

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

**ANALYSES PHARMACOLOGIQUES DU PACAP,  
UN PEPTIDE PROMETTEUR POUR LE TRAITEMENT  
DE LA MALADIE DE PARKINSON**

Par  
Laura Lee-Gosselin

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

**Jury d'évaluation**

Examineur interne et Président du jury	Pr Steven Laplante INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Pr Jean DaSilva Faculté de médecine Département de pharmacologie et physiologie Université de Montréal
Directeur de recherche	Pr Alain Fournier INRS – Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Pr David Chatenet INRS – Institut Armand-Frappier

22 décembre 2017

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de recherche, le professeur Alain Fournier, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise au sein de son laboratoire. Merci d'avoir partagé tes connaissances, de m'avoir fait confiance pour l'avancement du projet et pour les nombreux encouragements. Ta disponibilité, ton écoute et tes conseils ont fait de mon passage au laboratoire une expérience enrichissante. Un grand merci à mon codirecteur, le professeur David Chatenet, pour toute ton aide durant ma maîtrise. Merci de m'avoir transmis tes connaissances et d'avoir été disponible pour m'encadrer et m'aider tout au long de mon programme de 2<sup>e</sup> cycle. Un sincère merci à Myriam Létourneau pour ta présence, tes précieux conseils et pour avoir répondu à toutes mes questions. J'aimerais aussi remercier le Pr Steven Laplante qui a si gentiment accepté de produire les spectres RMN de nos dérivés tryptophanyles. Merci à toute l'équipe du *Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides* et au *Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP)* pour votre soutien, vos conseils et surtout pour m'avoir fait passer de bons moments en votre compagnie. Vous avez été des collègues de travail extraordinaires, mais surtout vous avez été et vous demeurerez des amis en or. Un grand merci à mes parents pour m'avoir encouragée et soutenue durant ces deux dernières années. En tout temps, j'ai pu compter sur vous. Vous avez été continuellement présents et malgré la distance, vous étiez toujours là pour m'écouter, me conseiller et m'épauler.

## Résumé

Le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), *via* ses interactions avec trois récepteurs, soit PAC1, VPAC1 et VPAC2, est une molécule pléiotrope possédant notamment des propriétés neuroprotectrices. Ce peptide est ainsi considéré comme prometteur pour le développement d'un traitement des maladies neurodégénératives et notre objectif est donc de concevoir des dérivés du PACAP activant sélectivement PAC1, lequel médie un effet antiapoptotique au niveau des neurones. Des études récentes ont montré l'importance des acides aminés histidine-1 et phénylalanine-6 pour l'affinité et l'activité du peptide. En conséquence, nous avons évalué la relation entre les caractéristiques physicochimiques de ces résidus et les propriétés pharmacologiques du PACAP. Des tests d'affinité ont été effectués sur des cellules CHO exprimant l'un ou l'autre des récepteurs et l'activité biologique a été déterminée par des mesures de mobilisation calcique et d'activation de l'AMPc et de Gαq. Les résultats pour la position 1 suggèrent que la présence d'un hétéroatome capable de faire un pont H, et son orientation spatiale, sont deux éléments cruciaux. Pour la position 6, les résultats montrent que l'hydrophobicité du substituant est déterminante pour la liaison et l'activation de PAC1. Il appert cependant que ce résidu doit respecter certaines limites quant à sa géométrie et sa dimension.

**Mots-clés** : PACAP; Parkinson; récepteurs; PAC1; VPAC1; VPAC2; RCPG de la classe B; apoptose; mort neuronale; stress oxydatif.

## Abstract

The *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), *via* its interactions with three receptors named PAC1, VPAC1 and VPAC2, is a pleiotropic molecule showing, among others, neuroprotective properties. Thus, this peptide is considered as promising for the development of a treatment for neurodegenerative diseases and accordingly, our objective is to design PACAP derivatives able to activate selectively PAC1, which mediates an antiapoptotic effect in neurons. Recent studies have shown the importance of the amino acids histidine-1 and phenylalanine-6 in binding to receptors and biological activities. As a result, we evaluated the relationship between the physico-chemical characteristics of these residues and the pharmacological properties of PACAP. Binding assays were performed on CHO cells expressing one or the other of the three receptors and biological activity was determined by calcium mobilization assays and cAMP and Gαq activation measurements. The results for position 1 suggest that the presence of a heteroatom capable of H-bonding, as well as its spatial orientation, are two crucial elements. In position 6, the results show that hydrophobicity of the substituent is important for binding and activation of PAC1. However, it appears that this residue must respect certain limits in its geometry and size.

**Key words:** PACAP; Parkinson, receptors; PAC1; VPAC1; VPAC2; class B GPCR; apoptosis; neuronal death; oxidative stress.

# Table des matières

Introduction .....	1
Chapitre 1: Revue de la littérature .....	7
1. Le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide .....	7
1. Découverte du PACAP .....	7
2. Structure primaire .....	8
3. Structure secondaire .....	9
4. <i>Asx-turn</i> .....	10
5. Motif <i>N-capping</i> .....	12
6. Distribution du PACAP .....	13
7. Dégradation enzymatique du PACAP .....	15
2. Récepteurs du PACAP .....	16
1. RCPG de la classe B .....	16
2. Modèle d'activation .....	17
3. Signalisation .....	19
3. Activité biologique du PACAP .....	20
1. Effets du PACAP sur le système nerveux central .....	20
2. Effets du PACAP sur les autres organes .....	21
4. Relations structure-activité .....	23
1. Études par délétions .....	23
2. <i>Ala-scan</i> .....	25
3. <i>D-scan</i> et <i>N-méthyl-scan</i> .....	26
4. Modifications aux positions 1, 3 et 6 .....	27
Chapitre 2 : Hypothèse et objectif du projet .....	30
Chapitre 3 : Méthodologie .....	32
1. Synthèse .....	32
2. Purification et caractérisation des peptides .....	34
3. C2-arylation .....	35
4. Test de liaison .....	37
5. Test de mobilisation calcique .....	38
6. Test AMPc .....	39
7. Activation de la protéine Gαq .....	41

Chapitre 4: Résultats et discussion.....	42
1. Développement d'analogues modifiés en position 1 .....	43
1. Test de liaison .....	44
2. Activation de la protéine Gαq.....	46
2. Développement d'analogues modifiés en position 6 .....	50
1. C2-arylation .....	50
2. Test de liaison .....	51
3. Test de mobilisation calcique.....	53
4. Activation de la protéine EPAC.....	55
5. Activation de la protéine Gαq.....	57
6. Biais .....	61
Chapitre 5 : Conclusion .....	65
Annexe 1 .....	68
Annexe 2 .....	74
Bibliographie .....	85

## Liste des abréviations

Aib : Acide aminoisobutyrique

AC : Adénylyl cyclase

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ADNF: *Activity-dependent neurotrophic factor*

ADNP: *Activity-dependent neurotrophic protein*

BHE : Barrière hématoencéphalique

Bip : L-Biphénylalanine

BOP : Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)phosphonium

BRET : *Bioluminescence resonance energy transfer*

Cha : L-Cyclohexylalanine

COMT : Catécholamine-O-méthyltransférerase

CRH : *Corticotropin-releasing hormone*

CT : Calcitonine

DCM : Dichlorométhane

DDC : Dopa-décarboxylase

DIEA : Diisopropyléthylamine

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

DMF : Diméthylformamide

DMSO-d6 : Diméthylsulfoxyde deutéré

DOPAL : 3,4-Dihydroxyphénylacétaldéhyde

DPP-IV: Dipeptidyl peptidase IV

EPAC : *Exchange protein directly activated by cAMP*

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

GIP : Peptide insulinothéropique dépendant du glucose

GDP: Guanosine diphosphate

GFP : *Green fluorescent protein*

GHRH: *Growth hormone-releasing hormone*

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

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

GnRH: *Gonadotropin-releasing hormone*

Hyp : Hydroxyproline

Iaa : Acide acétique-4-imidazole  
Iac : Acide acrylique-4-imidazole  
Ind: Acide indole-2-carboxylique  
iv : Intraveineuse  
L-dopa : Levodopa (L-3,4-dihydroxyphénylalanine)  
LH : Hormone lutéinisante  
MAO : Monoamine-oxydase  
MAP : Protéine activée par un mitogène  
MIP : *Macrophage inflammatory protein*  
Nal : L-1-Naphtylalanine  
NEP : Endopeptidase neutre  
PACAP : *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*  
PC : Prohormone convertase  
PHM : Peptide histidine-méthionine  
PKA : Protéine kinase A  
RANTES: *Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*  
RSA : Relation structure-activité  
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G  
Sar : Sarcosine  
SNC : Système nerveux central  
Tic : Acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique  
Tiq : Acide tétrahydroisoquinoline-1-carboxylique  
TFA : Acide trifluoroacétique  
TRH : *Thyrotropin-releasing hormone*  
VIP : Peptide vasoactif intestinal



