and Alain Fournier. **(2011)** *Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects.* **Biochemical Pharmacology** 81(4): 552-61.

2. Ngoc-Duc Doan, David Chatenet, Myriam Létourneau, David Vaudry, Hubert Vaudry and Alain Fournier. **(2012)** *Receptor-independent cellular uptake of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide.* **BBA - Molecular Cell Research** 1823(4): 940-9.

3. Ngoc-Duc Doan, Myriam Létourneau, David Vaudry, Nicolas Doucet, Benjamin Folch, Hubert Vaudry, Alain Fournier, and David Chatenet. **(2012)** *Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide.* **Journal of Controlled Release** 163(2):256-65.

Liste des articles non-inclus dans ma thèse

1. David Chatenet, Myriam Létourneau, Quang Trinh Nguyen, Ngoc-Duc Doan, Jocelyn Dupuis and Alain Fournier **(2012)** *Discovery of new antagonists aimed at discriminating UII and URP-mediated biological activities: insight into UII and URP receptor activation.* **British Journal of Pharmacology, *In Press.*** DOI: **10.1111/j.1476-5381.2012.02217.x**

2. Ngoc-Duc Doan[‡], Mai T.T. Nguyen[‡], Myriam Létourneau, Kathy Turcote, Alain Fournier, and David Chatenet. **(2012)** *Biochemical and pharmacological characterization of nuclear Urotensin-II binding sites in rat heart.* **British Journal of Pharmacology,** 166(1):243-57.
   [‡] equal contribution

3. Agnieszka Dejda, Steve Bourgault, Ngoc-Duc Doan, Myriam Létourneau, Alain Couvineau, David Vaudry, Hubert Vaudry, and Alain Fournier. **(2011)** *Identification by photoaffinity labeling of the extracellular N-terminal domain of PAC1 receptor as the major binding-site for PACAP.* **Biochimie** 93(4): 669-677.

4. Steve Bourgault, David Chatenet, Olivier Wurtz, Ngoc-Duc Doan, Hubert Vaudry, Alain Fournier and David Vaudry. **(2011)** *Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic factor to a neuroprotective drug.* **Current Pharmaceutical Design** 17(10):1002-1024.

5. Steve Bourgault, David Vaudry, Alain Dejda, Ngoc-Duc Doan, Hubert Vaudry and Alain Fournier. **(2009)** *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective peptide.* **Current Medicinal Chemistry** 16(33):4462-80.

6. Ngoc-Duc Doan, Steve Bourgault, Myriam Létourneau and Alain Fournier. **(2008)** *Effectiveness of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction for solid-phase peptide modification*. **Journal of Combinatorial Chemistry** 10(1): 44-51.

Table des matières Page

Liste des figures iii
Liste des tableaux v
Liste des abréviations vi
Chapitre 1 : Revue de la littérature 1
1.1. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) 1
1.1.1. Biosynthèse du PACAP 4
1.1.2. Structure secondaire du PACAP 5
1.1.3. Distribution du PACAP 9
1.1.4. Passage du PACAP à travers la barrière hémato-encéphalique. 11
1.2. Les récepteurs du PACAP 12
1.2.1. Distribution des récepteurs du PACAP 13
1.2.2. Ligands sélectifs pour les récepteurs du PACAP 14
1.2.3. Activation du récepteur 17
1.3. Activité biologique du PACAP 18
1.3.1. Effet neuroprotecteur du PACAP 21
1.3.2. Effet du PACAP sur le système reproducteur 27
1.4 Études de type structure-fonction du PACAP 30
1.4.1. Pharmacophores du PACAP 30
1.4.2. Modulation de la sélectivité du PACAP pour PAC1 ou VPACs 34
1.4.3. Interactions des ligands peptidiques avec les membres de la classe B des RCPG 35
1.5. Cell-penetrating peptides (CPPs) 41
1.5.1. Mécanismes d'internalisation 46
1.5.2. Applications à visée thérapeutique 49
1.5.3. Limitations des CPPs 54

1.6. Objectifs généraux et spécifiques 55
Préface au chapitre 2 59
Chapitre 2 : Article 1 60
Mise en contexte 61
Design and *in vitro* characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects 62
Préface au chapitre 3 75
Chapitre 3 : Article 2 76
Mise en contexte 77
Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide .. 78
Préface au chapitre 4 102
Chapitre 4 : Article 3 103
Mise en contexte 104
Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide 105
Chapitre 5 : Discussion générale 123
5.1. Développement d'agonistes sélectifs pour les récepteurs PAC1 et VPAC1 123
5.2. Pharmacologie intracrine du PACAP 132
5.3. Développement de nouveaux transporteurs peptidiques basés sur la séquence du PACAP 138
Chapitre 6 : Conclusion 144
Chapitre 7 : Perspectives 147
Références 153

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de la biosynthèse du PACAP et du PRP. 5

Figure 2: Structure secondaire du PACAP38 lié aux micelles de DPC (pdb 2D2P). 7

Figure 3 : Structure secondaire et projection hélicoïdale des résidus du VIP et du PACAP38 liés à la membrane. 8

Figure 4 : Structure du PACAP38 de la carpe chinoise. 9

Figure 5 : Passage du PACAP à travers la barrière hémato-encéphalique. 12

Figure 6 : Voies de signalisation intracellulaire stimulées par l'activation des récepteurs PAC/VPAC. 18

Figure 7 : Effet du PACAP38 sur le volume de la zone infarcie après une occlusion de l'artère cérébrale. 22

Figure 8 : Signaux de transduction impliqués dans l'effet neuroprotecteur du PACAP. 24

Figure 9 : Représentation schématique des effets protecteurs directs et indirects du PACAP sur les neurones, les astrocytes et la microglie. 26

Figure 10 : Mécanisme proposé pour la régulation à la hausse de l'expression des gènes codés pour le PACAP, *via* la production d'AMPc, dans les cellules gonadotropes et folliculo-stellaires. 29

Figure 11: Représentation graphique du motif N-capping présent dans le PACAP. 32

Figure 12: Représentation schématique du PACAP27 lié au domaine N-terminal du récepteur PAC1. 37

Figure 13: Disposition du PACAP(6-38) lorsque lié au domaine N-terminal du récepteur PAC1. 40

Figure 14: Modèle d'activation proposé pour les récepteurs du PACAP. 41

Figure 15: Structure de la calcitonine humaine, de la pénétratine et du transportan. 45

Figure 16: Mécanismes d'entrée des CPPs dans la cellule. 47

Figure 17: Illustration des différentes méthodes de conjugaison des cargaisons avec les CPPs... 51

Figure 18: Représentation schématique du coude Asx-Pro présent dans l'extrémité N-terminale du PACAP 127

Figure 19 : Superposition des conformations de plus basse énergie des résidus 2 et 3 de PACAP27, [Pro^2]PACAP27 et [D-Pro^2]PACAP27. 130

Figure 20: Identification des sites de liaison du PACAP dans les préparations nucléaires de tissus isolés du rat. 134

Figure 21: Pharmacologie intracrine du PACAP 137

Figure 22: Distribution intracellulaire des complexes peptide-cargaison. 140

Figure 23: (A) Distribution dans des cellules CHO-K1 vivantes non transfectées du PACAP (28-38), du JNKI-1, du PACAP38 et du JNKI-1 – PACAP38 conjugués à la fluorescéine (au moyen du FITC). 142

Liste des tableaux

Tableau 1: Séquence en acides aminés des membres de la superfamille VIP/GRF/Glucagon retrouvés chez l'humain 1

Tableau 2: Similarité structurale des peptides de la superfamille VIP/GRF/Glucagon. 2

Tableau 3 : Séquences du PACAP retrouvées chez différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés 3

Tableau 4: Caractéristiques pharmacologiques et mécanismes de transduction des récepteurs du PACAP 13

Tableau 5: Ligands sélectifs (agonistes ou antagonistes) pour les récepteurs du PACAP. 16

Tableau 6: Effets physiologiques associés au PACAP 20

Tableau 7: Principaux peptides capables de traverser la membrane cellulaire. 43

Tableau 8: État du développement clinique de composés conjugués à des CPPs. 46

Tableau 9: Affinité de liaison 128

Tableau 10: Activité agoniste (mobilisation calcique) 129

Tableau 11: Activité antagoniste (mobilisation calcique) 129

Liste des abréviations

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

ACTH : Adrénocorticotrophine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNP : *Activity-dependent neurotrophic protein*

ADNF : *Activity-dependent neurotrophic factor*

Aib : Acide aminoisobutyrique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARNm : Acide ribonucléique messager

AVC : Accident vasculaire cérébral

BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*

BHE : Barrière hémato-encéphalique

Bip : Biphénylalanine

Bpa : Benzoylphénylalanine

B-pc : Benzyl-pénicilline.

CBP : *CREB binding protein*

CGCs : Cellules granulaires du cervelet

Cha : Cyclohexylalanine

CPPs : *Cell-penetrating peptides*

CRF : Corticolibérine

CREB : *cAMP-responsive element-binding protein*

DC : Dichroïsme circulaire

Disc : Acide 1,3-dihydro-2*H*-isoindole carboxylique,

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPC : Dodécylphosphocholine

DREAM : *Dowstream regulatory element antagonist modulator*

Elk-1 : *E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1*

EPAC : *Exchange proteins activated by cAMP*

Erk2 : *Extracellular signal-regulated kinase*

FSH : Hormone folliculo-stimulante

Fst : Follistatine

GAG : Glycosaminoglycanes

GH : Hormone de croissance

GILT : *Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*

GIP : *Gastric inhibitory polypeptide*

GLP-1 : *Glucagon-like peptide-1*

GLP-2 : *Glucagon-like peptide-2*

GnRH : Gonadolibérine

GRF : Facteur de libération de l'hormone de croissance

hCG : Hormone gonadotrophine chorionique

hCT : Calcitonine humaine

Hyp : Hydroxyproline

HSV1 : Virus herpes simplex 1

icv : Intracérébroventriculaire

IL-1β : Interleukine-1β

IL-6 : Interleukine-6

Ind : Acide indoline-2-carboxylique

JNK : *c-Jun N-terminal kinase*

LH : Hormone lutéinisante

iNOS 2 : *Inducible nitric oxide synthase 2*

MAP : *Model amphipathic peptide*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MCAO : Obstruction de l'artère cérébrale moyenne

MIP-1α : *Macrophage inflammatory protein-1α*

MPG : 3-méthyladénine-DNA glycosylase

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

Nal : Naphtylalanine

NGF : Facteur de croissance des nerfs

Nle : Norleucine

NO : Oxyde nitrique

NOE : Effet nucléaire Overhauser

NOS1: *Nitric oxide synthase type 1*

PACAP : *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*

PC-12 : Cellules de phéochromocytomes de rat

PAC1 : Récepteur de type 1 du PACAP

PI3K : phosphatidyl-inositol-3'-OH kinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PKCδ : Protéine kinase Cδ

pHLIP : *pH Low Insertion Peptide*

PLC : Phospholipase C

PLD : Phospholipase D,

PNA : *Peptide nucleic acid*

PHI : Peptide histidine-isoleucine

PHM : Peptide histidine-méthionine

PrP : Protéine prion humaine

PTH : Parathormone

PTD : Domaine protéique transmembranaire

PTS-6 : *Peptide transport system 6*

pVEC : *VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide*

RANTES : *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*

RhoA : *Ras homolog gene family, member A*

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : *Reactive oxygen species*

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

SAP : *Sweet arrow peptide*

Sar : Sarcosine

sHGP : *Shortered peptide derived from HIV gp41*

SNC : Système nerveux central

SPAK : *Stress-activated protein kinase*

Strep : Streptavidine conjuguée avec Alexa Fluor® 568.

SV40 : Simian vacuolating virus 40

TAT : *Trans-activator of transcription*

TEAF : *Transcription enhancer factor*

Tf : Transferrine

TFE : 2,2,2-trifluoroéthanol

Tiq :	Acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-1-carboxylique,
Tic :	Acide 1,2,3,4,-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique
TrkA :	Tyrosine kinase type I
TNF-α :	*Tumor necrosis factor-α*
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine,
VIP :	*Vasoactive intestinal peptide*
VPAC1 :	Récepteur de type 1 du VIP,
VPAC2 :	Récepteur de type 2 du VIP,

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)

Le *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide* (PACAP) a été initialement isolé à partir d'extraits d'hypothalamus de moutons sur la base de sa capacité à stimuler la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans des cellules hypophysaires antérieures de rat (Miyata *et al.*, 1989). Le PACAP a ensuite été caractérisé comme étant un neuropeptide de 38 acides aminés possédant une extrémité C-terminale amide et un site de clivage interne (Gly^{28}-Lys^{29}-Arg^{30}) permettant de générer une seconde isoforme. Cette dernière, également isolée à partir d'extraits d'hypothalamus de moutons, comprend les 27 acides aminés de l'extrémité N-terminale du PACAP38, et fut en conséquence dénommée PACAP27 (Miyata *et al.*, 1990). La structure primaire du PACAP27 est identique à 68% à celle du *vasoactive intestinal peptide* (VIP). Cette forte similarité de séquence a permis d'inclure le PACAP au sein de la superfamille VIP/GRF/Glucagon (Tableau 1), laquelle est constituée de peptides structurellement similaires. Ainsi, la structure secondaire des peptides de cette superfamille est très similaire avec une extrémité N-terminale désordonnée et une hélice-α du côté C-terminal (Tableau 2).

Tableau 1: Séquence en acides aminés des membres de la superfamille VIP/GRF/Glucagon retrouvés chez l'humain. Les résidus en rouge sont différents de ceux retrouvés chez le PACAP38 (Vaudry *et al.*, 2000b).

Peptides	Séquence
PACAP38	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKNK-NH_2
PACAP27	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVL-NH_2
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH_2
Sécrétine	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLLQGLV-NH_2
GRF	YADAIFTNSYSKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL-NH_2
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT
PHM	HADGVFTSDFSKLLGQLSAKKYLESLM-NH_2
GIP	YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFNWLLAQKGKKNDWKHNITQ-OH
GLP-1	HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR
GLP-2	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD
Calcitonine	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH_2

Tableau 2: Similarité structurale des peptides de la superfamille VIP/GRF/Glucagon.

Peptides	Nombre de résidus	Solvant	Distribution d'hélice-α	Référence
PACAP38	38	Micelles DPC	6-26 et 29-34	(Sze *et al.*, 2007)
PACAP27	27	50% TFE	9-20	(Wray *et al.*, 1998)
		DPC micelles	5-27	(Bourgault *et al.*, 2009b)
VIP	28	50% méthanol	4-29	(Umetsu *et al.*, 2011)
		30% TFE	7-24	(Tan *et al.*, 2006)
		Micelles DPC	6-26	(Umetsu *et al.*, 2011)
Sécrétine	27	DMSO	7-13 et 17-25	(Watkins *et al.*, 2012)
		40% TFE	7-13 et 17-25	
GRF	44	70% méthanol	4-29	(Campbell *et al.*, 1995)
		30% TFE	6-13 et 16-29	
Glucagon	29	Micelles DPC	7-14 et 18-29	(Ying *et al.*, 2003)
GIP	42	DMSO	7-30	(Watkins *et al.*, 2012)
		DHPC/DSS	6-31	(Venneti *et al.*, 2011b)
GLP-1	30	50% TFE	7-28	(Neidigh *et al.*, 2001)
		Micelles DPC	7-28	
GLP-2	35	50% TFE	6-27	(Venneti *et al.*, 2011a)
		Micelles DPC	6-24	
Calcitonine	32	Méthanol	9-19	(Amodeo *et al.*, 1999)

Malgré le fait que le PACAP ait été le dernier peptide de la superfamille VIP/GRF/Glucagon à avoir été identifié, il est très probable que ce peptide soit la molécule ancestrale de cette superfamille. En effet, le PACAP a été identifié chez plusieurs espèces de vertébrés et d'invertébrés, et notamment chez l'homme (Hosoya *et al.*, 1992; Ohkubo *et al.*, 1992), le mouton (Miyata *et al.*, 1989; Miyata *et al.*, 1990), le rat (Ogi *et al.*, 1990), la souris (Okazaki *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1998a), le poulet (McRory *et al.*, 1997b), le lézard (Pohl *et al.*, 1998), la grenouille (Chartrel *et al.*, 1991), le saumon (Parker *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1997), le poisson-chat (McRory *et al.*, 1995) et la raie (Matsuda *et al.*, 1998). En outre, les deux isoformes ont été également caractérisées chez les ascidies, un groupe évolutif précédant les vertébrés (McRory *et al.*, 1997a). Contrairement aux autres membres de cette superfamille, la structure primaire du PACAP (humain, souris, rat, boeuf, mouton, porc, cochon d'Inde) est strictement conservée chez

les mammifères (Tableau 3) (Sherwood *et al.*, 2000). De plus, la structure primaire du PACAP38 retrouvé chez les mammifères ne diffère que d'un seul acide aminé comparativement à celle de la grenouille verte *Rana ridibunda*, une espèce qui s'est éloignée des mammifères, il y a environ 280 millions d'années (Chartrel *et al.*, 1991). En particulier, le segment N-terminal, *i.e.* PACAP27, responsable de l'activité biologique, a été totalement préservé au cours de l'évolution et ce, des amphibiens jusqu'aux mammifères (Bourgault *et al.*, 2009b; Sherwood *et al.*, 2000) (Tableau 3). Par contre, les résidus variables sont principalement retrouvés à l'extrémité C-terminale du PACAP38 qui n'est pas cruciale pour l'activité biologique du peptide. Le fait que les pressions évolutives aient donné lieu à la préservation de la structure primaire du PACAP suggère un rôle physiologique important pour ce neuropeptide (Bourgault *et al.*, 2009a; Bourgault *et al.*, 2009b; Sherwood *et al.*, 2000).

Tableau 3 : Séquences du PACAP retrouvées chez différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés (Bourgault *et al.*, 2009b; Sherwood *et al.*, 2000). Les résidus en rouge diffèrent de ceux retrouvés chez les mammifères.

PACAP	Séquence	% Identité
Humain, souris, rat, boeuf, mouton, porc, cochon d'Inde, lézard	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKNK-NH_2	100
Poulet	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKNK-NH_2	97
Grenouille	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRIKNK-NH_2	97
Dipneuste	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKKYKQRVKNK-NH_2	97
Poisson rouge	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYRQRVKNK-NH_2	97
Esturgeon	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGRRYRQRVRNK-NH_2	92
Raie	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKPKVKNS-NH_2	92
Stargazer, plie, flétan	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLAAVLGRRYRQRVRNK-NH_2	89
Saumon (5 espèces)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYRQRYRSK-NH_2	89
Poisson-chat	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGRRYRQRFRNK-NH_2	89
Carpe Chinoise	HSDGIFTDIYSRYRKQMAVKKYLAAVLGRRYRQRIKNK-NH_2	89
Uranoscopus japonicus	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLAAVLGRRYRQRVRNK-NH_2	89
Ascidie-I	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYLAAVL-NH_2	96
Ascidie-II	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYINALL-NH_2	85

1.1.1. Biosynthèse du PACAP

Chez l'homme, le gène codant pour le PACAP est localisé au niveau de la région P11 du chromosome 18 (Hosoya et al., 1992) Ce gène est composé de cinq exons et la séquence codant pour le PACAP est située au niveau du cinquième exon (**Figure 1**). Le premier exon, ainsi que la partie 3' du cinquième exon correspondent à des régions non traduites, le deuxième exon code pour le peptide signal et le troisième exon code pour le pro-peptide (Bourgault *et al.*, 2009b; Sherwood *et al.*, 2000). Le promoteur du gène du PACAP contient plusieurs sites d'initiation de la transcription ainsi que différents sites de polyadénylation, y compris de nombreuses séquences régulatrices telles que deux séquences CRE (*cAMP response-like element*), une séquence TRE (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response element), deux sites de liaison pour le transactivateur du GHF-1 (*growth hormone factor-1*), un domaine riche en CT précédé d'une boîte GC (GC box) reconnue par le facteur de transcription Sp1, ainsi qu'un facteur de transcription régulant l'expression tissu-spécifique de l'hormone de croissance (Bourgault *et al.*, 2009b). Généralement, une seule forme de 176 acides aminés du prépro-PACAP est générée (Hosoya et al., 1992; Ogi et al., 1990; Ohkubo et al., 1992).

À la suite de la biosynthèse du prépro-PACAP, un clivage protéolytique par une *signal peptidase* dans le réticulum endoplasmique génère le pro-PACAP de 152 acides aminés, dépourvu de peptide signal. La présence de nombreux sites comportant un seul résidu basique ou une paire d'acides aminés basiques qui peuvent être reconnus par plusieurs proprotéine convertases. Ainsi, le pro-PACAP est clivé à trois sites caractérisés par la présence de paires d'acides aminés basiques *i.e.* Arg^{79}-Arg^{80}, Lys^{129}-Arg^{130}, et Arg^{170}-Arg^{171} pour générer le big PACAP-related peptide (bigPRP, résidus 81 à 128)) et une forme glycine-allongée en C-terminal du PACAP38 (résidus 131 à 169). Par la suite, un clivage au niveau de l'Arg^{110} du bigPRP suivi de l'enlèvement de ce résidu par les carboxypeptidases E, H, ou M mène à la formation d'un peptide de 29 acides aminés, dénommé PRP, démontrant une similarité de séquence (22%) avec le PACAP27 et dont la fonction biologique n'est pas encore clairement établie (Tam et al., 2007). Pour sa part, la maturation (clivages, amidation) du PACAP38 se fait via l'action des convertases du prépro-PACAP, suivie de l'action d'une carboxypeptidase et de l'amidation C-terminale. De façon similaire, la génération du PACAP27 à partir du PACAP38 est permise grâce à un processus de protéolyse au niveau de deux résidus basiques (Lys^{159}-Arg^{160}) suivi

d'une amidation du Gly^{158} par la *peptidyl glycine α-amidating monooxygenase* (Bourgault *et al.*, 2009b; Okazaki *et al.*, 1992).

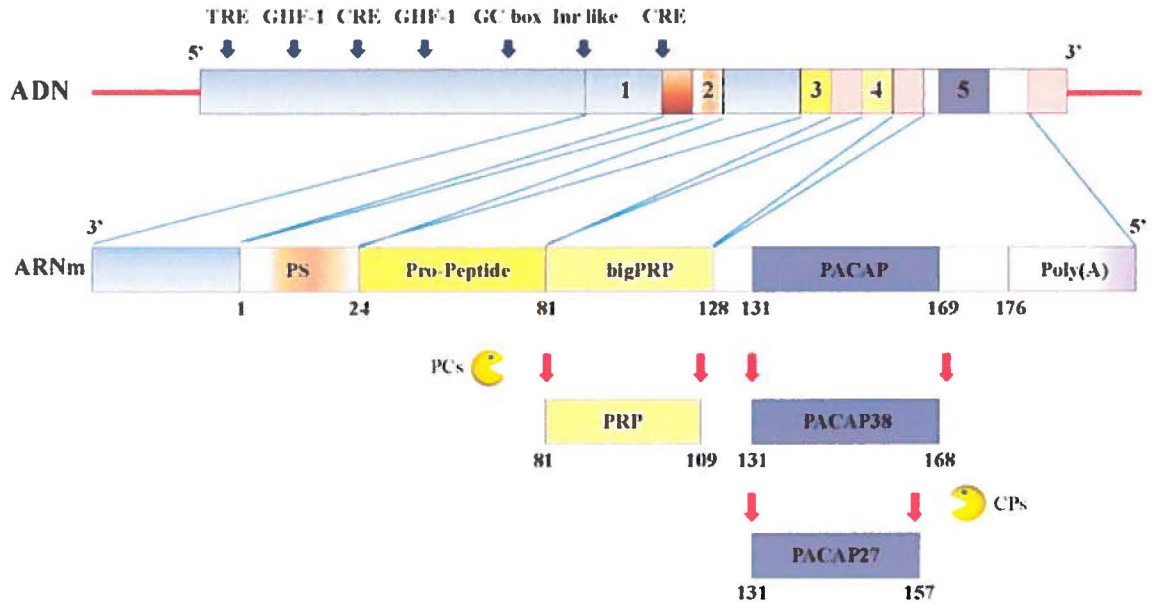


Figure 1. Représentation schématique de la biosynthèse du PACAP et du PRP. Les 5 exons correspondent aux rectangles et sont numérotés. Les régions non traduites des exons 1 et 5 sont représentées par la couleur rose. Les domaines codant pour le peptide signal (PS), le propeptide, le PRP et le PACAP sont colorés de façon graduée. La localisation des sites principaux de liaison pour des facteurs de transcription potentiels et de polyadénylation est indiquée (flèche) sur le gène : : Les abréviations utilisées sont TRE, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate response element; GHF-1, growth hormone factor-1; CRE, cAMP response element; GC box, boîte GC; Inr-like, initiator-like element. Les sites de clivage reconnus par les proprotéine convertases (PC) ainsi que par la carboxypeptidase sont indiqués par des flèches au-dessus de l'entité générée.

1.1.2. Structure secondaire du PACAP

La structure secondaire du PACAP a été essentiellement déterminée par dichroïsme circulaire (DC) et résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces études ont initialement démontré que la structure des huit premiers acides aminés du domaine N-terminal est désordonnée et qu'elle est suivie d'une région (résidus 9 à 27) constituée de 3 domaines distincts: (i) une conformation

similaire à celle d'un coude β retrouvée au niveau des résidus Ser^{9} à Arg^{12}, (ii) une structure de type hélice α pour les régions 12-20 et 22-25 ainsi que (iii) des segments désordonnés (Lys^{21}-Tyr^{22} et Ala^{25}-Val^{26}-Leu^{27}) (Inooka *et al.*, 1992). L'incorporation de mimétiques de coude β de type II/II' au niveau des résidus 10-11 du PACAP entraîne une perte de l'affinité de liaison du peptide envers des récepteurs PAC1 et VPAC1 suggérant ainsi que la présence d'un coude β dans la région 9-12 peut être dépendante du solvant utilisé (Gonzalez-Muniz *et al.*, 2001). En accord avec cette hypothèse, des études RMN effectuées dans un environnement plus hydrophobe (50% 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE)/eau) ont démontré que le segment 9-27 du PACAP27 est caractérisé par une conformation de type hélice α bien définie possédant une discontinuité au niveau des résidus Lys^{20} et Lys^{21} (Wray *et al.*, 1993). L'absence du coude β préalablement observé au niveau des résidus 9-12 provient vraisemblablement de la stabilisation de l'hélice α par le TFE, un solvant utilisé pour mimer l'environnement amphiphile des membranes cellulaires. La même étude a également démontré que la structure du PACAP27 ressemble remarquablement à celle du PACAP38 (Wray *et al.*, 1993). En effet, le PACAP38 contient un domaine N-terminal désordonné de huit acides aminés, suivi par une structure en hélice de Ser^{9} à Val^{26} avec une discontinuité au niveau des positions Lys^{20} et Lys^{21}. Il existe également une courte région hélicoïdale dans le domaine C-terminal entre Gly^{28} et Arg^{34} (**Figure 2**) (Wray *et al.*, 1993).

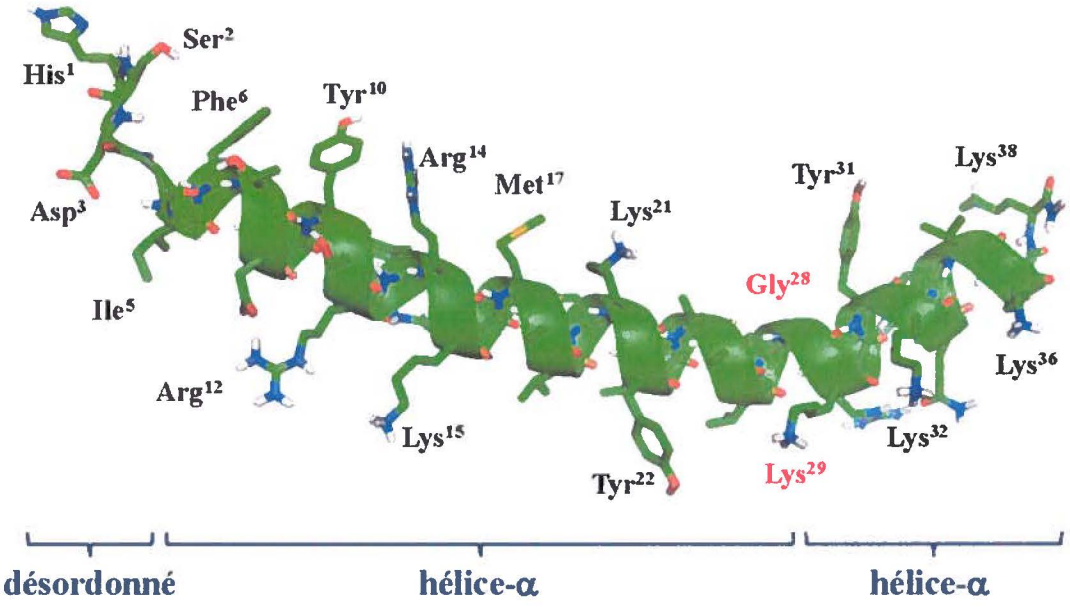


Figure 2: Structure secondaire du PACAP38 lié aux micelles de DPC (pdb 2D2P). Visualisation effectuée avec l'aide du logiciel PyMOL 1.3r1.

Récemment, des études RMN, réalisées dans des micelles de dodécylphosphocholine (DPC), ont démontré que le PACAP27 est constitué d'une structure hélicoïdale (résidus Ile^5 à Ile^{27}) précédée par un domaine N-terminal désordonné (Bourgault *et al.*, 2009b). En fait, l'utilisation de micelles de DPC, qui miment les propriétés de la membrane cellulaire, est présentement considérée comme un modèle de choix pour étudier la conformation d'un peptide se liant à la membrane. Une étude structurale récente, effectuée dans deux solvants différents imitant l'environnement de la membrane plasmique, a démontré que comme le PACAP, le VIP est composé d'une région N-terminale désordonnée et d'une longue hélice-α (Umetsu *et al.*, 2011) (**Figure 3**). Au cours de cette même étude (Umetsu *et al.*, 2011), il fut ainsi observé que les chaînes latérales des résidus Phe^6, Tyr^{10}, Leu^{13} et Met^{17} du VIP formaient une zone hydrophobe impliquée dans les interactions peptide-membrane (**Figure 3**). Un phénomène similaire fut également observé pour le PACAP38, les résidus hydrophobes Phe^6, Tyr^{10}, Tyr^{13}, Met^{17}, Ala^{24}, Tyr^{31}, et Val^{35} étant en contact avec la membrane (Umetsu *et al.*, 2011).

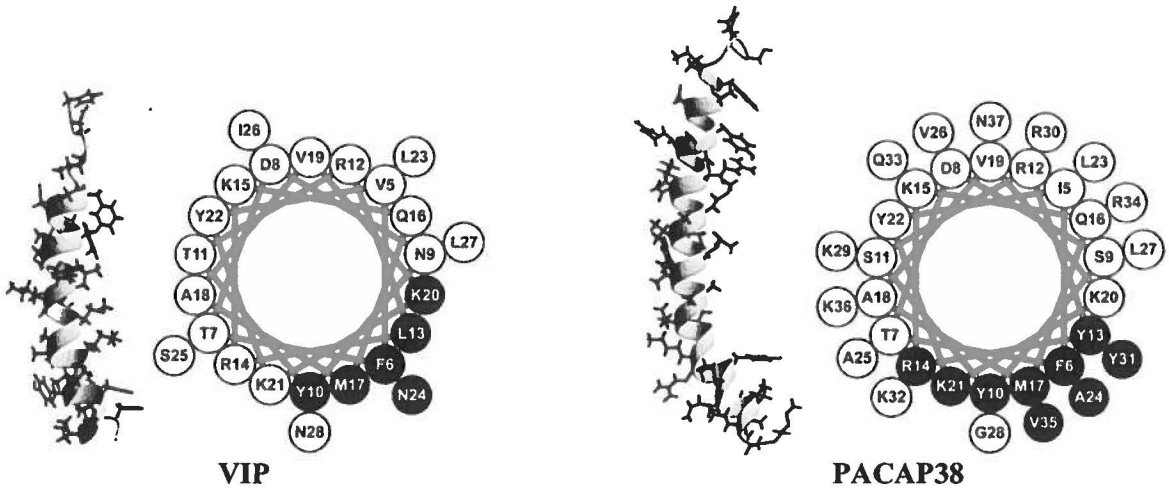


Figure 3 : Structure secondaire et projection hélicoïdale des résidus du VIP et du PACAP38 liés à la membrane. Les acides aminés situés à l'interface peptide-membrane sont indiqués en noir (Umetsu *et al.*, 2011).

Récemment, une étude structurale, utilisant la spectroscopie RMN à haute résolution, a démontré que l'isoforme de la carpe chinoise du PACAP38 est composée de trois domaines distincts soit une région N-terminale (His^{1}-Ile^{5}) flexible, une hélice α centrale (Phe^{6}-Val^{26}) et un court segment C-terminal hélicoïdal (Lys^{29}-Arg^{34}) (Sze *et al.*, 2007). Sze et ses collègues ont aussi démontré que cet isoforme adopte une structure amphipathique avec un côté hydrophobe et un autre hydrophile (**Figure 4**) (Sze *et al.*, 2007). Ce caractère amphipathique et fortement basique est souvent retrouvé dans des peptides antimicrobiens et des *cell-penetrating peptides* (CPPs) (voir section **1.5. *Cell-penetrating Peptides***).

Particulièrement, la structure secondaire du peptide lié à son récepteur a été également étudiée par des méthodes de spectrométrie RMN (Inooka *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2007). Cette dernière sera présentée dans la section **1.4.3 "*Interactions des ligands peptidiques avec les membres de la classe B des RCPG*"**.

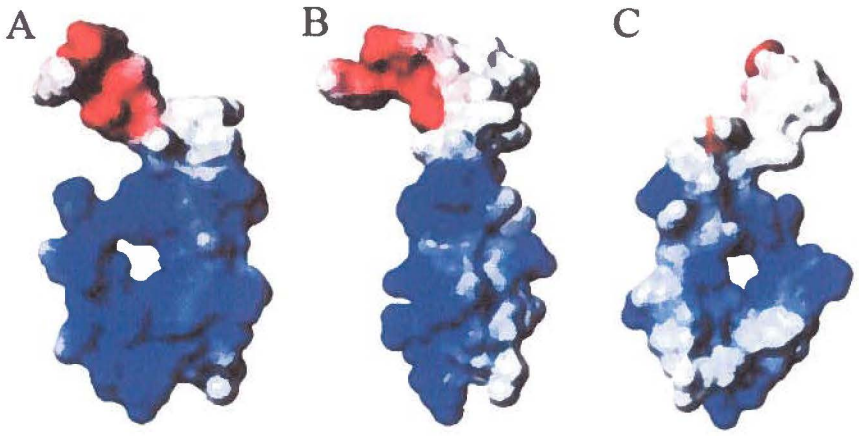


Figure 4 : Structure du PACAP38 de la carpe chinoise. Représentations de surface avec vues de face (A), de côté (B) et de l'arrière (C), présentant les résidus acides (rouge), basiques (bleu) et neutres (gris). Adapté de Sze et al., 2007.

1.1.3. Distribution du PACAP

Au niveau du système nerveux central (SNC), des concentrations élevées de PACAP ont été retrouvées dans l'hypothalamus chez le rat et plus particulièrement, au niveau des neurones parvo- et magnocellulaires des noyaux paraventriculaires et supraoptique (Arimura *et al.*, 1991; Ghatei *et al.*, 1993). Les neurones immunoréactifs pour le PACAP ne sont pas limités à la zone de l'hypothalamus, mais sont également largement distribués dans diverses régions du cerveau (Arimura *et al.*, 1991). Enfin, de nombreuses fibres immunoréactives pour le PACAP ont été observées au niveau des capillaires sanguins du système porte hypothalamo-hypophysaire (Hannibal *et al.*, 1995b; Hannibal *et al.*, 1995c; Kivipelto *et al.*, 1992; Koves *et al.*, 1991; Koves *et al.*, 1990; Mikkelsen *et al.*, 1995; Tamada *et al.*, 1994). Cette observation, corrélée à une concentration du peptide dans le système porte hypophysaire significativement plus élevée que dans la circulation périphérique, suggère que le PACAP peut agir comme une neurohormone au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Dow *et al.*, 1994). Au niveau du SNC, l'isoforme de 38 acides aminés représente la forme prédominante, la forme tronquée, *i.e.* PACAP27, ne représentant que 10% du contenu en PACAP du tissu cérébral (Arimura *et al.*, 1991; Ghatei *et al.*, 1993; Hannibal *et al.*, 1995b; Masuo *et al.*, 1993).

Au niveau périphérique, le PACAP38 reste la forme moléculaire principale mais les proportions de PACAP27 et de PACAP38 varient entre les différents organes (Arimura *et al.*, 1991). Par exemple, dans le côlon, le PACAP27 représente environ 30% de l'immunoréactivité totale alors qu'il ne représente qu'une portion très minoritaire dans le testicule (Arimura *et al.*, 1991; Vaudry *et al.*, 2000b). Les plus fortes concentrations de PACAP ont ainsi été trouvées dans les testicules, les glandes surrénales, le tractus gastro-intestinal et les tissus lymphoïdes. En particulier, la quantité totale de PACAP dans les deux testicules est plus élevée que celle observée dans l'ensemble du système nerveux central (Arimura *et al.*, 1991). Dans l'ovaire, la concentration de PACAP est beaucoup plus faible que dans le testicule, et le peptide semble être contenu dans les fibres nerveuses (Steenstrup *et al.*, 1995). Une immunoréactivité de type PACAP a pu être observée dans divers tissus/organes associés avec le système immunitaire et notamment dans la moelle osseuse, le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques et la muqueuse du duodénum (Gaytan *et al.*, 1994; Moretti *et al.*, 2002). De plus, des sites de liaison pour le PACAP ont été identifiés sur les leucocytes, les cellules mononucléaires, les lymphoblastes, les lymphocytes, les monocytes, les cellules lymphoïdes, les macrophages, les cellules de myélome, les cellules T et les lymphocytes B (Ganea, 1996).

Pour sa part, l'ARNm du PACAP est retrouvé avec une densité élevée au niveau de la substance noire, du cortex cérébral et du cervelet (Vaudry *et al.*, 2000b) mais également au niveau de différentes glandes endocrines telles que les glandes surrénales, le pancréas, ainsi que dans les systèmes immunitaire, digestif, respiratoire et reproducteur (Arimura *et al.*, 1991; Bourgault *et al.*, 2009b; Vaudry *et al.*, 2000b). Plus particulièrement, l'ARNm du PACAP est principalement retrouvé dans les cellules germinales et les spermatocytes, mais n'est pas présent dans les fibres nerveuses du testicule (Hannibal *et al.*, 1995a; Hannibal *et al.*, 1995c; McArdle, 1994; Shioda *et al.*, 1994).

En résumé, le PACAP et son ARNm sont largement distribués dans le SNC et les organes périphériques, dont le pancréas, le système reproducteur et le système respiratoire (Bourgault *et al.*, 2009b).

1.1.4. Passage du PACAP à travers la barrière hémato-encéphalique.

La barrière hémato-encéphalique, majoritairement composée de cellules endothéliales réunies entre elles par des jonctions serrées, limite l'entrée des molécules circulant dans le SNC. Malheureusement, cette barrière représente un obstacle majeur pour le traitement des maladies du SNC car elle le rend imperméable à de nombreuses molécules à visée thérapeutique. Une molécule, dépendamment de ses caractéristiques physico-chimiques, peut pénétrer dans le SNC par les voies suivantes: (1) les molécules hydrosolubles peuvent traverser par les jonctions serrées, (2) les agents liposolubles peuvent traverser les membranes plasmiques des cellules endothéliales par diffusion, (3) l'entrée de glucose, d'acides aminés, de bases puriques, de nucléosides, de choline et d'autres substances peut se faire par des transporteurs ou (4) par des récepteurs présents sur l'endothélium, et finalement, (5) l'entrée des protéines plasmatiques est principalement régulée par l'adsorption-endocytose et la transcytose (Abbott *et al.*, 2006).

Le PACAP est l'un des premiers membres de la superfamille VIP/GRF/Glucagon pour lequel la capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été étudiée. Il fut ainsi observé que le PACAP27 et le PACAP38 sont capables de traverser la BHE de façon bidirectionnelle (**Figure 5**) (Banks *et al.*, 1993). Ainsi, après une injection intraveineuse (*i.v.*) de [^{125}I]PACAP27, ce dérivé pénètre dans le cerveau par un mécanisme de transport non saturable basé sur la diffusion passive transmembranaire. Bien que plus volumineuse et moins lipophile, la molécule [^{125}I]PACAP38 présente des paramètres pharmacocinétiques semblables. Cependant, ce dérivé entre dans le cerveau avec une vitesse approximativement 30% plus rapide que celle du [^{125}I]PACAP27 (Banks *et al.*, 1993; Dogrukol-Ak *et al.*, 2004). Notamment, le PACAP38 traverse la BHE plus rapidement au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe comparativement aux autres régions du cerveau (Nonaka *et al.*, 2002). Pour expliquer de ces différences, les auteurs suggèrent que le stress, la protéine β-amyloïde et l'âge sont possiblement impliqués. Un système de transport saturable faisant appel au *peptide transport system 6* (PTS-6) a été mis en évidence pour le PACAP38 (Banks *et al.*, 1993). Malgré cela et de façon surprenante, un pourcentage plus élevé de [^{125}I]PACAP27, comparé à [^{125}I]PACAP38, a été observé dans le cerveau après une administration *i.v.* (Banks *et al.*, 1993).

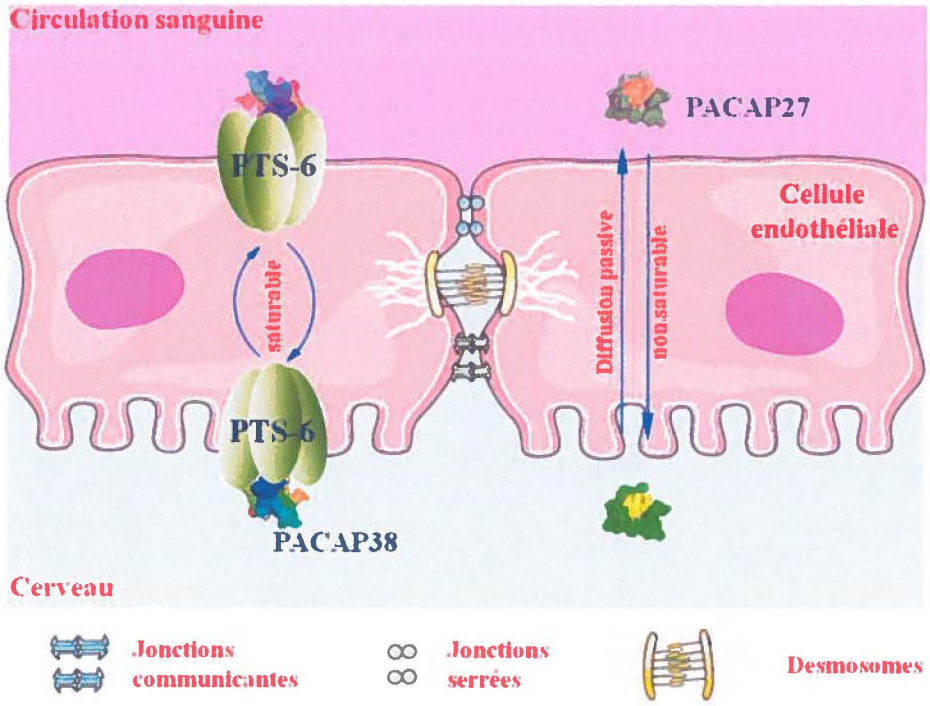


Figure 5 : Passage du PACAP à travers la barrière hémato-encéphalique. Le passage du PACAP38 est principalement effectué par un système de transport saturable, *i.e.* PTS-6, tandis que le passage du PACAP27 est non saturable et se base sur la diffusion passive transmembranaire.

1.2. Les récepteurs du PACAP

Jusqu'à présent, trois récepteurs pour le PACAP ont été caractérisés et clonés, à savoir les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2. Ces récepteurs appartiennent à la classe II de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, parfois aussi appelée famille B ou classe B. Les récepteurs VPAC1 et VPAC2 possèdent une affinité similaire envers le VIP et les deux formes moléculaires du PACAP. En revanche, le PACAP agit comme un ligand sélectif des récepteurs PAC1, avec une affinité et une activité biologique environ 1000 fois supérieure à celle du VIP. **(Tableau 4)** (Bourgault *et al.*, 2009b; Vaudry *et al.*, 2000b).

Tableau 4: Caractéristiques pharmacologiques et mécanismes de transduction des récepteurs du PACAP (Vaudry *et al.*, 2000b)

Sites de liaison	Affinité	Récepteur	*Mécanismes de transduction*	
			Adénylylcyclase	Calcium
PAC1	P38 ≈ P27 ≈ 0.5 nM VIP > 500 nM	PAC1	Stimule la production d'AMPc P38 ≈ P27 >> VIP	Stimule la mobilisation du calcium intracellulaire
VPAC	P38 ≈ P27 ≈ VIP ≈ 1 nM	VPAC1	Stimule la production d'AMPc P38 > P27 > VIP	Stimule la mobilisation du calcium intracellulaire
	P38 ≈ P27 ≈ VIP ≈ 1 nM	VPAC2	Stimule la production d'AMPc P38 ≈ P27 ≈ VIP	Stimule la mobilisation du calcium intracellulaire

Parmi les trois récepteurs associés aux activités biologiques du PACAP, le récepteur PAC1, contrairement aux récepteurs VPAC, est caractérisé par l'existence de nombreux variants d'épissage alternatif fonctionnel, au nombre de 9, présentant tous des profils pharmacologiques plus ou moins distinct (Bourgault *et al.*, 2009b; Dickson *et al.*, 2009; Sherwood *et al.*, 2000; Vaudry *et al.*, 2009).

1.2.1. Distribution des récepteurs du PACAP

Comme le PACAP, les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 sont retrouvés au niveau du SNC ainsi qu'au niveau des tissus périphériques. Dans le SNC, l'expression de l'ARNm du récepteur PAC1, particulièrement abondante et largement distribuée, a été démontrée dans le bulbe olfactif, l'hippocampe, le cortex cérébelleux, ainsi que dans l'hypothalamus, l'amygdale, le thalamus et la substance noire (Bourgault *et al.*, 2009b; Dickson *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1996; Vaudry *et al.*, 2000b). Une densité importante de récepteur PAC1 a également été détectée dans le cervelet et le pont (Basille *et al.*, 1994; Basille *et al.*, 1993; Cauvin *et al.*, 1991; Masuo *et al.*, 1992). En revanche, l'expression des sites de liaison VPAC est généralement restreinte à des régions plus localisées du cerveau incluant le cortex piriforme, le cortex cérébral, le gyrus denté, le noyau amygdalien latéral, le plexus choroïde, et la glande pinéale pour VPAC1 (Vaudry *et al.*, 2000b) ou encore le cortex cérébral, le noyau périventriculaire, le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale pour VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b; Dickson *et al.*, 2009). La densité des sites de liaison VPAC est généralement beaucoup plus faible que celle de PAC1 dans de nombreuses régions du cerveau telles que le noyau interne

du complexe amygdalien, le cortex frontal, le noyau hypothalamique latérale et le cervelet (Bourgault *et al.*, 2009b). Enfin, les récepteurs du PACAP ne sont pas uniquement présents dans les neurones, mais sont aussi exprimés dans les cellules gliales (Martin *et al.*, 1992; Tatsuno *et al.*, 1990).

Au niveau périphérique, ces trois récepteurs présentent une distribution différente avec notamment PAC1 principalement exprimé dans la médullosurrénale, l'utérus, les tissus lymphoïdes de l'intestin et les testicules (Vaudry *et al.*, 2000b), VPAC1 dans le foie, les reins, la prostate, les seins, la rate, les poumons et dans presque tous les tissus épithéliaux (Reubi, 2000), et VPAC2 dans les organes musculaires tels que les vaisseaux sanguins et des muscles lisses, et également dans le côlon, le pancréas, la thyroïde et la rétine (Harmar *et al.*, 2004).

1.2.2. Ligands sélectifs pour les récepteurs du PACAP

Dans l'optique de mieux comprendre les effets biologiques liés à l'activation de chacun de ces trois récepteurs, plusieurs groupes ont tenté de développer des analogues spécifiques envers PAC1, VPAC1 et VPAC2. À ce jour, aucun agoniste PAC1 sélectif n'est disponible hormis un peptide de 61 acides aminés isolé à partir de la glande salivaire de la mouche *Lutzomyia longipalpis* et dénommé maxadilan. Étonnamment, ce peptide ne démontre que très peu de similarité de séquence avec le PACAP, mais s'avère être pourtant un puissant agoniste supposément sélectif des récepteurs PAC1 (Moro *et al.*, 1997). Des études de type structure-activité sur le maxadilan ont également conduit à la conception d'un antagoniste sélectif du récepteur PAC1, *i.e. des*[24-42]maxadilan (Moro *et al.*, 1999). Cependant, le maxadilan et son antagoniste restent relativement mal caractérisés. En effet, le puissant effet vasodilatateur du maxadilan, non observé *via* l'activation de PAC1 avec le PACAP, suggère qu'il peut également se lier et activer d'autres récepteurs (Lerner *et al.*, 1991; Moro *et al.*, 1997). Par ailleurs, comme récemment démontré, le maxadilan et le PACAP27 diffèrent dans leur mode d'activation du récepteur PAC1 et/ou dans les signaux de transduction activés (Hoover *et al.*, 2009). Par conséquent, le maxadilan pourrait agir comme un agoniste biaisé du système PACAPergique au niveau de PAC1.

Couramment utilisé, le fragment 6-38 du PACAP est également un antagoniste du récepteur PAC1 (Robberecht *et al.*, 1992b). Par contre, celui-ci conserve une certaine activité résiduelle au

niveau des récepteurs VPAC2 (Dickinson *et al.*, 1997). Enfin, il fut récemment démontré que le PACAP(6-38) est également un puissant antagoniste des récepteurs du *cocaine-amphetamine regulated transcript* (CART) (Lin *et al.*, 2011). Les premiers antagonistes non peptidiques du récepteur PAC1, avec une affinité de l'ordre du nM, ont été découverts voilà quelques années (Beebe *et al.*, 2008). Néanmoins, leur spécificité n'a pas été décrite, ce qui suggère qu'ils ne sont probablement pas des outils pharmacologiques sélectifs. Le **tableau 5** présente les principaux agonistes et antagonistes peptidiques répertoriés dans la littérature. À noter, les ligands sélectifs des récepteurs VPAC sont essentiellement basés sur la séquence du VIP. Ainsi, un agoniste sélectif, le [Lys^{15}, Arg^{16}, Leu^{27}]VIP(1-7)/GRF(8-27), avec une haute affinité pour le récepteur VPAC1, a été développé à partir d'un hybride entre le VIP et le GRF (Gourlet *et al.*, 1997b). Par ailleurs, à partir d'une étude de type Ala-scan du VIP, un agoniste sélectif du VPAC1 *i.e.* [$Ala^{11,22,28}$]VIP, avec une affinité 1000 fois plus élevée que celle du VIP, a été identifié (Nicole *et al.*, 2000). Ce peptide ne montre aucun effet agoniste au niveau des récepteurs VPAC2, mais il se comporte comme un faible agoniste des récepteurs PAC1 (Dickson *et al.*, 2006).

Tableau 5: Ligands sélectifs (agonistes ou antagonistes) pour les récepteurs du PACAP.

Récepteur	Agoniste		Antagoniste	
	Composé (référence)	Limitation	Composé (référence)	Limitation
PAC1	Maxadilan (Moro *et al.*, 1997)	Effet vasodilatateur	*des*[24-42]Maxadilan (Moro *et al.*, 1999) PACAP(6-38) (Robberecht *et al.*, 1992b)	- Faible agoniste VPAC2 Antagoniste CART
VPAC1	[Ala^{11,22,28}]VIP (Nicole *et al.*, 2000) [Lys^{15}, Arg^{16}, Leu^{27}]VIP(1-7)/GRF(8-27) (Gourlet *et al.*, 1997b)	Faible agoniste PAC1 Aucune connue	[Tyr^{9}, Dip^{18}]VIP(6-23) (Tams *et al.*, 2000) PG 97-269 (Gourlet *et al.*, 1997a)	Faible affinité pour VPAC2 Aucune connue
VPAC2	Ro 25-1392 (Xia *et al.*, 1997) Ro 25-1553 (O'Donnell *et al.*, 1994a; O'Donnell *et al.*, 1994b)	Faible affinité pour VPAC1 Activation de PAC1 Faible affinité pour VPAC1	PG 99-465 (Moreno *et al.*, 2000) (2*R*,4*S*)-2-benzyl-4-hydroxy-N-((1*S*,2*R*)-2-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)-5-(4-nitrophénylsulfonamido)pentanamide (Chu *et al.*, 2010) (2*R*,4*S*)-2-benzyl-5-(4-*tert*-butylphénylsulfonamido)-4-hydroxy-*N*-((1*S*,2*R*)-2-hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)pentanamide (Chu *et al.*, 2010)	Faible agoniste VPAC1 Aucune connue Aucune connue

Plusieurs analogues « sélectifs » pour le récepteur VPAC2 sont également disponibles. Parmi ceux-ci, on retrouve deux analogues cycliques, *i.e.* Ro 25-1392 (Ac-[Glu^{8}, Tyr(CH$_3$O)^{10}, Lys^{12}, Nle^{17}, Ala^{19}, Asp^{25}, Leu^{26}, Lys^{27,28}]-VIP(cyclo 21-25)), et Ro 25-1553 (Ac-His^{1}[Glu^{8}, Lys^{12}, Nle^{17}, Ala^{19}, Asp^{25}, Leu^{26}, Lys^{27,28}, Gly^{29,30}, Thr^{31}]VIP-NH2(cyclo 21 – 25)) (Bolin *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1997). Cependant, ces composés ont démontré une activité agoniste évidente pour le récepteur VPAC1 lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations de l'ordre du micromolaire. De plus, le peptide Ro 25-1553 est également capable d'activer les récepteurs PAC1. Deux autres agonistes puissants du récepteur VPAC2, *i.e.* BAY 55-9837 et R3P65, ont également été

développés par Bayer et sont considérés comme des agents thérapeutiques potentiels pour le diabète de type II (Tsutsumi *et al.*, 2002; Yung *et al.*, 2003). Toutefois, à des concentrations élevées, R3P65 active également les récepteurs VPAC1 et PAC1 (Yung *et al.*, 2003). De plus, dans un autre modèle *in vitro,* soit des cellules CHO transfectées avec les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2, ce peptide est un agoniste très puissant des récepteurs VPAC1, l'étant même plus que pour VPAC2 (Dickson *et al.*, 2006).

Par ailleurs, quelques antagonistes sélectifs des récepteurs VPAC ont aussi été décrits. Par exemple, l'analogue PG99-465 était considéré comme le premier antagoniste sélectif du récepteur VPAC2 (Moreno *et al.*, 2000). Toutefois, six ans plus tard, il fut démontré que ce peptide est un agoniste partiel de VPAC2 et un agoniste complet pour les récepteurs VPAC1 et PAC1 pour la stimulation d'AMPc (Dickson *et al.*, 2006). À ce jour, un seul antagoniste sélectif du récepteur VPAC1, le PG97-269, *i.e.* Ac-[His^{1}, D-Phe^{2}, Lys^{15}, Arg^{16}, Leu^{17}]VIP(3-7)/GRF(8-27) a été décrit (Gourlet *et al.*, 1997a). D'autre part, récemment, un antagoniste non peptidique du récepteur VPAC2, ne possédant aucune activité agoniste ou antagoniste détectable pour les récepteurs VPAC1 ou PAC1, a été développé (Chu *et al.*, 2010). De plus, ce premier antagoniste non peptidique est également le seul antagoniste du récepteur VPAC2 connu à ce jour qui interagit de façon allostérique avec la région transmembranaire du récepteur (Chu *et al.*, 2010).

1.2.3. Activation du récepteur

Comme la majorité des récepteurs du groupe B, les récepteurs PAC1/VPAC ont un domaine N-terminal de plus de 120 résidus, qui contient un peptide signal hydrophobe N-terminal de même qu'un domaine de liaison (Laburthe *et al.*, 2002b). Ce long domaine est impliqué dans la reconnaissance du récepteur *via* la formation d'un complexe avec le neuropeptide PACAP. La formation de ce complexe entre la portion hélicoïdale du PACAP et le domaine N-terminal du récepteur induit un changement conformationnel de ce dernier permettant ainsi à la portion N-terminale du PACAP d'interagir avec la région juxtamembranaire du récepteur pour induire, via le recrutement des protéines $G_{\alpha s}$, l'activation de l'adénylylcyclase et donc conséquemment l'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMP_c. Toutefois, les récepteurs PAC1/ VPAC peuvent aussi stimuler la production de calcium intracellulaire et moduler l'activité de la phospholipase D (PLD), des tyrosines kinases, des canaux calciques, des RhoA GTPases et des MAP kinases (**Figure 6**) (Chatterjee *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2009; Hardwick *et al.*, 2006;

Henle *et al.*, 2006; Macdonald *et al.*, 2005; McCulloch *et al.*, 2000; Morisset *et al.*, 1995; Moroo *et al.*, 1998; Watkins *et al.*, 2004). En général, bien que les cascades de l'AMPc, du calcium et de la PLD soient toutes stimulées via les récepteurs PAC1/VPAC, l'activation de la voie de l'adénylylcyclase (AC) est généralement plus efficace que les autres (McCulloch *et al.*, 2000; McCulloch *et al.*, 2001).

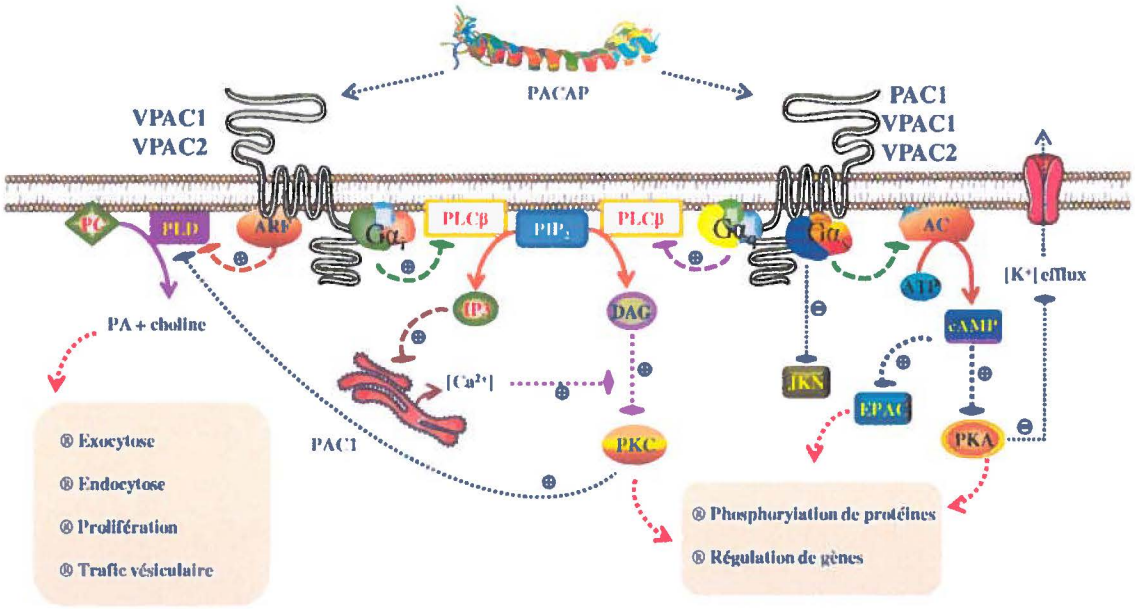


Figure 6 : Voies de signalisation intracellulaire stimulées par l'activation des récepteurs PAC/VPAC. Lors de leur activation, les trois récepteurs sont capables de se coupler à $G\alpha_s$ conduisant ainsi à la production intracellulaire d'AMPc. En outre, les récepteurs peuvent également activer la PLC, ce qui provoque une augmentation de $[Ca^{2+}]$ intracellulaire par l'intermédiaire d'un couplage avec $G\alpha_q$ (les trois récepteurs) et $G\alpha_i$ (VPAC1 et VPAC2). Adapté de Dickson *et al.*, 2009.

1.3. Activité biologique du PACAP

Le PACAP, initialement caractérisé en tant qu'agent hypophysiotrope, est également impliqué dans la régulation d'une multitude d'effets biologiques (Vaudry *et al.*, 2009). Au niveau du système nerveux central, le PACAP peut agir comme une neurohormone, un neurotransmetteur et un facteur trophique (Bourgault *et al.*, 2009a; Vaudry *et al.*, 2009). Parmi les diverses actions du PACAP, on peut noter qu'une injection intracérébroventriculaire ou intracisternale du

PACAP cause une augmentation dose-dépendante de la concentration plasmatique de vasopressine (Murase *et al.*, 1993; Seki *et al.*, 1995). L'administration centrale de PACAP produit des augmentations significatives de gonadolibérine (*Gonadotropin Releasing Hormone,* GnRH), de somatostatine, de vasopressine et d'ocytocine et elle induit l'expression du gène codant pour la corticolibérine (*Corticotropin Releasing Factor*/CRF) (Bourgault *et al.*, 2011). Ces différents effets sont bloqués par une injection concomitante de PACAP(6-38) et ils semblent donc être régulés par l'activation des récepteurs PAC1 (Grinevich *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1996). De façon surprenante, l'administration intraveineuse de PACAP provoque, au niveau de l'hypothalamus, une diminution des ARNm codant pour la GnRH et aucun changement dans l'expression des ARNm de la somatostatine (Li *et al.*, 1996). Il a également été démontré que le PACAP est impliqué dans la régulation circadienne de la production de mélatonine (Cagampang *et al.*, 1998; Shinohara *et al.*, 1999). En accord avec la distribution du PACAP et de ses récepteurs dans des régions spécifiques du SNC, le PACAP exerce des effets variés, dont les plus étudiés concernent ses activités neurotrophiques et neuroprotectrices.

Au niveau périphérique, le PACAP agit sur les glandes endocrines, les gonades ainsi que sur les systèmes immunitaire, respiratoire, cardiovasculaire et intestinal (Bourgault *et al.*, 2009b). Par exemple, au niveau cardiovasculaire, le PACAP exerce une forte activité relaxante sur les cellules musculaires lisses *via* l'activation des récepteurs VPAC (Huang *et al.*, 1993). L'injection de PACAP chez l'homme induit une augmentation du débit cardiaque (Birk *et al.*, 2007). Dans le système respiratoire, le PACAP cause une relaxation des muscles de la trachée (Araki *et al.*, 1992), favorise la bronchodilatation (Linden *et al.*, 1995) ou encore stimule la sécrétion de mucus et de chlore (Derand *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 1998). Le **Tableau 6** dresse un sommaire des effets biologiques induits par le PACAP.

Tableau 6: Effets physiologiques associés au PACAP (Adapté de Vaudry *et al.*, 2009).

Tissus / organes	Actions biologiques
Système nerveux central	Hypothalamus : • Action de neurotransmetteurs ou de neuromodulateurs régulant la sécrétion de neurohormones hypophysiotropes. • Stimulation de la libération d'ocytocine et de vasopressine. • Stimulation de la synthèse de somatostatine, de gonadolibérine (GnRH) et de corticolibérine (CRF). Stimulation de la sécrétion de mélatonine. Action neurotrophique lors du développement. Activité neuroprotectrice (anti-apoptotique).
Hypophyse	Activité hypophysiotrope; stimule la libération de : • GH (hormone de croissance) • ACTH (hormone adrénocorticotrope) • LH (hormone lutéinisante) • FSH (hormone folliculo-stimulante) Stimulation de la libération de vasopressine
Système reproducteur	Stimulation de la sécrétion de testostérone (cellules de Leydig). Stimule la sécrétion d'oestradiol (cellules de Sertoli). Implication dans la spermatogenèse. Stimulation de la synthèse de progestérone. Stimulation de la maturation d'ovocyte. Inhibition de l'apoptose folliculaire.
Système respiratoire	Relaxation des muscles lisses de la trachée. Bronchodilatation.
Système digestif	Foie : Stimulation de la libération de glucose (*via* VPAC2). Pancréas : Stimulation de la sécrétion d'insuline et de glucagon (*via* VPAC2). Stimulation de la sécrétion salivaire. Relaxation des muscles lisses gastriques. Stimulation de la sécrétion de bicarbonate (duodénum).
Système cardiovasculaire	Vasodilatation (cerveau, yeux, pancréas, testicules, peau…) (*via* VPAC2). Augmentation du débit cardiaque et de la force de contraction ventriculaire (*via* VPAC2).
Système immunitaire	Implication dans la réaction inflammatoire. Stimulation de la migration, de la phagocytose et de la production de TNF-α et d'IL-6 chez les macrophages inactifs. Diminution de la sécrétion de TNF-α, de NO et d'IL-1 chez les macrophages activés. Modulation de la synthèse de cytokines.
Glande thyroïde	Stimulation de la sécrétion de thyroxine (T_4).
Glandes surrénales	Stimulation de la libération de catécholamines. Stimulation de la libération d'enképhalines

Pour une information plus détaillée sur les activités biologiques associées au PACAP, le lecteur est invité à lire une revue de notre groupe (Vaudry *et al.*, 2009). Dans le cadre de cette thèse, mes

efforts se concentreront principalement sur les effets de ce peptide au niveau du SNC et du système reproducteur.

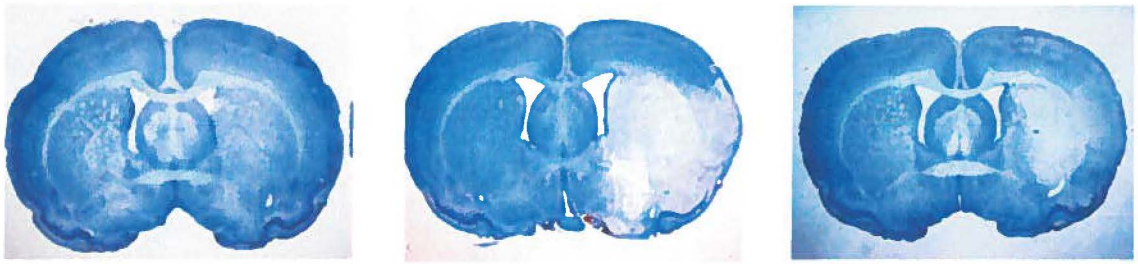
1.3.1. Effet neuroprotecteur du PACAP

1.3.1.1. Modèle in vitro

Plusieurs études ont démontré que le PACAP possède d'importantes propriétés neuroprotectrices face à divers agents neurotoxiques. Des cultures primaires de cellules granulaires du cervelet (*cerebellar granule cells* : CGCs) ont été fréquemment utilisées pour étudier l'effet du PACAP sur l'apoptose. Dans des conditions normales de culture, ce peptide protège les CGCs contre la mort cellulaire programmée survenant au cours du développement cérébelleux (Vaudry *et al.*, 2000a). Plus intéressant, ce dernier est capable de prévenir la mort cellulaire induite par différentes formes d'agression. Il a ainsi été observé qu'un traitement des CGCs avec du PACAP empêche la mort cellulaire apoptotique induite par l'éthanol et ceci même si le PACAP est ajouté au milieu de culture 2 h après l'exposition à l'alcool (Vaudry *et al.*, 2002a; Vaudry *et al.*, 2002b). En condition de stress oxydatif, une coincubation des CGCs avec du peroxyde d'hydrogène et du PACAP assure la survie des cellules et leur permet de garder leur forme typique de neurones différenciés, *i.e.* des cellules fusiformes bipolaires avec de longues neurites. Le PACAP est capable d'inhiber significativement l'effet néfaste du H_2O_2 en agissant sur le potentiel membranaire des mitochondries supprimant ainsi totalement la fragmentation de l'ADN (Vaudry *et al.*, 2002a). Des effets similaires ont également été observés avec les céramides, des métabolites des sphingolipides qui sont des médiateurs essentiels de la réponse au stress cellulaire et des facteurs importants impliqués dans l'apoptose. Ainsi, l'incubation de CGCs avec la céramide C2 augmente nettement la mort cellulaire par apoptose alors qu'un cotraitement avec le PACAP entraîne un arrêt de la fragmentation de l'ADN et induit une restauration de l'activité mitochondriale (Vaudry *et al.*, 2003). Enfin, dans un modèle utilisant des cellules PC12 dérivées d'un phéochromocytome de rat, le PACAP protège ces cellules contre la cytotoxicité du peptide β-amyloïde (Onoue *et al.*, 2002a), du PrP(106-126) (fragment 106-126 de la protéine prion humaine) (Onoue *et al.*, 2002b) ou encore du gp120, la glycoprotéine de l'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Brenneman *et al.*, 2002).

1.3.1.2. Modèle in vivo

Des effets neuroprotecteurs envers certains agents neurotoxiques, *i.e.* MPTP, glutamate ou acide kaïnique, ont également été répertoriés dans des modèles *in vivo* (Arimura *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 2003; Reglodi *et al.*, 2004a). Notamment, ces effets ont été démontrés dans divers modèles d'atteinte cérébrale tels que (i) la maladie de Parkinson (Reglodi *et al.*, 2004b), (ii) l'ischémie cérébrale (Dejda *et al.*, 2011b; Reglodi *et al.*, 2000) et (iii) certains dommages traumatiques (Farkas *et al.*, 2004). Plus particulièrement, dans un modèle d'ischémie cérébrale par obstruction de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) chez le rat, Dejda et ses collègues ont démontré que des doses de PACAP38, de l'ordre du picomolaire, et de son analogue stable, *i.e.* acétyl-[Ala^{15,20}]PACAP38-propylamide, pouvaient réduire fortement le volume de la zone infarcie et réduire les manifestations de troubles neurologiques induits par l'accident vasculaire cérébral (Dejda *et al.*, 2011b) (**Figure 7**). Cette action protective contre les dommages ischémiques a également été observée lorsque le PACAP est injecté *icv* préalablement à l'épisode cérébro-ischémique (Tamas *et al.*, 2002). Un effet neuroprotecteur du PACAP est également constaté lorsque ce dernier est injecté *iv* 24 heures après l'ischémie (Uchida *et al.*, 1996). Enfin, il fut montré que des souris déficientes en PACAP présentent des lésions plus grandes et que ces lésions peuvent être réduites en présence de PACAP exogène, lequel semble favoriser la récupération fonctionnelle (Chen *et al.*, 2006; Ohtaki *et al.*, 2006).



Sham **MCAO** **MCAO + PACAP38**

Figure 7 : Effet du PACAP38 sur le volume de la zone infarcie après une occlusion de l'artère cérébrale. Les images représentent une coupe coronale du cerveau de rat après différents traitements, i.e. Sham, MCAO et MCAO + PACAP38. Les zones infarcies des hémisphères ipsilatéraux du cerveau apparaissent en blanc. Tiré de Dejda et al., 2011.

1.3.1.2. Mécanisme d'action

Dans de nombreux modèles cellulaires, incluant les cellules PC12, les CGCs, les neuroblastomes et les astrocytes, l'effet neuroprotecreur du PACAP semble être médié par l'activation du récepteur PAC1. Ce dernier, une fois activé, va bloquer essentiellement la voie apoptotique cellulaire en modulant la protéine Bcl-2 et en inhibant la caspase-3 (**Figure 8**). En effet, l'action neuroprotectrice du PACAP peut être bloquée par le PACAP(6-38), un antagoniste considéré spécifique pour le récepteur PAC1. De plus, le VIP, utilisé aux mêmes concentrations, n'engendre aucun des effets obtenus avec le PACAP dans certains modèles cellulaires tels que les PC12, les CGCs, les neuroblastomes et les astrocytes (Bourgault *et al.*, 2009a; Bourgault *et al.*, 2009b; Wolf *et al.*, 1995). Ces deux données semblent confirmer que les effets anti-apoptotiques du PACAP sont reliés principalement à l'activation des récepteurs PAC1. Sur des cultures de cellules granulaires du cervelet, l'activation du récepteur PAC1 provoque une augmentation d'AMPc, laquelle conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA), des *exchange proteins activated by cAMP* (EPAC), de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) ou encore la phosphorylation de la *cAMP-responsive element-binding protein* (CREB) (**Figure 8**) (Dejda *et al.*, 2008). L'activation de la MAPK et la phosphorylation de CREB conduisent ensuite à la stimulation de la transcription de Bcl-2 qui, à son tour, participe aux processus de désactivation de la caspase-3. Il a été également démontré qu'un inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) pouvait empêcher les effets neuroprotecteurs du PACAP en bloquant le processus de désactivation de la caspase-3 (**Figure 8**) (Onoue *et al.*, 2002b; Zamostiano *et al.*, 2001). Enfin, le PACAP est capable de bloquer l'apoptose en inhibant l'activation de la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) de la *stress-activated protein kinase* (SPAK) (Bourgault *et al.*, 2011) ou encore en réduisant l'efflux potassique (Mei *et al.*, 2004).

Dans certains types cellulaires, la voie de signalisation anti-apoptotique principale est constituée de la phosphatidyl-inositol-3'-OH kinase (PI3K)/sérine-thréonine kinase Akt (Bourgault *et al.*, 2011). Il fut ainsi observé que le PACAP est capable d'activer la voie Akt par le biais de la transactivation du récepteur de la tyrosine kinase type 1 (TrkA) après l'internalisation du récepteur PAC1 (Lee *et al.*, 2002; May *et al.*, 2010; Rajagopal *et al.*, 2004). De plus, le PACAP induit également l'expression de nombreuse neurotrophines dans des neurones et des cellules gliales. En particulier, le PACAP est connu pour induire l'expression du *brain-derived*

neurotrophic factor (BDNF), du *nerve growth factor* (NGF), de la neurotrophine-1, de la neurotrophine-3 et de la neurotrophine-4, de même que de leurs récepteurs (Somogyvari-Vigh *et al.*, 2004). Par ailleurs, le PACAP stimule l'expression et la libération de *l'activity-dependent neurotrophic protein* (ADNP) dans les neurones et les astrocytes (Li *et al.*, 2005; Nakamachi *et al.*, 2006; Zusev *et al.*, 2004). Cette stimulation de l'expression de facteurs de survie semble donc être un mécanisme neuroprotecteur supplémentaire associé au PACAP (Bourgault *et al.*, 2011).

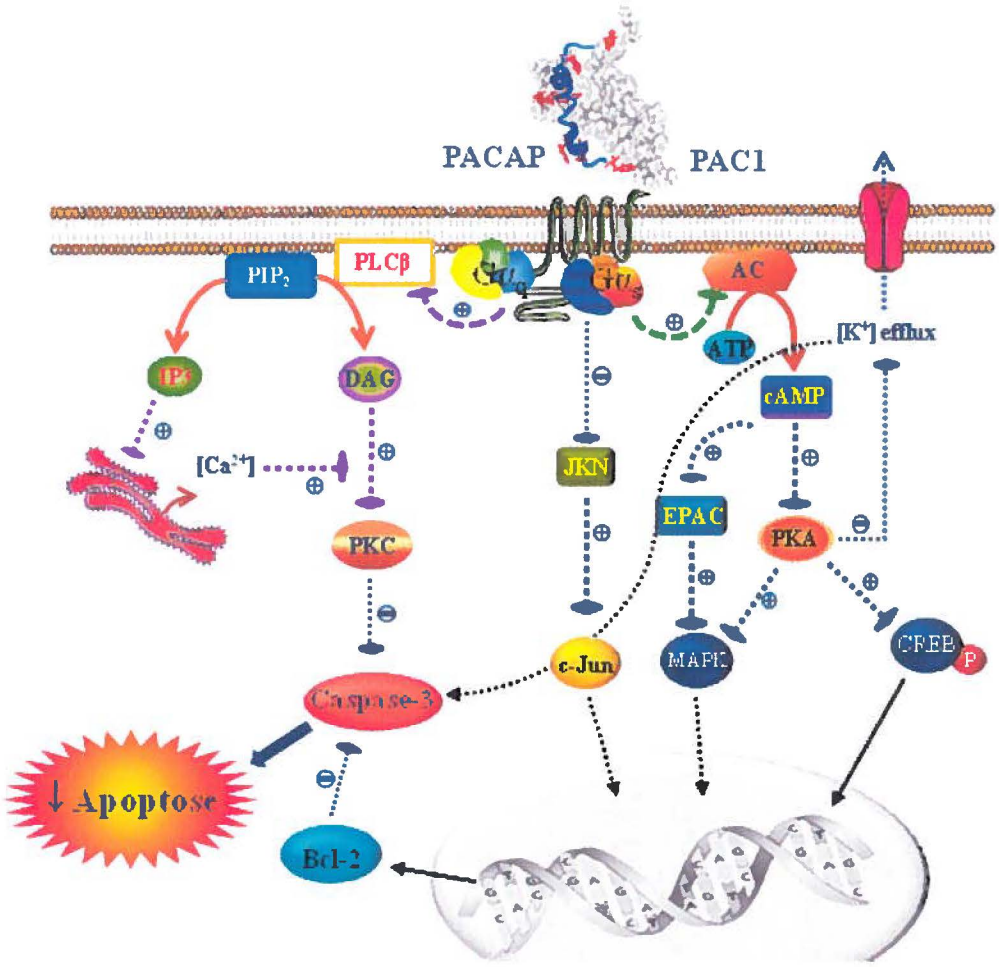


Figure 8 : Signaux de transduction impliqués dans l'effet neuroprotecteur du PACAP.

En raison de la vaste distribution du PACAP et de ses récepteurs dans le système nerveux central, le mécanisme d'inhibition de l'apoptose par le PACAP observé *in vitro* semble également se retrouver *in vivo*. Par exemple, le PACAP augmente l'expression de Bcl-2 et inhibe la

libération du cytochrome C dans un modèle murin d'ischémie cérébrale (Ohtaki *et al.*, 2006). Récemment, Dejda et ses collègues ont démontré que le PACAP38 et un analogue stable, *i.e.* acétyl-[Ala^{15},Ala^{20}]PACAP38-propylamide, pouvaient inhiber l'expression d'ARNm de promoteurs de mort associés avec Bcl-2, tels que la caspase 3, la *macrophage inflammatory protein-1α* (MIP-1α), *l'inducible nitric oxide synthase 2* (iNOS 2), et le *tumor necrosis factor-α* (TNF-α). En revanche, les peptides PACAP27 et PACAP38 augmentent l'expression des ARNm de l'*extracellular signal-regulated kinase 2* (Erk2), du *B-cell CLL/lymphoma 2*, et de l'interleukine 6 (IL-6) (Dejda *et al.*, 2011b). Ces résultats indiquent que l'effet neuroprotecteur de PACAP après une MCAO (*middle cerebral artery occlusion*) est dû à sa capacité à inhiber l'apoptose, mais aussi à sa capacité à moduler la réponse inflammatoire. En effet, il a été démontré que le PACAP réduit les phénomènes inflammatoires dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires chroniques (Martinez *et al.*, 2002). En mesurant le volume de l'infarctus chez les souris déficientes en PACAP, les auteurs ont démontré le rôle crucial du PACAP endogène dans la réduction des dommages neuronaux induits par les AVC (Chen et al., 2006; Ohtaki et al., 2006). Plus intéressant encore, des souris PACAP+/- et PACAP-/- présentent un niveau supérieur en cytochrome C et inférieur en expression de Bcl-2 cytoplasmique que les animaux de type sauvage (Ohtaki et al., 2006). Ces observations suggèrent que le PACAP, agissant sur la voie apoptotique mitochondriale, inhibe l'activité de la caspase-9 et par la suite celle de la caspase-3, qui sont activées dans les modèles d'ischémie. De plus, l'effet neuroprotecteur du PACAP dans ces modèles peut être aussi indirect, i.e. médié par les astrocytes via la libération de l'interleukine 6 (Ohtaki et al. 2006).

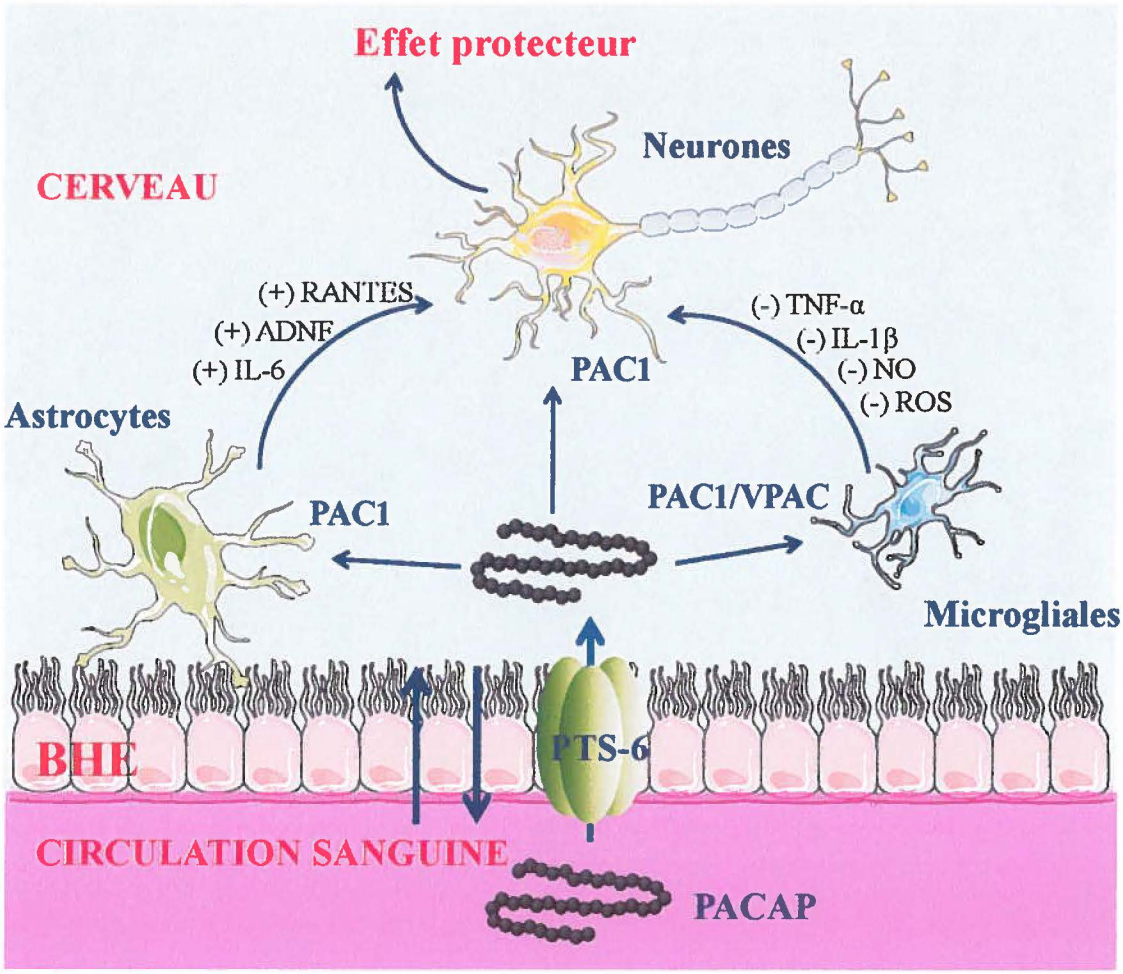


Figure 9 : Représentation schématique des effets protecteurs directs et indirects du PACAP sur les neurones, les astrocytes et la microglie. ADNF, *activity-dependent neurotrophic factor*; IL-1β, interleukine-1β; IL-6, interleukine-6; NO, oxyde nitrique; PAC1, récepteur PACAP 1; PTS-6, *specific peptide transporter system 6*; RANTES, *Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*; ROS, espèces réactives de l'oxygène; TNF-α, *tumor necrosis factor-α*; VPAC, les récepteurs communs du VIP et du PACAP. (Adapté de Bourgault *et al.*, 2011.

Notamment, chez les souris déficientes en 1L-6, les effets neuroprotecteurs du PACAP sont altérés (Ohtaki *et al.*, 2006). De même, une augmentation de la région nécrosée fut observée suite à l'injection d'un anticorps spécifique au récepteur de l'IL-6 (IL-6R) dans un modèle murin d'ischémie cérébrale (Yamashita *et al.*, 2005). Dans un modèle d'axotomie du nerf facial, le

PACAP inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IFN-γ et il induit l'expression de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10 (Armstrong *et al.*, 2008). Le VIP et le PACAP inhibent directement la production de NO par les microglies activées et la production de molécules pro-inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1β et les ROS (**Figure 9**) (Bourgault *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2003). En outre, le PACAP et le VIP inhibent l'expression des chimiokines CXC, MIP-2, KC, CC, MIP-1∞, MIP-1β et MCP-1, qui réduisent l'activité chimiotactique des cellules microgliales activées (Abad *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2002a; Delgado *et al.*, 2002b). Ces résultats suggèrent que les neuropeptides VIP et PACAP libérés par les neurones au cours d'une réponse inflammatoire serviraient de facteurs de survie neuronale en limitant les processus inflammatoires (Delgado *et al.*, 2002a). De même, une étude *in vivo* chez des souris déficientes PACAP suggère que ce dernier est impliqué de façon critique dans une réponse immunitaire soigneusement contrôlée, nécessaire pour la régénération du système nerveux (Armstrong *et al.*, 2008). Ces études supportent ainsi l'hypothèse que le PACAP joue un rôle important dans le mécanisme de défense naturelle des lésions nerveuses.

1.3.2. Effet du PACAP sur le système reproducteur

La présence de PACAP et de ses récepteurs dans le testicule et l'ovaire laisse supposer que le peptide peut fonctionner comme un régulateur local de l'activité reproductrice (Bourgault *et al.*, 2009b). En effet, l'expression du PACAP dans les testicules de rat est contrôlée par les gonadotrophines hypophysaires telles que l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Shuto *et al.*, 1995). De plus, dans des modèles *in vitro*, le PACAP stimule la sécrétion de testostérone dans les cellules de Leydig de rat (Romanelli *et al.*, 1997; Rossato *et al.*, 1997) de même que la sécrétion d'œstradiol et d'inhibine dans des cellules de Sertoli (Heindel *et al.*, 1992). Dans l'épithélium épididymaire, le PACAP inhibe l'excrétion des ions chlorures, lesquels participent à l'activation et le stockage des spermatozoïdes. De façon intéressante, le vieillissement testiculaire est retardé chez les souris déficientes en PACAP, probablement *via* l'expression de facteurs stéroïdogéniques. En effet, ces facteurs sont capables de diminuer la production d'espèces réactives de l'oxygène, lesquelles sont responsables de l'apoptose (Lacombe *et al.*, 2006). De plus, plusieurs études ont démontré que le PACAP est impliqué dans l'induction et le maintien de la fonction érectile (Hedlund *et al.*, 1995; Hedlund *et al.*, 1994). En accord avec cette observation, un acide stéarique conjugué avec le VIP est ainsi capable d'augmenter l'activité

copulatoire et les réflexes péniens chez les rats castrés traités avec de la testostérone (Gozes *et al.*, 1992).

De plus, la présence d'une immunoréactivité de type PACAP dans les tubules épididymaires indique que le PACAP est synthétisé localement et peut donc agir comme un régulateur paracrine de la maturation des spermatozoïdes (Zhou *et al.*, 1997). Récemment, Winters et ses collègues ont proposé un mécanisme d'autorégulation du PACAP dans les cellules gonadotropes et folliculo-stellaires (**Figure 10**). Ainsi, le PACAP active le récepteur PAC1 pour augmenter la production d'AMPc, induisant par le fait même l'expression des gènes codant pour le PACAP et pour son récepteur spécifique PAC1 ainsi que pour la synthase de l'oxyde nitrique de type 1 (NOS1) et la follistatine (Fst). Le PACAP sécrété par l'action des gonadotrophines va ensuite activer les cellules folliculo-stellaires, qui vont alors sécréter également *de novo* du PACAP qui, à son tour, va stimuler les gonadotrophines. Récemment, la présence du récepteur PAC1 dans des fractions intracellulaires des cellules germinales testiculaires a été démontrée (Li *et al.*, 2004). Cette observation, corrélée aux résultats précédents, soulève l'hypothèse que le PACAP endogène libéré dans la cellule pourrait activer directement des récepteurs intracellulaires. La régulation par le PACAP de l'AMPc dans les extraits intracellulaires semble répondre, du moins partiellement, à cette question en démontrant que le PACAP est également un facteur intracrine.

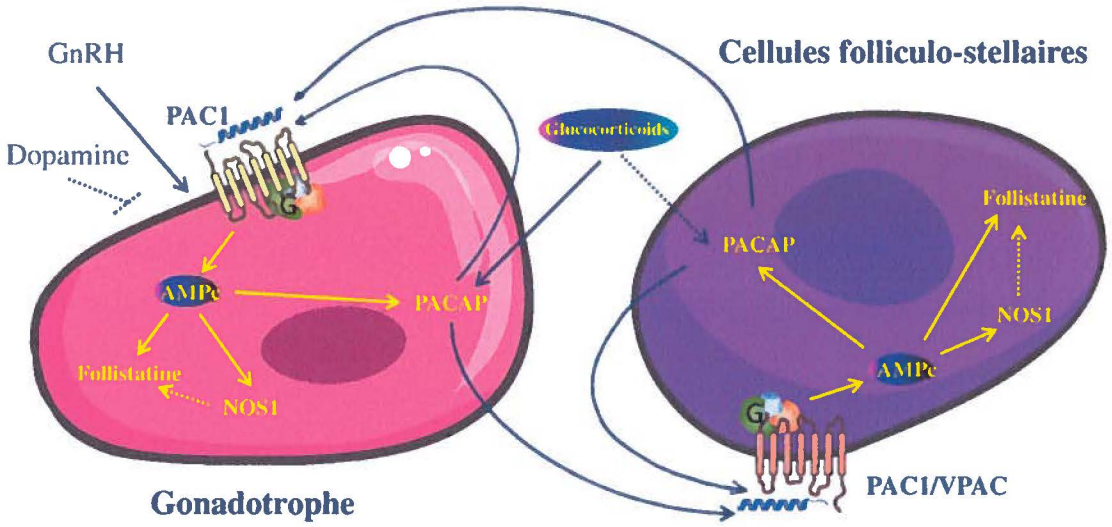


Figure 10 : Mécanisme proposé pour la régulation à la hausse de l'expression des gènes codés pour le PACAP, *via* la production d'AMPc, dans les cellules gonadotropes et folliculo-stellaires. Adapté de (Winters *et al.*, 2011).

De même, l'exposition au PACAP de cellules de la granulosa en culture cause une augmentation de la production de progestérone (Zhong *et al.*, 1994). L'immunoneutralisation du PACAP endogène réduit la formation de la progestérone et altère la lutéinisation suggérant ainsi que le PACAP joue un rôle important dans la production de progestérone pendant la période préovulatoire (Gras *et al.*, 1999). De plus, Ko et ses collègues ont suggéré que l'activation des récepteurs de la progestérone est nécessaire pour l'expression des gènes codant pour le PACAP (Ko *et al.*, 1999). En effet, le blocage du récepteur de la progestérone avec l'antagoniste ZK98299 abolit l'effet de l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) sur l'expression génique du PACAP (Ko et al., 1999). Il faut également noter que l'hCG stimule l'expression des ARNm des récepteurs du PACAP et de la progestérone. De plus, l'incubation de follicules préovulatoires immatures de rat avec le PACAP ou le VIP induit une inhibition concentration-dépendante de l'apoptose folliculaire, réduit la prolifération cellulaire induite par la FSH et impliquerait le recrutement cyclique des follicules immatures (Winters *et al.*, 2011). Également, *via* l'activation des récepteurs VPAC, le PACAP induit la relaxation des muscles lisses nonvasculaires suggérant que ce peptide régule le système musculaire dans l'appareil reproducteur féminin. En outre, il a

été démontré que seulement 21% des souris femelles déficientes en PACAP ont réussi à donner naissance à la suite d'accouplement (Isaac *et al.*, 2008). En conclusion, ces données démontrent le rôle crucial du PACAP dans la régulation de la fonction reproductrice.

1.4 Études de type structure-fonction du PACAP

1.4.1. Pharmacophores du PACAP

Comme les autres membres de la famille glucagon-GRF-sécrétine, l'extrémité N-terminale His^1-Ile^5 du PACAP semble jouer un rôle crucial dans l'activité biologique du peptide. La suppression du résidu His^1 entraîne une diminution significative de l'affinité du PACAP27 pour son récepteur PAC1 (Bitar *et al.*, 1993; Gourlet *et al.*, 1991). De même, la délétion de ce résidu dans le PACAP38 abolit sa capacité à stimuler l'adénylylcyclase sur des fragments d'adénohypophyse (Yon *et al.*, 1993). Dans des cellules pancréatiques AR4-2J de rat, la suppression des résidus His^1 et Ser^2 réduit d'environ 3000 fois la puissance du PACAP27 à stimuler l'adénylylcyclase (Robberecht *et al.*, 1992a). La délétion successive des résidus N-terminaux a ainsi permis l'identification d'un antagoniste, le PACAP(6-38), mais surtout mis en évidence l'importance de ce domaine N-terminal du PACAP dans le processus d'activation des récepteurs (Robberecht *et al.*, 1992b). En accord avec cette idée, il fut récemment observé qu'une forme contrainte de ce domaine N-terminal, *i.e. cyclo*[CHSDGIC], était capable de stimuler la production d'AMPc et d'augmenter la viabilité des cellules CHO exprimant le récepteur PAC1 (Yu *et al.*, 2010). *In vivo*, ce cyclopeptide mime les effets du PACAP sur le taux de glucose et le taux d'insuline plasmatique (Yu *et al.*, 2010). Néanmoins, le profile pharmacologique de ce cyclopeptide, cyclo[CHSDGIC], a été obtenu dans un système inadéquatement validé. Par exemple, les tests d'AMPc ont été effectués sur des cellules CHO transfectées avec le récepteur PAC1, mais aucune donnée pharmacologique avec le peptide natif, ce qui aurait validé le système, n'a été décrite dans ce travail ou dans une étude antérieure auparavant. Toutefois, même si certaines données expérimentales sont discutables, les résultats *in vitro* et *in vivo* révèlent que la forme contrainte de l'extrémité N-terminale du PACAP est capable d'activer le récepteur PAC1.

L'acétylation de l'amine libre N-terminale ne modifie ni l'affinité, ni l'activité biologique du PACAP, indiquant ainsi que cette fonction n'est pas indispensable pour l'activation de ses récepteurs. (Bourgault *et al.*, 2008a; Bourgault *et al.*, 2009b; Robberecht *et al.*, 1992a).

Récemment, des études de type Ala-scan et D-scan des 7 premiers résidus de l'extrémité N-terminale du peptide ont démontré que la fonction acide carboxylique du résidu Asp^3 et le groupe phényle de Phe^6 sont des caractéristiques essentielles pour l'activation du récepteur PAC1 (Vaudry *et al.*, 2009). L'introduction d'une Ala aux positions 1, 2, 4 et 5 ne modifie pas significativement les propriétés pharmacologiques du peptide. La substitution de His^1 par Phe réduit la capacité du PACAP27 à stimuler l'activité adénylylcyclase, démontrant ainsi un rôle important du groupe imidazole (Hou *et al.*, 1994; Robberecht *et al.*, 1992a). Le remplacement du résidu sérine en position 2 par une alanine a peu d'effets sur le profil pharmacologique de l'analogue alors que sa substitution par un résidu Phe ou Arg diminue de 1000 fois sa capacité à stimuler l'adénylylcyclase (Hou *et al.*, 1994). Ces observations indiquent d'une part que le groupement hydroxyle de Ser n'est pas nécessaire pour l'activation du récepteur PAC1 et d'autre part que l'augmentation de l'encombrement stérique ou l'incorporation d'un résidu chargé positivement est très défavorable. La substitution du résidu Asp^3 par une Asn réduit nettement l'effet stimulant du PACAP27 sur l'adénylylcyclase. Enfin, il semble que les positions 1, 2 et 3 ne soient pas sensibles à une inversion de chiralité et que la fonction amine de l'extrémité N-terminale ne soit pas indispensable à l'activation du récepteur (Bourgault *et al.*, 2009b).