## Listes des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la synthèse de la dopamine à partir de la tyrosine ....	2
Figure 2: Causes possibles du stress oxydatif observé dans la maladie de Parkinson. Adaptée de Manoharan <i>et al.</i> , 2016.....	2
Figure 3: Représentation schématique des mécanismes principaux de l'action neuroprotectrice du PACAP dans les maladies neurodégénératives.....	4
Figure 4: Représentation moléculaire de l'Asx- <i>turn</i> (Doan <i>et al.</i> , 2011) .....	11
Figure 5: Représentation schématique des différents types de motif N- <i>capping</i> . Adaptée de Neumann <i>et al.</i> , 2008. ....	12
Figure 6: Représentation schématique du motif N- <i>capping</i> (Bourgault <i>et al.</i> , 2011).....	13
Figure 7: Représentation schématique du rôle du PACAP dans différents organes. Adaptée de Diané <i>et al.</i> , 2014. ....	14
Figure 8: Site de clivage enzymatique du PACAP. CP, carboxypeptidase; DPP IV, dipeptidyl peptidase IV; EP, endopeptidases plasmatiques; NEP, endopeptidase neutre; PC, prohormone convertase. Adaptée de Bourgault <i>et al.</i> , 2009a. ....	16
Figure 9: Représentation schématique du modèle d'activation suggéré pour le PACAP.....	18
Figure 10: Représentation schématique des voies de signalisation lors de la liaison du PACAP au récepteur et menant à une réponse cellulaire. Adaptée de Diané <i>et al.</i> , 2014. ....	20
Figure 11: Structure du PACAP38 indiquant les segments responsables de l'activité, de la sélectivité et de la liaison pour les différents récepteurs. Adaptée de Vaudry <i>et al.</i> , 2009.....	25
Figure 12: Méthylation de l'histidine en position 1 sur l'azote distal ( $\tau$ ) ou proximal ( $\pi$ ). ....	27
Figure 13 Structure chimique de l'acide acrylique-4-imidazole et de l'acide acétique-4-imidazole. ....	28
Figure 14 Structure chimique des composés induisant une contrainte conformationnelle.....	29
Figure 15: Structure chimique des composés utilisés pour substituer la phénylalanine-6. ....	29
Figure 16: Dérivés de l'acide propionique mimant les propriétés physico-chimiques du noyau imidazole, utilisés pour la substitution de l'histidine-1. ....	30
Figure 17: Dérivés tryptophanyles modifiés à la position C2 du noyau indole.....	31

Figure 18: Résumé schématique des étapes de la synthèse peptidique.....	33
Figure 19: Représentation schématique de l'arylation en C2 du noyau indole du Fmoc-tryptophane .....	36
Figure 20: Représentation schématique de la mobilisation calcique se déroulant suite à l'activation de la voie de signalisation de la phospholipase C. Adaptée de Enzo Life Sciences.	39
Figure 21: Changement conformationnel de la protéine EPAC en présence de l'AMPc (schéma produit par Mathilde Poujol de Molliens, INRS – IAF) .....	40
Figure 22: Principe de donneur (D) – accepteur (A) observé avec la technologie BRET entre l'enzyme Rluc et la protéine GFP. Adaptée de Couturier <i>et al.</i> , 2012. ....	41
Figure 23: Inhibition de la liaison du marqueur <sup>125</sup> I-Ac-PACAP27 sur des cellules CHO transfectées avec les récepteurs PAC1, VPAC1 ou VPAC2, avec des concentrations croissantes (10 <sup>-11</sup> M à 10 <sup>-5</sup> M) des analogues modifiés en position 1.....	46
Figure 24: Courbes concentration-réponse montrant l'effet des analogues modifiés en position 1 sur l'activation de Gαq dans des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur PAC1. ....	48
Figure 25 : Inhibition de la liaison du marqueur <sup>125</sup> I-Ac-PACAP27 sur des cellules CHO transfectées avec les récepteurs PAC1, VPAC1 ou VPAC2, avec des concentrations croissantes (10 <sup>-11</sup> M à 10 <sup>-5</sup> M) des analogues modifiés à la position 6.....	53
Figure 26: Courbes concentration-réponse illustrant l'effet des différentes modifications sur la mobilisation du calcium dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur PAC1. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de réponse (fluorescence) obtenu pour le PACAP27 à 10 <sup>-5</sup> M.....	54
Figure 27: Courbes concentration-réponse illustrant l'effet des différentes modifications introduites à la position 6 du PACAP27 sur l'activation d'EPAC dans des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur PAC1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réponse normalisé par rapport au PACAP27 à 10 <sup>-5</sup> M. ....	56
Figure 28: Courbes concentration-réponse illustrant l'effet des différentes modifications introduites à la position 6 du PACAP27 sur le recrutement de Gαq dans des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur PAC1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réponse normalisé par rapport au PACAP27 à 10 <sup>-5</sup> M. ....	57

Figure 29 : Schéma montrant différentes voies de signalisation du PACAP suite à l'activation du récepteur PAC1 (Bourgault <i>et al.</i> , 2011).....	60
Figure 30: Diagrammes en toile d'araignée pour tous les analogues modifiés en position 6 pour EPAC et Gαq en utilisant le Emax et le logR. ....	62
Figure 31: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp-OH .....	75
Figure 32: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe)-OH .....	76
Figure 33: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CH <sub>3</sub> )-OH .....	78
Figure 34: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-F)-OH.....	79
Figure 35 : Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-Br)-OH .....	81
Figure 36: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CF <sub>3</sub> )-OH.....	82
Figure 37: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-NO <sub>2</sub> )-OH .....	84

## Liste des tableaux

Tableau 1: Structure primaire des différents membres de la famille PACAP-VIP-sécrétine-GHRH chez les humains. Adapté de Shen <i>et al.</i> , 2013.....	8
Tableau 2: Comparaison des structures primaires du PACAP de différentes espèces. ....	9
Tableau 3: Fmoc-AA-OH utilisés pour la synthèse des différents analogues du PACAP.....	33
Tableau 4 : Masses obtenues pour les analogues modifiés en position 1 ou 6.....	35
Tableau 5 : Concentration produisant 50% d'inhibition de la liaison spécifique de <sup>125</sup> I-Ac-PACAP27 pour le [Nle <sup>17</sup> ]PACAP27 et ses analogues modifiés en position 1.....	46
Tableau 6 : Résultats obtenus pour l'activation de Gαq pour les analogues modifiés en position 1.....	48
Tableau 7: Masses et temps de rétention en HPLC analytique obtenus pour les analogues modifiés en position 6.....	51
Tableau 8 : Concentration produisant 50% d'inhibition de la liaison spécifique de <sup>125</sup> I-Ac-PACAP27 pour le [Nle <sup>17</sup> ]PACAP27 et ses analogues modifiés en position 6.....	53
Tableau 9: Résultats obtenus pour la mobilisation calcique pour les analogues modifiés en position 6.....	55
Tableau 10: Résultats obtenus pour l'activation d'EPAC pour les analogues modifiés en position 6.....	57
Tableau 11: Résultats obtenus pour l'activation de Gαq pour les analogues modifiés en position 6.....	58
Tableau 12: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp-OH .....	74
Tableau 13: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe)-OH.....	76
Tableau 14: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CH <sub>3</sub> )-OH.....	77
Tableau 15: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-F)-OH.....	79
Tableau 16: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-Br)-OH .....	80
Tableau 17: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CF <sub>3</sub> )-OH ..	82
Tableau 18: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-NO <sub>2</sub> )-OH ..	83