Il a été récemment suggéré que les ligands peptidiques de la classe B des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) possédaient au sein de leur structure un motif de type N-*capping* constituant un élément clé pour la liaison et l'activation du récepteur (Neumann *et al.*, 2008). Ces structures, bien définies, généralement situées à l'extrémité N-terminale d'une hélice α sont connus pour stabiliser le segment N-terminal de la structure hélicoïdale via des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes (Aurora *et al.*, 1998) (**Figure 11**). Pour le PACAP, cette structure est stabilisée par des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des résidus aromatiques Phe^6 et Tyr^{10} et par la présence d'une liaison hydrogène entre la chaîne latérale de Thr^7 et le proton amide du résidu Tyr^{10} (Neumann *et al.*, 2008). La présence de ce motif au sein du PACAP est partiellement confirmée par des études de type structure-activité (Bourgault *et al.*, 2011; Inooka *et al.*, 2001). Par exemple, le remplacement du résidu Phe^6 par une alanine abolit la liaison du PACAP au récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b). L'inversion de la chiralité de Ile^5 et Phe^6 a causé une perte importante de l'activité biologique du peptide. De même, la substitution du résidu Phe^6 ou Tyr^{10} par Ala réduit dramatiquement l'affinité du peptide envers le

récepteur PAC1 (Inooka *et al.*, 2001). Récemment, Bourgault et ses collègues ont également démontré qu'une modification de l'encombrement stérique ou de la densité électronique du noyau aromatique de la chaîne latérale de Phe^6 modifiait le profil pharmacologique du peptide (Bourgault *et al.*, 2009b).

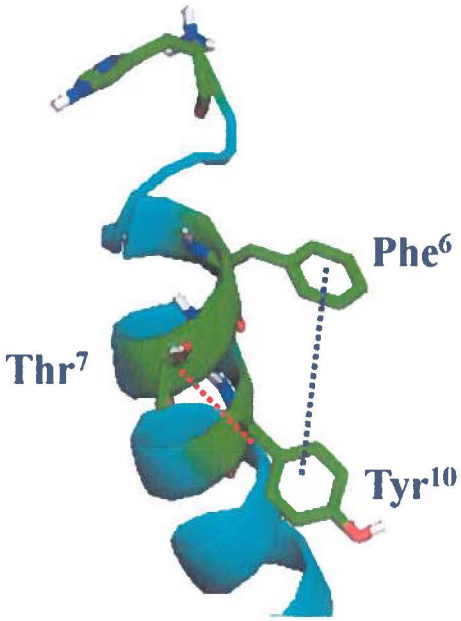


Figure 11: Représentation graphique du motif N-capping présent dans le PACAP. Ce motif particulier est caractérisé par des interactions hydrophobes entre la chaîne latérale des résidus aromatiques Phe^6 et Tyr^{10} (ligne pointillée bleue) et par la présence d'une liaison hydrogène entre la chaîne latérale de Thr^7 et le proton amide du résidu Tyr^{10} (ligne pointillée rouge). Visualisation effectuée avec l'aide du logiciel PyMOL 1.3r1 (Pdb: 2D2P).

Le segment C-terminal, *i.e.* PACAP(28-38), est surtout impliqué dans le maintien d'une interaction efficace avec les différents récepteurs. En effet, les délétions successives au niveau de ce domaine ont donné des analogues montrant une légère réduction de l'affinité et de l'activité biologique. En revanche, le domaine C-terminal du PACAP27 apparaît jouer un rôle important dans la reconnaissance des sites de liaison. Il est important de rappeler que l'activation du récepteur PAC1 est proportionnelle à la quantité relative de ligand lié au récepteur puisque la différence au niveau de l'activité biologique entre les fragments et le PACAP27 est comparable à celle de l'affinité (Gourlet *et al.*, 1996b). Ces observations suggèrent qu'au niveau moléculaire,

tous les fragments tronqués du côté C-terminal du PACAP27 peuvent activer le récepteur PAC1 de façon similaire. Notamment, le résidu Leu^{23} semble jouer un rôle crucial pour l'activité biologique du peptide (Bourgault *et al.*, 2009b). En effet, le PACAP(1-22) présente une diminution importante de son affinité de liaison et de son activité biologique, par rapport à son homologue PACAP(1-23) (Bourgault *et al.*, 2008b). De plus, le dérivé [Lys^{23}]PACAP27 est pratiquement incapable de se lier au récepteur PAC1 (Yung *et al.*, 2003). D'ailleurs, une étude récente effectuée au sein de notre laboratoire a démontré que certaines délétions à l'extrémité C-terminale peuvent être tolérées puisque l'affinité et l'activité du peptide sont conservées. Ainsi, la suppression du fragment 22-38 ne réduit que de 100 fois l'affinité et de 200 fois l'activité du peptide tandis que la délétion des fragments 21-38, 20-38 ou 19-38 cause une perte majeure de l'affinité, mais également de l'effet stimulant du peptide sur la mobilisation calcique (Bourgault *et al.*, 2008a; Bourgault *et al.*, 2008b). Par contre, l'analyse des caractéristiques pharmacologiques et conformationnelles de plusieurs dérivés hybrides aliphatiques du PACAP27 constitués d'un espaceur moléculaire reliant le domaine N-terminal à la région C-terminale, a révélé qu'aucun de ces analogues ne possédait une affinité significative envers le récepteur PAC1, même si certains d'entre eux présentaient un spectre de dichroïsme circulaire correspondant à la structure en hélice α caractéristique de ces peptides. Cette étude suggère que plusieurs domaines du PACAP27 sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur PAC1 et que la présence de la conformation hélicoïdale n'est pas un élément suffisant pour l'activation des récepteurs. De plus, le fait qu'un peptide chimère, formé du PACAP(28-38) et du VIP, montre une affinité 100 fois plus grande que le VIP pour le récepteur PAC1 (Gourlet *et al.*, 1997a; Gourlet *et al.*, 1996a) fournit une preuve supplémentaire que la région C-terminale du PACAP38 renforce l'affinité du peptide. Cette hypothèse fut d'ailleurs supportée par des analyses RMN du complexe constitué du PACAP(6-38) et du domaine extracellulaire N-terminal du PAC1 qui ont démontré un contact étroit entre les résidus Lys^{29}-Arg^{34} du PACAP et les résidus Glu^{117}, Tyr^{118} et Glu^{119} du récepteur (Sun *et al.*, 2007).

Les remplacements successifs de résidus Arg^{14}, Lys^{15} ou Lys^{20} par Ala n'affectent pas l'affinité du PACAP38 alors que leur substitution par un résidu chargé négativement, *i.e.* Glu, inhibe la liaison de PACAP27 et PACAP(6-38) au niveau du domaine N-terminal du récepteur PAC1 (Sun *et al.*, 2007). La substitution successive des résidus hydrophobes Tyr^{22}, Val^{26} ou Leu^{27} du

PACAP(6-38) par Ala réduit l'affinité de ces peptides pour le domaine N-terminal extracellulaire du récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2008a; Sun *et al.*, 2007; Yung *et al.*, 2003). L'incorporation de l'acide aminé photoréactif, benzoylphénylalanine, à la position 22 du PACAP27, réduit son affinité de 10 fois (Dejda *et al.*, 2011a). L'intégrité de l'hélice α des segments central et C-terminal semble essentielle pour maintenir une forte affinité envers le récepteur PAC1. En effet, la déstabilisation de la structure secondaire, par l'incorporation d'une liaison ψ CH2-NH entre les résidus Lys^{21} et Tyr^{22}, réduit l'affinité du PACAP38 (Bourgault *et al.*, 2008a). Des résultats similaires ont été également observés quand les résidus Val^{19}, Lys^{20} ou Lys^{21} sont remplacés par Gly (Robberecht *et al.*, 1992a; Sun *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que la région hélicoïdale du PACAP peut tolérer différentes modifications ponctuelles, tant qu'elles ne perturbent pas significativement la structure secondaire du peptide.

La majorité des études de type structure-activité portant sur les récepteurs VPAC ont été réalisées à l'aide du VIP. Très peu d'études sur les pharmacophores du PACAP portant sur les récepteurs VPAC1 et/ou VPAC2 ont été effectuées.

1.4.2. Modulation de la sélectivité du PACAP pour PAC1 ou VPACs

Des études de type structure-activité réalisées avec le PACAP27 ont cependant démontré que l'extrémité N-terminale, et plus particulièrement les résidus Gly^4 et Ile^5, semblent être très importants pour la sélectivité du peptide. En effet, les substitutions concomitantes des résidus 4, 5 et 9 du PACAP27 par des résidus correspondant à ceux du VIP entraînent une perte de l'activité biologique sans en altérer sérieusement l'affinité envers le récepteur PAC1 (Schafer *et al.*, 1991). De même, le peptide [Gly^4, Ile^5, Ser^9]VIP est, contrairement au VIP, capable d'activer le récepteur PAC1 (Onoue *et al.*, 2001), démontrant ainsi l'importance de ces résidus dans la reconnaissance sélective du peptide avec les récepteurs PAC1 ou VPAC. L'extrémité N-terminale du peptide semble également être importante pour l'interaction du peptide avec le récepteur VPAC1. Notamment, la délétion des résidus His^1 et Ser^2 du PACAP27 et du PACAP38 provoque une perte d'affinité dix fois plus élevée envers VPAC1 comparativement à VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1995). De même, les dérivés tronqués du côté C-terminal du PACAP possèdent une préférence envers le récepteur VPAC1 par opposition au récepteur VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1998; Gourlet *et al.*, 1996b). Le PACAP(1-25) montre une spécificité 66 fois plus élevée pour le

récepteur VPAC1 que pour le récepteur VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1998). Plus particulièrement, le [Arg^{16}]PACAP23 a été considéré comme un analogue sélectif du récepteur VPAC1 (Van Rampelbergh *et al.*, 2000). Cependant, cet analogue a été seulement caractérisé sur les récepteurs VPAC1 et VPAC2. Ce résultat suggère que la structure hélicoïdale retrouvée au niveau des résidus 23 à 27 est nécessaire pour permettre une interaction et une activation efficace avec le récepteur VPAC2. L'ajout de la séquence Lys^{29}-Arg^{30}-Tyr^{31} du PACAP38, un peptide sans sélectivité envers le récepteur VPAC2, à l'extrémité C-terminale du VIP, améliore grandement la sélectivité du peptide sur le récepteur VPAC2 (Yung *et al.*, 2003). De plus, il semble que l'incorporation de résidus chargés positivement à l'extrémité C-terminale pourrait également diminuer l'affinité du VIP et du PACAP envers le récepteur VPAC1 sans affecter leur interaction avec le récepteur VPAC2. À ce titre, les analogues [Lys^{18}]PACAP27 et [Lys^{22}]PACAP27 présentent une haute sélectivité envers le récepteur VPAC2. En outre, le remplacement simultané des résidus Val^{19}, Leu^{27} et Asn^{28} par respectivement Ala, Lys et Lys, conduit à un analogue du VIP présentant une sélectivité élevée envers le récepteur VPAC2 (Yung *et al.*, 2003). En outre, l'agoniste spécifique du récepteur VPAC2, le Ro 25-1553, est lui aussi caractérisé par une extrémité C-terminale allongée et un pont lactame entre les chaînes latérales des résidus Lys^{21} et Asp^{25}. En résumé, le récepteur VPAC1 semble tolérant à la déstabilisation et à la contraction du domaine hélicoïdal C-terminal. Au contraire, ce domaine semble important pour maintenir une interaction spécifique et efficace avec le récepteur VPAC2.

1.4.3. Interactions des ligands peptidiques avec les membres de la classe B des RCPG

En tant que membres de la classe B des RCPG, les récepteurs PAC1/VPAC partagent plusieurs propriétés structurales et moléculaires communes avec les autres membres de cette famille (Laburthe *et al.*, 2002a). Ainsi, un modèle global de liaison des ligands peptidiques de cette famille à leurs récepteurs, connu sous le nom de modèle à deux domaines, fut ainsi proposé. Dans ce modèle, les segments central et C-terminal du ligand se lient au domaine extracellulaire N-terminal du récepteur provoquant ainsi un changement de conformation du récepteur. Ce changement provoque le rapprochement et l'interaction du segment N-terminal du ligand avec le domaine juxtamembranaire du récepteur, induisant ainsi l'activation du récepteur (Bourgault *et al.*, 2011; Dickson *et al.*, 2009; Grace *et al.*, 2004; Grace *et al.*, 2010; Hoare, 2005). Le domaine extracellulaire N-terminal du récepteur est donc le domaine principal pour la liaison avec le

peptide, et à l'inverse, le segment C-terminal du ligand est important pour l'affinité et la sélectivité du peptide vis-à-vis ses récepteurs (Grace *et al.*, 2010).

Ce modèle commun d'interaction ligand-récepteur de la classe B des RCPG a été initialement proposé à la suite d'une étude portant sur des chimères parathormone (PTH)/calcitonine et leurs récepteurs (Bergwitz *et al.*, 1996). Il a été démontré qu'un peptide contenant le domaine C-terminal du PTH et le domaine N-terminal de la calcitonine peut se lier avec une haute affinité à un récepteur chimérique obtenu par l'addition du domaine N-terminal du récepteur PTH1 au domaine juxtamembranaire du récepteur de la calcitonine (Bergwitz *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré que les fragments N-terminaux de la PTH se lient avec une bonne affinité au domaine juxtamembranaire isolé du récepteur PTH1. Ce type d'observation fut ensuite étendu au récepteur du GLP-1 et de la corticolibérine (CRF) (Hoare, 2005). Enfin, des études de photomarquage ont clairement montré l'existence d'une interaction entre les chaînes latérales du segment C-terminal des peptides et l'extrémité N-terminale du récepteur (Dong *et al.*, 2004). De même, des chaînes latérales du segment N-terminal du peptide s'associent de façon étroite à des résidus du domaine juxtamembranaire du récepteur (Assil-Kishawi *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2004; Gensure *et al.*, 2003).

Dans le cas des récepteurs PAC1/VPAC, la liaison du neuropeptide VIP avec VPAC1 a été étudiée par photomarquage, ainsi que par RMN et modélisation moléculaire sous contraintes (Ceraudo *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2006). Il fut ainsi démontré que les résidus Phe^{6}, Tyr^{22} et Asn^{24} du VIP sont respectivement en contact avec les résidus Asp^{107}, Gly^{116} et Cys^{122} de l'extrémité extracellulaire N-terminale du récepteur. De même, le résidu C-terminal Asn^{28} du VIP est en contact avec la Lys^{127} de cette même extrémité du récepteur (Ceraudo *et al.*, 2008). Des expériences de photomarquage au moyen du dérivé photoréactif [Bpa^{0}]VIP, ont récemment révélé que l'extrémité N-terminale du VIP interagit avec l'ectodomaine N-terminal et la première hélice transmembranaire du récepteur (Couvineau *et al.*, 2011). Ces données suggèrent une hétérogénéité de mécanismes d'interaction peptide-récepteur pour le VIP et les autres membres de la classe B des RCPG. Récemment, notre groupe a montré que le domaine extracellulaire N-terminal du PAC1 est également le site principal de liaison du PACAP. En particulier, nous avons observé que les dérivés [Bpa^{0}, Nle^{17}]PACAP27, [Bpa^{6}, Nle^{17}]PACAP27 et [Nle^{17}, Bpa^{22}]PACAP27 se lient respectivement aux segments Ser^{98}-Met^{111}, Ser^{124}-Glu^{125} et Ser^{141}-

Met[172] du récepteur PAC1 (Dejda *et al.*, 2011a) (**Figure 12**). Selon la topologie proposée du récepteur PAC1, il semble que ces segments soient principalement situés dans le domaine extracellulaire N-terminal. Ces résultats suggèrent que les domaines de liaison du PACAP s'écartent légèrement par rapport aux autres RCPG de la classe B (Bourgault *et al.*, 2011).

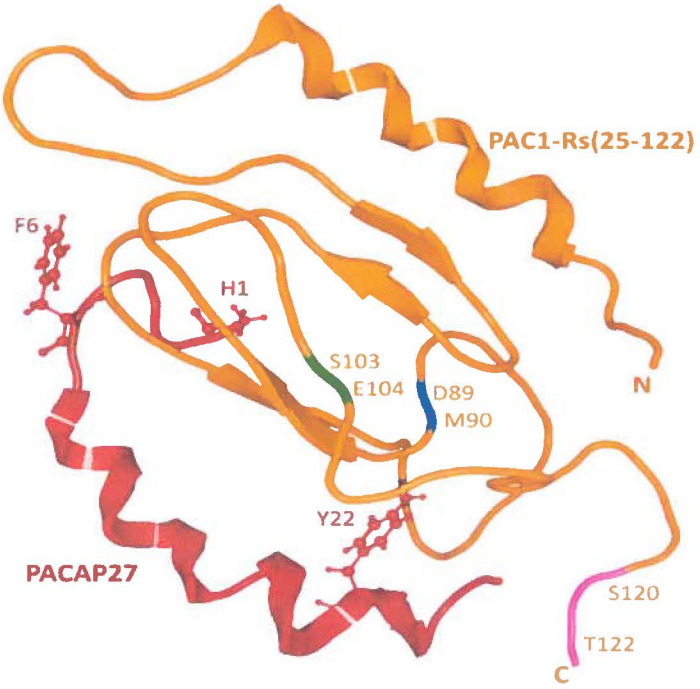


Figure 12: Représentation schématique du PACAP27 lié au domaine N-terminal du récepteur PAC1. Le PACAP27 est représenté en rouge-violet et la chaîne latérale des résidus Phe[6] et Tyr[22] ainsi que la fonction amine N-terminale du résidu His[1] sont affichés. Le domaine N-terminal du récepteur PAC1 est coloré en or et les fragments du récepteur interagissant avec les sondes [Bpa[0], Nle[17]]PACAP27, [Bpa[6], Nle[17]]PACAP27 et [Nle[17], Bpa[22]]PACAP27 apparaissent respectivement en bleu, vert et magenta. Cette figure a été tirée de Dejda et al., 2011.

Le modèle de liaison à deux domaines a également été confirmé par des études structurales à l'aide de la RMN, des complexes formés par la liaison des ligands peptidiques au domaine N-terminal extracellulaire de leurs récepteurs. Par exemple, l'interaction entre le CRF et le domaine N-terminal de son récepteur démontre que la région C-terminale du peptide se lie, *via* une hélice α, à la surface du domaine N-terminal du récepteur par des interactions spécifiques, *i.e.* interactions électrostatiques et/ou hydrophobes entre les chaînes latérales du ligand et du

récepteur (Grace *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2006). D'ailleurs, des études de RMN du complexe formé par le domaine N-terminal du récepteur CRF-R1 et son agoniste peptidique montrent que l'interaction initiale ligand-récepteur induit la formation de l'hélice vers l'extrémité N-terminale du ligand, positionnant par le fait même les résidus N-terminaux du peptide pour l'activation du récepteur (Grace *et al.*, 2010).

Comme décrit auparavant, les premiers résidus de l'extrémité N-terminale du peptide sont importants pour l'activité biologique tandis que les résidus du domaine C-terminal sont essentiels pour la liaison spécifique (Bourgault *et al.*, 2009a). Ainsi, le PACAP(6-38) est un antagoniste du récepteur PAC1. Cette observation peut être facilement comprise à l'aide du modèle à deux étapes mettant en jeu la liaison du ligand et l'activation subséquente des RCPG de type B1. Si le segment N-terminal du ligand est supprimé, le fragment C-terminal se lie au récepteur mais est incapable de produire l'activation. Notamment, la délétion des cinq premiers résidus du PACAP38 n'a aucun impact sur l'affinité de ce dérivé envers le domaine N-terminal du récepteur PAC1 (Sun *et al.*, 2007). En revanche, ce même composé présente une affinité plus faible par rapport au PACAP38 pour le récepteur PAC1 natif (Robberecht *et al.*, 1992b). De plus, alors que le segment Phe^{6}-Ser^{9} présente une conformation hélicoïdale lorsque le peptide est lié au domaine extracellulaire N-terminal du récepteur, aucun signal de type effet nucléaire Overhauser (NOE) n'a pu être identifié en RMN, suggérant l'absence d'interactions entre les résidus du segment 6 à 9 et ce domaine du récepteur (Sun *et al.*, 2007). Ces résultats amènent à la conclusion que le domaine N-terminal du PACAP interagit plutôt avec d'autres parties du récepteur comme les boucles extracellulaires ou les domaines transmembranaires de PAC1. Cependant, jusqu'à maintenant, aucun contact n'a pu être démontré entre l'extrémité N-terminale du peptide et d'autres segments du récepteur. Néanmoins, le modèle à deux domaines est toujours approprié pour illustrer les mécanismes moléculaires de la liaison du PACAP à son récepteur spécifique car on peut soupçonner que le changement structural du peptide induit par son interaction initiale avec le segment N-terminal du récepteur aligne favorablement les pharmacophores de liaison. De plus, la pertinence de ce modèle à deux domaines est soutenue par la similarité de séquence et de structure des récepteurs VPAC/PAC1 avec les autres RCPG de la classe B.

L'utilisation de méthode classique de RMN, i.e. ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, TOCSY et NOESY, permettant de déterminer la conformation du PACAP lorsque celui-ci est lié à son récepteur spécifique (PAC1),

a permis de démontrer l'existence d'une structure apériodique en coude, stable, au niveau de l'extrémité N-terminale (résidus 3 à 7) lorsque le neuropeptide est lié à son récepteur (Inooka *et al.*, 2001). Plus précisément, les auteurs ont proposé que l'extrémité N-terminale du PACAP était constituée de deux coudes β successifs; un de type II' regroupant les résidus Asp^3, Gly^4, Ile^5 et Phe^6 et l'autre de type I qui s'étend de Gly^4 à Thr^7. Toutefois, en tenant compte des études de type structure-activité, Bourgault et ses collègues ont suggéré que cette structure unique pouvait être le résultat d'un changement de conformation se produisant à l'étape de liaison et qui est étroitement liée à l'intégrité de l'hélice α, une structure cruciale pour l'association initiale du PACAP au récepteur PAC1.

Les analyses structurales du complexe formé par le PACAP(6-38) et le domaine extracellulaire N-terminal du récepteur PAC1, montrent que les résidus Lys^{29} à Lys^{34} du peptide sont en contact avec les résidus Glu^{117}, Tyr^{118}, et Glu^{119} du domaine extracellulaire N-terminal, définissant ainsi l'orientation de son extrémité C-terminale. Ainsi, l'extrémité N-terminale du PACAP(6-38) traverse le feuillet β3 du PAC1 et interagit avec le résidu Lys^{74} du récepteur. Pour établir cette interaction, la structure hélicoïdale du PACAP est interrompue à la position Ala^{18}. Cette courbure structurale permet ainsi à l'extrémité N-terminale du PACAP(6-38) (résidus Tyr^{10}-Met^{17}) d'interagir avec les feuillets β3-β4 de la protéine. L'extrémité C-terminale du peptide (résidus 26-34) se positionne au-dessus du pont disulfure (Cys^{77}-Cys^{113}) et se termine près du segment C-terminal du domaine extracellulaire N-terminal de la protéine. Ce mode de liaison place ainsi le PACAP sur les côtés opposés du feuillet β central du récepteur (**Figure 13**) (Sun *et al.*, 2007). Des modifications ponctuelles d'acides aminés ont également révélé que les résidus hydrophobes Val^{19}, Tyr^{22}, Val^{26} et Leu^{27} jouent un rôle important dans l'interaction entre le fragment Ala^{18}-Leu^{27} du peptide et le domaine extracellulaire N-terminal du récepteur PAC1. L'ensemble de ces données structurales et de mutagenèses dirigées ont permis de conclure que les portions N-terminale et centrale du PACAP forment un complexe avec le domaine N-terminal extracellulaire du récepteur et que le domaine C-terminal du peptide est alors en contact avec la région extracellulaire du domaine transmembranaire (Sun *et al.*, 2007). Cette orientation permet aux acides aminés Tyr^{10}, Arg^{14} et Lys^{21} du PACAP, des résidus clés pour la liaison au récepteur PAC1, d'entrer en contact avec les parties du récepteur à l'extérieur du domaine extracellulaire N-terminal, telles que la première boucle extracellulaire (Sun *et al.*, 2007). La

superposition de la structure de PACAP liée au récepteur est en accord avec le rôle de ces résidus dans l'activation du récepteur et supporte également le modèle à deux domaines pour l'activation (Bourgault *et al.*, 2009a; Inooka *et al.*, 2001).

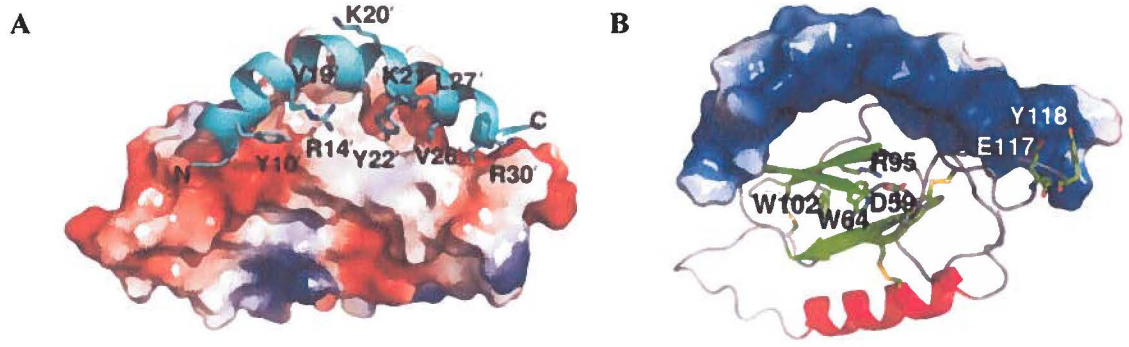


Figure 13: Disposition du PACAP(6-38) lorsque lié au domaine N-terminal du récepteur PAC1. La densité de charge de surface pour PAC1 (A) et PACAP (B) est présentée. PACAP(6-38) est représenté en bleu-gris (A) et les chaînes latérales de Tyr^{10}, Arg^{14}, Val^{19}, Lys^{20}, Lys^{21} Tyr^{22}, Val^{26}, Leu^{27} et Arg^{30} sont affichées. Les résidus Lys^{29} à Lys^{34} du PACAP(6-38) sont en contact avec les résidus Glu^{117}, Tyr^{118} et Glu^{119} du domaine extracellulaire N-terminal du PAC1 (B). Tiré de Sun *et al.*, 2007.

À cause de son caractère basique élevé, une interaction non spécifique, *via* des liaisons électrostatiques, a été proposée pour le PACAP lorsqu'il est à proximité de la membrane plasmique (Bourgault *et al.*, 2009a; Inooka *et al.*, 2001; Umetsu *et al.*, 2011). Ensuite, l'environnement hydrophobe de la surface de la cellule provoque probablement un changement conformationnel du peptide, jusque-là dans un arrangement moléculaire désordonné, vers une structure hélicoïdale, ce qui est un prérequis pour assurer la reconnaissance du PACAP par ses récepteurs membranaires, après diffusion sur la surface de la membrane cellulaire (**Figure 14**). Au contact du domaine N-terminal du récepteur, des interactions hydrophobes entre l'extrémité C-terminale du PACAP et ce domaine du récepteur induisent des changements structuraux au niveau du segment N-terminal (His^1-Thr^7) du peptide, vraisemblablement via la stabilisation d'une structure repliée, comprenant deux coudes β consécutifs, soit un premier de type 1l' (Asp^3 à Phe^6) et un second de type I (Gly^4 à Thr^7) (Inooka *et al.*, 2001). La région hydrophobe comprenant les chaînes latérales de Phe^6 et Tyr^{10} adopte ensuite une conformation étroitement

liée au motif « hélice N-*capping* » afin probablement de stabiliser la structure bioactive du peptide dans sa portion N-terminale (Neumann *et al.*, 2008). Enfin, le segment N-terminal du PACAP (His^1-Gly^4) interagit avec des boucles extracellulaires du récepteur PAC1, et possiblement des domaines transmembranaires, pour ultimement adopter la conformation conduisant à l'activation du récepteur (Bourgault *et al.*, 2011) (**Figure 14**).

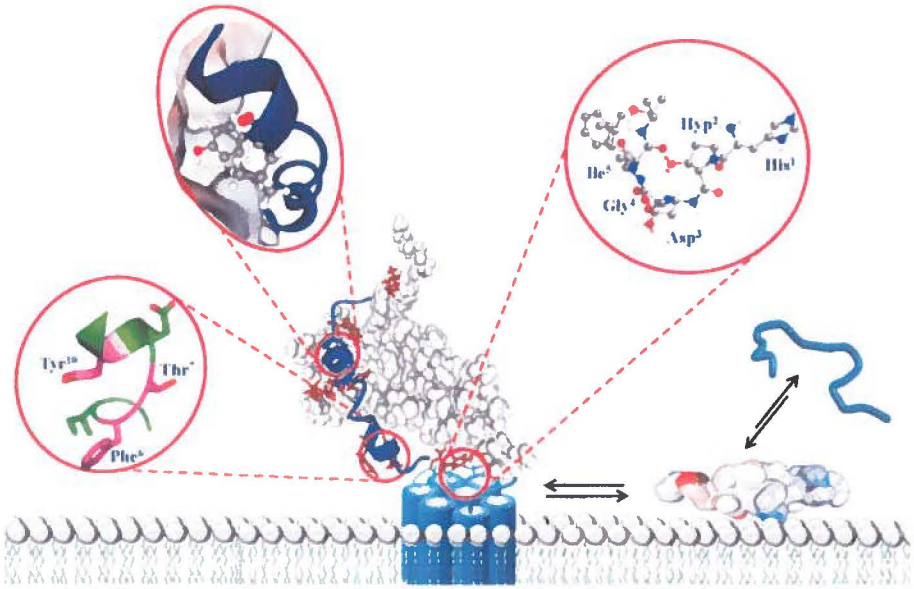


Figure 14: Modèle d'activation proposé pour les récepteurs du PACAP. En entrant en contact avec la membrane plasmique, via des interactions électrostatiques, le PACAP, alors dans une conformation désordonnée, change en une conformation hélicoïdale, laquelle joue un rôle essentiel pour la liaison aux récepteurs. Le PACAP diffuse ensuite sur la surface de la cellule et le segment en hélice se lie au domaine extracellulaire N-terminal du récepteur. La région Phe^6-Tyr^{10} forme ensuite un motif d'hélice N-*capping* afin probablement de stabiliser la structure bioactive du peptide au niveau N-terminal pour qu'il interagisse avec le domaine juxtamembranaire du récepteur et induise un changement de sa conformation globale.

1.5. Cell-penetrating peptides (CPPs)

En raison de leur faible propension à traverser la membrane des cellules eucaryotes et de leur dégradation relativement rapide, certains polypeptides et oligonucléotides n'ont pu devenir des candidats prometteurs pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Par

exemple, l'efficacité du méthotrexate, un agent antinéoplasique ayant une cible intracellulaire, est limitée car ce composé pénètre difficilement dans les cellules tumorales (Bertino *et al.*, 1996). Ce problème représente un obstacle important à surmonter en recherche biomédicale. Jusqu'à récemment, le transport de macromolécules hydrophiles vers les compartiments cytoplasmiques et nucléaires des cellules vivantes, sans perturber la membrane plasmique, semblait un objectif très difficile à atteindre. Par conséquent, la découverte du premier CPP, la pénétratine, provenant de l'homéodomaine d'un facteur de transcription codé par le gène *Antennapedia* chez la drosophile, a annoncé des possibilités enthousiasmantes (Joliot et al., 1991). Ce peptide peut en effet se déplacer à travers la membrane plasmique des cellules vivantes, probablement sans l'aide de protéines membranaires ou de récepteurs spécifiques, et permettre ainsi le transport intracellulaire d'oligopeptides ou d'oligonucléotides qui lui sont conjugués. Actuellement, plusieurs CPPs, naturels ou synthétiques, ont été utilisés comme vecteurs pour le transport de médicaments à l'intérieur de cellules.

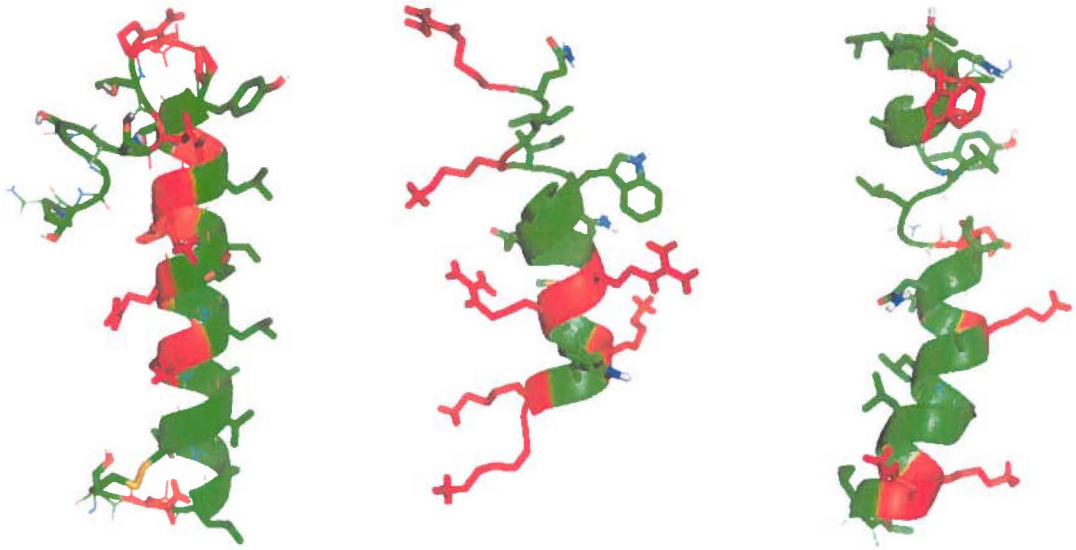
La plupart des CPPs, généralement oligo- ou polycationiques, sont dérivés d'enveloppe virale ou de protéines d'insectes ou de mammifères. Leurs découvertes sont généralement le résultat de l'observation que certains facteurs de transcription peuvent passer d'une cellule à l'autre, et donc être internalisés et excrétés par les cellules vivantes. Afin de mieux comprendre ce mécanisme d'internalisation, l'homéodomaine codé par le gène *Antennapedia* fut modifié par mutagenèse dirigée permettant ainsi de mettre en évidence le rôle clé joué par la troisième hélice (acides aminés 43-58) dans la translocation de cette protéine à travers la membrane plasmique (Christiaens *et al.*, 2004; Derossi *et al.*, 1994). Cette découverte a ainsi conduit au développement de la pénétratine, un peptide de 16 acides aminés capable de traverser la membrane cellulaire par un mécanisme récepteur-indépendant (Wagstaff *et al.*, 2006). En 1997, un approche semblable fut utilisée pour identifier la séquence minimale de la protéine *trans-activator of transcription* (TAT) responsable de son internalisation dans la cellule (Vives *et al.*, 1997). À l'heure actuelle, la pénétratine ainsi que les oligopeptides dérivés du TAT, constituent les CPPs les plus étudiés. D'autres CPPs oligocationiques ont aussi été décrits dans la littérature, comme par exemple les peptides de la famille du MPG (qui contient un domaine hydrophobe dérivé de la séquence du gp41 du VIH et un domaine hydrophile dérivé de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T de SV40), pVEC (dérivé de VE-cadhérine) et VP22 (dérivé

de la protéine virale HSV-1) (Lindgren *et al.*, 2000). Cependant, des peptides faiblement cationiques, tels ceux issus du domaine C-terminal de la calcitonine humaine (hCT) ou les peptides sHGP (dérivés de la protéine gp41 du VIH) se sont avérés également capables de traverser la membrane cellulaire, sans l'aide de récepteurs spécifiques (Kwon *et al.*, 2010; Machova *et al.*, 2002). Plus récemment, le *sweet arrow peptide* (SAP), un trimère linéaire répétitif de la séquence synthétique VRLPPP, a aussi été identifié comme un CPP (Fernandez-Carneado *et al.*, 2004). Enfin, plusieurs autres CPPs synthétiques ont été conçus dont le transportan (Pooga *et al.*, 1998), le MAP (*model amphipathic peptide*) (Oehlke *et al.*, 1998) et les oligoarginines (Mitchell *et al.*, 2000b). Le **tableau 7** présente les CPPs les plus couramment utilisés et leur séquence.

Tableau 7: Principaux peptides capables de traverser la membrane cellulaire.

CPP	**Séquence**	**Origine**
Tat(48–60)	GRKKRRQRRRPPQ	Protéine *trans-activator of transcription* du VIH (VIH-TAT)
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	Homéodomaine *Antennapedia*
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	Protégrine-I (leucocytes de porc)
SynB3	RRLSYSRRRF	Protégrine-I (leucocytes de porc)
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Galanine et mastoparan
Signal sequence-based peptide	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Protéine de fusion gp41 (à partir d'antigène SV40 T)
Peptides MPG		
Pβ	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	gp41-SV40
Pα	GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV	gp41-SV40
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAHSK	VE-Cathérine de souris
VP22	DAATATRGRSAASRPTE	Protéine virale (HSV-1)
CADY	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA	Dérivé de PPTG11, variante de la protéine de fusion JTS1
R9	RRRRRRRRR	Synthétique
MAP	KLALKLALKALKAALKLA	Synthétique
Dérivés de hCT		
hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	Calcitonine humaine
hCT(9-32)-br	LGTYTQDFNK(**X**)FHTFPQTAIGVGAP **X** = AFGVGPDEVKRKKKP	Calcitonine humaine SV40
SAP	VRLPPP-VRLPPP-VRLPPP	Maize modifié

Ces CPPs ne partagent généralement pas de séquences communes mais plutôt des propriétés physicochimiques telles que la présence de charges positives et une structure hélicoïdale amphipathique. Ainsi, certains CPPs adoptent un caractère amphiphile au sein d'une structure en hélice α, comme par exemple le peptide MAP ou la calcitonine, tandis que d'autres, tel le transportan, ont des caractéristiques structurales spécifiques qui définissent des régions hydrophobes et hydrophiles au sein d'une hélice (**Figure 15**) (Dennison *et al.*, 2005; Deshayes *et al.*, 2005; Heitz *et a*l., 2009). Généralement, les CPPs sont chargés positivement à pH physiologique (Zorko *et al.*, 2005), à l'exception du pHLIP (*pH Low Insertion Peptide*) (Reshetnyak *et al.*, 2006) et quelques rares CPPs anioniques comme le SAP(E) (Martin *et al.*, 2011). Les arginines participent plus efficacement à l'internalisation des CPPs que les lysines, bien que ces deux résidus contribuent également à la charge nette du peptide (Mitchell *et al.*, 2000a; Rothbard *et al.*, 2004). Cette différence peut être expliquée par la capacité du groupement guanidinium de Arg à donner deux liaisons hydrogènes alors qu'une seule est possible avec Lys. Le caractère hydrophobe peut également jouer un rôle clé dans la pénétration de peptides cationiques courts (Carrigan *et al.*, 2005). Par exemple, la myristoylation des résidus tyrosine et sérine augmente fortement la pénétration intracellulaire par rapport à la séquence non modifiée (Carrigan *et al.*, 2005). De même, la suppression de trois résidus hydrophobes à l'extrémité N-terminale du pVEC abolit son absorption cellulaire (Elmquist *et al.*, 2006).



Calcitonine humaine Pénétratine Transportan

Figure 15: Structure de la calcitonine humaine, de la pénétratine et du transportan. Visualisation effectuée avec l'aide du logiciel PyMOL 1.3r1. en utilisant les coordonnées pdb 2JXZ, 1OMQ et 2SMZ du Protein Data Bank. Les résidus basiques sont marqués en rouge et les résidus neutres ou hydrophobes sont marqués en vert.

À l'heure actuelle, les CPPs offrent une perspective de livraison non invasive des médicaments à l'intérieur de la cellule, du SNC, ou des tumeurs (Johnson *et al.*, 2011). Avec un grand nombre d'études visant à développer des composés ayant une cible intracellulaire (Dietz *et al.*, 2004), l'utilisation des CPPs comme vecteur thérapeutique devient de plus en plus importante. Par conséquent, certains CPPs ont été évalués cliniquement (Johnson *et al.*, 2011) (**Tableau 8**).

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent une des pathologies pour lesquelles des CPPs ont été utilisés afin de faciliter le relargage d'agents thérapeutiques. Par exemple, l'injection intraartérielle, intrapéritonéale ou intraveineuse d'un inhibiteur sélectif de la protéine kinase Cδ (PKCδ), soit le KAI-9803, diminue significativement la taille de l'infarctus après une lésion ischémique cérébrale (Asoh *et al.*, 2002). KAI-9803 est formé d'un fragment du domaine C2 de la protéine kinase Cδ conjugué au TAT par un pont disulfure. Ce composé a également été testé dans divers modèles de pathologies cardiaques pour lesquelles la PKCδ intracellulaire est également activée (Inagaki *et al.*, 2003a; Inagaki *et al.*, 2003b). Les résultats des essais cliniques de phase 2 ont ainsi confirmé les effets observés dans les modèles animaux (Bates *et al.*, 2008;

Johnson *et al.*, 2011). D'autres composés, utilisant le TAT ou divers CPPs, sont à l'heure actuelle en cours d'évaluation clinique dans des applications aussi diverses que les déficits auditifs, la douleur ou encore la cicatrisation (Johnson *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2009). Ces essais cliniques démontrent clairement le potentiel des CPPs comme véhicules d'agents thérapeutiques dans le traitement de diverses maladies humaines.

Tableau 8: État du développement clinique de composés conjugués à des CPPs. Adapté de (Johnson *et al.*, 2011)

Entreprise	Molécule	Site/Action	CPP	Indication	État
Capstone Therapeutics	AZX100	HSP20	PTD4	Chéloïdes des cicatrices	Phase 2
KAI Pharmaceuticals	KAI-8903	Inhibiteur de protéine kinase Cδ	TAT-PTD	Infarctus du myocarde	Phase 2b
	KAI-1678	Inhibiteur de protéine kinase Cε	TAT-PTD	Douleur	Phase 2a
	KAI-1455	Inhibiteur de protéine kinase Cε	TAT-PTD	Cytoprotection/ischémie	Phase 1
Xigen	XG-102	Kinases c-Jun N-terminales	TAT-PTD	Ischémie cérébrale Perte d'audition	Phase 1 Phase 2
Revace Therapeutics	RT001	Administration transdermique de la toxine *Botulinum* de type A	TAT-PTD	Rides Transpiration excessive	Phase 2b Phase 1
CellGate	PsorBan	Administration transdermique de cyclosporine A	R8	Psoriasis	Phase 2 (études abandonnées)

1.5.1. Mécanismes d'internalisation

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études se sont concentrées sur la compréhension des interactions nécessaires à l'internalisation des CPPs et sur la recherche de modifications visant à augmenter leur absorption. Malheureusement, les mécanismes précis d'internalisation des CPPs à travers la membrane cellulaire ne sont toujours pas complètement élucidés. À l'heure actuelle, deux types d'internalisation cellulaire, la translocation directe et l'endocytose, ont été décrits (**Figure 16**) (Heitz *et al.*, 2009; Jarver *et al.*, 2010; Madani *et al.*, 2011; Zorko *et al.*, 2005). La translocation directe est un processus ne requérant pas d'énergie et qui présente l'avantage d'un accès direct et rapide des CPPs au cytoplasme des cellules. En revanche, l'endocytose est

dépendante de l'énergie et présente l'inconvénient d'une accumulation cytoplasmique lente et limitée des CPPs. De manière générale, l'endocytose regroupe la phagocytose (pour les grosses particules) et la pinocytose (pour les solutés) qui est constituée de quatre types: la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la cavéoline, l'endocytose dépendante de la clathrine et l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline. La contribution de chaque mécanisme à l'internalisation des CPPs, soit translocation directe *versus* endocytose, est dépendante de la nature du CPP utilisé, du type cellulaire et de la composition de la membrane, de la concentration du CPP ainsi que du cargo transporté.

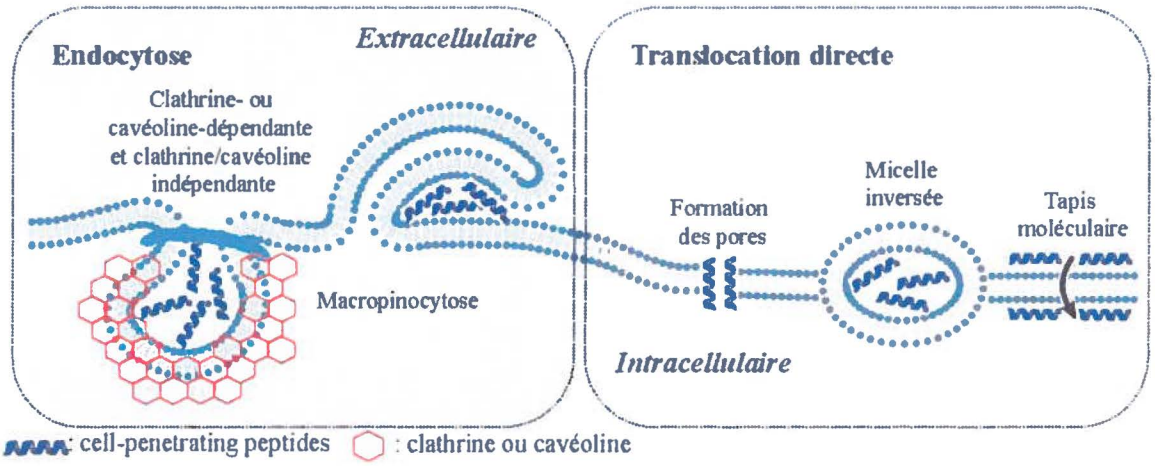


Figure 16: Mécanismes d'entrée des CPPs dans la cellule. Deux modes d'internalisation des CPPs dans la cellule existent : l'endocytose et la translocation directe. L'endocytose regroupe la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose dépendante de la cavéoline, l'endocytose indépendante de la clathrine ou de la cavéoline ; tandis que la translocation directe comporte trois modèles : la formation de pores dans la membrane cellulaire, les micelles inversées et le tapis moléculaire (Koren *et al.*, 2012; Trabulo *et al.*, 2010).

1.5.1.1. Influence du CPP

Pour les peptides contenant plusieurs arginines, l'internalisation semble être dépendante des interactions électrostatiques avec la membrane plasmique et vraisemblablement des liaisons hydrogènes avec le groupement guanidinium de l'arginine (Futaki, 2005). En effet, le remplacement de ces résidus par d'autres acides aminés chargés ou l'éloignement du groupement

guanidinium du squelette de la chaîne peptidique change significativement la cinétique et le mode d'absorption du peptide. Ces changements modifient probablement les interactions entre les CPPs et les charges négatives portées par les glycosaminoglycanes (GAG) à la surface des cellules, une interaction considérée comme essentielle pour le transfert de peptides riches en résidus arginine (Suzuki *et al.*, 2002; Tyagi *et al.*, 2001). La première interaction avec les GAGs semble déclencher une série d'événements conduisant à l'internalisation des peptides par macropinocytose, voie principale d'endocytose des CPPs cationiques. Par ailleurs, d'autres voies d'endocytose comme l'endocytose dépendante de la clathrine et celle dépendante de la cavéoline ont été également décrites pour les CPPs cationiques (Heitz *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2005). Pour les peptides qui ne sont pas riches en arginine, tels le transportan et le MPG, peu d'études ont été effectuées sur leurs mécanismes d'internalisation. Il semble toutefois que le transfert de ce type de CPP à travers la membrane cellulaire soit également effectué par le biais de l'endocytose (Kang *et al.*, 1998). En particulier, dans le cas de la pénétratine et du transportan, il a été suggéré que la translocation et l'endocytose intervenaient simultanément dans leur mécanisme d'internalisation (Heitz *et al.*, 2009; Letoha *et al.*, 2003).

1.5.1.2. Influence de la concentration

Le mécanisme d'internalisation des CPPs est dépendant de la concentration du peptide. En effet, Jiao et ses collègues ont démontré qu'à faibles concentrations, le peptide Antp entre dans la cellule principalement par translocation directe. Cette translocation est accomplie par un mécanisme impliquant des cotransporteurs et est susceptible d'impliquer la membrane lipidique chargée négativement. À des concentrations plus élevées, en plus de la translocation, le peptide va s'accumuler à la surface de la cellule, conduisant à l'agglomération des GAGs provoquant ainsi l'endocytose (Jiao *et al.*, 2009). Par exemple, pour des concentrations supérieures à 40 µM, la pénétratine entre dans les cellules par au moins trois mécanismes différents: la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine et l'endocytose dépendante de la cavéoline (Duchardt *et al.*, 2007). En conclusion, la contribution de chaque voie d'internalisation dans le mécanisme général de pénétration d'un CPP est dépendante de sa concentration et de la nature du CPP.

1.5.1.3. Influence du cargo

L'endocytose comme mécanisme d'internalisation des CPPs est plus ou moins acceptée du fait des variations en fonction de la taille de la « cargaison ». En fait, l'internalisation d'une cargaison peptidique de moins de 50 acides aminés serait modulée par le potentiel membranaire, alors que l'entrée de protéines passerait par les vésicules cytoplasmiques (Tunnemann *et al.*, 2006). Par exemple, la colocalisation du Tat conjugué à la fluorescéine ou à l'Alexa 488, avec la transferrine (Tf), un marqueur classique de l'endocytose, suggère une internalisation par endocytose médiée par les clathrines (Richard et al., 2003). Cependant, aucune colocalisation entre le Tat conjugué à la protéine fluorescente EGFP et la Tf n'a été observée, indiquant que l'internalisation du complexe Tat-EGFP est clathrine-indépendante (Fittipaldi et al., 2003). Récemment, il fut proposé que l'absorption d'une protéine conjuguée avec le TAT ou l'octaarginine serait regulée par la macropinocytose (Moulton *et al.*, 2004; Nakase *et al.*, 2004; Wadia *et al.*, 2004). Le transportan conjugué à diverses protéines semble être internalisé par l'intermédiaire de la voie endocytique dépendante des radeaux lipidiques (*lipid rafts*); ce mécanisme pouvant être qualifié de macropinocytose (Padari *et al.*, 2005; Saalik *et al.*, 2004; Simeoni F., 2003). Pour la translocation d'acides nucléiques, il semble également que le mécanisme d'entrée du complexe CPP-acide nucléique soit dépendant de la nature du CPP. En effet, la colocalisation du complexe transportan-PNA (*peptide nucleic acid*) avec le dextran fluorescent, un marqueur classique de macropinocytose, est plus importante que celle observée avec la pénétratine ou le TAT.

En résumé, en fonction de la nature du CPP et de sa cargaison, différents mécanismes d'endocytose ou de translocation directe sont impliqués dans l'internalisation de ces complexes. La contribution respective des mécanismes de pénétration des CPPs (endocytose *versus* translocation directe) varie donc selon la nature de la cargaison, du CPP utilisé et de la concentration du complexe CPP-cargaison.

1.5.2. Applications à visée thérapeutique

Les progrès de la génomique et de la protéomique ont abouti à l'identification de cibles moléculaires pour le traitement de différentes pathologies. Le développement de médicaments efficaces exige l'accès facile à leur cible, notamment intracellulaires, justifiant ainsi le besoin de développer des molécules à visée thérapeutique pénétrant à l'intérieur de la cellule. De même, la

barrière hémato-encéphalique se compose d'une monocouche de cellules endothéliales polarisées, connectées par des jonctions serrées, qui sépare le compartiment sanguin du compartiment liquide extracellulaire du parenchyme du cerveau. Cette barrière représente un obstacle majeur pour les médicaments agissant au niveau du système nerveux central (SNC). Les principaux critères permettant d'évaluer le transport d'une molécule organique du sang vers le SNC sont sa lipophilicité, sa masse moléculaire et sa charge nette. Par conséquent, en se basant simplement sur leur lipophilicité et leur masse moléculaire, environ 95% des médicaments sont retenus par la barrière hémato-encéphalique (Pardridge, 2002). Ces restrictions ont limité l'usage de certains composés et l'optimisation du transfert de molécules à l'intérieur de la cellule et/ou du SNC apparaît donc comme une priorité.

Le développement de systèmes conjugués peptide-cargaison (**Figure 17**) est basé sur l'hypothèse qu'une amélioration de l'absorption d'un médicament par les cellules cibles ou le cerveau se traduira par un bénéfice thérapeutique. La conjugaison d'un médicament avec un vecteur de transport conduisant à une perte d'activité biologique de la molécule constitue la situation idéale. En fait, le développement de complexes liés par une liaison pouvant être clivée une fois le médicament rendu à son site d'action afin de restaurer l'effet biologique est donc très attrayant.

La plupart des cargaisons sont couplées au vecteur peptidique par l'intermédiaire d'un lien covalent tel un pont du disulfure. Ce type de lien, qui est facile à former, permet la libération de la cargaison par réduction de la liaison disulfure à l'intérieur de la cellule, grâce à la présence d'enzymes dans les lysosomes telles que la *gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase* (GILT) (Arunachalam *et al.*, 2000). Ce type de lien peut également être coupé par les thiorédoxines présentes en abondance dans les zones blessées (Abdiu *et al.*, 2000). Cette coupure libère ainsi la cargaison dans la matrice extracellulaire avant même que le vecteur peptidique n'ait pu atteindre le cytoplasme. Des liaisons de type *N*-hydroxysuccinimidyle ont également été utilisées pour la conjugaison du vecteur peptidique et de sa cargaison. Cette méthodologie est facile à effectuer, mais ne permet pas la libération de la cargaison. Par ailleurs, la conjugaison entre les CPPs et des cargaisons protéiques est fréquemment obtenue par fusion directe en ajoutant les CPPs aux extrémités N- ou C-terminales de la protéine (Stewart *et al.*, 2008). D'autre part, les polynucléotides sont souvent liés aux CPPs par des liaisons électrostatiques, formant ainsi des complexes polyéléctrolytiques retenus par les charges négatives du

polynucléotides et positives du CPP (Crombez *et al.*, 2007; Lundberg *et al.*, 2007; Simeoni F., 2003). Dans la majorité des cas, les CPPs ont prouvé leur capacité à transférer diverses molécules dans les cellules en culture, y compris des petites molécules, des oligonucléotides, des peptides, des protéines, ainsi que des nanoparticules et des points quantiques (*quantum dots*). Cependant, le développement de vecteurs dépend non seulement de son efficacité à traverser la membrane cellulaire, mais aussi de son profil de biodistribution et de sa pharmacocinétique. Idéalement, un vecteur peptidique efficace devrait pouvoir augmenter l'absorption et la biodisponibilité du médicament dans le plasma humain tout en étant facile et peu coûteux à synthétiser à grand échelle (Temsamani *et al.*, 2004).

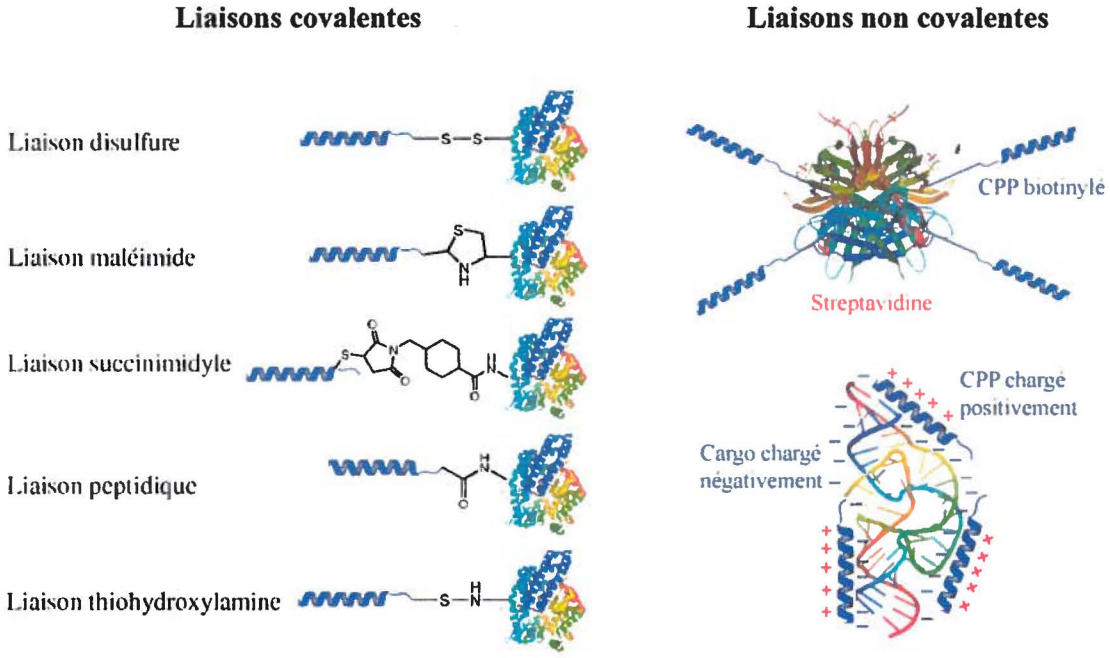


Figure 17: Illustration des différentes méthodes de conjugaison des cargaisons avec les CPPs

Transport de petites molécules: La membrane plasmique agit comme une barrière non seulement pour des substances hydrophiles, mais aussi pour des petites molécules hydrophobes. Par exemple, l'efficacité du méthotrexate est limitée parce que cette molécule antinéoplasique est incapable de rentrer dans le cytoplasme afin d'activer sa cible intracellulaire. En augmentant l'entrée de cet agent anticancéreux par une conjugaison à un CPP, la cytotoxicité de ce composé fut augmentée de cinq fois par rapport au méthotrexate seul (Lindgren *et al.*, 2006). De façon

similaire, le couplage de la doxorubicine à un CPP (TAT ou pénétratine) augmente la toxicité de la molécule dans les cellules CHO, HUVEC et MDA-MB 231 (Aroui *et al.*, 2010). La doxorubicine, conjuguée au vecteur SynB par l'intermédiaire d'une liaison succinate, voit son absorption dans le cerveau fortement améliorée (Rousselle *et al.*, 2000). Cette vectorisation de la doxorubicine a ainsi considérablement augmenté son absorption dans le cerveau, sans pour autant perturber la barrière hémato-encéphalique. Le vecteur SynB a également été utilisé avec un antibiotique, la benzyl-pénicilline (B-pc). La conjugaison par le biais d'un lien ester glycolamidique a amélioré significativement son absorption au cerveau et conséquemment, son efficacité dans le traitement des infections du SNC (Rousselle *et al.*, 2002).

Transport de peptides: Le peptide antimicrobien ayant la séquence peptidique $(KLAKLAK)_2$ a attiré l'attention en tant que candidat potentiel pour des applications thérapeutiques. En effet, bien qu'il ne perturbe pas la membrane plasmique, il perfore les mitochondries, induisant l'apoptose lorsqu'il pénètre dans les cellules (Javadpour *et al.*, 1997). Toutefois, le peptide seul ne possède qu'une faible activité cytotoxique envers les cellules cancéreuses, ce qui limite son usage pour le traitement du cancer. L'utilisation de CPPs, afin d'augmenter sa pénétration dans les cellules, a permis d'améliorer son efficacité (Ellerby *et al.*, 1999; Law *et al.*, 2006). La dalargine, un hexapeptide dérivé de la Leu-enképhaline, ne possède aucune activité analgésique suite à son administration systémique, à cause de sa faible capacité à passer la BHE (Rousselle *et al.*, 2003). La vectorisation de ce peptide avec SynB améliore nettement son absorption au cerveau et son activité analgésique (Rousselle *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2000). Des stratégies similaires ont également été exploitées pour l'inhibiteur peptidique sélectif de la kinase-1 de c-Jun (D-JNKI-1), ou pour le peptide NBD avec, dans les deux cas, une amélioration très nette dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'ischémie cérébrale ou de la maladie de Parkinson (Borsello *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2007; Hirt *et al.*, 2004).

Transport de protéines: Le transport de protéines à l'intérieur de la cellule est généralement entravé par leur taille. L'utilisation de techniques de recombinaison génétique, afin d'exprimer ces protéines directement dans la cellule, a son propre ensemble de limites dont l'efficacité de transfection variable et des effets cytotoxiques. À cet égard, l'utilisation des CPPs devient une bonne alternative. En effet, il fut démontré que les CPPs étaient capables de transférer efficacement à l'intérieur de la cellule des protéines ayant une taille variant entre 30 kDa et 150

kDa (Fonseca *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2008). Par exemple, l'administration chez la souris de la β-galactosidase (120 kDa) fusionnée au peptide TAT a donné une pénétration efficace de tous les tissus, même au niveau de la barrière hémato-encéphalique, tout en maintenant l'activité biologique de l'enzyme (Schwarze *et al.*, 1999).

Transport d'ADN plasmidique et d'oligonucléotides: Les procédures actuelles de transfert de gènes, incluant des stratégies virales et non-virales (lipoplexes, polyplexes) et des méthodes physiques comme la micro-injection ou l'électroporation, ont des limitations qui empêchent leur usage. D'une part, bien que l'électroporation *in vitro* et *in vivo* soit une technique reconnue pour introduire un gène dans l'environnement intracellulaire, cette méthode donne des résultats très variables et semble inefficace chez des cellules de nouveaux-nés (Matsuda *et al.*, 2008). De plus, le courant électrique élevé provoque de graves lésions cutanées, des brûlures et de la douleur. D'autre part, un inconvénient majeur de la méthode de micro-injection est évidemment la vitesse de manipulation puisque chaque cellule doit être traitée séparément. Cette technologie est laborieuse et ne convient donc pas pour la recherche *in vivo* ou pour une étude nécessitant un grand nombre de cellules (Hahn *et al.*, 2010). De façon similaire, l'utilisation des stratégies virales et non-virales est limitée car elle engendre certains effets toxiques ou encore des réponses immunitaires.

Les CPPs possèdent des propriétés semblables aux polyplexes et aux lipoplexes, comme par exemple leur caractère cationique et leur haute capacité d'association cellulaire. Ainsi, il a été postulé qu'ils pourraient servir d'agents de livraison d'ADN ou d'oligonucléotides. De plus, puisque le transfert nucléaire est nécessaire à l'activité biologique, la localisation nucléaire de certains CPPs a été mise à profit (Bolhassani, 2011; Hassane *et al.*, 2010). On peut signaler que le transportan et la pénétratine ont été en mesure de relarguer dans le compartiment intracellulaire un *peptide nucleic acid* (PNA) de 21 résidus qui seul ne pouvait pas traverser la membrane plasmique des cellules de mélanome (Pooga *et al.*, 1998). De plus, la technologie basée sur les petits ARN interférants (siRNA) a su également tirer profit des CPPs. En effet, le couplage de TAT à un siRNA augmente l'absorption cellulaire de ce dernier sans interférer avec la localisation périnucléaire requise pour son activité (Chiu *et al.*, 2004). Les complexes ADN-TAT peuvent être utilisés pour transférer de l'ADN plasmidique dans les cellules de mammifères (Ignatovich *et al.*, 2003). Bien que des études plus approfondies soient nécessaires, les systèmes

de transfert pour les oligonucléotides et l'ADN plasmidique, basés sur les CPPs, sont très prometteurs (Hassane *et al.*, 2010).

Transport de nanoparticules et liposomes: Il a été démontré que les CPPs sont capables d'améliorer l'entrée des nanoparticules dans une cellule (Lewin *et al.*, 2000). Par exemple, la conjugaison de TAT à la surface de nanoparticules encapsulant un inhibiteur de protéase pour une thérapie anti-VIH augmente la biodisponibilité dans le SNC de cet inhibiteur et permet ainsi de maintenir des niveaux thérapeutiques pendant une période prolongée (Rao *et al.*, 2008). De même, la conjugaison de TAT ou de la pénétratine à des liposomes améliore significativement le transfert intracellulaire de ces derniers (Console *et al.*, 2003; Torchilin *et al.*, 2001). Récemment, il a été démontré que des nanoparticules, constituées de chitosan conjugué à de l'acide thioglycolique (ATG) ou au peptide TAT, sont de 7 à 8 fois plus efficaces dans le transfert d'ADN plasmique que les nanoparticules non modifiées (Rahmat *et al.*, 2012). Contrairement aux cargaisons de type protéique ou peptidique, les nanoparticules ou les liposomes peuvent être modifiés par un CPP au niveau de plusieurs sites sur chaque particule. Il est ainsi intéressant de noter que la densité de ces sites d'ancrage influence l'efficacité de transfert mais également la voie d'internalisation empruntée par ces dérivés (Khalil *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2002).

1.5.3. Limitations des CPPs

En général, le développement de systèmes conjugués peptide-cargaison est basé sur la prémisse qu'une amélioration de l'absorption d'un médicament par les cellules ou le cerveau se traduira par un bénéfice thérapeutique. Cependant, ce développement nécessitera une évaluation minutieuse afin de déterminer si l'avantage attendu ne sera pas anéanti par de possibles problèmes créés par cette modification. À cet effet, la toxicité et l'immunogénicité d'un vecteur peptidique doivent être considérées avant d'envisager une application clinique (Kuo *et al.*, 2009; Low *et al.*, 2007a; Moschos *et al.*, 2007). Des études récentes ont démontré que l'utilisation *in vivo* de CPPs synthétiques ou dérivés de virus pouvait être associée à une action biologique intrinsèque ou à une réponse immunitaire innée. Moschos et ses collègues ont ainsi observé que l'administration de la pénétratine ou du TAT chez la souris causait une réduction significative de l'expression de la p38 MAP kinase (Moschos *et al.*, 2007). De même, par des interactions avec le récepteur *Toll-like*, la pénétratine semble affecter le système immunitaire inné (Low *et al.*, 2007b). Enfin, une analyse génétique à l'aide de puces à ADN a révélé que 4386 gènes sont modulés, dont 55 qui

sont associés à des fonctions immunitaires, suite à l'exposition de macrophages U-937 à l'octoarginine (Kuo *et al.*, 2009). Par conséquent, le développement de transporteurs à partir de séquences de peptides endogènes peut présenter une voie prometteuse pour surmonter ces obstacles.

Un autre inconvénient majeur des CPPs est leur manque de spécificité vis-à-vis les cellules cibles, par exemple, des cellules cancéreuses. La spécificité cellulaire est particulièrement importante si un CPP est conçu pour servir de système de livraison pour des agents antinéoplasiques. Toutefois, les efforts visant à développer des CPPs ciblant spécifiquement des cellules cancéreuses se sont avérés difficiles (Mader *et al.*, 2006; Papo *et al.*, 2003). Jusqu'à présent, seuls quelques rares CPPs possèdent une spécificité importante envers les cellules cancéreuses (Hong *et al.*, 2000; Javadpour *et al.*, 1997; Javadpour *et al.*, 1996). À cet égard, la découverte des peptides spécifiques pour les cellules cancereuses, *i.e. tumor-homing peptides*, devient extrêmement prometteuse pour la livraison spécifique d'agents thérapeutiques (Hamzah *et al.*, 2011; Laakkonen *et al.*, 2002; Laakkonen *et al.*, 2010; Laakkonen *et al.*, 2008). En effet, les "cell-homing peptides" sont des peptides synthétiques, identifiés par la méthode de phage-display, qui ciblent spécifiquement des marqueurs spécifiques exprimés au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux, des vaisseaux lymphatiques et/ou des cellules tumorales. Certains cell-homing peptides reconnaissent des marqueurs spécifiques de l'angiogenèse et sont ainsi capables de se lier à plusieurs types de tumeurs. En conséquence, la combinaison de *cell-penetrating peptides* et de *cell-homing peptides* ou *tissues-homing peptides* est actuellement considérée comme une méthode très encourageante pour surmonter le problème de spécificité des CPPs.

1.6. Objectifs généraux et spécifiques

Ce travail visait à développer des analogues du PACAP à potentiel thérapeutique. À cette fin, les études que nous avons menées ont consisté (1) à développer des analogues ciblant préférentiellement les récepteurs impliqués dans les actions anti-apoptotiques et anti-inflammatoires, (2) à étudier la pharmacologie intracrine du PACAP afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans ses effets neuroprotecteurs à faible concentration et (3) à développer de nouveaux transporteurs peptidiques basés sur la séquence du PACAP.

Le PACAP représente un bon candidat pour le traitement de diverses maladies neurodégénératives ou atteintes du système nerveux central, car (1) ce neuropeptide est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et (2) son effet neuroprotecteur très puissant a été démontré dans divers modèles *in vitro* et *in vivo* d'atteintes du cerveau, comme par exemple (i) la maladie de Parkinson (Reglodi *et al.*, 2004b), (ii) l'ischémie cérébrale (Reglodi *et al.*, 2000) et (iii) certains dommages traumatiques (Farkas *et al.*, 2004). Ces effets neuroprotecteurs sont issus de son action anti-apoptotique (*via* l'activation du récepteur spécifique PAC1) et de ses propriétés anti-inflammatoires (*via* l'activation du récepteur VPAC1) (Bourgault *et al.*, 2011; Bourgault *et al.*, 2009b). Toutefois, les multiples activités biologiques du PACAP, et notamment l'effet vasodilatateur induit *via* l'activation du récepteur VPAC2, pourraient provoquer des effets indésirables limitant ainsi son utilisation. L'objectif initial de ce projet de recherche consistait à développer et caractériser des analogues sélectifs pour les récepteurs PAC1 et VPAC1 de façon à s'affranchir des effets indésirables causés par l'activation du récepteur VPAC2. Pour ce faire, des modifications conformationelles et chimiques ont été introduites au niveau du domaine N-terminal du peptide afin de déterminer des éléments clés impliqués dans la reconnaissance et l'activation de PAC1, VPAC1 et VPAC2. Le segment N-terminal a été ciblé pour introduire des modifications puisque les résidus de l'extrémité N-terminale sont non seulement importants pour l'activation des récepteurs du PACAP mais ces derniers moduleraient la sélectivité des analogues envers les différents récepteurs. Ces dérivés peptidiques produits par synthèse organique sur phase solide ont donc été évalués *in vitro* au moyen de trois lignées cellulaires transfectées respectivement avec les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2, afin d'évaluer leur capacité à lier et à activer chacun des trois sous-types de récepteurs. Enfin, l'effet neuroprotecteur des analogues avec un profil pharmacologique amélioré a été évalué dans un modèle *in vitro* de mort neuronale. Les résultats de ce travail sont présentés dans le chapitre 2 (**Article 1**).

Des études antérieures ont montré que le PACAP exerçait des effets neuroprotecteurs puissants à de très faibles concentrations, soit de l'ordre du femtomolaire ou picomolaire (Ohtaki *et al.*, 2008; Tamas *et al.*, 2002). En conséquence, l'utilisation à faibles concentrations des analogues décrits dans l'Article 1, malgré une faible liaison et activation de VPAC2, pourrait s'avérer une stratégie prometteuse pour le traitement de maladies neurodégénératives. Dans cette seconde partie de notre étude, nous avons tenté de mieux comprendre les mécanismes

moléculaires/cellulaires pouvant être responsables de ces activités subnanomolaires. Une hypothèse que nous avons explorée repose ainsi sur une action intracrine du PACAP, comme suggérée par Li et collaborateurs (Li *et al.*, 2004). En effet, la présence dans le compartiment intracellulaire de sites de liaison spécifiques du PACAP fut démontrée dans des préparations cytosoliques et nucléaires de cellules germinales testiculaires (Li *et al.*, 2003). De plus, le PACAP, lequel contient pas moins de 11 résidus basiques dans sa séquence, possède des caractéristiques physico-chimiques, *i.e.* structure secondaire caractérisée par une hélice amphiphile et une forte anisotropie, qui n'est pas sans rappeler les caractéristiques des protéines de transduction des souches virales, et notamment le peptide Tat du virus HIV. En plus de confirmer la présence de sites de liaison nucléaires dans divers tissus, nous avons également cherché à évaluer la capacité de translocation à travers la membrane cellulaire du PACAP et de ses dérivés inactifs par cytométrie en flux et microscopie confocale. Le mécanisme d'entrée du peptide a été également étudié afin de déterminer si le peptide était capable d'atteindre son site de liaison intracellulaire. De plus, nous avons évalué si le peptide était capable de sortir du cytosol, une fois à l'intérieur des cellules. Pour terminer, nous avons mesuré la capacité du PACAP à activer ses récepteurs dans des préparations de noyaux isolés de testicules de rat. Les résultats de ce travail sont présentés dans le chapitre 3 (**Article 2**).

Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la capacité du PACAP à traverser efficacement la membrane cellulaire par un mécanisme indépendant de l'internalisation du récepteur. Nous avons premièrement observé que le complexe PACAP38-fluorescéine pénètre beaucoup plus facilement à l'intérieur de la cellule que le TAT(48-60)-fluorescéine. Sur cette base, nous avons ainsi cherché à développer des analogues du PACAP pouvant être utilisés comme CPP (*cell-penetrating peptide*) pour le transport vers l'intérieur de la cellule de divers types d'agents pharmacologiques et/ou diagnostiques. Le PACAP fut ainsi conjugué avec divers types de molécules, i.e. petite molécule, peptide ou protéine, et la capacité de pénétration de ces complexes a été évaluée. Toutefois, l'utilisation du PACAP sous sa forme native comme transporteur peptidique est restreinte à cause de ses activités biologiques intrinsèques. À ce titre, la conception de dérivés inactifs du PACAP pourrait alors représenter une bonne alternative. Dans ce travail, sur la base de nos études initiales, nous avons donc développé des formes inactives du PACAP se comportant comme des CPPs. Leur capacité à délivrer des cargaisons

variées, comme (1) des petites molécules, (2) des peptides, (3) des protéines et (4) des polynucléotides, ainsi que leur toxicité, ont été évaluées sur différents types cellulaires. Les résultats de ce travail sont présentés dans le chapitre 4 (**Article 3**).

Préface au chapitre 2

Sur la base d'études précédentes ayant suggéré le rôle clé du segment N-terminal dans l'activité et la sélectivité du peptide envers les récepteurs, nous avons décidé d'explorer l'impact de diverses modifications au niveau de ces résidus afin de déterminer de façon plus précise les pharmacophores responsables de l'affinité, de l'activité et de la sélectivité pour les récepteurs du PACAP. Ces dérivés peptidiques produits par synthèse organique sur phase solide ont donc été évalués *in vitro* au moyen de trois lignées cellulaires transfectées respectivement avec les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2, afin d'établir leur capacité à lier et à activer chacun des trois sous-types de récepteurs. Nos résultats confirment le caractère essentiel des résidus His^1, Asp^3, Leu^5 et Phe^6 dans la liaison du PACAP aux différents récepteurs et suggèrent que des modifications à la position Ser^2 ou à la position Thr^7 pourraient moduler la sélectivité des analogues pour l'un ou l'autre des récepteurs. Nous avons ainsi pu identifier deux analogues, *i.e.* [Ala^7]- et [Hyp^2]PACAP27, présentant une sélectivité accrue pour les récepteurs PAC1 et VPAC1. Ces deux analogues se sont également montrés capables de bloquer la toxicité induite par la neurotoxine MPP^+ sur des cellules SH-SY5Y.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue *Biochemical Pharmacology* en 2011 (Doan *et al.*, 2011b).

Chapitre 2 : Article 1

Mise en contexte

Bien qu'étant un bon candidat pour le développement de médicaments pour le traitement de maladies neurodégénératives diverses, le potentiel thérapeutique du PACAP est en partie limité par son action périphérique principalement associée à l'activation des récepteurs VPAC2 (Fizanne *et al.*, 2004; Kellogg *et al.*, 2010; Linden *et al.*, 2003). Par exemple, l'injection *iv* de PACAP38 à des volontaires sains augmente de façon significative le rythme cardiaque (Birk *et al.*, 2007) suite à l'induction d'une vasodilatation périphérique (Dorner *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 1992). Des effets indésirables du PACAP, tels que la tachycardie, l'hypotension et l'hyperventilation, ou encore des maux de tête, ont également été observés (Bourgault *et al.*, 2011). Ce chapitre présente ainsi le développement d'analogues du PACAP ciblant préférentiellement les récepteurs PAC1 et VPAC1, principalement responsables des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires, au détriment des récepteurs VPAC2. Une étude de type relation structure-activité a été effectuée et nous a permis d'identifier deux dérivés sélectifs pour les récepteurs PAC1/VPAC1, *i.e.* [Hyp^2]PACAP27 et [Ala^7]PACAP27. Ces deux composés se sont avérés capables de protéger efficacement les neurones dopaminergiques contre la toxicité du MPP^+, un modèle *in vitro* de la maladie de Parkinson. De plus, ce travail a également fourni des informations importantes sur la conformation bioactive du domaine N-terminal du PACAP suite à son interaction avec le récepteur PAC1 et/ou les récepteurs VPAC1 et VPAC2, nous permettant d'améliorer ainsi nos connaissances actuelles sur ce neuropeptide. Ces informations seront très utiles pour le développement des prochaines générations d'analogues du PACAP affichant un profil pharmacologique amélioré.

Pour rapeller, le contenu peptidique utilisé dans mon travail a été déterminée par une méthode spectrométrique en fonction du coefficient d'extinction des résidus tyrosines (PACAP27 a 3 résidus tyrosines tandis que PACAP38 en contient 4). En effet, par la mesure de l'absorbance d'une solution peptidique dans l'eau à 280 nm, on peut déterminer la concentration de ce peptide.

$$\text{Mg peptide/ml} = (A_{280} \times DF \times MW) / e$$

A_{280} est l'absorbance réelle de la solution à 280 nm dans une cellule de 1-cm, DF est le facteur de dilution, MW est le poids moléculaire du peptide et e est le coefficient d'extinction molaire des résidus tyrosines à 280 nm.

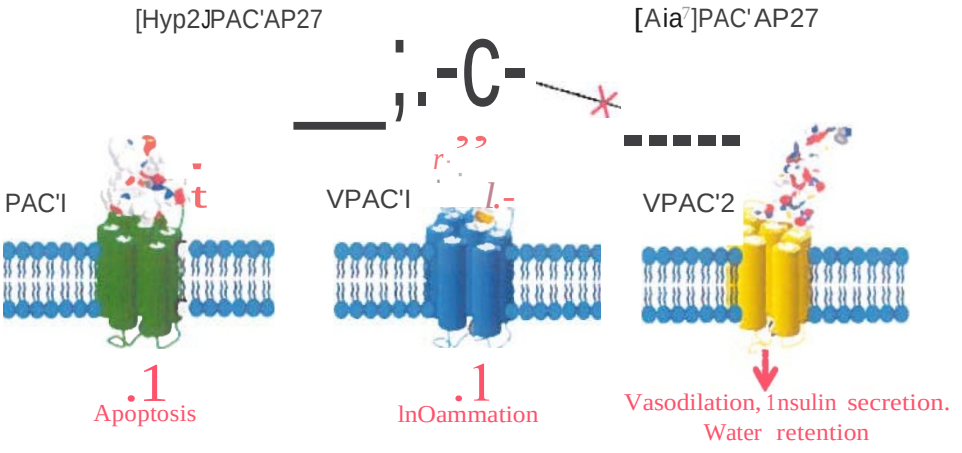
Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Design and *in vitro* characterization of PACt NPACt-selective agonists with potent neuroprotective effects

Ngoc-Duc Doan [a,b], Steve Bourgault [a,b], Agnieszka Dejda [a,b], Myriam Le´tourneau [a,b], Michel Detheux [c], David Vaudry [b,d], Hubert Vaudry [b,d], David Chatenet [a,b], Alain Fournier [a,b,*]

a Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Ville de Laval, Québec H7V 187, Canada
b Laboratoire International Associé Samuel de Champlain INSERM – INRS, France, Canada
c Euroscreen S.A., 47 Rue Adrienne Bolland, 86041 Gosselies, Belgium
d INSERM-U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

Article publié dans *Biochemical Pharmacology*, vol. 81 (4), p. 552-561, 2011.
Doi : http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.11.015



Résumé de l'article en français

Le *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) est un neuropeptide qui exerce une multitude d'effets biologiques dans le système nerveux central et périphérique. Par l'activation de ces récepteurs PAC1 et VPAC1, le PACAP est capable d'exercer des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires, deux phénomènes impliqués dans la pathogenèse et la progression des maladies neurodégénératives. L'objectif de cette étude était de fournir des indications sur les déterminants moléculaires de l'extrémité N-terminale du PACAP et de développer de nouveaux agonistes PAC1/VPAC1 puissants et sélectifs favorisant la survie neuronale. Nous avons ainsi synthétisé une série d'analogues du PACAP et évalué leur profil pharmacologique, affinité de liaison et capacité à induire la mobilisation du calcium intracellulaire, pour chaque récepteur, *i.e.* PAC1, VPAC1 et VPAC2. Les analogues présentant un profil pharmacologique amélioré ont été évalués dans un modèle *in vitro* de mort neuronale. Nos résultats ont montré que l'introduction d'une hydroxyproline (Hyp) ou d'une alanine (Ala), respectivement aux positions 2 et 7, permet de générer des dérivés dépourvus d'activité envers le récepteur VPAC2. De plus, cette étude de type structure-activité a permis de proposer l'existence de structures secondaires spécifiques (coude Asx-Pro et motif de N-*capping*) qui pourraient être responsables de la reconnaissance, de la sélectivité et de l'activation des différents récepteurs. Enfin, l'évaluation de l'activité neuroprotectrice de ces deux dérivés, *i.e.* [Ala^{7}]PACAP27 et [Hyp^{2}]PACAP27, a confirmé leur capacité à protéger les neurones dopaminergiques SH-SY5Y contre la neurotoxicité du 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^{+}). Ces nouvelles données pharmacologiques et structuralles seront très utiles pour la conception rationnelle de dérivés sélectifs pour PAC1/VPAC1 qui pourraient représenter des agents thérapeutiques potentiels pour le traitement de maladies neurodégénératives.

Contribution de l'étudiant

La majorité du travail en laboratoire a été effectuée par Ngoc-Duc Doan. La première version du manuscrit a été rédigée par Ngoc-Duc Doan. Steve Bourgault a participé à la conception et à la synthèse de différents peptides. Agnieszka Dejda a optimisé le test de survie cellulaire (figure 3A) et réalisé des expériences de cotraitement (figure 3C). Michel Detheux de la compagnie Euroscreen a développé les cellules transfectées avec les récepteurs humains PAC1, VPAC1 et VPAC2. Myriam Létourneau, David Vaudry et Hubert Vaudry ont participé à cet article en facilitant le choix des orientations des travaux de recherche et en révisant le manuscrit. David Chatenet a émis certaines hypothèses permettant de discuter d'éléments clés du travail et a révisé le manuscrit. Alain Fournier, titulaire d'une subvention des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour un projet intitulé « Pharmacologie moléculaire du PACAP » a supervisé les travaux et révisé le manuscrit.

Préface au chapitre 3

La présence de site de liaison spécifique dans le compartiment intracellulaire, de même que les caractéristiques physico-chimiques du PACAP, nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le PACAP pourrait traverser la membrane plasmique afin d'atteindre des cibles intracellulaires. Nous avons donc mesuré la capacité de translocation du PACAP par cytométrie en flux et microscopie confocale sur des préparations cellulaires vivantes (CHO-K1, HEK 293 et HeLa) dépourvues d'expression des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2. Par microscopie confocale, nous avons ainsi observé une accumulation des deux isoformes fluorescentes du PACAP dans la région nucléaire et périnucléaire des cellules. De façon surprenante, le segment riche en résidu basique, i.e. PACAP(28-38), s'est avéré incapable de traverser la membrane plasmique et ce dans tous les types cellulaires étudiés. L'analyse du mécanisme d'entrée du peptide (effet du pH, de la température, utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'endocytose) dans la cellule suggère un mécanisme récepteur-indépendant mettant en jeu différentes voies incluant la translocation directe et l'endocytose. De plus, nous avons démontré que, une fois à l'intérieur des cellules, le PACAP n'est pas entièrement dégradé par les enzymes intracellulaires et qu'une quantité significative du matériel peptidique initial est en mesure de sortir intact des cellules. Finalement, nous avons constaté que le PACAP est capable de stimuler la libération calcique et l'initiation de la transcription dans des noyaux isolés de testicules de rat.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* en 2012 (Doan *et al.*, 2012a).

Chapitre 3 : Article 2

Mise en contexte

La présence dans le compartiment intracellulaire de sites de liaison spécifiques du PACAP a été observée dans les cellules germinales testiculaires. De façon surprenante et intéressante, la densité des récepteurs PAC1 est plus élevé au niveau nucléaire que membranaire (Li *et al.*, 2004). Ces observations posent la question concernant la manière dont ces récepteurs intracellulaires sont activés par leurs ligands endogènes. Le PACAP, lequel contient pas moins de 11 résidus basiques dans sa séquence, possède des caractéristiques physico-chimiques, *i.e.* structure secondaire caractérisée par une hélice amphiphile et une forte anisotropie, qui ne sont pas sans rappeler les caractéristiques des protéines de transduction des souches virales, et notamment le peptide Tat du virus HIV. Nous avons donc émis l'hypothèse que le PACAP pourrait agir de façon intracrine en traversant la membrane plasmique afin d'atteindre ses cibles intracellulaires. Répondre à cette question nous a également permis de proposer une hypothèse expliquant les effets puissants, de longue durée et ce, à de très faibles concentrations, observés avec le PACAP. Cette étude contribue ainsi à une meilleure compréhension de la pharmacologie moléculaire du neuropeptide PACAP.

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

Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

Ngoc-Duc Doan[a,c], David Chatenet[b,c], Myriam Létourneau[b,c], Hubert Vaudry[b,c], David Vaudry[b,c], Alain Foumier[b,c]

[a] INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Ville de Laval, Québec, Canada H7V 187
[b] INSERM-U982, Laboratoire de Différenciation & Communication Neuronales & Neuroendocrines, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan, France
[c] Laboratoire International Associé Samuel de Champlain (INSERM-INRS-Université de Rouen), Ville de Laval, Québec, Canada

Article publié dans *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research*, vol. 1823 (4), p. 940-949,2012.

DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.001

Highlights

- 8oth PACAP isoforms cross the plasma membrane by a receptor-independent mechanism.

- Direct translocation and endocytosis are involved in cellular uptake of PACAP.

-A significant amount of intact PACAP38 is also able to exit cells.

- Specifie PACAP binding sites are present in rat tissue nuclei.

- PACAP stimulates calcium release and transcription initiation in rat testis nuclei.

Résumé de l'article en français

Le *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), est une neurohormone hypothalamique participant à la régulation d'une multitide de fonctions physiologiques. La découverte récente de récepteurs intracellulaires du PACAP dans le cerveau et les testicules, ainsi que certaines caractéristiques physicochimiques du peptide, *i.e.* une hélice α prolongée contenant des résidus basiques, nous a incité à évaluer la capacité du PACAP à traverser la membrane plasmique par un mécanisme indépendant d'un récepteur. En utilisant la microscopie confocale et la cytométrie en flux, nous avons démontré la capacité du PACAP conjugué à la fluorescéine à pénétrer efficacement dans le compartiment interne de la cellule par translocation directe et endocytose. Notre étude a également révélé que, une fois à l'intérieur des cellules, le PACAP38 n'est pas entièrement dégradé par les enzymes intracellulaires et qu'une quantité importante de ce dernier est en mesure de sortir des cellules. En outre, des récepteurs nucléaires du PACAP ont été identifiés en utilisant le test de liaison spécifique sur des fractions nucléaires provenant de divers tissus de rat. Nous avons également constaté que le PACAP stimule la libération intranucléaire de calcium dans des noyaux isolés de cellules testiculaires de rat. De plus, le PACAP27 et le PACAP38, mais pas le *Vasoactive intestinal polypeptide* (VIP), sont capables de réguler la synthèse *de novo* d'ADN dans ces mêmes noyaux. Cet effet, aboli par l'antagoniste PACAP (6-38), supporte la présence de récepteurs PAC1 à la membrane nucléaire et soulève des questions sur le rôle de ces récepteurs dans l'activité biologique du peptide. Ces résultats contribuent ainsi à la caractérisation du PACAP comme facteur intracrine et suggèrent que ces sites de liaison PAC1 intracellulaires, probablement associés à des activités biologiques spécifiques, doivent être pris en compte lors du développement de médicaments.

Contribution de l'étudiant

La majorité du travail en laboratoire a été effectuée par Ngoc-Duc Doan. La première version du manuscrit a été rédigée par Ngoc-Duc Doan. Myriam Létourneau, David Vaudry et Hubert Vaudry ont participé à cet article en facilitant le choix des orientations des travaux de recherche et en révisant le manuscrit. David Chatenet et Alain Fournier ont supervisé les travaux, émis certaines hypothèses permettant de discuter d'éléments clés du travail et révisé le manuscrit. Alain Fournier est le titulaire d'une subvention des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour un projet intitulé « Pharmacologie moléculaire du PACAP ».

RECEPTOR-INDEPENDENT CELLULAR UPTAKE OF PITUITARY ADENYLATE CYCLASE-ACTIVATING POLYPEPTIDE

Ngoc-Duc Doan, David Chatenet, Myriam Létourneau, Hubert Vaudry, David Vaudry and Alain Fournier*

INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Ville de Laval, Québec H7V 1B7, Canada (N.D.D., D.C., M.L., A.F.); INSERM - U982, Laboratoire de Différenciation & Communication Neuronales & Neuroendocrines, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan, France (D.V., H.V.); Laboratoire International Associé Samuel de Champlain (INSERM – INRS – Université de Rouen) (N.D.D., D.C., M.L., H.V., D.V. and A.F.).

Supporting Informations

Table S1 & Figure S1-S6

Table S1 : Analytical data obtained by MALDI-TOF spectrometry and by RP-HPLC.

Compounds	HPLC[a]	MS calculated[b]	MS found[b]
PACAP27	> 98%	3147.6	3148.3
PACAP38	> 98%	4534.3	4534.9
PACAP(28-38)	> 98%	1401.7	1402.5
TAT(48-60)	> 95%	1719.5	1720.9
FITC-Ahx-PACAP27	> 98%	3649.8	3650.4
FITC-Ahx-PACAP38	> 98%	5036.5	5037.2
FITC-Ahx-PACAP(28-38)	> 98%	1903.9	1904.7
FITC-Ahx-[Disc^{6}]PACAP27	> 98%	3647.8	3648.2
FITC-Ahx-TAT(48-60)	> 98%	2221.7	2223.1

[a]Percentage of purity determined by HPLC
[b]Observed $[M+H]^+$ value compared with the calculated m/z mass.

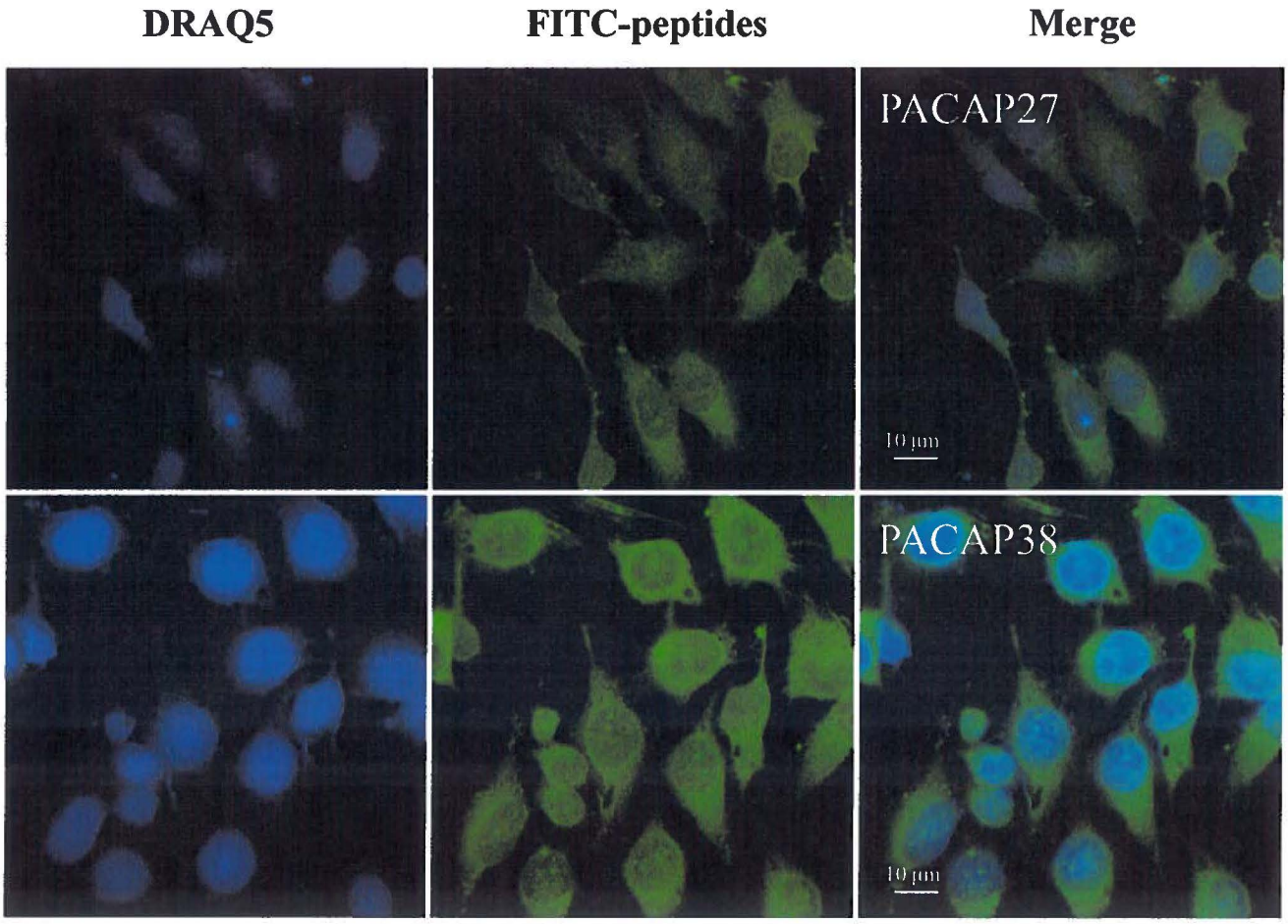


Fig. S1. Confocal microscopy images of the cellular distribution of the fluorescent PACAP27 and PACAP38 in CHO-K1.