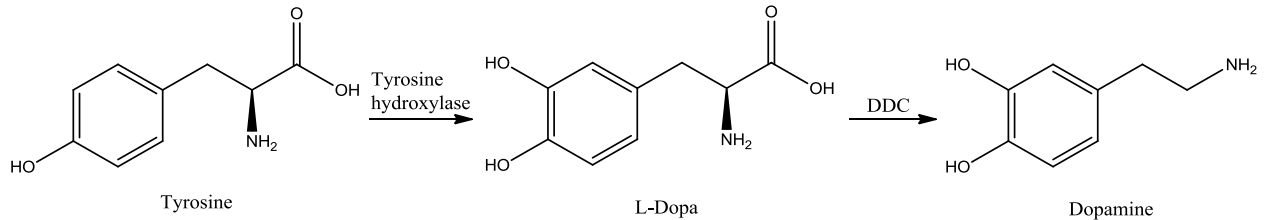
## Introduction

Les maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer et d'Huntington affectent des millions de personnes dans le monde. Elles se caractérisent par la dégénérescence et la mort des neurones menant à plusieurs problèmes au niveau cognitif, moteur et sensoriel, et toutes ces pathologies mènent éventuellement à la mort. En particulier, la maladie d'Alzheimer se caractérise par une perte progressive et irréversible des fonctions mentales, dont la mémoire, celle d'Huntington, par des troubles cognitifs, moteurs et psychiatriques, et celle de Parkinson, par une perte progressive des fonctions cognitives et motrices. De plus, pour ces différentes atteintes neurologiques, les processus biologiques impliqués sont semblables et font intervenir l'apoptose, l'inflammation et les dommages oxydatifs. La maladie de Parkinson s'avère être le deuxième trouble neurodégénératif le plus commun chez les humains après la maladie d'Alzheimer, affectant entre 1 et 2% de la population âgée de 65 ans et plus. D'ici 2031, il est estimé que le nombre de Canadiens atteints, âgés de plus de 40 ans, passera de 99 000 à 163 700, et ceux âgés de 65 ans et plus passera de 71 500 à 148 800 (Agence-de-la-santé-publique-du-Canada, 2014). Parmi les nombreux symptômes moteurs et non moteurs associés à la maladie de Parkinson, on retrouve notamment des tremblements, de la bradykinésie, de la rigidité, de l'instabilité posturale, une anomalie dans le parler, de la dépression, de l'anxiété, des problèmes de sommeil, des difficultés respiratoires, digestives et excrétrices et un dysfonctionnement sexuel (Kalia *et al.*, 2015, Saeed *et al.*, 2017) .

La maladie de Parkinson est causée par un dysfonctionnement des neurones dopaminergiques dans la substance noire et est entre autres caractérisée par le dépôt de corps d'inclusion intracellulaires (corps de Lewy) (Reglodi *et al.*, 2015). La dopamine est un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines et elle joue un rôle dans diverses fonctions importantes telles que le comportement, la cognition, les fonctions motrices, le sommeil et la mémorisation. Les catécholamines sont des composés organiques synthétisés à partir de la tyrosine et jouant le rôle d'hormones ou de neurotransmetteurs. Plus précisément, pour produire la dopamine, la tyrosine subit tout d'abord une hydroxylation en position méta de son noyau phénolique à l'aide de l'enzyme tyrosine hydroxylase, ce qui permet la formation de la levodopa (L-dopa). Par la suite, la L-dopa est décarboxylée par la dopa-décarboxylase (DDC) pour former la dopamine (Figure 1). Celle-ci peut alors être recyclée par les neurones dopaminergiques ou dégradée par les cellules gliales (Beal, 2003). La dégradation peut se faire par la

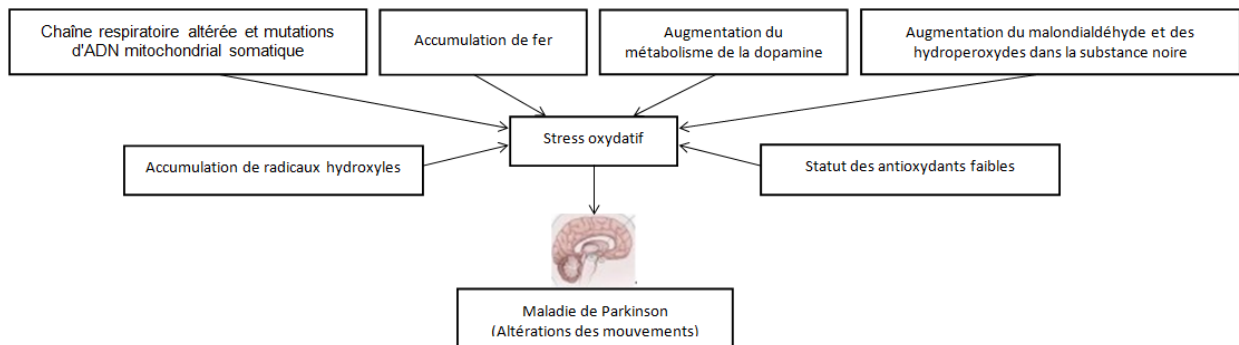
catécholamine-O-méthyltransférase (COMT) ou par des enzymes mitochondriales, les monoamines-oxydases A et B (MAO A et B), et par une désamination oxydative produisant du peroxyde d'hydrogène et du 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL) (Meiser *et al.*, 2013).

**Figure 1 : Représentation schématique de la synthèse de la dopamine à partir de la tyrosine**



La cause de la maladie de Parkinson reste encore inconnue mais plusieurs études suggèrent que la génétique ou l'exposition à différentes toxines environnementales telles que les pesticides (par exemple le paraquat) pourrait jouer un rôle dans son apparition. Toutefois, le vieillissement semble être le facteur prédominant. Les mécanismes pathophysiologiques connus sont le stress oxydatif, la neuroinflammation, le mauvais repliement des protéines ( $\alpha$ -synucléine) et le dysfonctionnement mitochondrial (Forloni *et al.*, 2002, Reglodi *et al.*, 2015). Le stress oxydatif serait l'un des facteurs de risque important de la dégénérescence, en partie dû à l'activité oxydative élevée de la MAO-B, à un taux élevé de fer favorisant la réaction de Fenton qui mène à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs), ainsi qu'à un faible taux de molécules anti-oxydantes telles que le glutathion (GSH) (Figure 2) (Manoharan *et al.*, 2016, Reglodi *et al.*, 2015).