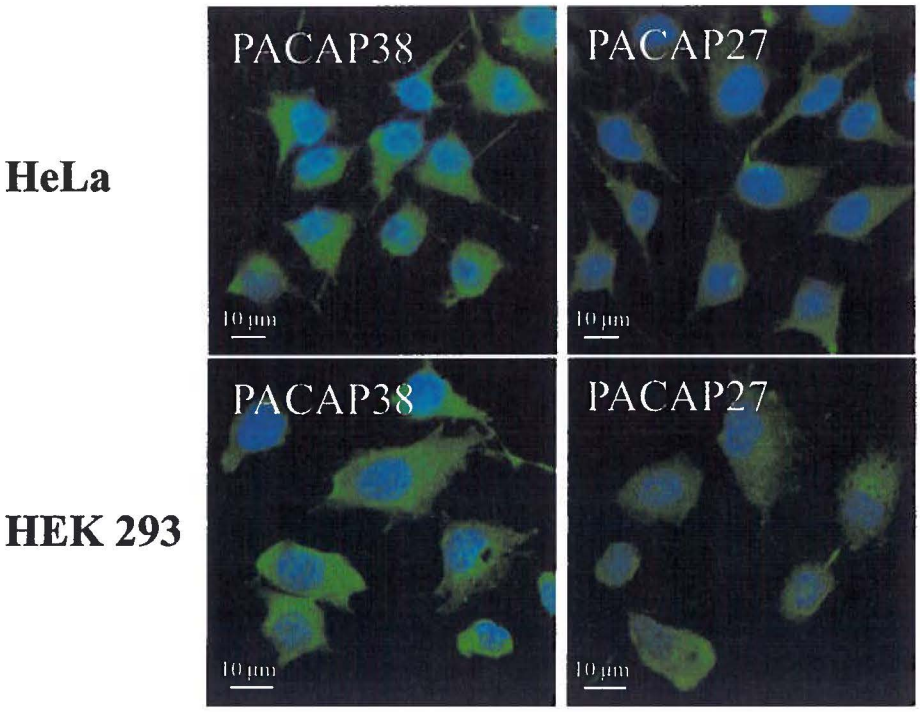


Fig. S2. Distribution of FITC-conjugated PACAP27 and PACAP38 in living non-transfected HEK293 or HeLa cells, as observed by confocal microscopy. Nuclei were stained with DRAQ5™.

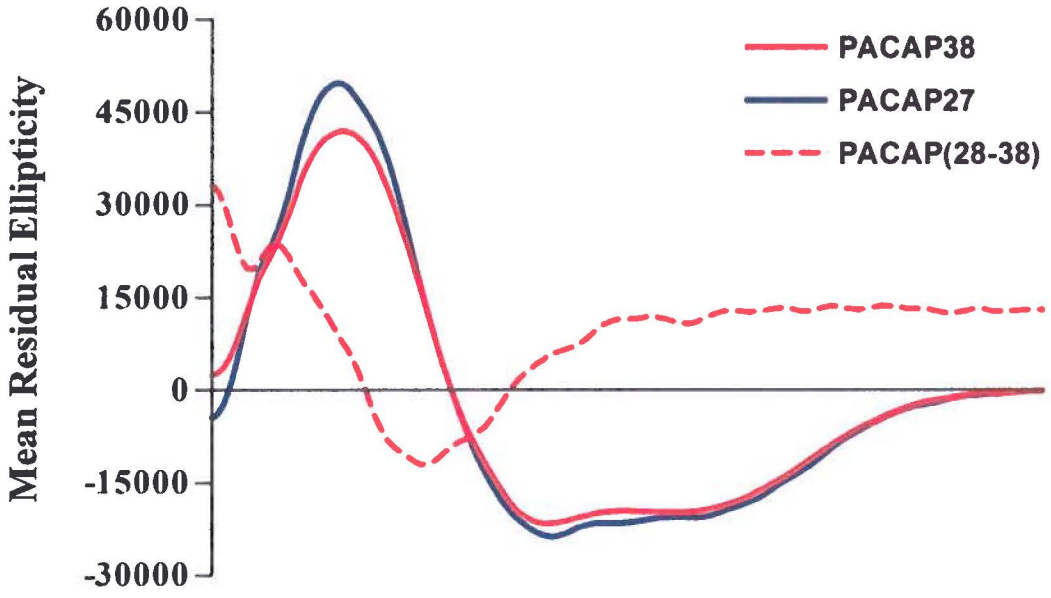


Fig. S3. Circular Dichroism analysis of PACAP27, PACAP38 and PACAP(28-38). Spectra were recorded from 180 to 250 nm, with a 0.5 nm step, a 2 nm bandwith, and an integration time of 0.2 s on a Jobin Yvon CD6 dichrograph. Each spectrum is the mean of 3 scans corrected for solvent contribution. A digital low-pass filter was used as a smoothing routine. Measurement were performed in 20% 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP), at 25 °C, using quartz cells of 0.1 mm optical path length. The peptide concentration was 0.05 mg/mL.

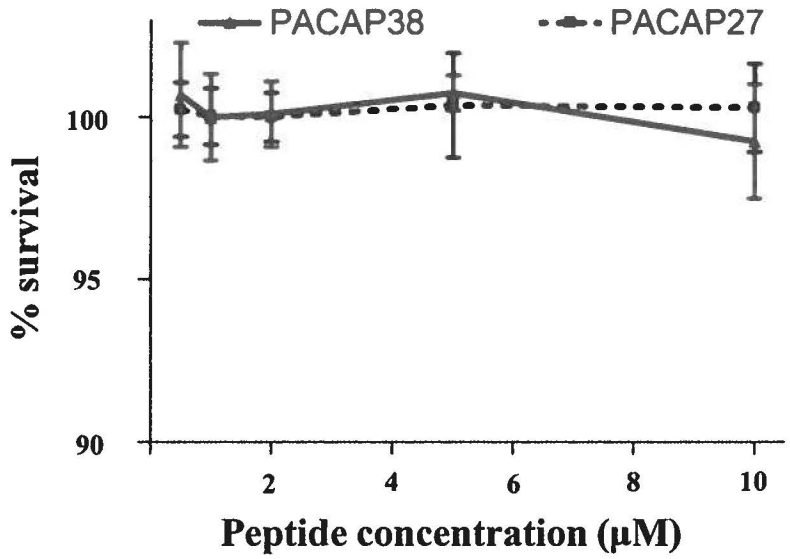


Fig. S4. Viability of CHO-K1 cells treated with various concentrations of PACAPs. CHO-K1 cells seeded into 96-well plates at a density of 30000 cells/well were treated with various concentrations of PACAP27 or PACAP38 (0.5 µM - 10 µM) for 4h. Cell viability was assessed by means of a MTT assay using a microplate reader (MTX^{TC} Revelation, Dynex Tech., VA, USA). Control experiments, *i.e.* cell culture medium alone or with cells were included in each experiment. All assays were run in octuplicate.

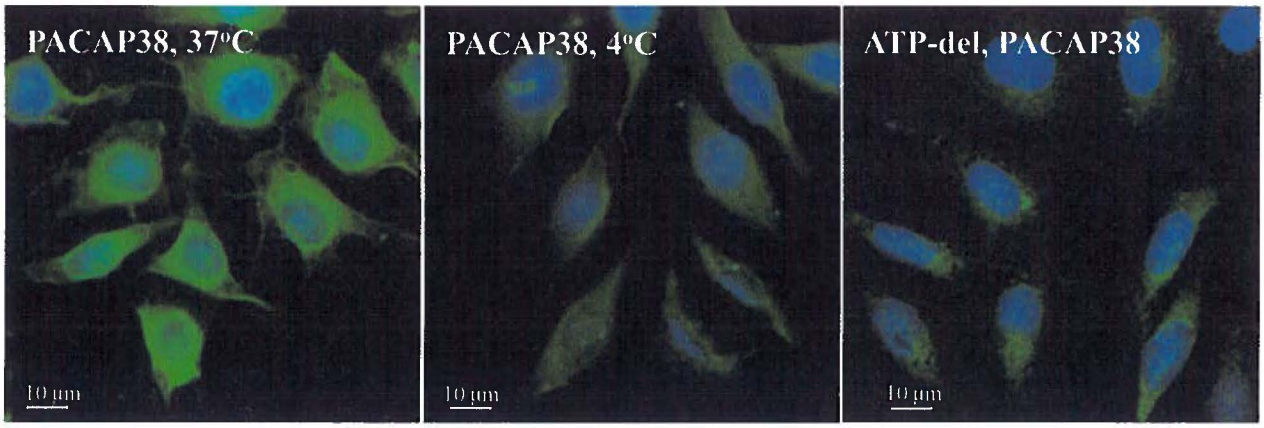


Fig. S5. Confocal microscopy images of the cellular distribution of the fluorescent peptides following incubation at low temperature or with ATP-deleted CHO-K1 cells.

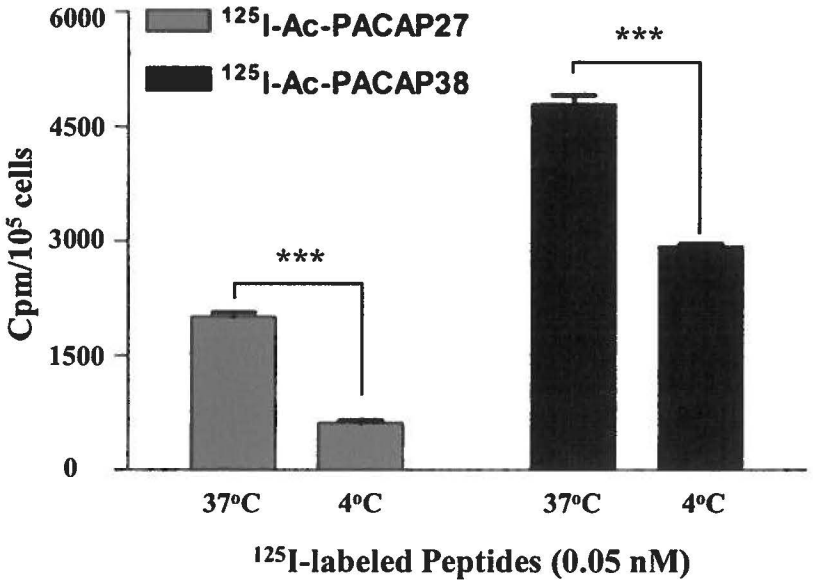


Fig. S6. Influence of low temperature on the cellular uptake of the peptides at physiological concentration. CHO-K1 cells were cooled to 4°C in serum-free medium for 15 min prior to incubation with ^{125}I-labelled peptides (0.05 nM, 1h).

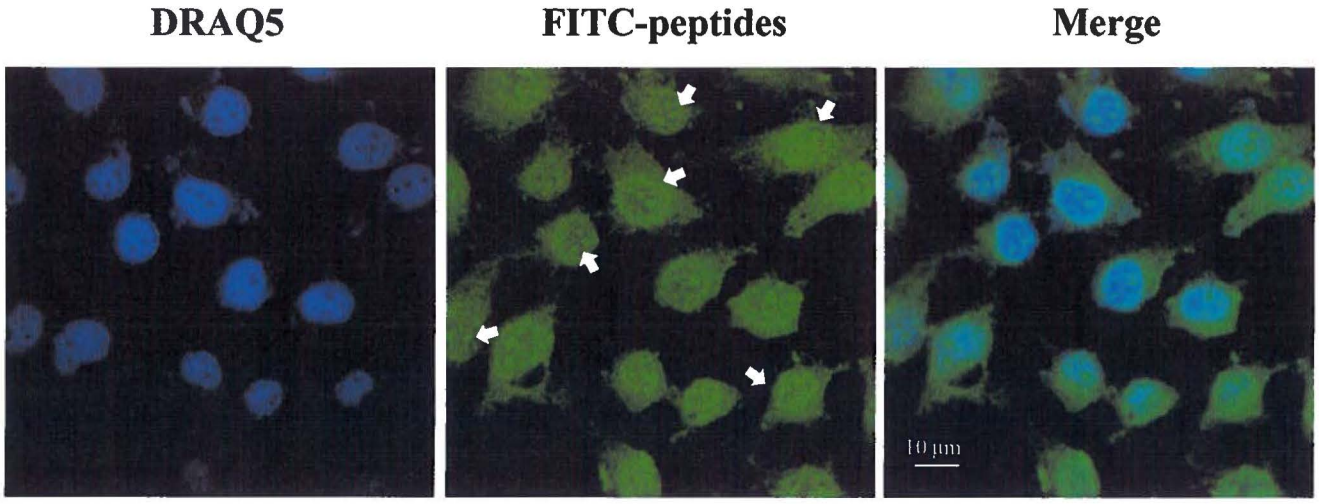


Fig. S7. Confocal microscopy images of the cellular distribution of the fluorescent PACAP38 in CHO-K1 cells following pre-incubation 10 min with NH_4Cl (10 mM). Punctate fluorescence indicate the exist of endocytic vesiles.

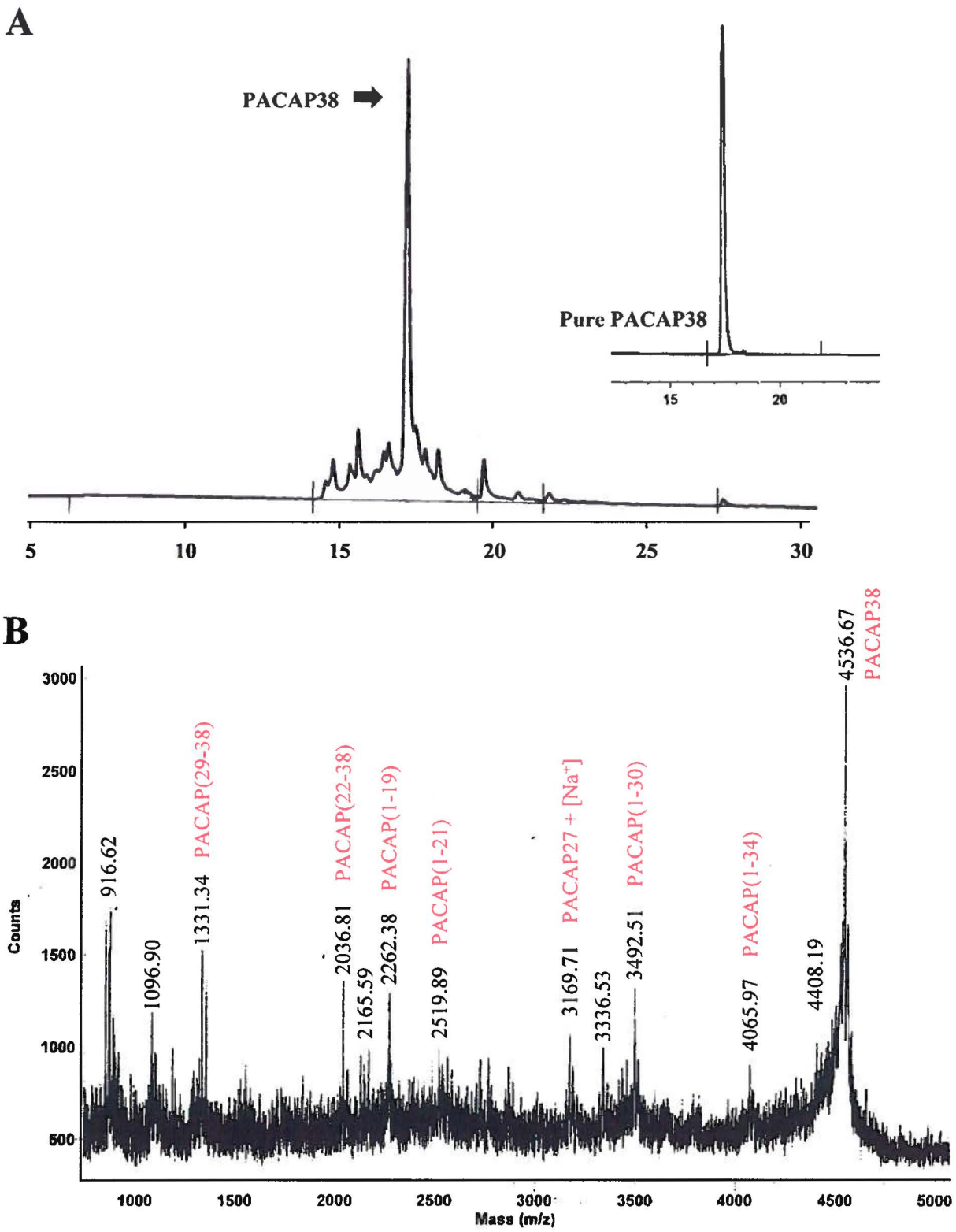


Fig. S8. HPLC (**A**) and MS (**B**) analysis of peptide metabolism. CHO-K1 cells maintained in FBS-free media containing PACAP38 (10^{-5}M) for 30 min. After ice-cold trypsinization and washings, cells were re-suspended in FBS-free media for an additional 30 min. The suspension was then centrifuged at 4°C for 5 min at 1500 rpm. Salts from the supernatant were eliminated by using a Sep-Pak C_{18} cartridge and the peptide mixture was then eluted with 60% ACN in H_2O (0.1% TFA). Materials present in the supernatant were finally characterized by analytical RP-HPLC and mass spectrometry using 2,5-dihydroxybenzoic acid as matrix.

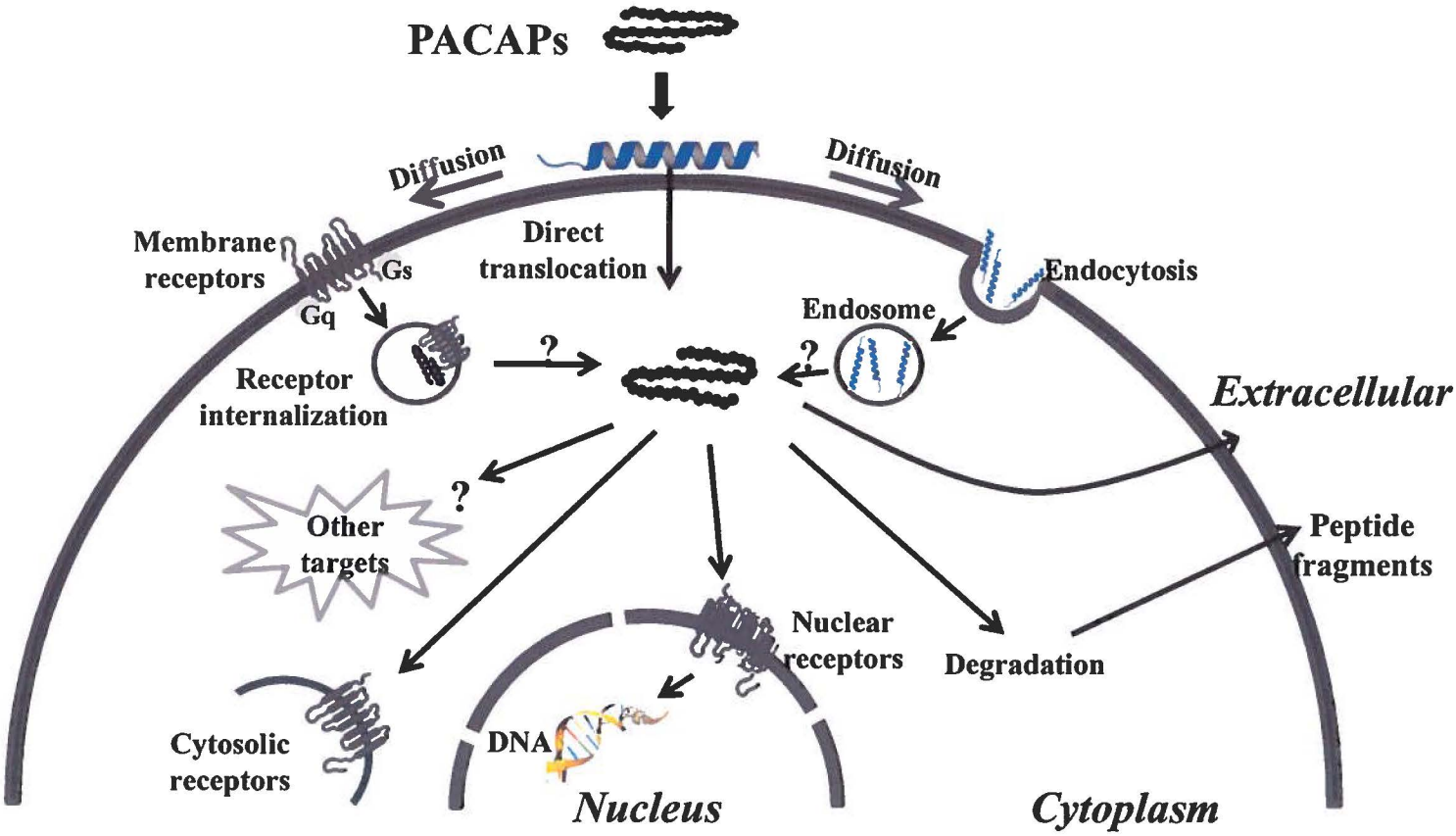


Fig. S9. Schematic representation of PACAP trafficking mechanism. Following the first non-specific interaction with cellular membrane, PACAP undergoes two-dimensional diffusion on the membrane surface leading to its internalization via receptor-dependent and independent mechanism (direct translocation and endocytosis). Once in the intracellular compartment, peptides interact with their intracellular targets such as cytosolic or nuclear receptors in order to induce downstream signaling pathways and ultimately gene expression. Although PACAP may be degraded by intracellular enzymes, a significant amount may also exit the cells and trigger in an autocrine or paracrine manner the production of PACAP leading to potent effect at low concentration.

Préface au chapitre 4

Sur la base de nos résultats précédents (chapitre 3), ayant démontré la capacité du PACAP à pénétrer très efficacement dans la cellule, nous avons émis l'hypothèse que ce peptide pourrait représenter un nouveau CPP. Pour ce faire, des dérivés biotinylés du PACAP ont été synthétisés et leur capacité à livrer une molécule de streptavidine à l'intérieur de la cellule fut testée. Par microscopie confocale et cytométrie en flux, nous avons ainsi démontré que le complexe PACAP38$_b$-Streptavidine pénètre dans les cellules vivantes (CHO-K1, HEK 293 et HeLa). Par la suite, des analogues inactifs du PACAP, *i.e.* PACAP(11-38) et [Arg^{17}]PACAP(11-38), ont été synthétisés et leur capacité à pénétrer dans la cellule, de même que le mécanisme impliqué dans cette translocation, ont été étudiés. Nous avons ainsi observé que la translocation directe, l'endocytose dépendante des cavéoles ou la macropinocytose étaient impliquées dans l'internalisation de [Arg^{17}]PACAP(11-38). De plus, il semble que ce composé soit capable de s'échapper des compartiments endosomaux/lysosomaux pour agir dans le compartiment cytosolique. Ce dérivé a été ensuite utilisé dans la livraison intracellulaire de diverses « cargaisons » telles que la fluorescéine, le peptide Id1/3-PA7, la streptavidine, et des polynucléotides (ribozyme, DNA). En particulier, nous avons observé que l'efficacité du [Arg^{17}]PACAP(11-38) en tant qu'agent de transfection est comparable à celle de la Lipofectamine 2000, tout en étant par contre non toxique pour les cellules.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue *Journal of Controlled Release* en 2012 (Doan *et al.*, 2012b).

Chapitre 4 : Article 3

Mise en contexte

Nous avons initialement démontré que le PACAP pénétrait très efficacement dans la cellule par un mécanisme indépendant de l'internalisation du récepteur impliquant la translocation et/ou endocytose (Doan *et al.,* 2012a). Ces observations nous ont permis de proposer que le PACAP et ses analogues pourraient être utilisés comme CPP, augmentant par le fait même le champ d'application du PACAP et de ses dérivés. De par son caractère endogène et sa taille, le PACAP ne devrait pas induire de réponses immunitaires ou d'actions toxiques. Cependant, les activités biologiques intrinsèques du PACAP pourraient restreindre son application comme CPP. À ce titre, le développement d'analogues pharmacologiquement inertes, gardant leurs propriétés de CPP, nous est apparu comme une excellente avenue de recherche. Cette étude nous a ainsi permis d'identifier de nouveaux membres de la famille des CPPs qui pourraient s'avérer d'excellents vecteurs pour des usages *in vitro* et *in vivo*.

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

Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

Ngoc-Duc Doan[1,3], Myriam Létourneau[1,3], David Vaudif·[3], Nicolas Doucet[1], Benjamin Folch[1], Hubert Vaudry[2,3], Alain Foumier[1,3]•*and David Chatenet[1,3]. *

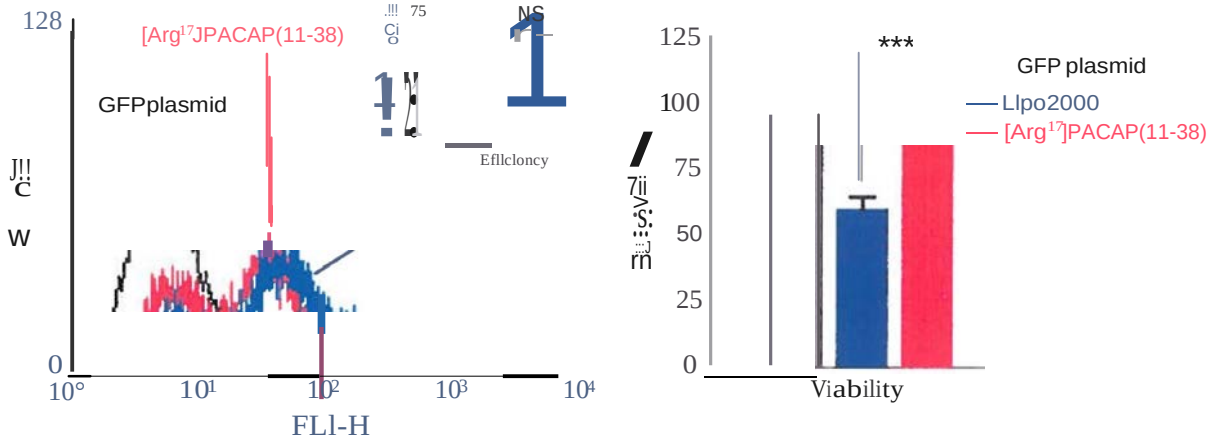
[1] INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Ville de Laval, Québec H7V 187, Canada;

[2] INSERM-U982, Laboratoire de Différenciation & Communication Neuronales & Neuroendocrines, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France;

[3] Laboratoire International Associé Samuel de Champlain (INSERM – INRS-Université de Rouen).

Article publié dans *Journal ofControlled Release*, vol. 163 (2), p. 256-265, 2012.

Doi : http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.08.021



Résumé de l'article en français

La découverte de *cell-penetrating peptides* (CPPs) a ouvert la voie à des approches prometteuses pour la livraison non invasive de biomolécules incapables normalement de pénétrer dans le compartiment intracellulaire. Cependant, à cause notamment de certains effets toxiques, leur utilisation en clinique est demeurée limitée. Pour surmonter cet obstacle, nous avons entrepris la conception et la caractérisation de nouveaux CPPs dérivés du peptide endogène *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP). Nous avons ainsi démontré la capacité des isoformes du PACAP (PACAP27 et PACAP38) à transporter efficacement la streptavidine à l'intérieur des cellules. Un fragment inactif conçu dans le laboratoire, le [Arg^{17}]PACAP(11-38), avec des propriétés physicochimiques et de pénétration cellulaire préservées, a également été utilisé successivement pour la livraison intracellulaire de diverses cargaisons telles que de petites molécules, des peptides, des protéines et des polynucléotides. De plus, son efficacité en tant qu'agent de transfection s'est montrée comparable à celle de la Lipofectamine 2000, tout en étant non toxique pour les cellules. Le mécanisme d'entrée a également été étudié et il a été établi que la translocation directe, l'endocytose dépendante des cavéoles et la macropinocytose étaient impliquées dans l'internalisation de [Arg^{17}]PACAP(11-38). Cette étude a non seulement mis en évidence un nouvel aspect de l'utilité du PACAP et de ses dérivés pour un usage thérapeutique mais aussi contribué à l'identification de nouveaux membres de la famille des CPPs. À ce titre, des analogues inactifs du PACAP semblent représenter d'excellents vecteurs pour des applications *in vitro* et *in vivo*.

Contribution de l'étudiant

La majorité du travail en laboratoire a été effectuée par Ngoc-Duc Doan. La première version du manuscrit a été rédigée par Ngoc-Duc Doan. Nicolas Doucet et Benjamin Folch ont participé à ce travail en réalisant la modélisation de la structure de [Arg^{17}]PACAP(11-38) (figure 2B) et en contribuant à l'analyse des corrélations entre les propriétés physicochimiques et la capacité de translocation. Myriam Létourneau, David Vaudry et Hubert Vaudry ont participé à cet article en facilitant le choix des orientations des travaux de recherche et en révisant le manuscrit. David Chatenet et Alain Fournier ont supervisé les travaux, émis certaines hypothèses permettant de discuter d'éléments clés du travail et révisé le manuscrit. Alain Fournier est le titulaire d'une subvention des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour un projet intitulé « Pharmacologie moléculaire du PACAP ».

Design and Characterization of Novel Cell-Penetrating Peptides from Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

Ngoc-Duc Doan[1,3], Myriam Létourneau[1,3], David Vaudry[2,3], Nicolas Doucet[1], Benjamin Folch[1], Hubert Vaudry[2,3], Alain Fournier[1,3,*] and David Chatenet[1,3*]

[1)] INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Ville de Laval, Québec H7V 1B7, Canada;
[2)] INSERM-U982, Laboratoire de Différenciation & Communication Neuronales & Neuroendocrines, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France;
[3)] Laboratoire International Associé Samuel de Champlain (INSERM - INRS – Université de Rouen).

Supporting Informations

Table S1 and Figure S1-S3

Table S1 : Analytical data obtained with MALDI-TOF spectrometry and with RP-HPLC.

Compounds	HPLC[a]	MS calculated[b]	MS found[b]
PACAP27	> 98%	3147.6	3148.3
Biotin-PACAP27	> 95%	3373.9	3374.6
PACAP38	> 98%	4534.3	4534.9
Biotin-PACAP38	> 95%	4760.6	6761.8
Biotin-TAT(48-60)	> 90%	1945.8	1946.3
FITC-Ahx-PACAP38	> 98%	5036.5	5037.2
FITC-Ahx-PACAP(28-38)	> 98%	1903.9	1904.7
PACAP(11-38)	> 98%	3409.5	3410.7
[Arg^{17}]PACAP(11-38)	> 95%	3438.6	3439.2
Biotin-[Arg^{17}]PACAP(11-38)	> 95%	3704.9	3705.7
FITC-Ahx-[Arg^{17}]PACAP(11-38)	> 95%	3940.8	3941.5
[Cys^{0}, Arg^{17}]PACAP(11-38)	> 95%	3541.8	3543.1
Id1/3-AP7	> 98%	2207.6	2208.7
FITC-Ahx-Id1/3-AP7	> 98%	2709.8	2710.5
FITC-Ahx-Id1/3-AP7-[Cys^{0}, Arg^{17}]PACAP(11-38)	> 95%	6249.6	6251.0

[a]Percentage of purity determined by HPLC
[b]Observed $[M+H]^+$ value compared with the calculated mass.

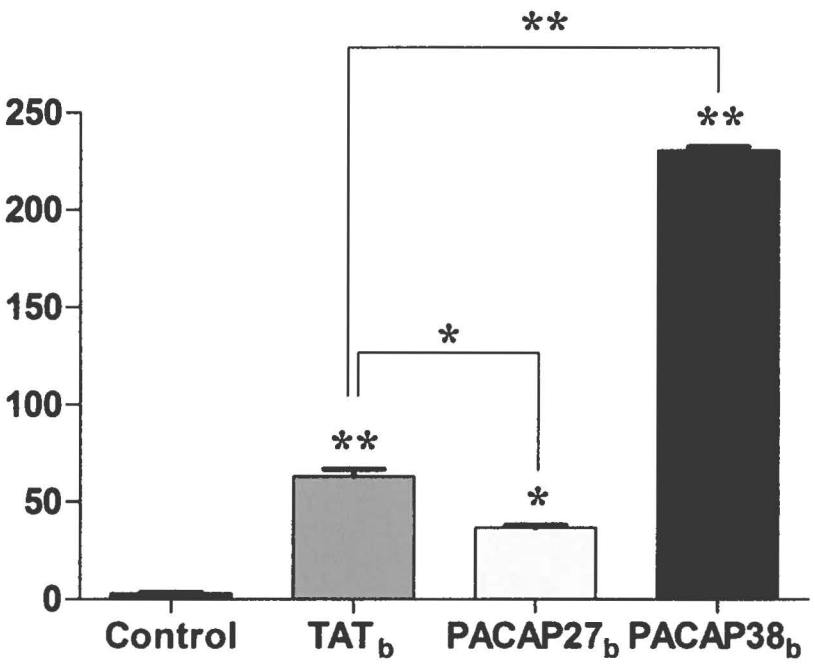


Figure S1. Transduction efficiency of TAT_b-Strep, $PACAP27_b$-Strep and $PACAP38_b$-Strep in living CHO-K1 cells as measured by confocal microscopy. Average fluorescent intensities of cells were analyzed by MetaMorph® Software (Molecular Divices). Each experience data is the mean of 3 imaged points (each point contains at least 30 cells) in one cover slip and repetitive for 3 times.

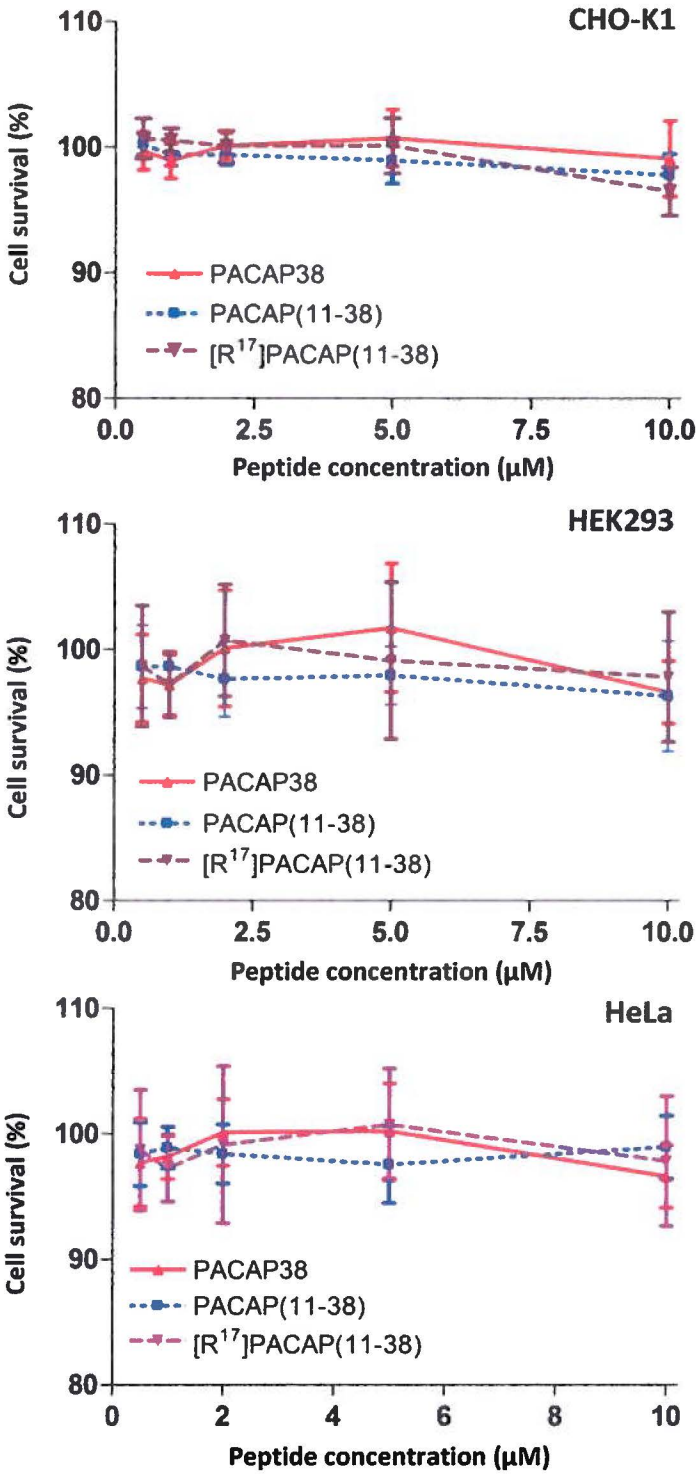


Figure S2. Viability of CHO-K1, HEK293 and HeLa cells treated with various concentrations of PACAPs. CHO-K1 cells seeded into 96-well plates at a density of 30000 cells/well were treated with various concentrations of PACAP38, PACAP(11-38) or [R^{17}]PACAP(11-38) (0.5 µM - 10 µM) for 4h. Cell viability was assessed by means of a MTT assay using a microplate reader. Control experiments, *i.e.* cell culture medium alone or with cells were included in each experiment. All assays were run in octuplicate.

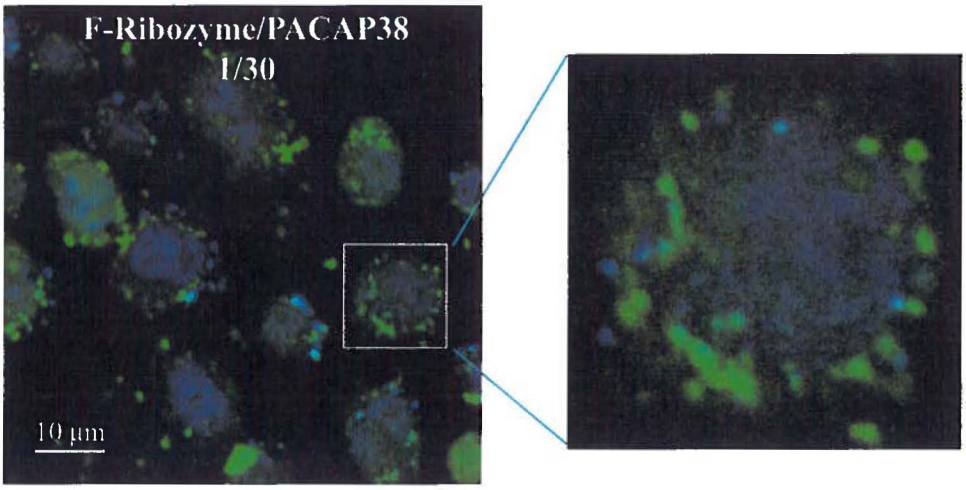


Figure S3. Subcellular distribution of PACAP38/FITC-ribozyme complex

Chapitre 5 : Discussion générale

5.1. Développement d'agonistes sélectifs pour les récepteurs PAC1 et VPAC1

Avec les accidents vasculaires cérébraux, les maladies neurodégénératives sont aujourd'hui considérées comme l'une des causes principales de décès. De ce fait, elles constituent un problème socio-économique important dans les pays industrialisés. À l'heure actuelle, les médicaments disponibles sur le marché sont incapables d'arrêter définitivement la progression de la neurodégénérescence et ne fournissent que des avantages modestes au niveau cognitif, comportemental et fonctionnel (Andreassen *et al.*, 2001; Brasnjevic *et al.*, 2009; Doody *et al.*, 2001; Kremer *et al.*, 1999). L'apoptose et l'inflammation sont les deux principaux phénomènes impliqués dans la progression de ces maladies (Friedlander, 2003; Glass *et al.*, 2010), de sorte que l'utilisation d'agents anti-inflammatoires et/ou anti-apoptotiques est actuellement considérée comme une avenue thérapeutique prometteuse. Plusieurs agents visant à protéger les neurones contre la mort cellulaire et ainsi réduire la progression de la maladie, sont actuellement en cours d'évaluation clinique (Friedlander, 2003). Toutefois, pour être efficace *in vivo* après une administration orale ou *i.v.*, ces composés doivent traverser la BHE pour atteindre leur cible biologique dans le SNC. La BHE, composée majoritairement de cellules endothéliales connectées les unes aux autres par des jonctions serrées, limite l'entrée dans le SNC de nombreuses molécules provenant de la circulation sanguine. La grande majorité des médicaments sont ainsi incapables de traverser cette barrière, ce qui limite leur usage thérapeutique (Pardridge, 2005). Par conséquent, des composés qui simultanément sont capables de traverser la BHE et possèdent des propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires pourraient s'avérer salutaires pour le traitement des maladies neurodégénératives. Le neuropeptide PACAP affiche ces propriétés et il est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. Il apparaît donc naturellement comme un candidat de choix pour le développement d'une stratégie efficace pour traiter les maladies neurodégénératives et d'autres formes de lésions au cerveau comme les accidents vasculaires cérébraux et certains retards mentaux tels que ceux associés au syndrome d'alcoolisme fœtal.

Le PACAP possède en effet de puissantes activités neuroprotectrices dans divers modèles *in vitro* et *in vivo* d'atteintes du cerveau, comme par exemple (i) la maladie de Parkinson (Reglodi

et al., 2004b), (ii) l'ischémie cérébrale (Reglodi *et al.*, 2000) et (iii) certains dommages traumatiques (Farkas *et al.*, 2004). Notamment, dans un modèle d'ischémie cérébrale, l'injection de PACAP *i.v.* ou *icv* réduit considérablement la taille de la zone infarcie (Dejda *et al.*, 2011b; Reglodi *et al.*, 2000; Tamas *et al.*, 2002). Cet effet neuroprotecteur est également observé lorsque ce peptide est injecté *iv* 24 heures après le début de l'évènement ischémique (Uchida *et al.*, 1996). De même, dans un modèle murin de la maladie de Parkinson utilisant la 6-OHDA comme agent neutoxique, un traitement avec du PACAP38 prévient la mort par apoptose des cellules dopaminergiques de la *substantia nigra* (Reglodi *et al.*, 2004b). Enfin dans un modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer, il fut observé qu'un traitement au PACAP par voie intranasale améliore nettement les fonctions cognitives chez les animaux (Rat *et al.*, 2011). Plusieurs études ont ainsi montré que le PACAP protège les cellules neuronales par le biais de son action anti-apoptotique (*via* l'activation du récepteur spécifique PAC1) et ses propriétés anti-inflammatoires (*via* l'activation du récepteur VPAC1) (Bourgault *et al.*, 2011; Bourgault *et al.*, 2009b). Donc, comme souligné précédemment, par leurs propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires, ainsi que par leur capacité à traverser la BHE, le PACAP et plusieurs de ses dérivés peuvent représenter une alternative thérapeutique efficace pour le traitement des maladies neurodégénératives ou des dommages cérébraux provenant de divers traumatismes.

Toutefois, les multiples activités biologiques du PACAP, tant au niveau central que périphérique, pourraient éventuellement provoquer des effets indésirables limitant ainsi son utilisation. En effet, l'injection *iv* de PACAP38 à des volontaires sains augmente de façon significative le rythme cardiaque (Birk *et al.*, 2007) suite à l'induction d'une vasodilatation périphérique (Dorner *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 1992). Il a également été démontré que le PACAP38 diminue la pression partielle de dioxyde de carbone à la fin de l'expiration chez des sujets en bonne santé (Birk *et al.*, 2007), en causant une augmentation de la ventilation (Ishizuka *et al.*, 1992; Runcie *et al.*, 1995). Des effets marqués sur la peau du visage et de la poitrine ont été observés chez les volontaires après l'injection *iv* de PACAP (Birk *et al.*, 2007). Enfin, le PACAP38 provoque des maux de tête chez des volontaires sains de même que chez des patients atteints de migraines (Schytz *et al.*, 2009). Ces effets indésirables, observés par exemple suite à une injection *iv* de PACAP, empêcheraient vraisemblablement son utilisation. Une des approches pour éviter ses effets serait le développement d'analogues ciblant préférentiellement les récepteurs impliqués

dans les actions anti-apoptotiques et anti-inflammatoires. Notamment, plusieurs études ont démontré que les effets indésirables du PACAP, tels que la tachycardie, l'hypotension et l'hyperventilation, sont principalement induits par l'activation des récepteurs VPAC2 (Fizanne *et al.*, 2004; Kellogg *et al.*, 2010; Linden *et al.*, 2003). En considérant que l'activation des récepteurs PAC1 et VPAC1 est principalement responsable des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires du PACAP, le développement de dérivés ciblant à la fois les récepteurs PAC1 et VPAC1 devient donc un objectif prioritaire

À cet égard, j'ai entrepris au cours de ma thèse l'analyse pharmacologique de plusieurs analogues du PACAP modifié au niveau des résidus de son extrémité N-terminale (Doan *et al.*, 2011b). Le segment N-terminal a été ciblé pour introduire des modifications conformationnelles et chimiques puisqu'il joue un rôle clé dans l'activité et la sélectivité du peptide envers les récepteurs (Bourgault *et al.*, 2011). Cette étude nous a ainsi permis d'identifier deux agonistes, *i.e.* [Hyp^2]- et [Ala^7]PACAP27, capables de lier et d'activer efficacement les récepteurs PAC1 et VPAC1 (comparable au peptide natif). De plus, ce n'est qu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire que ces analogues se lient au récepteur VPAC2 et qu'ils parviennent à l'activer très faiblement (Doan *et al.*, 2011b). L'évaluation de leur potentiel neuroprotecteur a démontré que ces dérivés sont capables de protéger les cellules dopaminergiques SH-SY5Y contre la toxicité du MPP^+, et ceci tant dans des expériences réalisées en pré- ou en cotraitement. En effet, le prétraitement des cellules SH-SY5Y avec les analogues sélectifs PAC1/VPAC1 induit une protection comparable à celle obtenue avec le PACAP27 ou le PACAP38 (Doan *et al.*, 2011b). De même, les expériences de cotraitement ont également démontré l'efficacité des dérivés à protéger de manière significative les cellules SH-SY5Y contre l'apoptose induite par le MPP^+. De plus, ces résultats sont confirmés par l'analyse de fragmentation d'ADN et de condensation de la chromatine (Doan *et al.*, 2011b). Il est important de noter que les cellules SH-SY5Y expriment de manière constitutive les récepteurs PAC1 et VPAC2 (Lutz *et al.*, 2006). L'effet neuroprotecteur n'ayant pas été observé avec le VIP (agoniste VPAC2), ou après un traitement avec le PACAP(6-38) (antagoniste PAC1), ces résultats indiquent que les deux analogues sélectifs PAC1/VPAC1 protègent les neurones dopaminergiques de l'apoptose et/ou de l'autophagie par le biais de l'activation du récepteur PAC1. Les expériences de prétraitement sont souvent choisies dans des modèles *in vitro* de maladies neurodégénératives car elles évitent la

concurrence entre la progression de l'insulte et l'effet neuroprotecteur des molécules testées. Cependant, d'un point de vue thérapeutique, des expériences de co- et de post-traitement sont plus pertinentes car elles sont davantage liées à l'état pathologique. Il est important de rappeler que les premiers symptômes de la maladie de Parkinson apparaissent généralement lorsqu'environ 80% des neurones dopaminergiques sont morts (Dauer *et al.*, 2003). De même, dans la maladie d'Alzheimer, cette dernière ne peut être diagnostiquée que lorsque 5% à 10% des cellules neuronales sont mortes et plus de 80% d'entre elles présentent une nette réduction de leurs neurites. Ceci produit une perte de connections entre les neurones et conséquemment, un dysfonctionnement cognitif (van de Nes *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2003). C'est à ce moment-là, lorsque le premier diagnostic est posé, qu'une thérapie médicamenteuse est prescrite. Ainsi, avec comme objectif le développement de dérivés du PACAP à potentiel thérapeutique, il est extrêmement utile d'observer un effet neuroprotecteur de ces analogues PAC1/VPAC1-sélectifs dans des expériences en cotraitement. Ces résultats suggèrent que ces analogues PAC1/VPAC1 pourraient être en mesure de ralentir voire arrêter la progression de la maladie.

Comme indiqué précédemment, les deux isoformes naturelles du PACAP possèdent la capacité d'entrer dans le SNC (Banks *et al.*, 1993; Dogrukol-Ak *et al.*, 2004). Il est ainsi fort probable que les modifications introduites au niveau du domaine N-terminal, responsable de l'activation des récepteurs (Ser^2 par Hyp^2 ou Thr^7 par Ala^7), ne changent pas les propriétés physicochimiques des peptides, ces derniers conservant ainsi leur capacité à traverser la BHE. Enfin, il faut noter que le PACAP27 est plus stable dans la circulation sanguine que le PACAP38 (Bourgault *et al.*, 2008a). Donc, l'effet neuroprotecteur des analogues sélectifs aux récepteurs PAC1/VPAC1, *i.e.* [Hyp^2]PACAP27 et [Ala^7]PACAP27, corrélé à leur stabilité plasmatique et leur probable capacité à traverser la BHE, confirme leur potentiel pour le traitement de diverses maladies neurodégénératives où l'apoptose et l'inflammation sont impliquées. Néanmoins, pour prouver l'utilité possible de nos analogues, des études plus approfondies dans des systèmes plus complexes et plus semblables aux conditions physiologiques ou pathologiques sont nécessaires. Par exemple, un système intégrant l'interaction des neurones avec des cellules microgliales activées serait avantageux pour évaluer l'effet de ces analogues sur la réponse inflammatoire. Enfin, un modèle *in vivo* sera également essentiel pour évaluer le potentiel thérapeutique des analogues peptidiques dans le traitement d'atteintes neurologiques.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence des éléments structuraux importants pour l'activation et la sélectivité des récepteurs du PACAP. Ainsi, le segment N-terminal du PACAP (His^1-Gly^4), qui est essentiel pour l'activité biologique, affiche une géométrie désordonnée quand le PACAP est en solution (Inooka *et al.*, 1992; Wray *et al.*, 1993) ou lié à des micelles de DPC (Bourgault *et al.*, 2009b). Cependant, les études réalisées dans le cours de ce travail suggèrent que l'extrémité N-terminale du PACAP adopte, lors de la liaison avec ses récepteurs, une conformation bioactive particulière semblable à un coude Asx-Pro, une structure étroitement liée à un coude β (Bourgault *et al.*, 2009b; Doan *et al.*, 2011b). Cette conformation est caractérisée par la présence de deux liaisons hydrogènes, l'une entre le carbonyle C=O de His^1 et le proton amide de Gly^4, comme observée dans les structures en coude β, et l'autre, entre l'atome d'azote δ du résidu His^1, *i.e.* position 3 du cycle imidazole, et le proton amide du résidu Asp^3 (**Figure 18**).

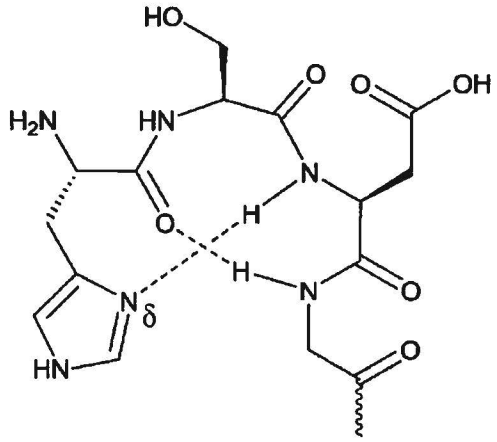


Figure 18: Représentation schématique du coude Asx-Pro présent dans l'extrémité N-terminale du PACAP

En effet, le remplacement du proton amide de Gly^4 par un groupement méthyle, *i.e.* [Sar^4]PACAP27 et [Sar^4]PACAP38, entraîne une perte significative de l'activité biologique du peptide. Nos résultats ont par ailleurs démontré que l'analogue [Sar^4]PACAP38 est un antagoniste non sélectif puissant des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 (résultats non publiés) (**Tableaux 9-11**). La suppression par N-méthylation de la liaison hydrogène entre l'atome d'azote δ du résidu His^1 et le proton amide du résidu Asp^3, *i.e.* [$His(3\text{-}Me)^1$]PACAP27 et [N-Me-Asp^3]PACAP27, génère des agonistes 100 fois moins puissants que le peptide natif. En revanche, l'incorporation d'un groupe méthyle en position 1 du noyau imidazole de His^1 n'affecte pas la

puissance du PACAP (Bourgault *et al.*, 2009b). De plus, en ligne directe avec ces observations, la substitution de Ser^2 du PACAP27 ou du PACAP38 par Pro, un acide aminé induisant un coude, a conduit à l'identification d'un agoniste puissant pour les récepteurs PAC1 et VPAC1 (les résultats du profil pharmacologique du [Pro^2]PACAP38 n'ont pas encore été publiés). Par contre, l'inversion de chiralité de Pro^2 dans cet analogue ([D-Pro^2]PACAP38) produit un antagoniste des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 (**Tableaux 9-11**). La substitution des résidus Ser^2 et Gly^4 du PACAP27, respectivement par D-Pro et Sar, *i.e.* [D-Pro^2]PACAP27 et [Sar^4]PACAP27, produit également des antagonistes des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2, mais avec de faibles affinités de liaison (résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que l'incorporation du résidu Pro à la position 2 induit des contraintes conformationelles spécifiques semblables à celles de la conformation bioactive du PACAP. Des études par RMN ont ainsi révélé la présence dans [Pro^2]PACAP27 d'une structure bien définie semblable à la structure du type coude Asx-Pro (Bourgault *et al.*, 2009b) (**Figure 19**). D'ailleurs, une étude a démontré la capacité du tripeptide His-Pro-X à adopter une structure compacte et bien définie qui ressemble à un coude Asx-Pro (Blank *et al.*, 2000). Cette observation, complémentaire à nos résultats de structure-activité, supporte l'existence d'une structure spécifique dans le domaine N-terminal du PACAP quand ce dernier est en contact avec son récepteur. Toutefois, la substitution de Ser^2 par D-Pro provoque des restrictions structurales qui ne sont pas compatibles avec l'activation du récepteur. Il est donc possible que cette limitation provenant du D-Pro empêche le résidu His^1 d'entrer efficacement en contact avec son site d'interaction. Cette hypothèse est supportée par l'importance de His^1 pour l'activité du peptide (Bourgault *et al.*, 2009b; Hou *et al.*, 1994; Robberecht *et al.*, 1992a).

Tableau 9: Affinité de liaison

Analogues	Masse moléculaire (Da)		Affinité (pIC_{50})		
	(observée)	(calculée)	PAC1	VPAC1	VPAC2
PACAP38	4534.5	4535.3	8.21 ± 0.08	8.17 ± 0.09	7.76 ± 0.15
[Pro^2]PACAP38	4544.7	4544.3	8.06 ± 0.14	7.76 ± 0.11	6.69 ± 0.09
[D-Pro^2]PACAP38	4545.1	4544.3	7.13 ± 0.11	6.54 ± 0.09	6.33 ± 0.13
[Sar^4]PACAP38	4549.3	4550.6	7.30 ± 0.16	5.80 ± 0.13	6.05 ± 0.08

Tableau 10: Activité agoniste (mobilisation calcique)

Analogues	PAC1		VPAC1		VPAC2	
	pEC_{50}	E_{Max} (%)	pEC_{50}	E_{Max} (%)	pEC_{50}	E_{Max} (%)
PACAP38	8.34 ± 0.09	100.0 ± 4.3	7.81 ± 0.08	101.2 ± 3.4	7.59 ± 0.07	101.7 ± 1.7
[Pro^2]PACAP38	7.79 ± 0.06	96.5 ± 1.8	7.25 ± 0.07	101.7 ± 2.6	6.42 ± 0.14	74.6 ± 5.2
[D-Pro^2]PACAP38	< 5	74.4 *	inactif		inactif	
[Sar^4]PACAP38	< 5	55.7 *	inactif		inactif	

*) Réponse maximale obtenue à concentration de 10^{-5} M.

Tableau 11: Activité antagoniste (mobilisation calcique)

Analogues	pIC_{50}		
	PAC1	VPAC1	VPAC2
[D-Pro^2]PACAP38	7.00 ± 0.14	6.01 ± 0.12	6.36 ± 0.08
[Sar^4]PACAP38	6.57 ± 0.11	6.01 ± 0.13	6.30 ± 0.09

La sélectivité des analogues [Pro^2]- et [Hyp^2]PACAP27 envers les récepteurs PAC1/VPAC1 suggère l'existence d'une structure bioactive essentiellement spécifique pour la reconnaissance des récepteurs PAC1 et VPAC1. Ces analogues, *i.e.* [Pro^2]PACAP27 et [Hyp^2]PACAP27, produisent seulement une faible activation du récepteur VPAC2 dans un test de mobilisation de calcium intracellulaire ([Hyp^2]PACAP27, E_{max} = 23 ± 5% et [Pro^2]PACAP27, E_{max} = 87 ± 7% à 10^{-5} M). Ces observations pourraient s'avérer utiles pour le développement de dérivés peptidiques de petite taille agissant sur le système PACAPergique et utiles pour le traitement des maladies neurodégénératives. Par ailleurs, la similarité de séquence existant entre le PACAP et les autres membres de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH (**Tableau 3**) suggère que ce coude Asx-Pro ne serait pas seulement crucial pour l'activation des récepteurs PAC1 et VPAC1, mais pourrait également être nécessaire pour la liaison et l'activation des autres RCPGs de la classe B.

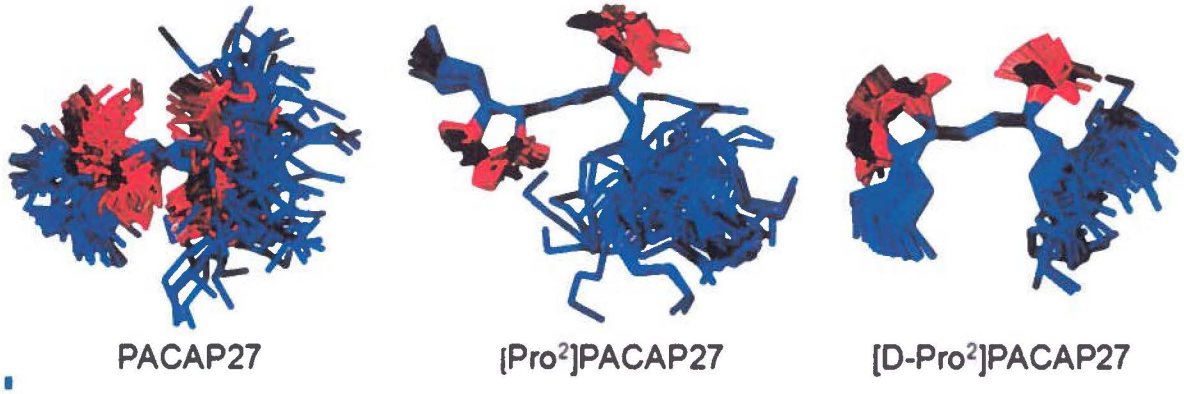


Figure 19 : Superposition des conformations de plus basse énergie des résidus 2 et 3 de PACAP27, [Pro^2]PACAP27 et [D-Pro^2]PACAP27. Tiré de Bourgault *et al.*, 2009b.

La présence d'une structure secondaire spécifique pour le PACAP a été initialement suggérée en comparant les structures primaires du PACAP et du VIP. Ainsi, une différence structurale majeure existe entre ces deux peptides au niveau des domaines 4-13 et 24-28. Il est établi que le VIP ne se lie pas efficacement au PAC1 et des études de type structure-activité ont par ailleurs démontré que le segment 24-28 n'est pas impliqué dans la sélectivité du PACAP envers le PAC1 (Onoue *et al.*, 2001; Schafer *et al.*, 1999). En effet, l'analogue [Asn^{24}, Ser^{25}, Ile^{26}, Asn^{28}] PACAP38 présente un profil pharmacologique similaire à celui observé pour la molécule-mère (Schafer *et al.*, 1999). Par contre, les analogues [Ala^4]PACAP27, [Val^5]PACAP27 et [Ala^4, Val^5]PACAP27 affichent une diminution importante de l'activité biologique pour le récepteur PAC1 (Schafer *et al.*, 1999) tandis que le dérivé [Gly^4, Ile^5, Ser^9]VIP s'avère capable de se lier à PAC1 et de l'activer (Onoue *et al.*, 2001). De plus, le fragment [Gly^4, Ile^5]VIP(1-10), contrairement au VIP, présente une structure tridimensionnelle similaire au PACAP(1-10) (Onoue *et al.*, 1999). Des études de spectroscopie RMN ont ainsi démontré l'existence d'une structure apériodique (épingle β) stable au niveau de l'extrémité N-terminale (résidus 3 à 7) lorsque le neuropeptide est lié au récepteur PAC1 (Inooka *et al.*, 2001). Cette structure unique est constituée de deux coudes β successifs, un de type II' regroupant les résidus Asp^3, Gly^4, Ile^5 et Phe^6 et l'autre de type I qui s'étend de Gly^4 à Thr^7. Cependant, notre étude démontre que la stabilisation de ces structures par l'incorporation de mimétiques de coude β abolit complètement la capacité du PACAP à se lier et à activer ses récepteurs (Doan *et al.*, 2011b). De plus, le

remplacement de Gly^4 avec le résidu 2-aminoisobutyrique (Aib), un promoteur d'hélice et de coude β, n'a pas causé une perte dramatique de l'affinité de liaison et de l'activité pour les récepteurs du PACAP. En accord avec une hypothèse de notre équipe (Bourgault *et al.*, 2009b), nous avons suggéré que cette structure unique observée par Inooka et ses collègues pouvait être le résultat d'un changement de conformation qui se produit à l'étape de liaison et qui est étroitement lié à l'intégrité de l'hélice α, une structure cruciale pour l'arrimage initial du PACAP au récepteur PAC1. Cette structure hélicoïdale commencerait au niveau du résidu Ile^5 du PACAP et participerait à la stabilisation de la conformation bioactive du peptide lors de son contact avec le récepteur. Par conséquent, selon notre hypothèse, l'impossibilité du VIP à se lier et à activer efficacement le récepteur PAC1 serait due, au moins en partie, à son incapacité à former une structure de type coude β au niveau du domaine N-terminal.

Récemment, il a été suggéré que la structure du PACAP est stabilisée par des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales de Phe^6 et de Tyr^{10}, et par la présence d'une liaison hydrogène entre la chaîne latérale de Thr^7 et le proton amide du résidu Tyr^{10} ou Ser^{11} (Neumann *et al.*, 2008). Au cours de notre étude, nous avons constaté que le remplacement du résidu Phe^6 par les acides aminés Tyr, cyclohexylalanine (Cha), biphénylalanine (Bip) ou naphtylalanine (Nal) ne modifie pas significativement les propriétés de liaison des analogues du PACAP, mais module leur spécificité envers les différents récepteurs. En revanche, l'introduction d'une alanine à la place de Phe^6 abolit la liaison du PACAP à ses récepteurs. Ces résultats suggèrent que l'encombrement stérique en position 6, jumelé à l'hydrophobicité, sont plus essentiels que l'aromaticité pour la reconnaissance des récepteurs. L'interaction hydrophobe entre les chaînes latérales des résidus Phe^6 et Tyr^{10} semble donc importante pour stabiliser l'hélice α de ce domaine. Il faut aussi noter que l'analogue [Ala^7]PACAP27 se comporte comme un agoniste PAC1/VPAC1-sélectif. Ce résultat suggère la participation active du groupement hydroxyle de Thr^7, probablement par le biais d'une liaison hydrogène, au mécanisme de reconnaissance avec le récepteur VPAC2. Dans l'hypothèse où il y a présence d'un pont hydrogène, il n'est pas encore établi s'il est de nature intra- ou intermoléculaire. Il est probable qu'une telle liaison hydrogène existe également avec le VIP car le résidu Thr^7 de ce peptide est aussi un élément clé pour la reconnaissance du récepteur VPAC2 (Hoare, 2005). En accord avec des études précédentes (Neumann *et al.*, 2008; Nicole *et al.*, 2000), nous avons alors suggéré qu'un motif N-*capping* de

type IA pouvait être nécessaire pour la reconnaissance du récepteur VPAC2, si le pont H est intramoléculaire. Des caractérisations pharmacologiques et structuralles plus approfondies seront nécessaires pour clarifier ce postulat.

Comme mesuré avec le test de mobilisation calcique intracellulaire, les analogues [Hyp^2] PACAP27 et [Ala^7]PACAP27 produisent à 10^{-5} M une faible activation des récepteurs VPAC2 ([Hyp^2]PACAP27, E_{max} = 23 ± 5%; [Ala^7]PACAP27, E_{max} = 41 ± 5%). Cette première génération d'analogues PAC1/VPAC1-sélectifs, caractérisée par une faible liaison et activation de VPAC2, pourrait malgré tout causer des effets non désirés. Cependant, il est à noter que le PACAP présente des effets neuroprotecteurs puissants, à des concentrations de l'ordre du femtomolaire contre la toxicité induite par la protéine d'enveloppe gp120 du VIH (Brenneman *et al.*, 2002), les lipopolysaccharides (Kong *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006) ou encore le prion (Onoue *et al.*, 2002b). De plus, dans plusieurs modèles d'ischémie cérébrale, les concentrations actives de PACAP sont également à l'échelle du picomolaire (Ohtaki *et al.*, 2008; Tamas *et al.*, 2002). En conséquence, l'utilisation d'analogues tels [Hyp^2]PACAP27 et [Ala^7]PACAP27 pourrait être une stratégie prometteuse pour le traitement de maladies neurodégénératives puisqu'ils sont efficaces à faibles concentrations, ce qui réduit voire élimine les risques d'effets secondaires produits par l'activation du récepteur VPAC2.

5.2. Pharmacologie intracrine du PACAP

À l'heure actuelle, le mécanisme moléculaire impliqué dans l'effet neuroprotecteur *in vitro* ou *in vivo* du PACAP à de faibles concentrations, n'est pas encore complètement élucidé. Dans un modèle de coculture de neurones et de cellules gliales, il semble que l'effet neuroprotecteur induit par le PACAP38, à des concentrations subpicomolaires, soit régulé par l'activation des MAPK ainsi que par la protéine kinase AMPc-dépendante et/ou par l'expression de l'ADNP (Li *et al.*, 2005). Un autre mécanisme pouvant expliquer ces activités à très faible concentration est basé sur une action intracrine postulée pour le PACAP (Li *et al.*, 2004). Le terme intracrine, proposé par le groupe de Richard N. Re dans les années 1980, décrit des hormones et des facteurs de croissance pouvant agir sur des sites intracellulaires, soit après leur internalisation, soit après leur librération dans l'environnement intracellulaire (Re *et al.*, 1984; Re, 1989). Les facteurs intracrines agissent généralement sur des cibles situés à proximité du noyau, des nucléoles, des mitochondries, des composantes du cytosquelette, ou d'autres composantes

intracellulaires. En effet, nombre de récepteurs d'hormones ou de cytokines ont été trouvés au noyau (Booz *et al.*, 1992; Gobeil *et al.*, 2006; Gwathmey *et al.*, 2010; Planque, 2006). De plus, la présence des protéines G hétérotrimériques dans le Golgi, le réticulum endoplasmique et le noyau, ainsi que la démonstration de l'activation d'ERK et des MAP kinases p38 par des récepteurs nucléaires couplés aux protéines G, supportent le concept que la signalisation intracellulaire classique est également présente à la membrane nucléaire (Boivin *et al.*, 2008; Gobeil *et al.*, 2006). À cet égard, la présence de récepteurs intracellulaires pour le VIP et le PACAP, comme observé dans les cellules germinales testiculaires (Li *et al.*, 2004), les tumeurs mammaires (Valdehita *et al.*, 2010) ou encore les cellules d'adénocarcinome du côlon (Omary *et al.*, 1987), a soulevé la possibilité de l'existence d'un système intracrine pour le PACAP. Dans la continuité de ces travaux, nous avons ainsi démontré que cette distribution nucléaire/ périnucléaire des récepteurs du PACAP était également retrouvée dans la rate, et la glande surrénale, mais pas dans le rein (**Figure 20**), suggérant ainsi l'importance de ce système intracrine dans les processus physiologiques associés au PACAP.

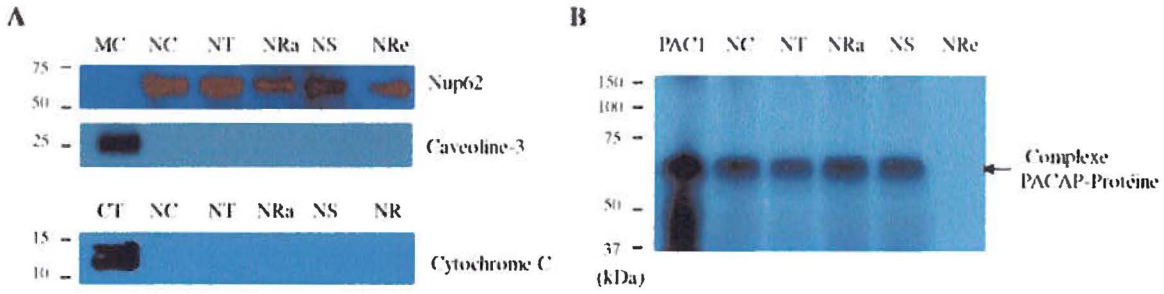


Figure 20: Identification des sites de liaison du PACAP dans les préparations nucléaires de tissus isolés du rat. (**A**) La pureté de chaque préparation nucléaire isolée a été évaluée par immunobuvardage de type Western, en utilisant des anticorps anti-Nup62, anti-cavéoline 3 et anti-cytochrome C. MC: fraction membranaire isolée à partir du cerveau de rat; NC: fraction nucléaire isolée à partir du cerveau de rat; NT: fraction nucléaire isolée à partir du testicule de rat; NRa: fraction nucléaire isolée à partir de la rate de rat; NS: fraction nucléaire isolée à partir de la glande surrénale de rat; NRe: fraction nucléaire isolée à partir du rein de rat. La fraction membranaire du cerveau (NC) et les protéines totales isolées à partir du cerveau (CT) ont été utilisées comme témoins. (**B**) des complexes photomarqués caractérisé par autoradiographie dans des fractions nucléaires isolées à partir de différents tissus de rat et à partir des cellules transfectées CHO-PAC1 (PAC1).

Étant donné que le PACAP stimule la mobilisation calcique et l'initiation de la transcription dans les noyaux de tissus du testicule isolés chez le rat, ces récepteurs apparaissent donc fonctionnels et sont éventuellement impliqués dans la régulation des gènes. En effet, la plupart des voies de signalisation associées aux RCPGs membranaires ont également été trouvés dans le noyau (Tadevosyan *et al.*, 2012). En fait, lors de la liaison de ligands, les récepteurs subissent un changement de conformation qui permet le recrutement de multiples complexes de coactivateurs. Certaines de ces protéines sont des facteurs de remodelage de la chromatine ou elles possèdent une activité acétylase d'histones, tandis que d'autres peuvent interagir directement avec les machineries de la transcription. Cela inclut de nombreuses protéines G comme les trois formes principales de la protéine α et les complexes βγ (Boivin *et al.*, 2005; Gobeil *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2001). En outre, les effets des récepteurs nucléaires sont généralement associés avec le recrutement de corégulateurs (Aranda *et al.*, 2001; Meier, 1997), y compris l'AC (Yamamoto *et*

al., 1998b), la PLA_2, la $PLC\beta_1$ et la $PLC\delta_1$ (Freyberg *et al.*, 2001), ainsi que plusieurs ions tels que le Ca^{2+}, le K^+ et le Cl^- (Tadevosyan *et al.*, 2012). De plus, des messagers secondaires associés à des voies de signalisation, y compris l'AMPc, le Ca^{2+} (Sastri *et al.*, 2005; Boivin *et al.*, 2006), l'IP3 et le DAG, sont également présents au niveau du noyau ou générés dans des noyaux isolés (Boivin *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Sastri *et al.*, 2005). Par exemple, la capacité à stimuler la libération de calcium nucléaire, et par conséquent l'expression des gènes, a déjà été démontrée pour les récepteurs nucléaires de l'endothéline, de l'angiotensine, de même que pour les récepteurs β-adrénergiques (Boivin *et al.*, 2003; Tadevosyan *et al.*, 2010; Tadevosyan *et al.*, 2012; Vaniotis *et al.*, 2010). De plus, il a été démontré que l'augmentation du Ca^{2+} au nucléoplasme module l'activité de plusieurs facteurs de transcription et de plusieurs kinases tels que la *CREB binding protein* (CBP) (Chawla *et al.*, 1998), le *E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1* (Elk-1) (Pusl *et al.*, 2002), le *transcription enhancer factor* (TEAF) (Thompson *et al.*, 2003), le *dowstream regulatory element antagonist modulator* (DREAM), la PKC, la *Src-like* kinase et la MAPK/ERK kinase (Gomes *et al.*, 2006). Ces dernières régulent un large éventail d'activités cellulaires. Ces résultats suggèrent ainsi que ces récepteurs intracellulaires joueraient un rôle majeur et complémentaire dans les activités biologiques associées au neuropeptide PACAP. En accord avec cette idée, Li et ses collègues ont observé la stimulation par le PACAP de la MAPK et de ERK dans des fractions cytosoliques produites à partir de cellules germinales testiculaires (Li *et al.*, 2004). Le rôle spécifique d'un tel système intracellulaire n'a pas encore été étudié mais celui-ci pourrait être impliqué dans des effets biologiques tels ceux reliés au phénomène de neuroprotection du PACAP (Bourgault *et al.*, 2009b; Ko *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005). Par ailleurs, la stimulation de ces récepteurs nucléaires pourrait activer des voies de signalisation différentes de celles associées classiquement au système membranaire, comme démontré pour le système rénine-angiotensine (Cook *et al.*, 2001), le récepteur GPR30 des oestrogènes (Dennis *et al.*, 2009) ou encore le récepteur métabotropique 5 du glutamate (Jong *et al.*, 2009). Bien que des études plus approfondies soient nécessaires pour clarifier ces hypothèses, un tel système intracellulaire devrait désormais être pris en compte pour expliquer les actions physiologiques et physiopathologiques du PACAP.

Une question clé concernant la manière dont ces récepteurs intracellulaires sont activés par leurs ligands endogènes reste cependant en suspens. L'endocytose associée à l'internalisation du

récepteur suite à son activation serait une voie possible de translocation du PACAP dans le compartiment intracellulaire. Néanmoins, la capacité du PACAP, composé d'une hélice α fortement basique, à se dissocier de son récepteur pour ensuite quitter les vésicules endocytiques, est encore inconnue. Cependant, il a été démontré que la dissociation de ^{125}I-PACAP27 lié à son récepteur est lente et incomplète (Mao *et al.*, 1998). Ainsi, la voie d'internalisation dépendante du récepteur ne semble pas être la route d'entrée majoritaire de ce neuropeptide. Au cours de cette thèse, nous avons démontré que les deux isoformes du PACAP sont capables de traverser la membrane cellulaire par un mécanisme récepteur-indépendant (Doan *et al.*, 2012a). L'étude que nous avons menée a révélé que les deux isoformes du PACAP pénètrent efficacement dans le compartiment interne de la cellule par translocation directe ainsi que par endocytose dépendante de la clathrine et par macropinocytose. Aux concentrations physiologiques, le PACAP27 pénètre rapidement dans les cellules par translocation directe, un mécanisme qui libère directement le neuropeptide dans le cytosol. Le fait que les deux isoformes du PACAP, à une concentration physiologique, soient capables de pénétrer dans les cellules par translocation directe suggère que ces peptides peuvent être disponibles pour interagir avec leurs cibles intracellulaires et que ce processus pourrait conduire au contrôle d'événements cellulaires. Notre étude a également prouvé qu'une fois à l'intérieur des cellules, le PACAP38 n'est pas entièrement dégradé par les enzymes et qu'une quantité importante du peptide intact est également en mesure de ressortir des cellules.

Outre la présence de récepteurs nucléaires et la capacité du PACAP à traverser la membrane cellulaire de façon bidirectionnelle, la pharmacologie intracrine de ce neuropeptide est également supportée, au moins au niveau testiculaire, par sa pharmacologie autocrine-paracrine (Winters *et al.*, 2011). Le PACAP endogène, sécrété dans l'environnement extracellulaire, pourrait entrer dans les cellules par translocation directe ou endocytose afin d'activer ses récepteurs ou autres cibles intracellulaires. D'autre part, le peptide dans le cytosol des cellules gonadotropes suite à sa biosynthèse, pourrait ainsi activer directement ses récepteurs intracellulaires. En effet, du PACAP endogène a été retrouvé dans l'environnement cytosolique des spermatides et ce peptide est co-immunoprécipité avec son récepteur intracellulaire (Li *et al.*, 2004). En outre, il fut démontré que la transcription testicule-spécifique du gène du PACAP humain est associée à une absence de peptide signal (Tominaga *et al.*, 2010), ce qui entraîne l'absence de secretion du

PACAP. Finalement, avec sa capacité à passer à travers la membrane lipidique dans les deux directions (entrée et sortie), il est fort possible que ce peptide puisse sortir des granules de sécrétion avant que ces dernières soient en état de fusion avec la membrane plasmique (**Figure 21**).

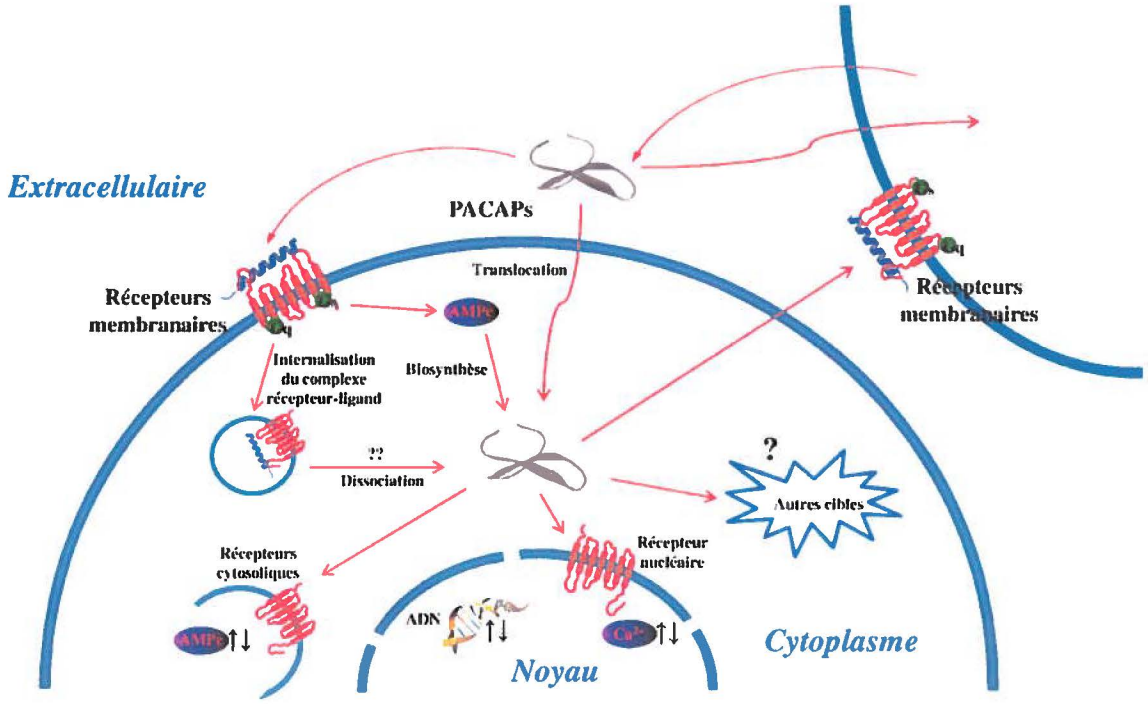


Figure 21: Pharmacologie intracrine du PACAP. Le PACAP endogène ou exogène présent dans la matrice extracellulaire peut activer les récepteurs membranaires induisant la biosynthèse de PACAP dans le cytoplasme. Le PACAP dans la matrice extracellulaire peut également entrer dans le cytoplasme par une internalisation dépendante ou non du récepteur. Le neuropeptide intracellulaire active les récepteurs du cytosol ou du noyau et stimule la production de messagers secondaires. Ce peptide peut également sortir du cytosol pour se diriger vers la matrice extracellulaire afin d'agir de façon similaire sur la même cellule ou les autres cellules du système physiologique.

5.3. Développement de nouveaux transporteurs peptidiques basés sur la séquence du PACAP

Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la capacité du PACAP à traverser efficacement la membrane cellulaire par un mécanisme indépendant de l'internalisation du récepteur. Nous avons ainsi cherché à développer des analogues du PACAP pouvant être utilisés comme CPP pour le transport vers l'intérieur de la cellule de divers types d'agents. Ainsi, nous avions observé que le complexe PACAP38-fluorescéine pénètre beaucoup plus facilement à l'intérieur de la cellule que le TAT(48-60)-fluorescéine. Cette observation a ensuite été validée par la capacité du PACAP biotinylé ($PACAP27_b$ et $PACAP38_b$) à livrer efficacement une molécule de streptavidine à l'intérieur de la cellule. Ces résultats permettent donc d'anticiper de nouvelles applications thérapeutiques pour le PACAP ou ses dérivés. De plus, à cause de son caractère endogène, le PACAP devrait être très utile dans la conception d'un CPP dénué d'effets secondaires indésirables, car il ne devrait pas induire de réponses immunitaires ou d'actions toxiques. En accord avec cette hypothèse, plusieurs dérivés de la calcitonine humaine, un autre peptide de la superfamille VIP/Glucagon/Sécrétine, ont été utilisés comme CPP depuis quelques années (Trehin *et al.*, 2004b). Toutefois, leur faible capacité de pénétration (Trehin *et al.*, 2004a) a limité leur usage. Ainsi avec une efficacité de translocation élevée, le PACAP pourrait fournir une alternative additionnelle et efficace pour remplacer les dérivés de hCT.

Toutefois, l'utilisation du PACAP sous sa forme native, comme transporteur peptidique, est restreinte par ses activités biologiques. À ce titre, la conception de dérivés inactifs du PACAP représente alors une bonne alternative. Dans ce travail, sur la base de nos études initiales, nous avons ainsi développé deux formes inactives, *i.e.* PACAP(11-38) et [Arg^{17}]PACAP(11-38), se comportant comme des CPPs. Nos études ont par exemple révélé la capacité du dérivé [Arg^{17}]PACAP(11-38) à livrer efficacement à l'intérieur de différentes lignées cellulaires (CHO-K1, HEK293 et HeLa) des cargaisons variées tels qu'une petite molécule (fluorescéine), des peptides non pénétrants (Id1/3-PA7), une protéine de haut poids moléculaire (Strep) ou encore des polynucléotides (ADN et ribozyme). L'efficacité de translocation de ce peptide semble être comparable à celle du TAT dans des conditions similaires, démontrant ainsi le fort potentiel de ce nouveau CPP pour la livraison non invasive de divers composés.

L'efficacité de tels transporteurs est principalement liée à leur capacité à libérer leur cargaison dans l'environnement intracellulaire, sans être encapsulés et ensuite dégradés dans les vésicules endosomales ou lysosomales. Notre étude démontre que la translocation directe, qui permet l'acheminement du transporteur peptidique et de sa cargaison dans le cytosol, est clairement impliquée dans le mécanisme d'entrée du dérivé fluorescent de [Arg^{17}]PACAP(11-38). Nos études mécanistiques ont également suggéré qu'après l'internalisation, [Arg^{17}]PACAP(11-38) serait libéré de l'endosome ou du macropinosome directement dans le cytosol. Bien que le mécanisme d'entrée des complexes CPP-cargaison soit dépendant du type de cargaison, l'absence de distribution ponctuée dans des cellules exposées à des complexes peptide- ou protéine-CPP nous amène à supposer la présence des cargaisons dans l'environnement cytoplasmique (**Figure 22**). Ainsi, l'efficacité du dérivé [Arg^{17}]PACAP(11-38) à livrer une cargaison à l'intérieur de la cellule et à la rendre disponible a été mis en évidence par la transfection avec succès de la protéine fluorescence verte (GFP) dans des cellules CHO-K1. Il appert qu'une fois internalisé dans la cellule par translocation directe et/ou endocytose, le complexe est déstabilisé afin de libérer l'ADN dans le cytosol. L'efficacité intrinsèque du [Arg^{17}]PACAP(11-38) comme agent de transfection s'est avérée comparable à celle de la Lipofectamine 2000 tout en étant dépourvu de toxicité pour les cellules. En résumé, ces résultats suggèrent que le composé [Arg^{17}]PACAP(11-38) ou d'autres dérivés avec des caractéristiques similaires voire améliorées auraient de nombreuses applications dans la livraison *in vitro* ou *in vivo* de composés pharmaceutiques ou biotechnologiques d'intérêt.

La nature endogène de ce neuropeptide peut présenter un avantage très important en vue de la conception d'analogues inactifs afin de les utiliser comme CPP. En effet, l'injection répétée de PACAP ne devrait pas engendrer une réponse immunologique puisque ce peptide de même que ses métabolites ne sont pas reconnus par le système immunitaire. Ce n'est pas le cas avec les CPPs d'origine virale ou de synthèse qui peuvent provoquer une réponse immune et des effets toxiques. Il a notamment été démontré que l'administration chez la souris de pénétratine ou de TAT(48-60) produit une réduction significative de l'expression des ARNm de la MAP kinase p38 (Moschos *et al.*, 2007). De plus, *via* des interactions avec les récepteurs *Toll-like*, la pénétratine affecte le système immunitaire inné (Low *et al.*, 2007b). De même, les CPPs synthétiques conçus sur la base de propriétés physicochimiques et/ou conformationnelles, sans

canevas de source naturelle, pourraient activer des réponses immunitaires et/ou interagir avec des cibles indésirables (Kuo *et al.*, 2009). L'utilisation du PACAP et de dérivés inactifs comme système de transport pourrait par conséquent réduire sinon éliminer les limitations déjà connus des CPPs et ouvrir ainsi de nouvelles perspectives dans le domaine biomédical.

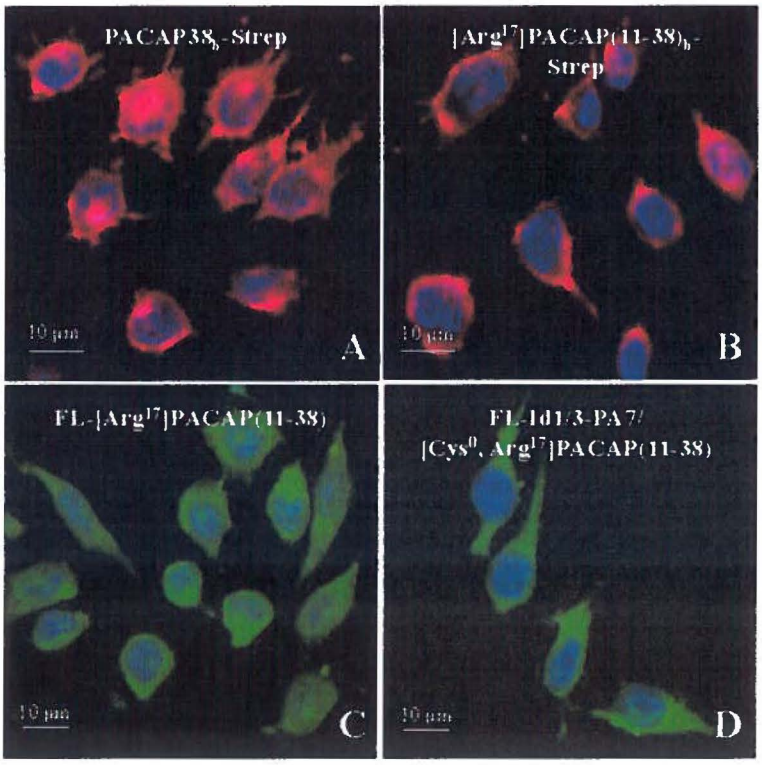


Figure 22: Distribution intracellulaire des complexes peptide-cargaison. (**A**) et (**B**) Distribution subcellulaire des complexes du PACAP38 et de [Arg^{17}]PACAP(11-38) biotinylés formés par liaison avec la protéine streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor® 568. (**C**) et (**D**) présentent la distribution homogène du peptide fluorescent FL-[Arg^{17}]PACAP(11-38) et FL-Id1/3-[Cys^0, Arg^{17}]PACAP(11-38) dans les compartiments intracellulaires.

En effet, le développement de CPPs avec des activités biologiques intrinsèques offre présentement une nouvelle stratégie pour la modulation d'événements intracellulaires (Divita, 2010; Jones *et al.*, 2010). L'objectif de cette stratégie est de toucher en parallèle plusieurs cibles complémentaires. Cette approche se base sur la thérapie combinatoire qui est présentement une des méthodes les plus efficaces pour prévenir ou traiter des maladies humaines comme le cancer,

le paludisme, la tuberculose, ainsi que les maladies cardiovasculaires. Par définition, le PACAP est déjà un CPP bioactif, car il peut moduler l'expression des gènes par le biais de l'activation des récepteurs membranaires/cytosoliques/nucléaires (Doan *et al.*, 2012a). En fait, avec ses propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires *via* l'activation des récepteurs membranaires et sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, le PACAP est actuellement un candidat prometteur pour ralentir, stopper ou même modifier sans danger l'évolution de maladies neurologiques (Bourgault *et al.*, 2009a; Doan *et al.*, 2011a). De plus, bien que le rôle spécifique des sites de liaison intracellulaires du PACAP n'ait pas encore été décrit, ce système retouvé au sein de la cellule pourrait vraisemblablement favoriser l'apparition d'effets biologiques bénéfiques associés au neuropeptide (Doan *et al.*, 2012a). En conséquence, le couplage du PACAP avec d'autres composés bioactifs ayant une cible intracellulaire pourrait produire des dérivés agissant en synergie sur un même site ou des sites complémentaires. Nous aurions alors des médicaments multifonctionnels pour le traitement de maladies spécifiques. Par exemple, nous pouvons imaginer un complexe CPP-cargaison composé de trois domaines fonctionnels, *i.e.* un transporteur bioactif (PACAP38), un inhibiteur de la kinase c-Jun N-terminal (JNKI) et un lien moléculaire clivable par une caspase. Or, lorsqu'internalisé dans la cellule, ce complexe serait clivé par une caspase entraînant ainsi la libération du PACAP bioactif et d'un inhibiteur de JNKI. Ainsi, ces deux molécules libérées dans le milieu intracellulaire agiraient en parallèle en inhibant deux voies dictinctes du processus d'apoptose. Nous avons déjà constaté que JNKI-1 seul peut pénétrer dans les cellules, mais avec une très faible efficacité (**Figure 23**). Par contre, le couplage de ce peptide au PACAP améliore de façon spectaculaire sa pénétration dans des cellules modèles. L'évaluation de l'effet biologique de ce complexe multifonctionnel est présentement en cours dans un modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale, dans le laboratoire de notre collaborateur le Dr David Vaudry de l'Université de Rouen.

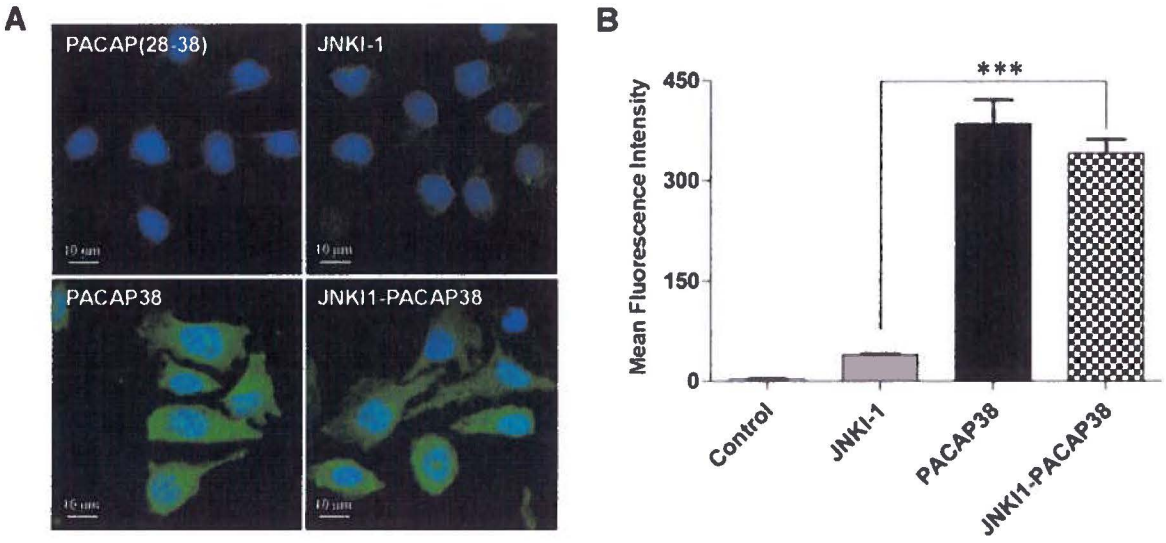


Figure 23: (A) Distribution dans des cellules CHO-K1 vivantes non transfectées du PACAP (28-38), du JNKI-1, du PACAP38 et du JNKI-1 – PACAP38 conjugués à la fluorescéine (au moyen du FITC). Les noyaux ont été colorés avec DRAQ5TM. (B) Efficacité de transduction dans des cellules CHO-K1 de peptides conjugués à la fluorescéine. Les cellules ont été incubées pendant 1h avec des peptides fluorescents (10^{-6} M) avant l'analyse par FACS.

Un autre exemple de l'effet bénéfique possible des CPPs basés sur le PACAP est la livraison du SOFA-HDV-ribozyme, un ribozyme qui reconnaît des régions conservées d'ARNm des virus influenza A (Motard *et al.*, 2011). Dans ce modèle, le ribozyme clive catalytiquement les cibles correspondantes d'ARNm viral tandis que PACAP inhibe l'apoptose cellulaire et l'inflammation, deux processus majeurs qui sont associés à une infection grippale. Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour vérifier notre hypothèse, nous pensons que ce concept serait bénéfique pour le traitement de certaines maladies. Néanmoins, le développement de tout nouveau CPP exigera une évaluation approfondie afin de déterminer si le bénéfice attendu par l'ajout d'un vecteur peptidique ne sera pas réduit par les problèmes créés par le transporteur. L'utilisation d'un CPP bioactif sera bénéfique dans le cas où l'activité biologique du vecteur peptidique est additive ou complémentaire à l'activité de la cargaison pour une cible donnée. Par exemple, en utilisant comme CPP une forme bioactive du PACAP, nous anticipons des résultats

très positifs lors de la livraison de molécules ciblant des maladies associées aux processus apoptotiques ou inflammatoires.

Chapitre 6 : Conclusion

Dans le cadre de cette thèse, nous avons tout d'abord cherché à développer des dérivés présentant à la fois une sélectivité pour les récepteurs PAC1 et VAPC1, pour le traitement de maladies neurodégénératives. Ainsi, nos études de type structure-activité nous ont permis d'identifier deux dérivés sélectifs pour PAC1/VPAC1, *i.e.* [Hyp^2]PACAP27 et [Ala^7]PACAP27, qui peuvent simultanément inhiber le processus d'apoptose (*via* le récepteur PAC1) et moduler la réponse inflammatoire (*via* le récepteur VPAC1), deux phénomènes observés dans les maladies neurodégénératives. Dans un modèle *in vitro* de la maladie de Parkinson, ces deux composés sont capables de protéger effectivement les neurones dopaminergiques contre la toxicité du MPP^+ et ce, dans des expériences de pré- et cotraitements. Ces résultats nous fournissent donc une base pour le développement de nouveaux peptides dérivés du PACAP pour le traitement éventuel de maladies neurodégénératives. De plus, le travail réalisé au cours de cette thèse a également fourni des informations moléculaires supplémentaires nous permettant d'améliorer nos connaissances actuelles sur ce neuropeptide. Nos résultats montrent par exemple des différences importantes au niveau des pharmacophores définissant la conformation biologiquement active du domaine N-terminal du PACAP suite à son interaction avec le récepteur PAC1 ou les récepteurs VPAC1 et VPAC2. Nos données démontrent entre autres l'importance des résidus His^1, Asp^3 et Phe^6 pour l'affinité de liaison et l'activité biologique envers les récepteurs du PACAP. Nous avons également montré que le segment N-terminal du PACAP (His^1 à Gly^4) adopte, lors de la liaison avec les récepteurs, une conformation bioactive particulière semblable à une structure de type coude Asx-Pro. De même, la présence d'un motif connu sous le nom de N-*capping*, qui participerait notamment au mécanisme de reconnaissance, de sélectivité et d'activation du récepteur, a été décrite. Plus important encore, nos résultats ont permis de supporter l'hypothèse que le motif N-*capping* de type IA joue un rôle important dans l'activation du récepteur VPAC2. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour valider nos postulats, ces observations nous fournissent des indications importantes sur la conformation bioactive du domaine N-terminal. Cette information sera très utile dans le développement des prochaines générations d'analogues du PACAP affichant un profil pharmacologique amélioré.