**Figure 2: Causes possibles du stress oxydatif observé dans la maladie de Parkinson. Adaptée de Manoharan *et al.*, 2016.**

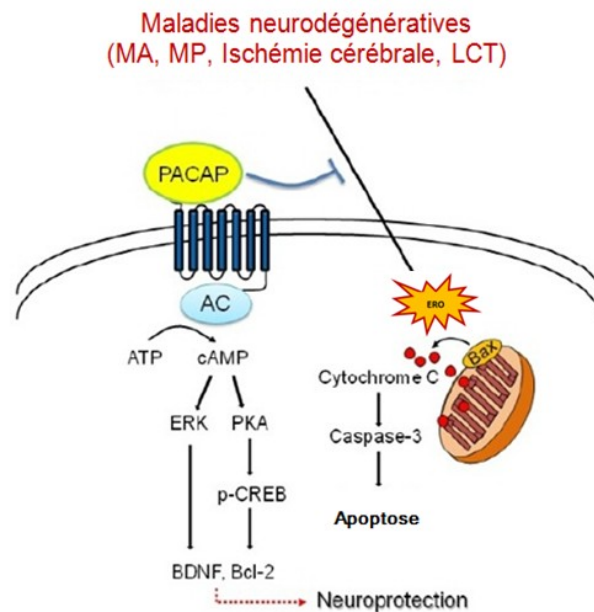


De nombreuses études ont été effectuées afin de découvrir des médicaments pouvant arrêter la mort neuronale observée dans la maladie de Parkinson. Toutefois, la découverte d'une telle substance a été jusqu'à maintenant infructueuse, entre autres à cause de la nécessité de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE). Donc, il n'existe aucun traitement curatif. Néanmoins, d'autres traitements sont connus et utilisés pour diminuer les symptômes causés par la maladie et ainsi soulager le patient. Les traitements palliatifs les plus connus sont l'administration de levodopa (L-dopa; L-3,4-dihydroxyphénylalanine) qui rétablit temporairement le niveau de dopamine dans le cerveau, l'utilisation d'agonistes dopaminergiques ou d'inhibiteurs de la catécholamine-O-méthyltransférase (COMT), de la monoamine-oxydase-B (MAO-B), ou encore des anticholinergiques (Goldenberg, 2008). Par contre, les patients traités de manière chronique avec ces composés peuvent développer des problèmes psychiatriques et moteurs tels que de la bradykinésie, des nausées, de la somnolence et des hallucinations qui nuisent bien sûr à leur qualité de vie. C'est pour cette raison qu'il est important de concevoir des outils thérapeutiques pouvant arrêter la mort neuronale associée à la maladie de Parkinson, et ce, sans effets secondaires.

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont montré le potentiel neuroprotecteur d'un peptide connu sous le nom de *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP). Ce dernier a été isolé en 1989 par Arimura et ses collègues à partir d'extraits hypothalamiques pour sa capacité à stimuler la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans des cellules hypophysaires (Miyata *et al.*, 1989). Par la suite, plusieurs études ont démontré son effet neuroprotecteur dans des modèles de neurodégénérescence, d'ischémies ou de lésions cérébrales (Miyata *et al.*, 1989, Vaudry *et al.*, 2009). Il a ainsi été observé que le PACAP diminuait la mort cellulaire induite par le stress oxydatif, qu'il offrait une protection *in vivo* dans les accidents vasculaires cérébraux et qu'il diminuait le volume de l'infarctus *via* des mécanismes antiapoptotiques et anti-inflammatoires. Sa capacité à prévenir la mort neuronale a aussi été montrée dans plusieurs modèles *in vivo* des maladies d'Huntington et de Parkinson, d'ischémie cérébrale et de lésions au cerveau (Bourgault *et al.*, 2009a, Reglodi *et al.*, 2006, Reglodi *et al.*, 2004, Tamas *et al.*, 2006, Uchida *et al.*, 1996). La neuroprotection du PACAP s'effectue *via* différents mécanismes cellulaires. Entre autres, il a été démontré que le PACAP favorise la survie cellulaire en stimulant la production d'agents neuroprotecteurs au niveau des astrocytes et/ou en réduisant la libération de cytokines délétères des microglies activées. Plus précisément, le PACAP stimule le relâchement de l'ADNF (*activity-dependent neurotrophic factor*), de l'ADNP (*activity-dependent neurotrophic protein*), des MIP (*macrophage inflammatory*

*protein*) et/ou des chimiokines RANTES (*regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*) (Masmoudi-Kouki *et al.*, 2007). Ce peptide favorise également la survie neuronale en diminuant la libération de facteurs neurotoxiques pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) des cellules gliales (Yang *et al.*, 2006), en induisant le relâchement de catécholamines des cellules chromaffines surrénaliennes, des neurones sympathiques et des cellules neurosécrétoires (Ghzili *et al.*, 2008, Mustafa *et al.*, 2010, Przywara *et al.*, 1996), en inhibant la production de cytokines et en stimulant la production de cytokines anti-inflammatoires (Delgado *et al.*, 2001, Ganea *et al.*, 2002, Martinez *et al.*, 2002), et finalement, en réduisant le niveau de caspase 3, un médiateur proapoptotique. Par ailleurs, l'activation du récepteur couplé aux protéines G (RCPG) PAC1 par le PACAP entraîne l'activation de la voie de l'adénylyl cyclase (AC)/protéine kinase A (PKA)/protéine activée par un mitogène (MAP) kinase qui va ainsi inhiber la caspase 9 et augmenter l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-2. Cette dernière va alors empêcher la libération du cytochrome C de la mitochondrie, et de ce fait même prévenir l'apoptose (Figure 3) (Dejda *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2014, Seaborn *et al.*, 2011).

**Figure 3: Représentation schématique des mécanismes principaux de l'action neuroprotectrice du PACAP dans les maladies neurodégénératives.**



**Déclenchement de l'expression du gène cible transcriptionnel antiapoptotique et inhibition des réponses de signalisation apoptotiques y compris la génération de EROs, la production de la protéine Bax mitochondriale et la libération de cytochrome C qui est responsable de l'activation de la caspase 3. Adaptée de Lee *et al.*, 2014.**



Ces études mettent en lumière le potentiel du PACAP qui apparaît alors comme une solution prometteuse pour le développement d'un agent thérapeutique capable de freiner la progression de la maladie de Parkinson. Cependant, le peptide en soi ne peut être considéré pour un traitement puisqu'il présente certains désavantages. Notamment, il est rapidement dégradé dans le sang par différentes peptidases endogènes telles que la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Plus précisément, la DPP-IV clive l'isoforme de 38 acides aminés du PACAP (PACAP38) au niveau des acides aminés des positions 2 et 4 pour donner le PACAP(3-38) et le PACAP(5-38) (Zhu *et al.*, 2003). Ces différents métabolites agissent comme des antagonistes du récepteur PAC1, diminuant ainsi de manière significative la durée d'action et l'efficacité du peptide. De plus, le PACAP est capable d'activer trois RCPGs de la classe B à savoir PAC1, VPAC1 et VPAC2. Le PAC1 est responsable de l'activité antiapoptotique, le VPAC1 module la réponse inflammatoire et le VPAC2 est à l'origine d'effets surtout périphériques telles la vasodilatation et la rétention d'eau (Fizanne *et al.*, 2004, Tsutsumi *et al.*, 2002). Puisque l'activation non sélective de ces trois RCPGs par le PACAP causera des effets secondaires, il est d'une importance critique, en vue d'un traitement de maladies neurodégénératives, de développer des composés activant préférentiellement PAC1 (antiapoptotique) et/ou simultanément les récepteurs PAC1 et VPAC1 (anti-inflammatoire), sans activer le récepteur VPAC2.

L'objectif de mon projet de recherche s'inscrit dans cette problématique. Afin d'élargir nos connaissances actuelles sur le potentiel thérapeutique du PACAP dans les maladies neurodégénératives, il est important de mieux comprendre les paramètres physico-chimiques spécifiques impliqués dans la reconnaissance du PACAP par les différents récepteurs et dans leur activation. L'objectif est donc d'effectuer différentes modifications dans la molécule dans le but de développer des composés qui activeraient de manière sélective le récepteur PAC1 et/ou simultanément les récepteurs PAC1/VPAC1 sans activer le récepteur VPAC2. Une action sur le récepteur VPAC1, sans être essentielle, pourrait constituer un avantage additionnel puisqu'il a été montré que des agents anti-inflammatoires produisent des effets bénéfiques dans des modèles de maladies neurodégénératives (Barnum *et al.*, 2014, Ramsey *et al.*, 2014). Puisque l'inflammation est une composante de la dégénérescence neuronale, l'activation du récepteur VPAC1, qui est à l'origine d'effets anti-inflammatoires, pourrait contribuer par addition ou synergie à ralentir voire stopper la neurodégénérescence.

En fonction des études antérieures de structure-activité, nous avons utilisé le PACAP27 comme gabarit moléculaire pour nos travaux. Ce peptide correspond à l'isoforme de 27 acides aminés du PACAP obtenue par délétion du segment 28-38 du PACAP38. Cette molécule montre des

effets biologiques très similaires à ceux de son précurseur de 38 acides aminés et son usage a donc été privilégié car en plus d'être équipotent, il présente un profil métabolique supérieur à celui du PACAP38 et il est capable de traverser efficacement la BHE (Bourgault *et al.*, 2008a). En premier lieu, l'histidine en position 1 a été remplacée par différents acides propioniques porteurs en C3 de groupements mimant les propriétés physico-chimiques du noyau imidazole (pont H et aromaticité). En deuxième lieu, la phénylalanine en position 6 a été substituée au moyen de dérivés tryptophanyles modifiés par C2-arylation du noyau indole. Cette modification augmente l'hydrophobicité ainsi que l'encombrement stérique, tout en conservant le caractère aromatique du résidu. Ces différents composés furent évalués pour leur capacité à lier les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 et à induire une mobilisation du calcium intracellulaire, une stimulation d'EPAC (*exchange protein directly activated by cAMP*) et une activation de la protéine Gαq.

Ce mémoire est composé d'une revue de la littérature mettant en lumière les connaissances actuelles sur la structure, ainsi que sur les propriétés pharmacologiques, chimiques et biologiques du PACAP, et d'une description de la méthodologie employée pour réaliser cette étude, et des résultats obtenus. Dans la dernière partie, les résultats sont discutés, des conclusions sont formulées, et des perspectives pour le projet sont présentées.

# CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1. Le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

### 1. Découverte du PACAP

Le 20<sup>e</sup> siècle a marqué le début d'une période fructueuse pour l'isolation et l'identification de plusieurs hormones. Plus précisément, en 1901, il y eut la découverte de l'adrénaline suivie de celle de la thyroxine, de l'insuline et des corticostéroïdes (Bennett, 1999, Ericson-Neilsen *et al.*, 2014, Hamdy, 2002, Wilcox, 2005). Un peu plus tard, l'hormone de croissance, les gonadotrophines, les hormones stimulantes de la thyroïde, la prolactine et l'hormone adrénocorticotrope ont été isolées (Ayyar, 2011, Forsyth *et al.*, 1972, Joseph-Bravo *et al.*, 2015, Kresge *et al.*, 2005, P. Michael Conn *et al.*, 1994). Puis, dans les années 50, Geoffrey Harris propose un concept où la sécrétion de chacune des hormones hypophysaires est régulée par une ou des neurohormones hypothalamiques (Watts, 2015). Cette hypothèse a rendu encore plus complexe le modèle de la transmission hormonale et incité les chercheurs à poursuivre intensément leurs investigations afin de caractériser de plus en plus d'hormones. Le travail demeurait toutefois très laborieux puisque les tests requis pour le criblage et la caractérisation des hormones étaient peu sensibles et nécessitaient un temps énorme. C'est alors, durant les années 60, que Berson et Yalow ont introduit le dosage radioimmunologique pour l'insuline (Kahn *et al.*, 2004). Cette méthode sensible, reproductible et très spécifique a pu être transposée pour l'ensemble des hormones et faciliter ainsi leurs études. Ainsi, au milieu des années 1980, la plupart des hormones hypothalamiques hypophysiotropes (TRH, GnRH, somatostatine, CRH, GHRH) étaient maintenant isolées et identifiées (Boler *et al.*, 1969, Guillemin *et al.*, 1976, Kakar *et al.*, 2002, Thorner *et al.*, 1997, Vale *et al.*, 1981). Ensuite, un groupe de l'Université Laval dirigé par Fernand Labrie a publié que toutes les hormones de type libérine, telles que la TRH, la GnRH, la GRH et la GHRH, activent l'adénylyl cyclase dans l'hypophyse et que par conséquent, elles provoquent des augmentations de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) cellulaire (Arimura, 2007). Minamino a alors proposé pour les hormones hypothalamiques une carte bidimensionnelle avec l'hydrophobicité tracée en fonction de la charge. En mesurant ces caractéristiques pour des fractions hypothalamiques ovines capables d'activer l'adénylyl cyclase, il était alors possible d'identifier de nouveaux composés jusqu'alors inconnus lorsque les propriétés ne correspondaient pas à celles d'une hormone déjà

répertoriée. Cela a mené à la découverte du PACAP en 1989 par l'équipe d'Arimura (Arimura, 2007).

## 2. Structure primaire

Le PACAP est présent sous deux isoformes de 38 et 27 acides aminés connues respectivement sous les appellations de PACAP38 et PACAP27. Le PACAP27 est obtenu grâce à la présence d'un site de clivage interne (Gly<sup>28</sup>-Lys<sup>29</sup>-Arg<sup>30</sup>) dans la séquence du PACAP38 (Bourgault *et al.*, 2009a). Les deux isoformes possèdent des activités biologiques similaires et font toutes deux partie de la famille des peptides sécrétine/glucagon/somatolibérine (GHRH). Cette famille inclut aussi le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), le *glucagon-like peptide-2* (GLP-2), le peptide vasoactif intestinal (VIP), le peptide histidine-méthionine (PHM) et le peptide insulinothéropé dépendant du glucose (GIP) (Tableau 1) (Shen *et al.*, 2013). Le PACAP27 partage 68% d'homologie de séquence avec le VIP.

**Tableau 1: Structure primaire des différents membres de la famille PACAP-VIP-sécrétine-GHRH chez les humains. Adapté de Shen *et al.*, 2013.**

Nom/Abréviation	Séquences
Sécrétine	HSDGTFTSELSRLREGARLLQGLV-NH <sub>2</sub>
PHI	HADGVFTSDYSRLLGQISAKKYLESLI- NH <sub>2</sub>
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH <sub>2</sub>
PACAP27	HSDGIFTDSYSRYKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>
PACAP38	HSDGIFTDSYSRYKQMAVKKYLA AVLGKRYKQRVKNK-NH <sub>2</sub>
GHRH	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL-NH <sub>2</sub>
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQFVWLMNT- NH <sub>2</sub>
GLP-2	HADGSFSDDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD-NH <sub>2</sub>
GLP-1	HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR- NH <sub>2</sub>
GIP	YAEFTFISDYSIAMDKIHQQDFVNQLLAQKGGKNDWKHNITQ-NH <sub>2</sub>

En particulier, l'homologie de séquence est observable entre tous les membres de cette famille au niveau du segment N-terminal. En effet, on retrouve principalement un résidu aromatique (histidine (His) ou tyrosine (Tyr)) en position 1, une phénylalanine (Phe) et une thréonine (Thr) respectivement aux positions 6 et 7, un résidu chargé négativement en position 3 (Asp ou Glu) et un résidu de faible poids moléculaire aux positions 2 et 4 (Bourgault *et al.*, 2011). L'homologie de séquence suggère que ces résidus sont cruciaux pour l'affinité et/ou pour l'activité biologique de ces peptides. Parmi la famille sécrétine/glucagon/GHRH, le PACAP est le peptide le plus

conservé au cours de l'évolution (Tableau 2) (A Adams *et al.*, 2002, Chartrel *et al.*, 1991, Kimura *et al.*, 1990, Matsuda *et al.*, 1998, J. McRory *et al.*, 1997, John E. McRory *et al.*, 1995, Parker *et al.*, 1993). Plus précisément, la portion N-terminale 1-27 du PACAP38 a été complètement conservée parmi tous les vertébrés à l'exception du poulet, de l'esturgeon et de l'uranoscope; ce qui suggère un rôle essentiel dans plusieurs fonctions biologiques.