Bien qu'il soit clairement établi que le PACAP est capable d'agir comme un facteur de régulation paracrine et autocrine, cette étude vient complémenter nos connaissances sur la pharmacologie intracrine de ce peptide, en démontrant notamment sa propension à traverser la membrane plasmique afin d'activer des cibles intracellulaires, de même que sa capacité à quitter le cytosol sans avoir été dégradé par des enzymes intracellulaires. Nous sommes ainsi les premiers à avoir décrit l'aptitude des deux isoformes du PACAP à traverser la membrane cellulaire par un mécanisme indépendant d'un récepteur. De plus, nous avons démontré que le PACAP conjugué à une sonde fluorescente, soit la fluorescéine, pénètre efficacement dans le compartiment interne de la cellule par translocation directe, endocytose dépendante de la clathrine et macropinocytose. En particulier, nos résultats suggèrent que ce peptide peut être disponible pour interagir avec des cibles intracellulaires et que ce processus le rendrait actif dans le contrôle d'événements observés au sein de la cellule. Notre étude a également révélé que le PACAP, une fois à l'intérieur des cellules, n'est pas entièrement dégradé par des enzymes et qu'une quantité relativement importante du peptide intact est en mesure d'en ressortir. Des analyses par HPLC et spectrométrie de masse ont révélé la présence du PACAP38 et de 13 fractions peptidiques différentes incluant le PACAP27 dans le milieu extracellulaire des cellules traitées auparavant avec du PACAP38. Nous avons aussi constaté que le PACAP stimule la mobilisation du Ca^{2+} nucléaire et induit l'initiation de la transcription dans des noyaux isolés de tissus testiculaires de rat. Ces observations soulèvent la possibilité que le PACAP soit capable de déclencher un cycle d'actions intracrines conduisant à des effets puissants, de longue durée et ce, à de très faibles concentrations. Ces constatations renforcent davantage notre postulat à savoir que le PACAP et des analogues sélectifs présentent un potentiel thérapeutique évident. Enfin, bien que le(s) rôle(s) physiologique(s) des sites de liaison intracellulaires du PACAP reste(nt) à être étudié(s) en profondeur, nos résultats évoquent que ces RCPGs pourraient être associés à des activités biologiques spécifiques qui devraient être prises en compte lors du développement de médicaments pour le traitement de pathologies associées au système PACAPergique.

Notre travail a aussi démontré que le PACAP peut être considéré comme un CPP endogène, qui peut servir pour la livraison de molécules bioactives. Nous avons ainsi observé que le PACAP biotinylé est capable de transporter efficacement la streptavidine (Strep) à l'intérieur de la cellule et ce, sans manifester d'effets toxiques. Plus intéressant encore, cette aptitude du PACAP38 à

livrer des cargaisons, telles la fluorescéine et la streptavidine, s'avère beaucoup plus développée que celle du TAT, le CPP le plus étudié et le plus utilisé à ce jour. Ce résultat démontre clairement l'efficacité de ce peptide comme système de transport de composés et ouvre par le fait même de nouvelles perspectives dans le domaine de la livraison de médicaments. Ainsi, l'utilisation du PACAP comme CPP, de par sa nature endogène, pourrait éviter certains effets indésirables associés avec des CPPs synthétiques ou dérivés de virus, comme une réponse immunitaire ou une toxicité cellulaire. De plus, les activités biologiques intrinsèques de ce CPP pourraient également favoriser le développement d'une nouvelle stratégie innovante pour la modulation d'événements intracellulaires.

Enfin, nous avons également développé des dérivés inactifs du PACAP, *i.e.* PACAP(11-38) et [Arg^{17}]PACAP(11-38), possédant des propriétés physicochimiques et des capacités de pénétration cellulaire très similaires à celles de la molécule-mère. Ainsi, notre étude a démontré que la translocation directe et l'endocytose sont impliquées dans le mécanisme d'entrée du [Arg^{17}]PACAP(11-38). Ce dernier a ensuite été utilisé dans la livraison intracellulaire de diverses cargaisons telles qu'une petite molécule (fluorescéine), un peptide incapable de pénétrer les cellules (Id1/3-PA7), une protéine de poids moléculaire élevé (streptavidine) et des polynucléotides (ADN et ribozyme). Il est utile de souligner que son efficacité en tant qu'agent de transfection est comparable à celle de la Lipofectamine 2000, tout en n'étant pas toxique pour les cellules, une propriété que n'a pas la Lipofectamine. Cette étude a par conséquent non seulement dévoilé un nouvel aspect d'utilisation du PACAP et de ses dérivés pour une application thérapeutique, mais aussi contribué à l'identification de nouveaux membres de la famille des CPPs. Comme tel, des analogues inactifs du PACAP devraient s'avérer d'excellents vecteurs pour des usages *in vitro* et *in vivo*.

L'ensemble de nos résultats démontre le potentiel exceptionnel du PACAP comme agent thérapeutique multifonctionnel pour ralentir, stopper et peut-être même renverser la progression de pathologies dégénératives, et également comme outil pharmacologique ou biotechnologique pour le transport de molécules utiles pour réguler/moduler des processus intracellulaires spécifiques.

Chapitre 7 : Perspectives

Ayant de nombreux avantages que plusieurs petites molécules et les protéines n'ont pas, les peptides sont particulièrement attrayants pour le développement de médicaments pour le traitement de diverses maladies. Malheureusement, ils ont aussi les défauts de leurs qualités et notamment parce qu'ils sont formés d'une chaîne d'acides aminés, ils sont soumis à une dégradation relativement rapide et présentent une faible biodisponibilité. Pour ces raisons, certains polypeptides, pourtant initialement identifiés comme des candidats très prometteurs comme médicaments, n'ont pu trouver d'applications thérapeutiques. Ainsi, à cause de leur nature peptidique, les deux analogues PAC1/VPAC1-sélectifs que nous avons identifiés risquent d'être rapidement dégradés par des enzymes présentes dans le plasma sanguin. Cette faible biodisponibilité pourrait ainsi réduire l'efficacité de ces composés. Pour contrecarrer cette difficulté, des modifications chimiques ou la conjugaison à des macromolécules telles que le polyéthylèneglycol, des lipides, des glucides ou des protéines peuvent être utilisées afin d'augmenter la biodisponibilité du peptide. En effet, l'introduction de modifications chimiques aux sites potentiels de clivage enzymatique confère souvent une résistance enzymatique à un peptide. Parmi les modifications couramment utilisées, on retrouve l'acétylation de l'extrémité N-terminale, l'amidation de l'extrémité C-terminale, la N-alkylation, la cyclisation, la modification de la chaîne latérale de résidus, le changement de chiralité et le remplacement du lien peptidique par une liaison isostérique (Adessi *et al.*, 2002). Récemment, dans notre laboratoire, deux analogues métaboliquement stables, *i.e.* N-acétyl-[Ala^{15}, Ala^{20}]PACAP38-propylamide et N-acétyl-PACAP27-propylamide ont été développés (Bourgault *et al.*, 2008a). Ces deux puissants agonistes présentent une demi-vie prolongée dans le plasma et un effet neuroprotecteur significatif dans un modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale (Bourgault *et al.*, 2008a; Dejda *et al.*, 2011b). L'application de telles modifications aux analogues PAC1/VPAC1-sélectifs pourrait éventuellement nous fournir des analogues sélectifs et stables. D'autres approches, telles que la PEGylation, la lipidisation, la glycosylation ou encore la fusion à une protéine au niveau C- ou N-terminal ou sur la chaîne latérale d'un résidu, pourraient aussi être utilisées pour augmenter la stabilité de nos peptides PAC1/VPAC1-sélectifs, tout en conservant ou même améliorant leurs profils pharmacologiques. Il est nécessaire de noter que le site de modification et la nature de la

modification joueront un rôle crucial sur la pharmacocinétique et le profil pharmacologique. Le choix des modifications est donc très important pour le développement de la deuxième génération d'analogues stables du PACAP ayant une forte spécificité envers les récepteurs PAC1 et VPAC1.

De plus, la barrière hémato-encéphalique et le liquide céphalo-rachidien sont responsables de la capacité ou non d'un médicament à atteindre le système nerveux central (Abbott *et al.*, 1996). Ces systèmes spécialisés, qui contrôlent la concentration et l'entrée des solutés dans le cerveau, agissent comme des barrières rendant difficile la livraison de molécules au niveau du SNC. Les deux isoformes du PACAP, *i.e.* PACAP27 et PACAP38, peuvent traverser la BHE par diffusion (PACAP27) ou via un transporteur spécifique (PACAP38). Nos dérivés étant modifiés au niveau de résidus N-terminaux non chargés, il est fort probable que ces deux composés PAC1/VPAC1-sélectifs puissent également atteindre le SNC. Toutefois, l'amélioration du transport de ces analogues du PACAP à travers la BHE peut aussi être considérée, ce qui faciliterait encore davantage l'application thérapeutique de ce neuropeptide anti-apoptotique et anti-inflammatoire. À cet égard, plusieurs approches, qui ont été utilisées pour améliorer la livraison spécifique et l'entrée dans le cerveau de divers peptides à potentiel pharmaceutique, pourraient être aussi utilisées pour le PACAP et ses dérivés (Bourgault *et al.*, 2009a). Ainsi, la conjugaison du PACAP ou de ses analogues avec un vecteur spécifique tel le *brain homing peptide* ou un anticorps monoclonal, serait une bonne alternative. Par exemple, la conjugaison du VIP avec un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la transferrine présent au niveau de la BHE augmente la concentration du peptide au cerveau (Patenaude *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1996). L'application de ce concept au PACAP et ses dérivés serait ainsi envisageable pour améliorer leur caractère thérapeutique. Par ailleurs, l'utilisation de petits vecteurs colloïdaux tels que les liposomes et les nanoparticules serait aussi une autre voie prometteuse pour la distribution sélective de dérivés du PACAP. De même, le développement d'une formulation intranasale, comme décrit pour d'autres ligands de la famille B des RCPGs, *i.e.* la GHRH, la sécrétine (Ohwaki *et al.*, 1987), le GLP-1 (Banks *et al.*, 2004), la calcitonine (Chen *et al.*, 2009; Kurose *et al.*, 1987) et le VIP (Gozes *et al.*, 1999), pourrait également améliorer la livraison spécifique du PACAP au cerveau.

Nos études de type structure-activité ont montré que le segment His^1-Gly^4 adopte, afin d'activer les récepteurs PAC1 et VPAC1, une conformation bioactive semblable à celle observée dans un coude Asx-Pro. Afin de caractériser les déterminants moléculaires et la conformation bioactive précise pour l'activation des récepteurs du PACAP, diverses modifications chimiques pourraient être introduites dans la molécule. Par exemple, le résidu histidine pourrait être remplacé par une asparagine, une glutamine ou une 2-pyrrolylalanine pour renforcer la liaison hydrogène entre le résidu à la position *i* et le proton amide de la position *i*+3 (Dorr *et al.*, 2012; Vasudev *et al.*, 2012). De plus, afin d'évaluer la participation de la liaison hydrogène entre le C=O de His^1 et le proton du NH de Gly^4, nous pouvons envisager la stabilisation du motif Asx-Pro, soit par l'introduction du tripeptide His-Pro-Aib (Blank *et al.*, 2000) *via* l'introduction d'un Aib, soit par le couplage d'un résidu (α-Me)Asp à la position Asp^3. Nous croyons que les analogues [Pro^2, Aib^3]-, [Pro^2, (α-Me)Asp^3]-, [Hyp^2, Aib^3]-, [Hyp^2, (α-Me)Asp^3]PACAP permettront d'élucider l'impact de la présence d'un coude de type Asx-Pro au niveau du domaine N-terminal. En ajout à cette approche, l'incorporation de mimétiques du coude Asx-Pro, tels que des pyrrolyles (Ko *et al.*, 2011) ou des tripeptides à structure contrainte (Pinsker *et al.*, 2011) devrait complémenter l'information structurale et faciliter l'identification d'analogues sélectifs. Ensuite, une stratégie semblable à celle appliquée pour le GLP-1 (Haque *et al.*, 2010; Mapelli *et al.*, 2009) ou pour les agonistes sélectifs du récepteur VPAC2 (Bokvist *et al.*, 2011) pourrait favoriser la génération de super analogues du PACAP, plus puissants, stables, à structure moléculaire réduite et sélectifs. En effet, la stratégie choisie sera d'introduire au niveau N-terminal (résidus 1-5) du peptide des mimétiques ayant une bonne sélectivité envers les récepteurs PAC1 et VPAC1, tandis que le segment C-terminal sera tronqué et l'hélice α sera stabilisée par l'ajout dans la chaîne peptidique de dérivés de la phénylalanine, tels que α-Me-Phe ou Bip, (Haque *et al.*, 2010; Mapelli *et al.*, 2009).

Au cours de notre étude, nous avons clairement observé la présence de récepteurs nucléaires du PACAP dans les noyaux isolés de tissus de rat tels ceux du cerveau, des testicules, de la rate et de la glande surrénale. De plus, ces récepteurs sont fonctionnels et probablement impliqués dans le contrôle d'événements cellulaires. Ce système intracellulaire pourrait donc jouer un rôle précis dans des activités biologiques associées au système PACAPergique en participant à la régulation globale des voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, l'activation des récepteurs nucléaires

pourrait stimuler des voies de signalisation différentes de celles associées au système membranaire. Pour clarifier et distinguer les fonctions physiologiques de chaque système (membranaire et intracellulaire), des études plus approfondies seront nécessaires. Ainsi, il sera essentiel de procéder à l'identification des protéines G couplées et des messagers secondaires tels que l'AMPc, le Ca^{2+} ou le phosphoinositol, d'établir l'identité des gènes activés et d'analyser les voies de phosphorylation de protéines qui sont associées à l'activation des récepteurs intracellulaires du PACAP. De plus, le développement d'agonistes et d'antagonistes qui pourraient reconnaître sélectivement les récepteurs membranaires et nucléaires serait fort utile pour distinguer les effets biologiques *in vitro* ou *in vivo* liés à chaque système. À cet égard, des analogues actifs mais incapables de pénétrer la cellule pourraient être une bonne stratégie pour étudier des effets biologiques provenant des récepteurs membranaires. Pour ce faire, l'introduction d'une séquence contenant la fonctionnalité acide sur la chaîne latérale d'un résidu du domaine C-terminal pourrait bloquer l'entrée du peptide au cytosol (Jiang *et al.*, 2004), tout en gardant son activité biologique. À l'opposé, l'utilisation d'analogues dits « cagés », porteurs d'un « masque moléculaire » clivable au niveau du domaine N-terminal du peptide, ce qui les rend temporairement invisibles pour les récepteurs, et ayant la capacité d'entrer dans la cellule, serait également avantageux pour étudier le système intracellulaire puisqu'ils sont en mesure de libérer la forme active au cytosol après le clivage du masque. Par exemple, l'incorporation d'un groupe photoclivable tels le 4,5-diméthoxynitrobenzyle (ODMNB) (Bourgault *et al.*, 2007), l'ester de 3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2-butyle (DMNPB) (Petersen *et al.*, 2008), le coumarinyle, le méthylphénol (Pelliccioli *et al.*, 2002) et le *p*-hydroxyphénacyle (Givens *et al.*, 2000), sur la chaîne latérale d'Asp^3 qui est cruciale pour l'affinité et l'activité du peptide, produirait vraisemblablement des dérivés inactifs, gardant néanmoins la capacité d'entrer dans la cellule et produisant la molécule-mère après irradiation à une longueur d'onde appropriée.

Un obstacle majeur au relargage des médicaments par des CPPs est la dégradation métabolique rapide des peptides lorsque ces derniers sont en contact avec des enzymes de la circulation sanguine ou des barrières épithéliales ou endothéliales. Par exemple, Koppelhus et ses collègues ont suggéré que la faible pénétration cellulaire de certains CPPs pourrait être expliquée par la dégradation rapide de ces derniers par des enzymes membranaires (Koppelhus *et al.*, 2002). De façon similaire, la faible efficacité de la hCT pour le transport *in vivo* des médicaments est

possiblement reliée à sa faible stabilité plasmatique (Rennert *et al.*, 2006). La présence d'acides aminés de configuration absolue L, de même que de sites de reconnaissance enzymatique, présente un danger pour les dérivés PACAP(11-38) et [Arg^{17}]PACAP(11-38) lorsqu'ils sont dans la circulation sanguine. Des modifications chimiques seront donc utiles pour développer des analogues stables de ces nouveaux CPPs. Le remplacement des acides aminés L par des résidus de configuration D est une voie à explorer afin d'empêcher la dégradation enzymatique du peptide. En effet, il a été démontré que des CPPs formés exclusivement d'acides aminés D sont très stables dans le plasma. Toutefois, puisque ces CPPs « tout D » sont difficiles à dégrader et par conséquent à éliminer, l'accumulation de ceux-ci pourrait être la source d'effets indésirables (Foerg *et al.*, 2008). Dans les circonstances, des modifications chimiques au niveau des régions de reconnaissance enzymatique, semblent être l'approche à privilégier pour ralentir la vitesse de dégradation métabolique, comme démontré pour l'hCT(9-32) (Rennert *et al.*, 2006). En effet, le remplacement des résidus 12 et 16 par une N-méthylphénylalanine ou une D-phénylalanine augmente la résistance protéolytique du hCT(9-32) dans le plasma sanguin humain. L'application de cette stratégie au PACAP et ses dérivés pourrait produire de meilleurs CPPs. Les autres méthodes, telles que la PEGylation, la lipidisation, la glycosylation, ou encore une modification chimique sur la chaîne latérale des résidus spécifiques, sont aussi des avenues prometteuses.

Ces analogues, *i.e.* PACAP(11-38) et [Arg^{17}]PACAP(11-38), sont peut-être moins intéressants pour l'industrie pharmaceutique par rapport aux autres CPPs, car ils contiennent 28 acides aminés dans leur séquence. Le développement d'un analogue inactif et plus court du PACAP est donc souhaitable (mais pas nécessairement obligatoire) pour produire un CPP idéal pour des applications thérapeutiques. Un tel développement s'inscrit d'ailleurs dans une démarche plus globale qui mènera à une meilleure compréhension des déterminants moléculaires régissant les propriétés pénétrantes du peptide à travers la membrane cellulaire. De plus, le travail va aussi conduire à une meilleure conception de la manière dont les propriétés physicochimiques des composés peptidiques sont responsables de la translocation intracellulaire. La spécificité des CPPs envers des cellules ou des tissus représente une autre limitation des CPPs dérivés du neuropeptide PACAP. Cette restriction est également un problème commun dans le domaine du transport de composés bioactifs au moyen de CPPs. Ainsi, la mise au point d'analogues du PACAP ayant une spécificité élevée envers des cellules ou des tissus, et conservant la capacité

de traverser de manière efficiente la membrane cellulaire, serait extrêmement utile en recherche biomédicale. Le couplage de *cell-targeting peptides*, qui ne possèdent pas la capacité d'entrer dans la cellule mais peuvent relarguer des molécules bioactives à proximité des sites désirés, pourrait augmenter leur spécificité. En effet, plusieurs approches, telles que l'expression phagique (*phage display*) ou la synthèse combinatoire, ont permis de générer des *cell-targeting peptides* ayant une affinité pour des marqueurs spécifiques des tissus (Laakkonen *et al.*, 2010; Sugahara *et al.*, 2010; Svensen *et al.*, 2012; Vives *et al.*, 2008). En particulier, deux *cell-targeting peptides* sont présentement évalués cliniquement, *i.e.* NGR (ciblant l'aminopeptidase CD13) et le *cyclo*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(NMe)Val] (Ilengitide, ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$) (Svensen *et al.*, 2012). Ce type d'approche pourrait donc être utile avec des dérivés du PACAP (Martín *et al.*, 2010). Enfin, pour éviter l'absorption non spécifique d'un CPP bâti sur un canevas PACAP, le peptide pourrait être masqué en utilisant des contre-ions comme, par exemple, des polysulfonamides (Sethuraman *et al.*, 2007; Sethuraman *et al.*, 2006) et des oligoglutamates (Jiang *et al.*, 2004). Ainsi, à pH 7,4, les polysulfonamides sont chargés négativement, empêchant théoriquement l'entrée d'un complexe PACAP-biomolécule. Par contre, dans un environnement acide tel que celui d'une tumeur, le sulfonamide perdrait sa charge et se détacherait, ce qui exposerait le complexe aux interactions avec les cellules tumorales. Enfin, l'utilisation de liens moléculaires fonctionnalisés (*linkers*), sensibles au pH ou à une enzyme spécifique, pourrait également améliorer la spécificité des complexes CPP-biomolécule.

Références

Abad, C, Martinez, C, Leceta, J, Juarranz, MG, Delgado, M, Gomariz, RP (2002) Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide expression in the immune system. *Neuroimmunomodulation* **10**(3): 177-186.

Abbott, NJ, Romero, IA (1996) Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today* **2**(3): 106-113.

Abbott, NJ, Ronnback, L, Hansson, E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**(1): 41-53.

Abdiu, A, Nakamura, H, Sahaf, B, Yodoi, J, Holmgren, A, Rosen, A (2000) Thioredoxin blood level increases after severe burn injury. *Antioxid Redox Signal* **2**(4): 707-716.

Adessi, C, Soto, C (2002) Converting a peptide into a drug: Strategies to improve stability and bioavailability. *Current Medicinal Chemistry* **9**(9): 963-978.

Amodeo, P, Motta, A, Strazzullo, G, Castiglione Morelli, MA (1999) Conformational flexibility in calcitonin: the dynamic properties of human and salmon calcitonin in solution. *J Biomol NMR* **13**(2): 161-174.

Andreassen, OA, Dedeoglu, A, Ferrante, RJ, Jenkins, BG, Ferrante, KL, Thomas, M, Friedlich, A, Browne, SE, Schilling, G, Borchelt, DR, Hersch, SM, Ross, CA, Beal, MF (2001) Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **8**(3): 479-491.

Araki, N, Takagi, K (1992) Relaxant effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on guinea-pig tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **216**(1): 113-117.

Aranda, A, Pascual, A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**(3): 1269-1304.

Arimura, A, Somogyvari-Vigh, A, Miyata, A, Mizuno, K, Coy, DH, Kitada, C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* **129**(5): 2787-2789.

Arimura, A, Somogyvari-Vigh, A, Weill, C, Fiore, RC, Tatsuno, I, Bay, V, Brenneman, DE (1994) PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann N Y Acad Sci* **739**: 228-243.

Armstrong, BD, Abad, C, Chhith, S, Cheung-Lau, G, Hajji, OE, Nobuta, H, Waschek, JA (2008) Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylyl cyclase activating peptide. *Neuroscience* **151**(1): 63-73.

Aroui, S, Brahim, S, Waard, MD, Kenani, A (2010) Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study. *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 419-425.

Arunachalam, B, Phan, UT, Geuze, HJ, Cresswell, P (2000) Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 745-750.

Asoh, S, Ohsawa, I, Mori, T, Katsura, K, Hiraide, T, Katayama, Y, Kimura, M, Ozaki, D, Yamagata, K, Ohta, S (2002) Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 17107-17112.

Assil-Kishawi, I, Abou-Samra, AB (2002) Sauvagine cross-links to the second extracellular loop of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *J Biol Chem* **277**(36): 32558-32561.

Aurora, R, Rose, GD (1998) Helix capping. *Protein Sci* **7**(1): 21-38.

Banks, WA, During, MJ, Niehoff, ML (2004) Brain uptake of the glucagon-like peptide-1 antagonist exendin(9-39) after intranasal administration. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(2): 469-475.

Banks, WA, Kastin, AJ, Komaki, G, Arimura, A (1993) Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **267**(2): 690-696.

Basille, M, Gonzalez, BJ, Fournier, A, Vaudry, H (1994) Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the rat cerebellum: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res Dev Brain Res* **82**(1-2): 81-89.

Basille, M, Gonzalez, BJ, Leroux, P, Jeandel, L, Fournier, A, Vaudry, H (1993) Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. *Neuroscience* **57**(2): 329-338.

Bates, E, Bode, C, Costa, M, Gibson, CM, Granger, C, Green, C, Grimes, K, Harrington, R, Huber, K, Kleiman, N, Mochly-Rosen, D, Roe, M, Sadowski, Z, Solomon, S, Widimsky, P (2008) Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation* **117**(7): 886-896.

Beebe, X, Darczak, D, Davis-Taber, RA, Uchic, ME, Scott, VE, Jarvis, MF, Stewart, AO (2008) Discovery and SAR of hydrazide antagonists of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor type 1 (PAC1-R). *Bioorg Med Chem Lett* **18**(6): 2162-2166.

Bergwitz, C, Gardella, TJ, Flannery, MR, Potts, JT, Kronenberg, HM, Goldring, SR, Juppner, H (1996) Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin - Evidence for a common pattern of ligand-receptor interaction. *Journal of Biological Chemistry* **271**(43): 26469-26472.

Bertino, JR, Goker, E, Gorlick, R, Li, WW, Banerjee, D (1996) Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* **1**(4): 223-226.

Birk, S, Sitarz, JT, Petersen, KA, Oturai, PS, Kruuse, C, Fahrenkrug, J, Olesen, J (2007) The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers. *Regul Pept* **140**(3): 185-191.

Bitar, KG, Coy, DH (1993) Interaction of ovine pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-38) with rat lung membranes. *Peptides* **14**(3): 621-627.

Blank, JT, Guerin, DJ, Miller, SJ (2000) A His-Pro-Aib peptide that exhibits an Asx-Pro-turn-like structure. *Org Lett* **2**(9): 1247-1249.

Boivin, B, Chevalier, D, Villeneuve, LR, Rousseau, E, Allen, BG (2003) Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem* **278**(31): 29153-29163.

Boivin, B, Lavoie, C, Vaniotis, G, Baragli, A, Villeneuve, LR, Ethier, N, Trieu, P, Allen, BG, Hebert, TE (2006) Functional beta-adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* **71**(1): 69-78.

Boivin, B, Vaniotis, G, Allen, BG, Hebert, TE (2008) G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *J Recept Signal Transduct Res* **28**(1-2): 15-28.

Boivin, B, Villeneuve, LR, Farhat, N, Chevalier, D, Allen, BG (2005) Sub-cellular distribution of endothelin signaling pathway components in ventricular myocytes and heart: lack of preformed caveolar signalosomes. *J Mol Cell Cardiol* **38**(4): 665-676.

Bokvist, BK, Zhang, L, Alsina-fernandez, J (2011) Selective VPAC2 receptor peptide agonists. *United States Patent 7897573*

Bolhassani, A (2011) Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1816**(2): 232-246.

Bolin, DR, Michalewsky, J, Wasserman, MA, O'Donnell, M (1995) Design and development of a vasoactive intestinal peptide analog as a novel therapeutic for bronchial asthma. *Biopolymers* **37**(2): 57-66.

Booz, GW, Conrad, KM, Hess, AL, Singer, HA, Baker, KM (1992) Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* **130**(6): 3641-3649.

Borsello, T, Clarke, PG, Hirt, L, Vercelli, A, Repici, M, Schorderet, DF, Bogousslavsky, J, Bonny, C (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* **9**(9): 1180-1186.

Bourgault, S, Chatenet, D, Wurtz, O, Doan, ND, Leprince, J, Vaudry, H, Fournier, A, Vaudry, D (2011) Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr Pharm Des* **17**(10): 1002-1024.

Bourgault, S, Letourneau, M, Fournier, A (2007) Development of photolabile caged analogs of endothelin-1. *Peptides* **28**(5): 1074-1082.

Bourgault, S, Vaudry, D, Botia, B, Couvineau, A, Laburthe, M, Vaudry, H, Fournier, A (2008a) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* **29**(6): 919-932.

Bourgault, S, Vaudry, D, Dejda, A, Doan, ND, Vaudry, H, Fournier, A (2009a) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Curr Med Chem* **16**(33): 4462-4480.

Bourgault, S, Vaudry, D, Guilhaudis, L, Raoult, E, Couvineau, A, Laburthe, M, Segalas-Milazzo, I, Vaudry, H, Fournier, A (2008b) Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *J Mol Neurosci* **36**(1-3): 260-269.

Bourgault, S, Vaudry, D, Segalas-Milazzo, I, Guilhaudis, L, Couvineau, A, Laburthe, M, Vaudry, H, Fournier, A (2009b) Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *J Med Chem* **52**(10): 3308-3316.

Brasnjevic, I, Steinbusch, HW, Schmitz, C, Martinez-Martinez, P (2009) Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol* **87**(4): 212-251.

Brenneman, DE, Hauser, JM, Spong, C, Phillips, TM (2002) Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides* **36**(4): 271-280.

Cagampang, FR, Piggins, HD, Sheward, WJ, Harmar, AJ, Coen, CW (1998) Circadian changes in PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA in the rat suprachiasmatic and supraoptic nuclei. *Brain Res* **813**(1): 218-222.

Campbell, RM, Bongers, J, Felix, AM (1995) Rational design, synthesis, and biological evaluation of novel growth hormone releasing factor analogues. *Biopolymers* **37**(2): 67-88.

Carrigan, CN, Imperiali, B (2005) The engineering of membrane-permeable peptides. *Anal Biochem* **341**(2): 290-298.

Cauvin, A, Robberecht, P, De Neef, P, Gourlet, P, Vandermeers, A, Vandermeers-Piret, MC, Christophe, J (1991) Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord. *Regul Pept* **35**(2): 161-173.

Ceraudo, E, Murail, S, Tan, YV, Lacapere, JJ, Neumann, JM, Couvineau, A, Laburthe, M (2008) The vasoactive intestinal peptide (VIP) alpha-Helix up to C terminus interacts with the N-terminal ectodomain of the human VIP/Pituitary adenylate cyclase-activating peptide 1 receptor: photoaffinity, molecular modeling, and dynamics. *Mol Endocrinol* **22**(1): 147-155.

Chartrel, N, Tonon, MC, Vaudry, H, Conlon, JM (1991) Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology* **129**(6): 3367-3371.

Chatterjee, TK, Sharma, RV, Fisher, RA (1996) Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem* **271**(50): 32226-32232.

Chawla, S, Hardingham, GE, Quinn, DR, Bading, H (1998) CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* **281**(5382): 1505-1509.

Chen, M, Li, XR, Zhou, YX, Yang, KW, Chen, XW, Deng, Q, Liu, Y, Ren, LJ (2009) Improved absorption of salmon calcitonin by ultraflexible liposomes through intranasal delivery. *Peptides* **30**(7): 1288-1295.

Chen, Y, Samal, B, Hamelink, CR, Xiang, CC, Chen, M, Vaudry, D, Brownstein, MJ, Hallenbeck, JM, Eiden, LE (2006) Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* **137**(1-2): 4-19.

Chiu, YL, Ali, A, Chu, CY, Cao, H, Rana, TM (2004) Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem Biol* **11**(8): 1165-1175.

Christiaens, B, Grooten, J, Reusens, M, Joliot, A, Goethals, M, Vandekerckhove, J, Prochiantz, A, Rosseneu, M (2004) Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides. *Eur J Biochem* **271**(6): 1187-1197.

Chu, A, Caldwell, JS, Chen, YA (2010) Identification and Characterization of a Small Molecule Antagonist of Human VPAC(2) Receptor. *Molecular Pharmacology* **77**(1): 95-101.

Console, S, Marty, C, Garcia-Echeverria, C, Schwendener, R, Ballmer-Hofer, K (2003) Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **278**(37): 35109-35114.

Cook, JL, Zhang, Z, Re, RN (2001) In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ Res* **89**(12): 1138-1146.

Couvineau, A, Laburthe, M (2011) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol.*

Crombez, L, Charnet, A, Morris, MC, Aldrian-Herrada, G, Heitz, F, Divita, G (2007) A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 1): 44-46.

Dauer, W, Przedborski, S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**(6): 889-909.

Dejda, A, Bourgault, S, Doan, ND, Letourneau, M, Couvineau, A, Vaudry, H, Vaudry, D, Fournier, A (2011a) Identification by photoaffinity labeling of the extracellular N-terminal domain of PAC1 receptor as the major binding site for PACAP. *Biochimie* **93**(4): 669-677.

Dejda, A, Jolivel, V, Bourgault, S, Seaborn, T, Fournier, A, Vaudry, H, Vaudry, D (2008) Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: a better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *J Mol Neurosci* **36**(1-3): 26-37.

Dejda, A, Seaborn, T, Bourgault, S, Touzani, O, Fournier, A, Vaudry, H, Vaudry, D (2011b) PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides* **32**(6): 1207-1216.

Delgado, M, Abad, C, Martinez, C, Juarranz, MG, Leceta, J, Ganea, D, Gomariz, RP (2003) PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **992**: 141-157.

Delgado, M, Jonakait, GM, Ganea, D (2002a) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* **39**(2): 148-161.

Delgado, M, Leceta, J, Ganea, D (2002b) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promote in vivo generation of memory Th2 cells. *FASEB J* **16**(13): 1844-1846.

Dennis, MK, Burai, R, Ramesh, C, Petrie, WK, Alcon, SN, Nayak, TK, Bologa, CG, Leitao, A, Brailoiu, E, Deliu, E, Dun, NJ, Sklar, LA, Hathaway, HJ, Arterburn, JB, Oprea, TI, Prossnitz, ER (2009) In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol* **5**(6): 421-427.

Dennison, SR, Wallace, J, Harris, F, Phoenix, DA (2005) Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Protein Pept Lett* **12**(1): 31-39.

Derand, R, Montoni, A, Bulteau-Pignoux, L, Janet, T, Moreau, B, Muller, JM, Becq, F (2004) Activation of VPAC1 receptors by VIP and PACAP-27 in human bronchial epithelial cells induces CFTR-dependent chloride secretion. *Br J Pharmacol* **141**(4): 698-708.

Derossi, D, Joliot, AH, Chassaing, G, Prochiantz, A (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* **269**(14): 10444-10450.

Deshayes, S, Morris, MC, Divita, G, Heitz, F (2005) Interactions of primary amphipathic cell penetrating peptides with model membranes: consequences on the mechanisms of intracellular delivery of therapeutics. *Curr Pharm Des* **11**(28): 3629-3638.

Dickinson, T, Fleetwood-Walker, SM, Mitchell, R, Lutz, EM (1997) Evidence for roles of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors in modulating the responses of rat dorsal horn neurons to sensory inputs. *Neuropeptides* **31**(2): 175-185.

Dickson, L, Aramori, I, McCulloch, J, Sharkey, J, Finlayson, K (2006) A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology* **51**(6): 1086-1098.

Dickson, L, Finlayson, K (2009) VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther* **121**(3): 294-316.

Dietz, GPH, Bahr, M (2004) Delivery of bioactive molecules into the cell: The Trojan horse approach. *Molecular and Cellular Neuroscience* **27**(2): 85-131.

Divita, G (2010) Bioactive cell-penetrating peptides: kill two birds with one stone. *Chem Biol* **17**(7): 679-680.

Doan, ND, Bourgault, S, Dejda, A, Letourneau, M, Detheux, M, Vaudry, D, Vaudry, H, Chatenet, D, Fournier, A (2011a) Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem Pharmacol* **81**(4): 552-561.

Doan, ND, Bourgault, S, Dejda, A, Letourneau, M, Detheux, M, Vaudry, D, Vaudry, H, Chatenet, D, Fournier, A (2011b) Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem Pharmacol* **81**(4): 552-561.

Doan, ND, Chatenet, D, Letourneau, M, Vaudry, H, Vaudry, D, Fournier, A (2012a) Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochim Biophys Acta* **1823**(4): 940-949.

Doan, ND, Letourneau, M, Vaudry, D, Doucet, N, Folch, B, Vaudry, H, Fournier, A, Chatenet, D (2012b) Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Control Release* **163**(2): 256-265.

Dogrukol-Ak, D, Tore, F, Tuncel, N (2004) Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Curr Pharm Des* **10**(12): 1325-1340.

Dong, M, Pinon, DI, Cox, RF, Miller, LJ (2004) Importance of the amino terminus in secretin family G protein-coupled receptors. Intrinsic photoaffinity labeling establishes initial docking constraints for the calcitonin receptor. *J Biol Chem* **279**(2): 1167-1175.

Doody, RS, Geldmacher, DS, Gordon, B, Perdomo, CA, Pratt, RD (2001) Open-label, multicenter, phase 3 extension study of the safety and efficacy of donepezil in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* **58**(3): 427-433.

Dorner, GT, Wolzt, M, Eichler, HG, Schmetterer, L (1998) Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1-27 on ocular, cerebral and skin blood flow in humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**(6): 657-662.

Dorr, AA, Lubell, WD (2012) Synthesis of protected 2-pyrrolylalanine for peptide chemistry and examination of its influence on prolyl amide isomer equilibrium. *J Org Chem* **77**(15): 6414-6422.

Dow, RC, Bennie, J, Fink, G (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophysial portal blood in the normal male and female rat. *J Endocrinol* **142**(1): R1-4.

Duchardt, F, Fotin-Mleczek, M, Schwarz, H, Fischer, R, Brock, R (2007) A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **8**(7): 848-866.

Ellerby, HM, Arap, W, Ellerby, LM, Kain, R, Andrusiak, R, Rio, GD, Krajewski, S, Lombardo, CR, Rao, R, Ruoslahti, E, Bredesen, DE, Pasqualini, R (1999) Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **5**(9): 1032-1038.

Elmquist, A, Hansen, M, Langel, U (2006) Structure-activity relationship study of the cell-penetrating peptide pVEC. *Biochim Biophys Acta* **1758**(6): 721-729.

Farkas, O, Tamas, A, Zsombok, A, Reglodi, D, Pal, J, Buki, A, Lengvari, I, Povlishock, JT, Doczi, T (2004) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. *Regul Pept* **123**(1-3): 69-75.

Fernandez-Carneado, J, Kogan, MJ, Castel, S, Giralt, E (2004) Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**(14): 1811-1814.

Fittipaldi, A, Ferrari, A, Zoppe, M, Arcangeli, C, Pellegrini, V, Beltram, F, Giacca, M (2003) Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem* **278**(36): 34141-34149.

Fizanne, L, Sigaudo-Roussel, D, Saumet, JL, Fromy, B (2004) Evidence for the involvement of VPAC1 and VPAC2 receptors in pressure-induced vasodilatation in rodents. *J Physiol* **554**(Pt 2): 519-528.

Foerg, C, Merkle, HP (2008) On the biomedical promise of cell penetrating peptides: limits versus prospects. *J Pharm Sci* **97**(1): 144-162.

Fonseca, SB, Pereira, MP, Kelley, SO (2009) Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**(11): 953-964.

Freyberg, Z, Sweeney, D, Siddhanta, A, Bourgoin, S, Frohman, M, Shields, D (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**(4): 943-955.

Friedlander, RM (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* **348**(14): 1365-1375.

Futaki, S (2005) Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* **57**(4): 547-558.

Ganea, D (1996) Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs. *Adv Neuroimmunol* **6**(1): 61-74.

Gaytan, F, Martinez-Fuentes, AJ, Garcia-Navarro, F, Vaudry, H, Aguilar, E (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell Tissue Res* **276**(2): 223-227.

Gensure, RC, Shimizu, N, Tsang, J, Gardella, TJ (2003) Identification of a contact site for residue 19 of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein analogs in transmembrane domain two of the type 1 PTH receptor. *Mol Endocrinol* **17**(12): 2647-2658.

Ghatei, MA, Takahashi, K, Suzuki, Y, Gardiner, J, Jones, PM, Bloom, SR (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol* **136**(1): 159-166.

Ghosh, A, Roy, A, Liu, X, Kordower, JH, Mufson, EJ, Hartley, DM, Ghosh, S, Mosley, RL, Gendelman, HE, Pahan, K (2007) Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18754-18759.

Givens, RS, Weber, JFW, Conrad, PG, Orosz, G, Donahue, SL, Thayer, SA (2000) New phototriggers 9: p-hydroxyphenacyl as a C-terminal photoremovable protecting group for oligopeptides. *Journal of the American Chemical Society* **122**(12): 2687-2697.

Glass, CK, Saijo, K, Winner, B, Marchetto, MC, Gage, FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**(6): 918-934.

Gobeil, F, Fortier, A, Zhu, T, Bossolasco, M, Leduc, M, Grandbois, M, Heveker, N, Bkaily, G, Chemtob, S, Barbaz, D (2006) G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **84**(3-4): 287-297.

Gobeil, F, Jr., Dumont, I, Marrache, AM, Vazquez-Tello, A, Bernier, SG, Abran, D, Hou, X, Beauchamp, MH, Quiniou, C, Bouayad, A, Choufani, S, Bhattacharya, M, Molotchnikoff, S, Ribeiro-Da-Silva, A, Varma, DR, Bkaily, G, Chemtob, S (2002) Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ Res* **90**(6): 682-689.

Gomes, DA, Leite, MF, Bennett, AM, Nathanson, MH (2006) Calcium signaling in the nucleus. *Can J Physiol Pharmacol* **84**(3-4): 325-332.

Gonzalez-Muniz, R, Martin-Martinez, M, Granata, C, de Oliveira, E, Santiveri, CM, Gonzalez, C, Frechilla, D, Herranz, R, Garcia-Lopez, MT, Del Rio, J, Angeles Jimenez, M, Andreu, D (2001) Conformationally restricted PACAP27 analogues incorporating type II/II' IBTM beta-turn mimetics. Synthesis, NMR structure determination, and binding affinity. *Bioorg Med Chem* **9**(12): 3173-3183.

Gourlet, P, De Neef, P, Cnudde, J, Waelbroeck, M, Robberecht, P (1997a) In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. *Peptides* **18**(10): 1555-1560.

Gourlet, P, Vandermeers, A, Van Rampelbergh, J, De Neef, P, Cnudde, J, Waelbroeck, M, Robberecht, P (1998) Analogues of VIP, helodermin, and PACAP discriminate between rat and human VIP1 and VIP2 receptors. *Ann N Y Acad Sci* **865**: 247-252.

Gourlet, P, Vandermeers, A, Vandermeers-Piret, MC, De Neef, P, Robberecht, P (1996a) Addition of the (28-38) peptide sequence of PACAP to the VIP sequence modifies peptide selectivity and efficacy. *Int J Pept Protein Res* **48**(4): 391-396.

Gourlet, P, Vandermeers, A, Vandermeers-Piret, MC, Rathe, J, De Neef, P, Robberecht, P (1996b) C-terminally shortened pituitary adenylate cyclase-activating peptides (PACAP) discriminate PACAP I, PACAP II-VIP1 and PACAP II-VIP2 recombinant receptors. *Regul Pept* **62**(2-3): 125-130.

Gourlet, P, Vandermeers, A, Vandermeers-Piret, MC, Rathe, J, De Neef, P, Robberecht, P (1995) Fragments of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide discriminate between type I and II recombinant receptors. *Eur J Pharmacol* **287**(1): 7-11.

Gourlet, P, Vandermeers, A, Vertongen, P, Rathe, J, De Neef, P, Cnudde, J, Waelbroeck, M, Robberecht, P (1997b) Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. *Peptides* **18**(10): 1539-1545.

Gourlet, P, Woussen-Colle, MC, Robberecht, P, de Neef, P, Cauvin, A, Vandermeers-Piret, MC, Vandermeers, A, Christophe, J (1991) Structural requirements for the binding of the pituitary adenylate-cyclase-activating peptide to receptors and adenylate-cyclase activation in pancreatic and neuronal membranes. *Eur J Biochem* **195**(2): 535-541.

Gozes, I, Fridkin, M (1992) A fatty neuropeptide. Potential drug for noninvasive impotence treatment in a rat model. *J Clin Invest* **90**(3): 810-814.

Gozes, I, Perl, O, Giladi, E, Davidson, A, Ashur-Fabian, O, Rubinraut, S, Fridkin, M (1999) Mapping the active site in vasoactive intestinal peptide to a core of four amino acids: neuroprotective drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 4143-4148.

Grace, CR, Perrin, MH, DiGruccio, MR, Miller, CL, Rivier, JE, Vale, WW, Riek, R (2004) NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(35): 12836-12841.

Grace, CR, Perrin, MH, Gulyas, J, Rivier, JE, Vale, WW, Riek, R (2010) NMR structure of the first extracellular domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (ECD1-CRF-R1) complexed with a high affinity agonist. *J Biol Chem* **285**(49): 38580-38589.

Gras, S, Hannibal, J, Fahrenkrug, J (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an auto/paracrine stimulator of acute progesterone accumulation and subsequent luteinization in cultured periovulatory granulosa/lutein cells. *Endocrinology* **140**(5): 2199-2205.

Grinevich, V, Fournier, A, Pelletier, G (1997) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* **773**(1-2): 190-196.

Gwathmey, TM, Westwood, BM, Pirro, NT, Tang, LJ, Rose, JC, Diz, DI, Chappell, MC (2010) Nuclear angiotensin-(1-7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **299**(5): F983-F990.

Hahn, P, Scanlan, E (2010) *Topics in current chemistry*. Vol. 296. Springer: New York.

Hamzah, J, Kotamraju, VR, Seo, JW, Agemy, L, Fogal, V, Mahakian, LM, Peters, D, Roth, L, Gagnon, MKJ, Ferrara, KW, Ruoslahti, E (2011) Specific penetration and accumulation of a homing peptide within atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(17): 7154-7159.

Hannibal, J, Fahrenkrug, J (1995a) Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene by rat spermatogenic cells. *Regul Pept* **55**(1): 111-115.

Hannibal, J, Mikkelsen, JD, Clausen, H, Holst, JJ, Wulff, BS, Fahrenkrug, J (1995b) Gene expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regul Pept* **55**(2): 133-148.

Hannibal, J, Mikkelsen, JD, Fahrenkrug, J, Larsen, PJ (1995c) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing factor-containing parvicellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology* **136**(9): 4116-4124.

Haque, TS, Lee, VG, Riexinger, D, Lei, M, Malmstrom, S, Xin, L, Han, S, Mapelli, C, Cooper, CB, Zhang, G, Ewing, WR, Krupinski, J (2010) Identification of potent 11mer glucagon-like peptide-1 receptor agonist peptides with novel C-terminal amino acids: Homohomophenylalanine analogs. *Peptides* **31**(5): 950-955.

Hardwick, JC, Tompkins, JD, Locknar, SA, Merriam, LA, Young, BA, Parsons, RL (2006) Calcium influx through channels other than voltage-dependent calcium channels is critical to the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced increase in excitability in guinea pig cardiac neurons. *Ann N Y Acad Sci* **1070**: 317-321.

Harmar, AJ, Sheward, WJ, Morrison, CF, Waser, B, Gugger, M, Reubi, JC (2004) Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* **145**(3): 1203-1210.

Hashimoto, H, Ishihara, T, Shigemoto, R, Mori, K, Nagata, S (1993) Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron* **11**(2): 333-342.

Hashimoto, H, Nogi, H, Mori, K, Ohishi, H, Shigemoto, R, Yamamoto, K, Matsuda, T, Mizuno, N, Nagata, S, Baba, A (1996) Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **371**(4): 567-577.

Hassane, FS, Saleh, AF, Abes, R, Gait, MJ, Lebleu, B (2010) Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**(5): 715-726.

Hedlund, P, Alm, P, Ekstrom, P, Fahrenkrug, J, Hannibal, J, Hedlund, H, Larsson, B, Andersson, KE (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* **116**(4): 2258-2266.

Hedlund, P, Alm, P, Hedlund, H, Larsson, B, Andersson, KE (1994) Localization and effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in human penile erectile tissue. *Acta Physiol Scand* **150**(1): 103-104.

Heindel, JJ, Powell, CJ, Paschall, CS, Arimura, A, Culler, MD (1992) A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating peptide, modulates Sertoli cell function in vitro. *Biol Reprod* **47**(5): 800-806.

Heitz, F, Morris, MC, Divita, G (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* **157**(2): 195-206.