**Tableau 2: Comparaison des structures primaires du PACAP de différentes espèces.**

<b>Espèces</b>	<b>Séquences</b>
Raie	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKPKVKNSGRRV FY
Mouton	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK
Rat et humain	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK
Poulet	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK
Grenouille	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRIKNK
Saumon	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYRQRYRNK
Poisson-chat	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GRRYRQRFRNK
Uranoscope	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLA AVL GRRYRQVRNK
Esturgeon	HSDGIFTDSYSRYREQMAVKKYLA AVL GKRYRQRIRNK
Tunicien 1	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYLA AVL
Tunicien 2	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYINALL

En ce qui concerne la portion 28-38, elle est beaucoup plus variable ce qui suggère qu'elle n'est pas essentielle pour l'activité biologique. Toutefois, des études effectuées avec le PACAP27 et le PACAP38 ont montré que le segment C-terminal (28-38) facilite la liaison du PACAP au récepteur PAC1, et ce, sans affecter la capacité du PACAP à activer l'adénylyl cyclase (Hou *et al.*, 1994, Robberecht *et al.*, 1992a, Robberecht *et al.*, 1992b). Appuyant cette théorie une étude effectuée par Bourgault *et al.* a démontré que des modifications chimiques introduites au niveau du segment N-terminal des deux isoformes étaient moins délétères pour la liaison du PACAP38 que pour l'isoforme PACAP27. En effet, les IC<sub>50</sub> obtenus pour les dérivés PACAP38 étaient généralement plus faibles que ceux obtenus avec les dérivés du PACAP27 (Bourgault *et al.*, 2009b).

### 3. Structure secondaire

Des études réalisées par dichroïsme circulaire (DC), résonance magnétique nucléaire (RMN), modélisation moléculaire et cristallographie ont permis de déterminer la structure secondaire du PACAP dans différents solvants et solutions. Les résultats de DC montrent que le PACAP est

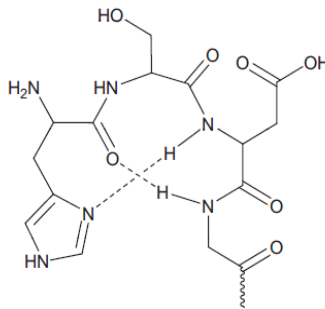
majoritairement de structure désordonnée dans l'eau (Inooka *et al.*, 1992). Par contre, dans des milieux favorisant la formation de ponts hydrogène, comme par exemple certains solvants organiques ou encore des micelles lipidiques, des hélices- $\alpha$  de longueurs variables s'assemblent en fonction du mélange. Par exemple, des travaux ont montré que le PACAP27 dissous dans une solution de trifluoroéthanol (TFE)/H<sub>2</sub>O à 50% présente une hélice- $\alpha$  entre les résidus 9 à 26 (Wray *et al.*, 1993). Dans une autre étude, réalisée avec du TFE à 30%, la portion N-terminale est apparue désordonnée et une structure en hélice- $\alpha$  a été observée entre les résidus 7 à 27 (Gonzalez-Muniz *et al.*, 2001). Lorsque c'est plutôt du méthanol (MeOH) qui est utilisé comme cosolvant, la portion N-terminale du peptide apparaît désordonnée et quatre domaines structurés sont constatés, soit un coude  $\beta$  au niveau des résidus 9 à 12 et 3 domaines hélicoïdaux qui s'étendent des acides aminés 12 à 14, 15 à 20 et 22 à 24 (Inooka *et al.*, 1992). En présence de micelles de dodécylphosphocholine (DPC), un milieu visant à mimer l'environnement membranaire de la cellule, c'est une hélice- $\alpha$  allant de l'extrémité C-terminale à Ile<sup>5</sup> et une portion N-terminale désordonnée qui sont alors notées (Bourgault *et al.*, 2011, Inooka *et al.*, 2001). La structure secondaire du PACAP complet lié au récepteur n'a pas encore été élucidée. Par contre, une telle étude a été accomplie avec le fragment 1-21 du PACAP, *i.e.* PACAP21, en utilisant la spectroscopie RMN-2D du proton, associée à un protocole de séquence de pulses mesurant les transferts d'effets nucléaires Overhauser (Inooka *et al.*, 2001). Cette méthode nécessite un échange rapide entre les formes libres et liées du ligand et c'est pourquoi il n'a pas été possible d'utiliser le PACAP27 dont l'affinité est très élevée comparativement au PACAP21. Les résultats suggèrent trois conformations différentes : un segment N-terminal étendu (résidus 1-3), un coude  $\beta$  de type II' (résidus 3-6) et un autre de type I (résidus 4-7), et une hélice- $\alpha$  en C-terminal (résidus 8-21). Cette différence de conformation au niveau du segment N-terminal, par rapport à ce qui avait été décrit lorsque le peptide est en présence de micelles, suggère qu'un shift conformationnel se manifeste lors de la liaison du peptide à son récepteur (Inooka *et al.*, 2001).

#### **4. Asx-turn**

Lorsque lié à des micelles, les 4 premiers acides aminés du PACAP27 adoptent une structure désordonnée (Bourgault *et al.*, 2009b). Toutefois, à la lumière de la séquence en cause, plusieurs études suggèrent que ce segment adopterait une conformation bioactive spécifique en *Asx-turn*, une structure étroitement liée au coude  $\beta$  (Doan *et al.*, 2011). En effet, la méthode prédictive de structures secondaires développée par Chou et Fasman (Chou *et al.*, 1974) appuie

cette hypothèse puisqu'elle propose un coude  $\beta$  pour ce térapeptide. En accord avec cette observation, l'incorporation en position 2 du segment N-terminal d'acides aminés qui induisent des coudes tels que la proline, l'hydroxyproline (Hyp) et l'acide aminoisobutyrique (Aib) produit des agonistes aussi puissants que le PACAP (Bourgault *et al.*, 2009b). Cette structure semble donc importante pour conserver une bonne activité du PACAP envers son récepteur. La substitution des acides aminés His<sup>1</sup>, Ser<sup>2</sup> ou Asp<sup>3</sup> par leur isomère de configuration D, censée stabiliser les structures en coude  $\beta$ , n'a pas d'effet délétère majeur. De plus, l'homologie de séquence de la portion N-terminale, observée pour l'ensemble des membres de la famille des peptides sécrétine/glucagon/GHRH, suggère que l'*Asx-turn* serait crucial pour l'activation du récepteur. Dans le cas du PACAP, il serait caractérisé par deux ponts H entre His<sup>1</sup> et Asp<sup>3</sup> et entre Ser<sup>2</sup> et Gly<sup>4</sup>. Plus précisément, il s'agirait de deux liaisons H impliquant d'une part le C=O de l'His<sup>1</sup> et le N-H de Gly<sup>4</sup> et d'autre part, l'atome d'azote proximal d'His<sup>1</sup> (atome  $\pi$  du noyau imidazole) et l'atome d'azote du squelette amide d'Asp<sup>3</sup> (Figure 4).

**Figure 4: Représentation moléculaire de l'*Asx-turn* (Doan *et al.*, 2011)**



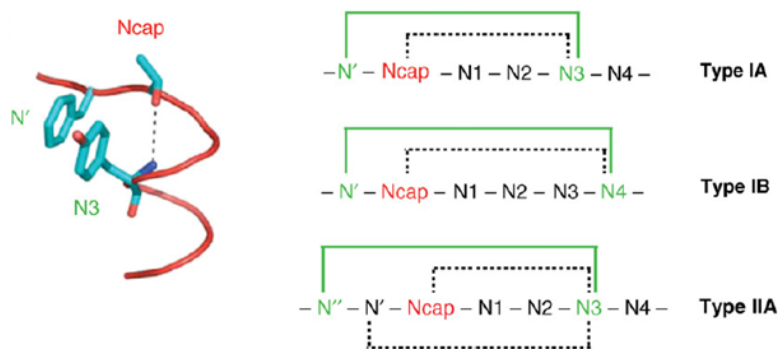
L'implication de ces acides aminés a été mise en évidence par différentes substitutions et par un *Ala-scan* qui consiste à remplacer successivement chaque résidu par une L-alanine. L'*Ala-scan* a permis de déterminer le rôle majeur de His<sup>1</sup> et Asp<sup>3</sup> dans l'activation des trois récepteurs. De plus, la substitution de l'histidine par une phénylalanine ou une 3-méthylhistidine (3-Me-His; méthyle sur N proximal) a donné des composés caractérisés par une perte importante d'affinité de liaison et d'activité biologique tandis que la méthylation en position 1 de l'imidazole (méthyle sur N distal) n'a eu que peu d'effet. Ces résultats suggèrent que le noyau imidazole du résidu en position 1 participe à la formation d'un pont H. L'importance d'Asp<sup>3</sup> a aussi été mise en lumière en substituant ce résidu par une asparagine ou une glycine. Ces substitutions ont eu un impact négatif sur la capacité du PACAP à lier et activer les récepteurs (Doan *et al.*, 2011). Il semblerait également que la présence du proton amide entre Ser<sup>2</sup>-Asp<sup>3</sup> soit cruciale pour l'activité puisque

des modifications telles que [Pro<sup>3</sup>]-, [Sar<sup>3</sup>]- et [N-Me-Asp<sup>3</sup>]PACAP27 ont entraîné une perte considérable voire totale d'activité biologique. Toutefois, selon le type de récepteur et le choix de la substitution, l'affinité est variable. En effet, [N-Me-Asp<sup>3</sup>]PACAP27 et [N-Me-Asp<sup>3</sup>]PACAP38 ont démontré une affinité importante tandis que [Pro<sup>3</sup>]PACAP27 et [Sar<sup>3</sup>]PACAP27 ont plutôt dévoilé une forte diminution de l'affinité, et ce, plus particulièrement envers le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Finalement, la substitution de Gly<sup>4</sup> par Ala n'a eu aucun effet significatif tandis que l'analogue [Sar<sup>4</sup>]PACAP38, semble être un antagoniste puissant du récepteur PAC1, suggérant l'implication de l'atome d'azote dans un pont H (Bourgault *et al.*, 2009b).

## 5. Motif N-capping

Les ligands de la classe B des RCPGs ont tous tendance à former des hélices alpha et les études de délétion successive des résidus du segment N-terminal démontrent que cette portion est essentielle pour l'activation du récepteur. Il a ainsi été suggéré qu'une partie du domaine N-terminal adopterait un motif appelé *N-capping* qui viendrait stabiliser l'hélice- $\alpha$ , imposerait un positionnement spatial spécifique des chaînes latérales et pourrait donc constituer un élément clé dans le mécanisme d'activation du récepteur. Ce motif serait caractérisé par des liaisons H impliquant un proton amide et une fonction carbonyle. Il existe trois types de motif *N-capping*, soit IA, IB et IIA (Figure 5) (Neumann *et al.*, 2008).

**Figure 5: Représentation schématique des différents types de motif *N-capping*. Adaptée de Neumann *et al.*, 2008.**

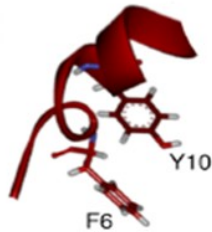


Pour le PACAP, le motif *N-capping* serait de type IA et serait stabilisé par des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales de Phe<sup>6</sup> et Tyr<sup>10</sup>, et par une liaison H entre l'atome d'oxygène de la chaîne latérale de Thr<sup>7</sup> et le proton du squelette amide de Tyr<sup>10</sup> (Aurora *et al.*,



1998). Des analyses structurales et des études de relations structure-activité (RSA) appuient cette hypothèse. En effet, la substitution de Phe<sup>6</sup> avec un résidu hydrophobe tel que la cyclohexylalanine (Cha) n'a pas d'effet sur la liaison tandis que la substitution avec une alanine abolit l'affinité pour les trois récepteurs. Aussi, la substitution de Phe<sup>6</sup> par des acides aminés comportant deux cycles aromatiques (la biphenylalanine ou le naphthylalanine) augmente de manière significative la puissance du peptide. Ces résultats suggèrent l'importance du caractère hydrophobe en position 6. De plus, la substitution de Phe<sup>6</sup> ou Tyr<sup>10</sup> avec une alanine diminue significativement l'affinité de liaison pour le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2011). Également, la substitution de Phe<sup>6</sup> ou Thr<sup>7</sup> par leur isomère de configuration D cause un effet délétère, ce qui supporte encore davantage l'idée qu'ils sont tous les deux impliqués dans la stabilisation du motif *N-capping* (Figure 6) (Bourgault *et al.*, 2011). Finalement, il semblerait que la présence de ce motif, au niveau du segment N-terminal, viendrait positionner l'His<sup>1</sup> dans la pochette d'activation et permettrait l'activation de la voie de signalisation G $\alpha$ s (Neumann *et al.*, 2008).

**Figure 6: Représentation schématique du motif *N-capping* (Bourgault *et al.*, 2011)**

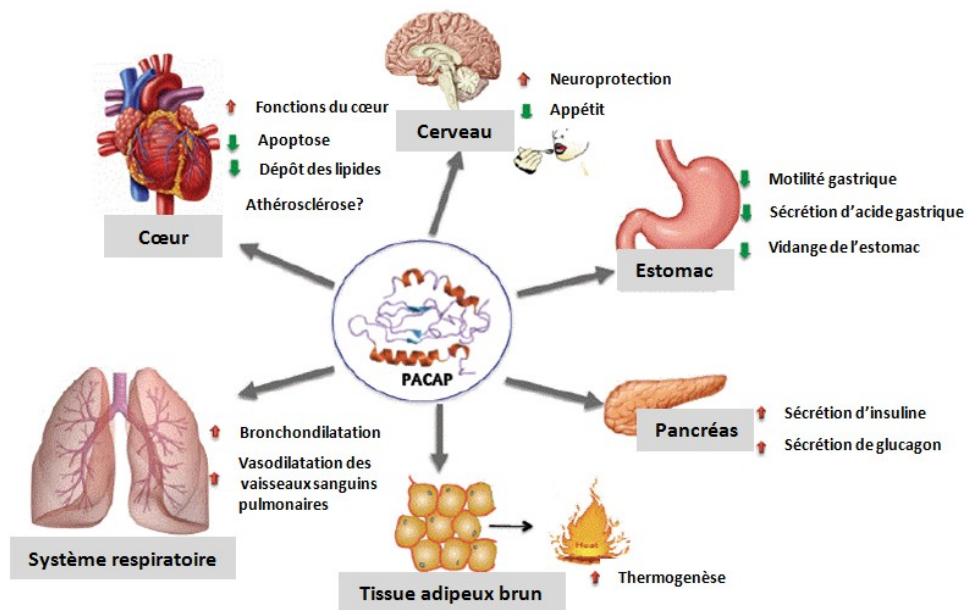


## 6. Distribution du PACAP

Le PACAP est un peptide pléiotrope présent chez tous les vertébrés étudiés. Il est l'un des neuropeptides les plus conservés et sa distribution dans l'organisme est en accord avec son implication dans de nombreux processus biologiques. En particulier, il est retrouvé au niveau des systèmes nerveux central (SNC; hypothalamus, hippocampe, cervelet, etc.) et périphérique (SNP; neurones sensoriels, neurones sympathiques préganglionnaires et neurones ganglionnaires parasympathiques). Il a notamment été démontré que la concentration la plus élevée du peptide est retrouvée dans l'hypothalamus (Arimura *et al.*, 1991). De plus, des analyses chromatographiques par HPLC sur phase inverse ont permis de découvrir que l'isoforme PACAP38 est prédominante et que le PACAP27 représente moins de 10% du

contenu total de peptide dans le cerveau (Vaudry *et al.*, 2000). Cependant, en périphérie, par exemple dans le côlon, le PACAP27 représenterait 30% du PACAP total tandis que dans les testicules, il ne serait presque pas détectable. Cela est probablement dû à la présence de différentes enzymes de conversion dans ces organes (Vaudry *et al.*, 2009). Dans le SNC, le PACAP agit comme une neurohormone, un neurotransmetteur, un facteur neurotrophique et un agent neuroprotecteur. De plus, il est aussi présent dans les organes périphériques telles les glandes endocrines (surrénales, pancréas, ovaires et testicules), au niveau du tube digestif et dans les systèmes respiratoire et cardiovasculaire où il exerce diverses fonctions. Par exemple, il a été observé que le PACAP est capable de moduler la réponse inflammatoire associée à plusieurs maladies neurodégénératives par l'inhibition de la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires (NFκB, TNF-α, IL-1). Aussi, de nombreuses études ont démontré le rôle du PACAP dans la régulation de l'homéostasie énergétique, dont l'appétit, la thermogénèse, la masse corporelle et les paramètres endocrines (Figure 7) (Diané *et al.*, 2014).