Henle, F, Fischer, C, Meyer, DK, Leemhuis, J (2006) Vasoactive intestinal peptide and PACAP38 control N-methyl-D-aspartic acid-induced dendrite motility by modifying the activities of Rho GTPases and phosphatidylinositol 3-kinases. *J Biol Chem* **281**(34): 24955-24969.

Hirt, L, Badaut, J, Thevenet, J, Granziera, C, Regli, L, Maurer, F, Bonny, C, Bogousslavsky, J (2004) D-JNKI1, a cell-penetrating c-Jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia. *Stroke* **35**(7): 1738-1743.

Hoare, SR (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* **10**(6): 417-427.

Hong, FD, Clayman, GL (2000) Isolation of a peptide for targeted drug delivery into human head and neck solid tumors. *Cancer Res* **60**(23): 6551-6556.

Hoover, DB, Tompkins, JD, Parsons, RL (2009) Differential activation of guinea pig intrinsic cardiac neurons by the PAC1 agonists maxadilan and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 (PACAP27). *J Pharmacol Exp Ther* **331**(1): 197-203.

Hosoya, M, Kimura, C, Ogi, K, Ohkubo, S, Miyamoto, Y, Kugoh, H, Shimizu, M, Onda, H, Oshimura, M, Arimura, A, et al. (1992) Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta* **1129**(2): 199-206.

Hou, X, Vandermeers, A, Gourlet, P, Vandermeers-Piret, MC, Robberecht, P (1994) Structural requirements for the occupancy of rat brain PACAP receptors and adenylate cyclase activation. *Neuropharmacology* **33**(10): 1189-1195.

Huang, M, Shirahase, H, Rorstad, OP (1993) Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP. *Peptides* **14**(4): 755-762.

Ignatovich, IA, Dizhe, EB, Pavlotskaya, AV, Akifiev, BN, Burov, SV, Orlov, SV, Perevozchikov, AP (2003) Complexes of plasmid DNA with basic domain 47-57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways. *J Biol Chem* **278**(43): 42625-42636.

Inagaki, K, Chen, L, Ikeno, F, Lee, FH, Imahashi, K, Bouley, DM, Rezaee, M, Yock, PG, Murphy, E, Mochly-Rosen, D (2003a) Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* **108**(19): 2304-2307.

Inagaki, K, Hahn, HS, Dorn, GW, 2nd, Mochly-Rosen, D (2003b) Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. *Circulation* **108**(7): 869-875.

Inooka, H, Endo, S, Kitada, C, Mizuta, E, Fujino, M (1992) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by 1H NMR and CD spectroscopies and distance geometry in 25% methanol solution. *Int J Pept Protein Res* **40**(5): 456-464.

Inooka, H, Ohtaki, T, Kitahara, O, Ikegami, T, Endo, S, Kitada, C, Ogi, K, Onda, H, Fujino, M, Shirakawa, M (2001) Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat Struct Biol* **8**(2): 161-165.

Isaac, ER, Sherwood, NM (2008) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is important for embryo implantation in mice. *Mol Cell Endocrinol* **280**(1-2): 13-19.

Ishizuka, Y, Kashimoto, K, Mochizuki, T, Sato, K, Ohshima, K, Yanaihara, N (1992) Cardiovascular and respiratory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *Regul Pept* **40**(1): 29-39.

Jarver, P, Mager, I, Langel, U (2010) In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery. *Trends Pharmacol Sci* **31**(11): 528-535.

Javadpour, MM, Barkley, MD (1997) Self-assembly of designed antimicrobial peptides in solution and micelles. *Biochemistry* **36**(31): 9540-9549.

Javadpour, MM, Juban, MM, Lo, WC, Bishop, SM, Alberty, JB, Cowell, SM, Becker, CL, McLaughlin, ML (1996) De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* **39**(16): 3107-3113.

Jiang, T, Olson, ES, Nguyen, QT, Roy, M, Jennings, PA, Tsien, RY (2004) Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(51): 17867-17872.

Jiao, CY, Delaroche, D, Burlina, F, Alves, ID, Chassaing, G, Sagan, S (2009) Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J Biol Chem* **284**(49): 33957-33965.

Johnson, RM, Harrison, SD, Maclean, D (2011) Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods Mol Biol* **683**: 535-551.

Joliot, A, Pernelle, C, Deagostini-Bazin, H, Prochiantz, A (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(5): 1864-1868.

Jones, S, Holm, T, Mager, I, Langel, U, Howl, J (2010) Characterization of bioactive cell penetrating peptides from human cytochrome c: protein mimicry and the development of a novel apoptogenic agent. *Chem Biol* **17**(7): 735-744.

Jong, YJ, Kumar, V, O'Malley, KL (2009) Intracellular metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) activates signaling cascades distinct from cell surface counterparts. *J Biol Chem* **284**(51): 35827-35838.

Kang, SH, Cho, MJ, Kole, R (1998) Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* **37**(18): 6235-6239.

Kaplan, IM, Wadia, JS, Dowdy, SF (2005) Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release* **102**(1): 247-253.

Kellogg, DL, Jr., Zhao, JL, Wu, Y, Johnson, JM (2010) VIP/PACAP receptor mediation of cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. *J Appl Physiol* **109**(1): 95-100.

Khalil, IA, Kogure, K, Futaki, S, Harashima, H (2006) High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J Biol Chem* **281**(6): 3544-3551.

Kimura, H, Kawatani, M, Ito, E, Ishikawa, K (2003) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on facial nerve recovery in the Guinea pig. *Laryngoscope* **113**(6): 1000-1006.

Kivipelto, L, Absood, A, Arimura, A, Sundler, F, Hakanson, R, Panula, P (1992) The distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity is distinct from helodermin- and helospectin-like immunoreactivities in the rat brain. *J Chem Neuroanat* **5**(1): 85-94.

Ko, C, In, YH, Park-Sarge, OK (1999) Role of progesterone receptor activation in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene expression in rat ovary. *Endocrinology* **140**(11): 5185-5194.

Ko, E, Burgess, K (2011) Pyrrole-based scaffolds for turn mimics. *Org Lett* **13**(5): 980-983.

Kong, LY, Maderdrut, JL, Jeohn, GH, Hong, JS (1999) Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mixed cortical neuron/glia cultures by femtomolar concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* **91**(2): 493-500.

Koppelhus, U, Awasthi, SK, Zachar, V, Holst, HU, Ebbesen, P, Nielsen, PE (2002) Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **12**(2): 51-63.

Koren, E, Torchilin, VP (2012) Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol Med* **18**(7): 385-393.

Koves, K, Arimura, A, Gorcs, TG, Somogyvari-Vigh, A (1991) Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* **54**(2): 159-169.

Koves, K, Arimura, A, Somogyvari-Vigh, A, Vigh, S, Miller, J (1990) Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* **127**(1): 264-271.

Kremer, B, Clark, CM, Almqvist, EW, Raymond, LA, Graf, P, Jacova, C, Mezei, M, Hardy, MA, Snow, B, Martin, W, Hayden, MR (1999) Influence of lamotrigine on progression of early Huntington disease: a randomized clinical trial. *Neurology* **53**(5): 1000-1011.

Kumar, V, Jong, YJ, O'Malley, KL (2008) Activated nuclear metabotropic glutamate receptor mGlu5 couples to nuclear Gq/11 proteins to generate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca2+ release. *J Biol Chem* **283**(20): 14072-14083.

Kuo, JH, Jan, MS, Lin, YL, Lin, C (2009) Interactions between octaarginine and U-937 human macrophages: global gene expression profiling, superoxide anion content, and cytokine production. *J Control Release* **139**(3): 197-204.

Kurose, H, Seino, Y, Shima, M, Tanaka, H, Ishida, M, Yamaoka, K, Yabuuchi, H (1987) Intranasal absorption of salmon calcitonin. *Calcif Tissue Int* **41**(5): 249-251.

Kwon, EJ, Liong, S, Pun, SH (2010) A truncated HGP peptide sequence that retains endosomolytic activity and improves gene delivery efficiencies. *Mol Pharm* **7**(4): 1260-1265.

Laakkonen, P, Porkka, K, Hoffman, JA, Ruoslahti, E (2002) A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med* **8**(7): 751-755.

Laakkonen, P, Vuorinen, K (2010) Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integrative Biology* **2**(7-8): 326-337.

Laakkonen, P, Zhang, L, Ruoslahti, E (2008) Peptide targeting of tumor lymph vessels. *Ann N Y Acad Sci* **1131**: 37-43.

Laburthe, M, Couvineau, A (2002a) Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept* **108**(2-3): 165-173.

Laburthe, M, Couvineau, A, Marie, JC (2002b) VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels* **8**(3-4): 137-153.

Lacombe, A, Lelievre, V, Roselli, CE, Salameh, W, Lue, YH, Lawson, G, Muller, JM, Waschek, JA, Vilain, E (2006) Delayed testicular aging in pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3793-3798.

Law, B, Quinti, L, Choi, Y, Weissleder, R, Tung, CH (2006) A mitochondrial targeted fusion peptide exhibits remarkable cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* **5**(8): 1944-1949.

Lee, FS, Rajagopal, R, Kim, AH, Chang, PC, Chao, MV (2002) Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *J Biol Chem* **277**(11): 9096-9102.

Lerner, EA, Ribeiro, JM, Nelson, RJ, Lerner, MR (1991) Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly Lutzomyia longipalpis. *J Biol Chem* **266**(17): 11234-11236.

Letoha, T, Gaal, S, Somlai, C, Czajlik, A, Perczel, A, Penke, B (2003) Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines. *J Mol Recognit* **16**(5): 272-279.

Lewin, M, Carlesso, N, Tung, CH, Tang, XW, Cory, D, Scadden, DT, Weissleder, R (2000) Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* **18**(4): 410-414.

Li, M, David, C, Kikuta, T, Somogyvari-Vigh, A, Arimura, A (2005) Signaling cascades involved in neuroprotection by subpicomolar pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38. *J Mol Neurosci* **27**(1): 91-105.

Li, M, Funahashi, H, Mbikay, M, Shioda, S, Arimura, A (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells. *Endocrine* **23**(1): 59-75.

Li, S, Grinevich, V, Fournier, A, Pelletier, G (1996) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on gonadotropin-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **41**(1-2): 157-162.

Lin, Y, Hall, RA, Kuhar, MJ (2011) CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6-38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides* **45**(5): 351-358.

Linden, A, Hansson, L, Andersson, A, Palmqvist, M, Arvidsson, P, Lofdahl, CG, Larsson, P, Lotvall, J (2003) Bronchodilation by an inhaled VPAC(2) receptor agonist in patients with stable asthma. *Thorax* **58**(3): 217-221.

Linden, A, Yoshihara, S, Chan, B, Nadel, JA (1995) Inhibition of bronchoconstriction by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP 1-27) in guinea-pigs in vivo. *Br J Pharmacol* **115**(6): 913-916.

Lindgren, M, Hallbrink, M, Prochiantz, A, Langel, U (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **21**(3): 99-103.

Lindgren, M, Rosenthal-Aizman, K, Saar, K, Eiriksdottir, E, Jiang, Y, Sassian, M, Ostlund, P, Hallbrink, M, Langel, U (2006) Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem Pharmacol* **71**(4): 416-425.

Lopes, LB, Furnish, EJ, Komalavilas, P, Flynn, CR, Ashby, P, Hansen, A, Ly, DP, Yang, GP, Longaker, MT, Panitch, A, Brophy, CM (2009) Cell permeant peptide analogues of the small heat shock protein, HSP20, reduce TGF-beta1-induced CTGF expression in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* **129**(3): 590-598.

Low, W, Mortlock, A, Petrovska, L, Dottorini, T, Dougan, G, Crisanti, A (2007a) Functional cell permeable motifs within medically relevant proteins. *J Biotechnol* **129**(3): 555-564.

Low, W, Mortlock, A, Petrovska, L, Dottorini, T, Dougan, G, Crisanti, A (2007b) Functional cell permeable motifs within medically relevant proteins. *Journal of Biotechnology* **129**(3): 555-564.

Lundberg, P, El-Andaloussi, S, Sutlu, T, Johansson, H, Langel, U (2007) Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *Faseb Journal* **21**(11): 2664-2671.

Lutz, EM, Ronaldson, E, Shaw, P, Johnson, MS, Holland, PJ, Mitchell, R (2006) Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. *Mol Cell Neurosci* **31**(2): 193-209.

Macdonald, DS, Weerapura, M, Beazely, MA, Martin, L, Czerwinski, W, Roder, JC, Orser, BA, MacDonald, JF (2005) Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G alpha q, protein kinase C, and activation of Src. *J Neurosci* **25**(49): 11374-11384.

Machova, Z, Muhle, C, Krauss, U, Trehin, R, Koch, A, Merkle, HP, Beck-Sickinger, AG (2002) Cellular internalization of enhanced green fluorescent protein ligated to a human calcitonin-based carrier peptide. *Chembiochem* **3**(7): 672-677.

Madani, F, Lindberg, S, Langel, U, Futaki, S, Graslund, A (2011) Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* **2011**: 414729.

Mader, JS, Hoskin, DW (2006) Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* **15**(8): 933-946.

Mao, YK, Wang, YF, Moogk, C, Fox-Threlkeld, JE, Xiao, Q, McDonald, TJ, Daniel, EE (1998) Locations and molecular forms of PACAP and sites and characteristics of PACAP receptors in canine ileum. *Am J Physiol* **274**(1 Pt 1): G217-225.

Mapelli, C, Natarajan, SI, Meyer, JP, Bastos, MM, Bernatowicz, MS, Lee, VG, Pluscec, J, Riexinger, DJ, Sieber-McMaster, ES, Constantine, KL, Smith-Monroy, CA, Golla, R, Ma, Z, Longhi, DA, Shi, D, Xin, L, Taylor, JR, Koplowitz, B, Chi, CL, Khanna, A, Robinson, GW, Seethala, R, Antal-Zimanyi, IA, Stoffel, RH, Han, S, Whaley, JM, Huang, CS, Krupinski, J, Ewing, WR (2009) Eleven amino acid glucagon-like peptide-1 receptor agonists with antidiabetic activity. *J Med Chem* **52**(23): 7788-7799.

Martin, I, Teixido, M, Giralt, E (2011) Design, synthesis and characterization of a new anionic cell-penetrating peptide: SAP(E). *Chembiochem* **12**(6): 896-903.

Martín, I, Teixidó, M, Giralt, E (2010) Building Cell Selectivity into CPP-Mediated Strategies *Pharmaceuticals (Basel)* **3**: 1456-1490.

Martin, JL, Feinstein, DL, Yu, N, Sorg, O, Rossier, C, Magistretti, PJ (1992) VIP receptor subtypes in mouse cerebral cortex: evidence for a differential localization in astrocytes, microvessels and synaptosomal membranes. *Brain Res* **587**(1): 1-12.

Martinez, C, Abad, C, Delgado, M, Arranz, A, Juarranz, MG, Rodriguez-Henche, N, Brabet, P, Leceta, J, Gomariz, RP (2002) Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 1053-1058.

Masuo, Y, Ohtaki, T, Masuda, Y, Tsuda, M, Fujino, M (1992) Binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain Res* **575**(1): 113-123.

Masuo, Y, Suzuki, N, Matsumoto, H, Tokito, F, Matsumoto, Y, Tsuda, M, Fujino, M (1993) Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res* **602**(1): 57-63.

Matsuda, K, Yoshida, T, Nagano, Y, Kashimoto, K, Yatohgo, T, Shimomura, H, Shioda, S, Arimura, A, Uchiyama, M (1998) Purification and primary structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) from the brain of an elasmobranch, stingray, Dasyatis akajei. *Peptides* **19**(9): 1489-1495.

Matsuda, T, Cepko, CL (2008) Analysis of gene function in the retina. *Methods Mol Biol* **423**: 259-278.

May, V, Lutz, E, MacKenzie, C, Schutz, KC, Dozark, K, Braas, KM (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. *J Biol Chem* **285**(13): 9749-9761.

McArdle, CA (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a key player in reproduction? *Endocrinology* **135**(3): 815-817.

McCulloch, DA, Lutz, EM, Johnson, MS, MacKenzie, CJ, Mitchell, R (2000) Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* **921**: 175-185.

McCulloch, DA, Lutz, EM, Johnson, MS, Robertson, DN, MacKenzie, CJ, Holland, PJ, Mitchell, R (2001) ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by VPAC receptors and a PAC(1) receptor splice variant. *Mol Pharmacol* **59**(6): 1523-1532.

McRory, J, Sherwood, NM (1997a) Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology* **138**(6): 2380-2390.

McRory, JE, Parker, DB, Ngamvongchon, S, Sherwood, NM (1995) Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Mol Cell Endocrinol* **108**(1-2): 169-177.

McRory, JE, Parker, RL, Sherwood, NM (1997b) Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA Cell Biol* **16**(1): 95-102.

Mei, YA, Vaudry, D, Basille, M, Castel, H, Fournier, A, Vaudry, H, Gonzalez, BJ (2004) PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci* **19**(6): 1446-1458.

Meier, CA (1997) Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *J Recept Signal Transduct Res* **17**(1-3): 319-335.

Mikkelsen, JD, Hannibal, J, Fahrenkrug, J, Larsen, PJ, Olcese, J, McArdle, C (1995) Pituitary adenylate cyclase activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J Neuroendocrinol* **7**(1): 47-55.

Mitchell, DJ, Kim, DT, Steinman, L, Fathman, CG, Rothbard, JB (2000a) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research* **56**(5): 318-325.

Mitchell, DJ, Kim, DT, Steinman, L, Fathman, CG, Rothbard, JB (2000b) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res* **56**(5): 318-325.

Miyata, A, Arimura, A, Dahl, RR, Minamino, N, Uehara, A, Jiang, L, Culler, MD, Coy, DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **164**(1): 567-574.

Miyata, A, Jiang, L, Dahl, RD, Kitada, C, Kubo, K, Fujino, M, Minamino, N, Arimura, A (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* **170**(2): 643-648.

Moreno, D, Gourlet, P, De Neef, P, Cnudde, J, Waelbroeck, M, Robberecht, P (2000) Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC(2) receptor. *Peptides* **21**(10): 1543-1549.

Moretti, C, Mencacci, C, Frajese, GV, Cerilli, M, Frajese, G (2002) Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends Endocrinol Metab* **13**(10): 428-435.

Morisset, J, Douziech, N, Rydzewska, G, Buscail, L, Rivard, N (1995) Cell signalling pathway involved in PACAP-induced AR4-2J cell proliferation. *Cell Signal* **7**(3): 195-205.

Moro, O, Lerner, EA (1997) Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem* **272**(2): 966-970.

Moro, O, Wakita, K, Ohnuma, M, Denda, S, Lerner, EA, Tajima, M (1999) Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type 1 receptor-specific antagonist. *J Biol Chem* **274**(33): 23103-23110.

Moroo, I, Tatsuno, I, Uchida, D, Tanaka, T, Saito, J, Saito, Y, Hirai, A (1998) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res* **795**(1-2): 191-196.

Moschos, SA, Jones, SW, Perry, MM, Williams, AE, Erjefalt, JS, Turner, JJ, Barnes, PJ, Sproat, BS, Gait, MJ, Lindsay, MA (2007) Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug Chem* **18**(5): 1450-1459.

Motard, J, Rouxel, R, Paun, A, von Messling, V, Bisaillon, M, Perreault, JP (2011) A novel ribozyme-based prophylaxis inhibits influenza A virus replication and protects from severe disease. *PLoS One* **6**(11): e27327.

Moulton, HM, Nelson, MH, Hatlevig, SA, Reddy, MT, Iversen, PL (2004) Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides. *Bioconjug Chem* **15**(2): 290-299.

Murase, T, Kondo, K, Otake, K, Oiso, Y (1993) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates arginine vasopressin release in conscious rats. *Neuroendocrinology* **57**(6): 1092-1096.

Nakamachi, T, Li, M, Shioda, S, Arimura, A (2006) Signaling involved in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-stimulated ADNP expression. *Peptides* **27**(7): 1859-1864.

Nakase, I, Niwa, M, Takeuchi, T, Sonomura, K, Kawabata, N, Koike, Y, Takehashi, M, Tanaka, S, Ueda, K, Simpson, JC, Jones, AT, Sugiura, Y, Futaki, S (2004) Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther* **10**(6): 1011-1022.

Neidigh, JW, Fesinmeyer, RM, Prickett, KS, Andersen, NH (2001) Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states. *Biochemistry* **40**(44): 13188-13200.

Neumann, JM, Couvineau, A, Murail, S, Lacapere, JJ, Jamin, N, Laburthe, M (2008) Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends Biochem Sci* **33**(7): 314-319.

Nicole, P, Lins, L, Rouyer-Fessard, C, Drouot, C, Fulcrand, P, Thomas, A, Couvineau, A, Martinez, J, Brasseur, R, Laburthe, M (2000) Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *J Biol Chem* **275**(31): 24003-24012.

Nonaka, N, Banks, WA, Mizushima, H, Shioda, S, Morley, JE (2002) Regional differences in PACAP transport across the blood-brain barrier in mice: a possible influence of strain, amyloid beta protein, and age. *Peptides* **23**(12): 2197-2202.

O'Donnell, M, Garippa, RJ, Rinaldi, N, Selig, WM, Simko, B, Renzetti, L, Tannu, SA, Wasserman, MA, Welton, A, Bolin, DR (1994a) Ro 25-1553: a novel, long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part I: In vitro and in vivo bronchodilator studies. *J Pharmacol Exp Ther* **270**(3): 1282-1288.

O'Donnell, M, Garippa, RJ, Rinaldi, N, Selig, WM, Tocker, JE, Tannu, SA, Wasserman, MA, Welton, A, Bolin, DR (1994b) Ro 25-1553: a novel, long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part II: Effect on in vitro and in vivo models of pulmonary anaphylaxis. *J Pharmacol Exp Ther* **270**(3): 1289-1294.

Oehlke, J, Scheller, A, Wiesner, B, Krause, E, Beyermann, M, Klauschenz, E, Melzig, M, Bienert, M (1998) Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta* **1414**(1-2): 127-139.

Ogi, K, Kimura, C, Onda, H, Arimura, A, Fujino, M (1990) Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem Biophys Res Commun* **173**(3): 1271-1279.

Ohkubo, S, Kimura, C, Ogi, K, Okazaki, K, Hosoya, M, Onda, H, Miyata, A, Arimura, A, Fujino, M (1992) Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA Cell Biol* **11**(1): 21-30.

Ohtaki, H, Nakamachi, T, Dohi, K, Aizawa, Y, Takaki, A, Hodoyama, K, Yofu, S, Hashimoto, H, Shintani, N, Baba, A, Kopf, M, Iwakura, Y, Matsuda, K, Arimura, A, Shioda, S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(19): 7488-7493.

Ohtaki, H, Nakamachi, T, Dohi, K, Shioda, S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* **36**(1-3): 16-25.

Ohwaki, T, Ando, H, Kakimoto, F, Uesugi, K, Watanabe, S, Miyake, Y, Kayano, M (1987) Effects of dose, pH, and osmolarity on nasal absorption of secretin in rats. II: Histological aspects of the nasal mucosa in relation to the absorption variation due to the effects of pH and osmolarity. *J Pharm Sci* **76**(9): 695-698.

Okazaki, K, Itoh, Y, Ogi, K, Ohkubo, S, Onda, H (1995) Characterization of murine PACAP mRNA. *Peptides* **16**(7): 1295-1299.

Okazaki, K, Kimura, C, Kosaka, T, Watanabe, T, Ohkubo, S, Ogi, K, Kitada, C, Onda, H, Fujino, M (1992) Expression of human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. *FEBS Lett* **298**(1): 49-56.

Omary, MB, Kagnoff, MF (1987) Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. *Science* **238**(4833): 1578-1581.

Onoue, S, Endo, K, Ohshima, K, Yajima, T, Kashimoto, K (2002a) The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* **23**(8): 1471-1478.

Onoue, S, Nagano, Y, Tatsuno, I, Uchida, D, Kashimoto, K (1999) Receptor-binding specificity depending on N-terminal structure of VIP/PACAP. *Biomedical Research* **20**: 219-231.

Onoue, S, Ohshima, K, Endo, K, Yajima, T, Kashimoto, K (2002b) PACAP protects neuronal PC12 cells from the cytotoxicity of human prion protein fragment 106-126. *FEBS Lett* **522**(1-3): 65-70.

Onoue, S, Waki, Y, Nagano, Y, Satoh, S, Kashimoto, K (2001) The neuromodulatory effects of VIP/PACAP on PC-12 cells are associated with their N-terminal structures. *Peptides* **22**(6): 867-872.

Padari, K, Saalik, P, Hansen, M, Koppel, K, Raid, R, Langel, U, Pooga, M (2005) Cell transduction pathways of transportans. *Bioconjug Chem* **16**(6): 1399-1410.

Papo, N, Shai, Y (2003) New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry* **42**(31): 9346-9354.

Pardridge, WM (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* **2**(1): 3-14.

Pardridge, WM (2002) Why is the global CNS pharmaceutical market so under-penetrated? *Drug Discov Today* **7**(1): 5-7.

Parker, DB, Coe, IR, Dixon, GH, Sherwood, NM (1993) Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *Eur J Biochem* **215**(2): 439-448.

Parker, DB, Power, ME, Swanson, P, Rivier, J, Sherwood, NM (1997) Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology* **138**(1): 414-423.

Patenaude, C, Massicotte, G, Lacaille, JC (2005) Cell-type specific GABA synaptic transmission and activity-dependent plasticity in rat hippocampal stratum radiatum interneurons. *Eur J Neurosci* **22**(1): 179-188.

Pelliccioli, AP, Wirz, J (2002) Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochemical & Photobiological Sciences* **1**(7): 441-458.

Perrin, MH, Grace, CRR, Riek, R, Vale, WW (2006) The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors - Sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci.* **1070:** 105-119.

Petersen, S, Alonso, JM, Specht, A, Duodu, P, Goeldner, M, del Campo, A (2008) Phototriggering of cell adhesion by caged cyclic RGD peptides. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**(17): 3192-3195.

Pinsker, A, Einsiedel, J, Harterich, S, Waibel, R, Gmeiner, P (2011) A highly efficient type I beta-turn mimetic simulating an Asx-Pro-turn-like structure. *Org Lett* **13**(13): 3502-3505.

Planque, N (2006) Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. *Cell Commun Signal* **4:** 7.

Pohl, M, Wank, SA (1998) Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and glucagon-like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *J Biol Chem* **273**(16): 9778-9784.

Pooga, M, Soomets, U, Hallbrink, M, Valkna, A, Saar, K, Rezaei, K, Kahl, U, Hao, JX, Xu, XJ, Wiesenfeld-Hallin, Z, Hokfelt, T, Bartfai, T, Langel, U (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* **16**(9): 857-861.

Pusl, T, Wu, JJ, Zimmerman, TL, Zhang, L, Ehrlich, BE, Berchtold, MW, Hoek, JB, Karpen, SJ, Nathanson, MH, Bennett, AM (2002) Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* **277**(30): 27517-27527.

Rahmat, D, Khan, MI, Shahnaz, G, Sakloetsakun, D, Perera, G, Bernkop-Schnurch, A (2012) Synergistic effects of conjugating cell penetrating peptides and thiomers on non-viral transfection efficiency. *Biomaterials* **33**(7): 2321-2326.

Rajagopal, R, Chen, ZY, Lee, FS, Chao, MV (2004) Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* **24**(30): 6650-6658.

Rao, KS, Reddy, MK, Horning, JL, Labhasetwar, V (2008) TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs. *Biomaterials* **29**(33): 4429-4438.

Rat, D, Schmitt, U, Tippmann, F, Dewachter, I, Theunis, C, Wieczerzak, E, Postina, R, van Leuven, F, Fahrenholz, F, Kojro, E (2011) Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *FASEB J* **25**(9): 3208-3218.

Re, R, Bryan, SE (1984) Functional Intracellular Renin-Angiotensin Systems May Exist in Multiple Tissues. *Clinical and Experimental Hypertension Part a-Theory and Practice* **6**(10-1): 1739-1742.

Re, RN (1989) The cellular biology of angiotensin: paracrine, autocrine and intracrine actions in cardiovascular tissues. *J Mol Cell Cardiol* **21 Suppl 5:** 63-69.

Reglodi, D, Fabian, Z, Tamas, A, Lubics, A, Szeberenyi, J, Alexy, T, Toth, K, Marton, Z, Borsiczky, B, Roth, E, Szalontay, L, Lengvari, I (2004a) Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regul Pept* **123**(1-3): 51-59.

Reglodi, D, Somogyvari-Vigh, A, Vigh, S, Kozicz, T, Arimura, A (2000) Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* **31**(6): 1411-1417.

Reglodi, D, Tamas, A, Lubics, A, Szalontay, L, Lengvari, I (2004b) Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* **123**(1-3): 85-94.

Rennert, R, Wespe, C, Beck-Sickinger, AG, Neundorf, I (2006) Developing novel hCT derived cell-penetrating peptides with improved metabolic stability. *Biochim Biophys Acta* **1758**(3): 347-354.

Reshetnyak, YK, Andreev, OA, Lehnert, U, Engelman, DM (2006) Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6460-6465.

Reubi, JC (2000) In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* **921:** 1-25.

Richard, JP, Melikov, K, Brooks, H, Prevot, P, Lebleu, B, Chernomordik, LV (2005) Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* **280**(15): 15300-15306.

Richard, JP, Melikov, K, Vives, E, Ramos, C, Verbeure, B, Gait, MJ, Chernomordik, LV, Lebleu, B (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **278**(1): 585-590.

Robberecht, P, Gourlet, P, De Neef, P, Woussen-Colle, MC, Vandermeers-Piret, MC, Vandermeers, A, Christophe, J (1992a) Receptor occupancy and adenylate cyclase activation in AR 4-2J rat pancreatic acinar cell membranes by analogs of pituitary adenylate cyclase-activating peptides amino-terminally shortened or modified at position 1, 2, 3, 20, or 21. *Mol Pharmacol* **42**(2): 347-355.

Robberecht, P, Gourlet, P, De Neef, P, Woussen-Colle, MC, Vandermeers-Piret, MC, Vandermeers, A, Christophe, J (1992b) Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem* **207**(1): 239-246.

Romanelli, F, Fillo, S, Isidori, A, Conte, D (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates rat Leydig cell function in vitro. *Neuropeptides* **31**(4): 311-317.

Rossato, M, Nogara, A, Gottardello, F, Bordon, P, Foresta, C (1997) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates rat Leydig cell steroidogenesis through a novel transduction pathway. *Endocrinology* **138**(8): 3228-3235.

Rothbard, JB, Jessop, TC, Lewis, RS, Murray, BA, Wender, PA (2004) Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J Am Chem Soc* **126**(31): 9506-9507.

Rousselle, C, Clair, P, Lefauconnier, JM, Kaczorek, M, Scherrmann, JM, Temsamani, J (2000) New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol Pharmacol* **57**(4): 679-686.

Rousselle, C, Clair, P, Smirnova, M, Kolesnikov, Y, Pasternak, GW, Gac-Breton, S, Rees, AR, Scherrmann, JM, Temsamani, J (2003) Improved brain uptake and pharmacological activity of dalargin using a peptide-vector-mediated strategy. *J Pharmacol Exp Ther* **306**(1): 371-376.

Rousselle, C, Clair, P, Temsamani, J, Scherrmann, JM (2002) Improved brain delivery of benzylpenicillin with a peptide-vector-mediated strategy. *J Drug Target* **10**(4): 309-315.

Runcie, MJ, Ulman, LG, Potter, EK (1995) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cardiovascular and respiratory responses in anaesthetised dogs. *Regul Pept* **60**(2-3): 193-200.

Saalik, P, Elmquist, A, Hansen, M, Padari, K, Saar, K, Viht, K, Langel, U, Pooga, M (2004) Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study. *Bioconjug Chem* **15**(6): 1246-1253.

Sastri, M, Barraclough, DM, Carmichael, PT, Taylor, SS (2005) A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 349-354.

Schafer, H, Schwarzhoff, R, Creutzfeldt, W, Schmidt, WE (1991) Characterization of a guanosine-nucleotide-binding-protein-coupled receptor for pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide on plasma membranes from rat brain. *Eur J Biochem* **202**(3): 951-958.

Schafer, H, Zheng, J, Morys-Wortmann, C, Folsch, UR, Schmidt, WE (1999) Structural motifs of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) defining PAC1-receptor selectivity. *Regul Pept* **79**(2-3): 83-92.

Schroeder, U, Schroeder, H, Sabel, BA (2000) Body distribution of 3H-labelled dalargin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. injections to mice. *Life Sci* **66**(6): 495-502.

Schwarze, SR, Ho, A, Vocero-Akbani, A, Dowdy, SF (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**(5433): 1569-1572.

Schytz, HW, Birk, S, Wienecke, T, Kruuse, C, Olesen, J, Ashina, M (2009) PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain* **132**(Pt 1): 16-25.

Seki, Y, Suzuki, Y, Baskaya, MK, Saito, K, Takayasu, M, Shibuya, M, Sugita, K (1995) Central cardiovascular effects induced by intracisternal PACAP in dogs. *Am J Physiol* **269**(1 Pt 2): H135-139.

Sethuraman, VA, Bae, YH (2007) TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors. *J Control Release* **118**(2): 216-224.

Sethuraman, VA, Na, K, Bae, YH (2006) pH-responsive sulfonamide/PEI system for tumor specific gene delivery: an in vitro study. *Biomacromolecules* **7**(1): 64-70.

Sherwood, NM, Krueckl, SL, McRory, JE (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* **21**(6): 619-670.

Shinohara, K, Funabashi, T, Kimura, F (1999) Temporal profiles of vasoactive intestinal polypeptide precursor mRNA and its receptor mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* **63**(2): 262-267.

Shioda, S, Legradi, G, Leung, WC, Nakajo, S, Nakaya, K, Arimura, A (1994) Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology* **135**(3): 818-825.

Shuto, Y, Somogyvari-Vigh, A, Shioda, S, Onda, H, Arimura, A (1995) Effect of hypophysectomy on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression in the rat testis. *Peptides* **16**(6): 1039-1044.

Simeoni F., MMC, Heitz F., Divita G. (2003) Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **31**(11): 2717-2724.

Somogyvari-Vigh, A, Reglodi, D (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* **10**(23): 2861-2889.

Steenstrup, BR, Alm, P, Hannibal, J, Jorgensen, JC, Palle, C, Junge, J, Christensen, HB, Ottesen, B, Fahrenkrug, J (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: occurrence and relaxant effect in female genital tract. *Am J Physiol* **269**(1 Pt 1): E108-117.

Stewart, KM, Horton, KL, Kelley, SO (2008) Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Organic & Biomolecular Chemistry* **6**(13): 2242-2255.

Sugahara, KN, Teesalu, T, Karmali, PP, Kotamraju, VR, Agemy, L, Greenwald, DR, Ruoslahti, E (2010) Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science* **328**(5981): 1031-1035.

Sun, C, Song, D, Davis-Taber, RA, Barrett, LW, Scott, VE, Richardson, PL, Pereda-Lopez, A, Uchic, ME, Solomon, LR, Lake, MR, Walter, KA, Hajduk, PJ, Olejniczak, ET (2007) Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 7875-7880.

Suzuki, T, Futaki, S, Niwa, M, Tanaka, S, Ueda, K, Sugiura, Y (2002) Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem* **277**(4): 2437-2443.

Svensen, N, Walton, JG, Bradley, M (2012) Peptides for cell-selective drug delivery. *Trends Pharmacol Sci* **33**(4): 186-192.

Sze, KH, Zhou, H, Yang, Y, He, M, Jiang, Y, Wong, AO (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology* **148**(10): 5042-5059.

Tadevosyan, A, Maguy, A, Villeneuve, LR, Babin, J, Bonnefoy, A, Allen, BG, Nattel, S (2010) Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *J Biol Chem* **285**(29): 22338-22349.

Tadevosyan, A, Vaniotis, G, Allen, BG, Hebert, TE, Nattel, S (2012) G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *J Physiol* **590**(Pt 6): 1313-1330.

Tam, JK, Lee, LT, Chow, BK (2007) PACAP-related peptide (PRP)--molecular evolution and potential functions. *Peptides* **28**(9): 1920-1929.

Tamada, Y, Tanaka, M, Ichitani, Y, Okamura, H, Yanaihara, N, Ibata, Y (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactive neuronal elements in rat hypothalamus and median eminence with special reference to morphological background of its effect on anterior pituitary--light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neurosci Lett* **180**(2): 105-108.

Tamas, A, Reglodi, D, Szanto, Z, Borsiczky, B, Nemeth, J, Lengvari, I (2002) Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuro Endocrinol Lett* **23**(3): 249-254.

Tams, JW, Jorgensen, RM, Holm, A, Fahrenkrug, J (2000) Creation of a selective antagonist and agonist of the rat VPAC(1) receptor using a combinatorial approach with vasoactive intestinal peptide 6-23 as template. *Mol Pharmacol* **58**(5): 1035-1041.

Tan, YV, Couvineau, A, Murail, S, Ceraudo, E, Neumann, JM, Lacapere, JJ, Laburthe, M (2006) Peptide agonist docking in the N-terminal ectodomain of a class II G protein-coupled receptor, the VPAC1 receptor. Photoaffinity, NMR, and molecular modeling. *J Biol Chem* **281**(18): 12792-12798.

Tatsuno, I, Gottschall, PE, Koves, K, Arimura, A (1990) Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **168**(3): 1027-1033.

Temsamani, J, Vidal, P (2004) The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discovery Today* **9**(23): 1012-1019.

Thompson, M, Andrade, VA, Andrade, SJ, Pusl, T, Ortega, JM, Goes, AM, Leite, MF (2003) Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **301**(2): 267-274.

Torchilin, VP, Rammohan, R, Weissig, V, Levchenko, TS (2001) TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8786-8791.

Trabulo, S, Cardoso, AL, Mano, M, de Lima, MCP (2010) Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel)*(3): 961-993.

Trehin, R, Krauss, U, Beck-Sickinger, AG, Merkle, HP, Nielsen, HM (2004a) Cellular uptake but low permeation of human calcitonin-derived cell penetrating peptides and Tat(47-57) through well-differentiated epithelial models. *Pharm Res* **21**(7): 1248-1256.

Trehin, R, Krauss, U, Muff, R, Meinecke, M, Beck-Sickinger, AG, Merkle, HP (2004b) Cellular internalization of human calcitonin derived peptides in MDCK monolayers: a comparative study with Tat(47-57) and penetratin(43-58). *Pharm Res* **21**(1): 33-42.

Tsutsumi, M, Claus, TH, Liang, Y, Li, Y, Yang, L, Zhu, J, Dela Cruz, F, Peng, X, Chen, H, Yung, SL, Hamren, S, Livingston, JN, Pan, CQ (2002) A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes* **51**(5): 1453-1460.

Tunnemann, G, Martin, RM, Haupt, S, Patsch, C, Edenhofer, F, Cardoso, MC (2006) Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J* **20**(11): 1775-1784.

Tyagi, M, Rusnati, M, Presta, M, Giacca, M (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **276**(5): 3254-3261.

Uchida, D, Arimura, A, Somogyvari-Vigh, A, Shioda, S, Banks, WA (1996) Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res* **736**(1-2): 280-286.

Umetsu, Y, Tenno, T, Goda, N, Shirakawa, M, Ikegami, T, Hiroaki, H (2011) Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environments. *Biochim Biophys Acta* **1814**(5): 724-730.

Valdehita, A, Bajo, AM, Fernandez-Martinez, AB, Arenas, MI, Vacas, E, Valenzuela, P, Ruiz-Villaespesa, A, Prieto, JC, Carmena, MJ (2010) Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer. *Peptides* **31**(11): 2035-2045.

van de Nes, JA, Nafe, R, Schlote, W (2008) Non-tau based neuronal degeneration in Alzheimer's disease -- an immunocytochemical and quantitative study in the supragranular layers of the middle temporal neocortex. *Brain Res* **1213**: 152-165.

Van Rampelbergh, J, Juarranz, MG, Perret, J, Bondue, A, Solano, RM, Delporte, C, De Neef, P, Robberecht, P, Waelbroeck, M (2000) Characterization of a novel VPAC(1) selective agonist and identification of the receptor domains implicated in the carboxyl-terminal peptide recognition. *Br J Pharmacol* **130**(4): 819-826.

Vaniotis, G, Del Duca, D, Trieu, P, Rohlicek, CV, Hebert, TE, Allen, BG (2010) Nuclear beta-adrenergic receptors modulate gene expression in adult rat heart. *Cell Signal* **23**(1): 89-98.

Vasudev, PG, Banerjee, M, Ramakrishnan, C, Balaram, P (2012) Asparagine and glutamine differ in their propensities to form specific side chain-backbone hydrogen bonded motifs in proteins. *Proteins* **80**(4): 991-1002.

Vaudry, D, Falluel-Morel, A, Basille, M, Pamantung, TF, Fontaine, M, Fournier, A, Vaudry, H, Gonzalez, BJ (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* **72**(3): 303-316.

Vaudry, D, Falluel-Morel, A, Bourgault, S, Basille, M, Burel, D, Wurtz, O, Fournier, A, Chow, BK, Hashimoto, H, Galas, L, Vaudry, H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* **61**(3): 283-357.

Vaudry, D, Gonzalez, BJ, Basille, M, Pamantung, TF, Fontaine, M, Fournier, A, Vaudry, H (2000a) The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/CPP32. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13390-13395.

Vaudry, D, Gonzalez, BJ, Basille, M, Yon, L, Fournier, A, Vaudry, H (2000b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* **52**(2): 269-324.

Vaudry, D, Pamantung, TF, Basille, M, Rousselle, C, Fournier, A, Vaudry, H, Beauvillain, JC, Gonzalez, BJ (2002a) PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* **15**(9): 1451-1460.

Vaudry, D, Rousselle, C, Basille, M, Falluel-Morel, A, Pamantung, TF, Fontaine, M, Fournier, A, Vaudry, H, Gonzalez, BJ (2002b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6398-6403.

Venneti, KC, Hewage, CM (2011a) Conformational and molecular interaction studies of glucagon-like peptide-2 with its N-terminal extracellular receptor domain. *FEBS Lett* **585**(2): 346-352.

Venneti, KC, Malthouse, JP, O'Harte, FP, Hewage, CM (2011b) Conformational, receptor interaction and alanine scan studies of glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Biochim Biophys Acta* **1814**(7): 882-888.

Vives, E, Brodin, P, Lebleu, B (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **272**(25): 16010-16017.

Vives, E, Schmidt, J, Pelegrin, A (2008) Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim Biophys Acta* **1786**(2): 126-138.

Wadia, JS, Stan, RV, Dowdy, SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* **10**(3): 310-315.

Wagner, U, Bredenbroker, D, Storm, B, Tackenberg, B, Fehmann, HC, von Wichert, P (1998) Effects of VIP and related peptides on airway mucus secretion from isolated rat trachea. *Peptides* **19**(2): 241-245.

Wagstaff, KM, Jans, DA (2006) Protein transduction: Cell penetrating peptides and their therapeutic applications. *Current Medicinal Chemistry* **13**(12): 1371-1387.

Warren, JB, Cockcroft, JR, Larkin, SW, Kajekar, R, Macrae, A, Ghatei, MA, Bloom, SR (1992) Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide Is a Potent Vasodilator in Humans. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **20**(1): 83-87.

Watkins, CC, Boehning, D, Kaplin, AI, Rao, M, Ferris, CD, Snyder, SH (2004) Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2631-2635.

Watkins, HA, Au, M, Hay, DL (2012) The structure of secretin family GPCR peptide ligands: implications for receptor pharmacology and drug development. *Drug Discov Today.*

Winters, SJ, Moore, JP, Jr. (2011) PACAP, an autocrine/paracrine regulator of gonadotrophs. *Biol Reprod* **84**(5): 844-850.

Wolf, N, Krieglstein, K (1995) Phenotypic development of neonatal rat chromaffin cells in response to adrenal growth factors and glucocorticoids: focus on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Neurosci Lett* **200**(3): 207-210.

Wray, V, Kakoschke, C, Nokihara, K, Naruse, S (1993) Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **32**(22): 5832-5841.

Wray, V, Nokihara, K, Naruse, S (1998) Solution structure comparison of the VIP/PACAP family of peptides by NMR spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* **865**: 37-44.

Wu, D, Pardridge, WM (1996) Central nervous system pharmacologic effect in conscious rats after intravenous injection of a biotinylated vasoactive intestinal peptide analog coupled to a blood-brain barrier drug delivery system. *J Pharmacol Exp Ther* **279**(1): 77-83.

Xia, M, Sreedharan, SP, Bolin, DR, Gaufo, GO, Goetzl, EJ (1997) Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **281**(2): 629-633.

Yamamoto, K, Hashimoto, H, Hagihara, N, Nishino, A, Fujita, T, Matsuda, T, Baba, A (1998a) Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* **211**(1): 63-69.

Yamamoto, S, Kawamura, K, James, TN (1998b) Intracellular distribution of adenylate cyclase in human cardiocytes determined by electron microscopic cytochemistry. *Microsc Res Tech* **40**(6): 479-487.

Yamashita, T, Sawamoto, K, Suzuki, S, Suzuki, N, Adachi, K, Kawase, T, Mihara, M, Ohsugi, Y, Abe, K, Okano, H (2005) Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J Neurochem* **94**(2): 459-468.

Yang, S, Yang, J, Yang, Z, Chen, P, Fraser, A, Zhang, W, Pang, H, Gao, X, Wilson, B, Hong, JS, Block, ML (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* **319**(2): 595-603.

Yang, Y, Mufson, EJ, Herrup, K (2003) Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **23**(7): 2557-2563.

Ying, J, Ahn, JM, Jacobsen, NE, Brown, MF, Hruby, VJ (2003) NMR solution structure of the glucagon antagonist [desHis1, desPhe6, Glu9]glucagon amide in the presence of perdeuterated dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry* **42**(10): 2825-2835.

Yon, L, Jeandel, L, Chartrel, N, Feuilloley, M, Conlon, JM, Arimura, A, Fournier, A, Vaudry, H (1993) Neuroanatomical and physiological evidence for the involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the regulation of the distal lobe of the frog pituitary. *J Neuroendocrinol* **5**(3): 289-296.

Yu, R, Wang, J, Li, J, Wang, Y, Zhang, H, Chen, J, Huang, L, Liu, X (2010) A novel cyclopeptide from the cyclization of PACAP(1-5) with potent activity towards PAC1 attenuates STZ-induced diabetes. *Peptides* **31**(6): 1062-1067.

Yung, SL, Dela Cruz, F, Hamren, S, Zhu, J, Tsutsumi, M, Bloom, JW, Caudle, M, Roczniak, S, Todd, T, Lemoine, L, MacDougall, M, Shanafelt, AB, Pan, CQ (2003) Generation of highly selective VPAC2 receptor agonists by high throughput mutagenesis of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Biol Chem* **278**(12): 10273-10281.

Zamostiano, R, Pinhasov, A, Gelber, E, Steingart, RA, Seroussi, E, Giladi, E, Bassan, M, Wollman, Y, Eyre, HJ, Mulley, JC, Brenneman, DE, Gozes, I (2001) Cloning and characterization of the human activity-dependent neuroprotective protein. *J Biol Chem* **276**(1): 708-714.

Zhang, JH, Barr, VA, Mo, Y, Rojkova, AM, Liu, S, Simonds, WF (2001) Nuclear localization of G protein beta 5 and regulator of G protein signaling 7 in neurons and brain. *J Biol Chem* **276**(13): 10284-10289.

Zhao, M, Kircher, MF, Josephson, L, Weissleder, R (2002) Differential conjugation of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake. *Bioconjug Chem* **13**(4): 840-844.

Zhong, Y, Kasson, BG (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **135**(1): 207-213.

Zhou, WL, Leung, PS, Wong, TP, Dun, NJ, Wong, PY, Chan, HC (1997) Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Endocrinol* **154**(3): 389-395.

Zorko, M, Langel, U (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**(4): 529-545.

Zusev, M, Gozes, I (2004) Differential regulation of activity-dependent neuroprotective protein in rat astrocytes by VIP and PACAP. *Regul Pept* **123**(1-3): 33-41.