**Figure 7: Représentation schématique du rôle du PACAP dans différents organes. Adaptée de Diané *et al.*, 2014.**



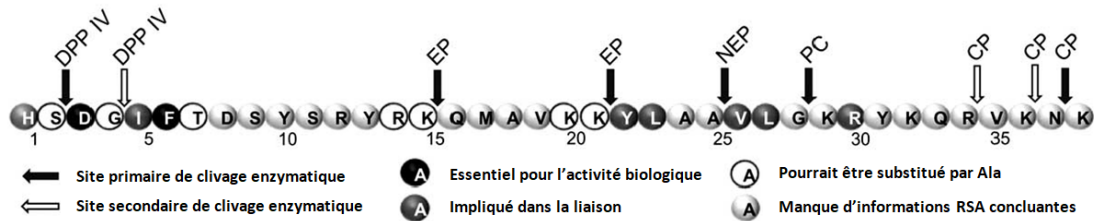
Les différents récepteurs sont retrouvés à divers endroits. Ainsi, le récepteur PAC1 est présent dans le SNC, plus précisément dans l'hypothalamus, le noyau supraoptique, le noyau périventriculaire et l'hypothalamus latéral. De plus, il est aussi retrouvé dans les tissus périphériques tels que les surrénales, l'hypophyse antérieure, les cellules germinales

testiculaires ainsi que dans la prostate (Onoue *et al.*, 2001, Pisegna *et al.*, 2007). Quant aux récepteurs VPAC1 et VPAC2, ils sont présents au niveau du cerveau, mais aussi en périphérie. Le récepteur VPAC1 est présent dans le tube digestif (Vaudry *et al.*, 2000), le foie, le muscle lisse et les poumons (Onoue *et al.*, 2001, Pisegna *et al.*, 2007) et le récepteur VPAC2 est entre autres exprimé dans le foie, l'estomac et le côlon (Pisegna *et al.*, 2007).

## 7. Dégradation enzymatique du PACAP

Le PACAP est capable de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE), un obstacle majeur pour les médicaments actuels. Le PACAP38 traverse la BHE à l'aide d'un système de transport appelé PTS-6 tandis que le PACAP27 entre par diffusion passive. Toutefois, ils possèdent tous deux une courte demi-vie, ce qui limite leur durée d'action (Bourgault *et al.*, 2008a, Bourgault *et al.*, 2009a). En effet, plusieurs enzymes présentes dans l'organisme telles que la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), l'endopeptidase neutre (NEP), des endopeptidases plasmatiques (EP), la prohormone convertase (PC) et la carboxypeptidase (CP) clivent le PACAP à différents endroits et réduisent sinon suppriment son activité biologique (Figure 8) (Bourgault *et al.*, 2008a, Bourgault *et al.*, 2009a, Gourlet *et al.*, 1997, Zhu *et al.*, 2003). Plus précisément, la DPP-IV coupe les deux isoformes du PACAP au niveau de la portion N-terminale entre les liens Ser<sup>2</sup>-Asp<sup>3</sup> et Gly<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>, tandis que la NEP clive le PACAP27 pour générer les PACAP(1-25) et PACAP(1-22). Cette dernière est cependant incapable d'agir sur le PACAP38. Les endopeptidases plasmatiques reconnaissent quant à elles les deux paires dibasiques (Arg<sup>14</sup>-Lys<sup>15</sup> et Lys<sup>20</sup>-Lys<sup>21</sup>) du PACAP38 et elles clivent après ces résidus. Étonnamment, malgré la présence de ces paires dibasiques dans le PACAP27, ce dernier n'est que très faiblement dégradé par ces mêmes endopeptidases (Bourgault *et al.*, 2008a). La portion 28-38 jouerait donc un rôle important au niveau de l'interaction du PACAP avec certaines peptidases, rendant le PACAP27 plus résistant vis-à-vis certaines enzymes. Quant aux prohormones convertases 1 et 2, et aux carboxypeptidases E et H, les premières enzymes clivent au niveau du résidu en position 28 du PACAP tandis que les secondes agissent au niveau du résidu carboxy-terminal.

**Figure 8: Site de clivage enzymatique du PACAP. CP, carboxypeptidase; DPP IV, dipeptidyl peptidase IV; EP, endopeptidases plasmatiques; NEP, endopeptidase neutre; PC, prohormone convertase. Adaptée de Bourgault *et al.*, 2009a.**



## 2. Récepteurs du PACAP

Le PACAP est capable de lier deux populations de récepteurs caractérisés par leurs affinités variables pour le PACAP et le VIP. Le type I, retrouvé principalement au niveau du SNC, démontre une grande affinité pour le PACAP et une faible affinité pour le VIP tandis que le type II, qui est abondant dans plusieurs organes périphériques, démontre une affinité similaire pour ces deux peptides. En effet, le  $K_d$  du PACAP38 et du PACAP27 est d'environ 0,5 nM alors que celui du VIP est supérieur à 500 nM (Bourgault *et al.*, 2011). Le second type est subdivisé en deux classes en fonction de leur affinité pour la sécrétine et l'hélodermine. Les trois sites de liaison ont été clonés et nommés PAC1, VPAC1 et VPAC2, et ils font tous partie des RCPGs de la classe B. Ainsi, le PAC1 fait partie des récepteurs de type I tandis que les récepteurs VPAC1 et VPAC2 sont de type II. En ce qui concerne le récepteur PAC1, il est important de mentionner qu'il existe plus de dix variants d'épissage provenant d'altérations au niveau des boucles intracellulaires, des domaines transmembranaires et du domaine N-terminal extracellulaire (Lutz *et al.*, 2006). D'autres membres de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH possèdent également de l'affinité pour ces récepteurs. En effet, le PHM montre de l'affinité pour les récepteurs VPAC1 et VPAC2, même si cette affinité est moins grande que celle du VIP et du PACAP (Dogrukol-Ak *et al.*, 2004).

### 1. RCPG de la classe B

Les RCPGs sont une grande famille de récepteurs membranaires impliqués dans la transmission de signaux. Ils régulent d'importantes fonctions endocrines et neuroendocrines et ils représentent donc des cibles majeures pour le traitement d'une multitude de problèmes de santé. Ils jouent un rôle clé dans divers processus physiologiques et pathologiques tels que la

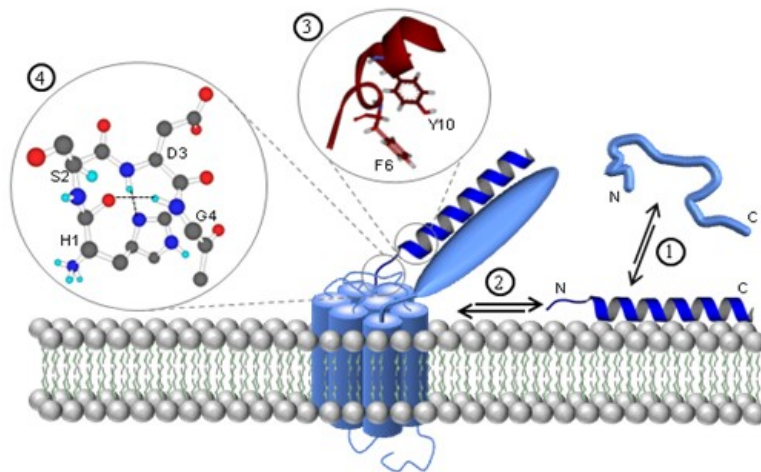
neurotransmission, le métabolisme cellulaire et la sécrétion, de même que dans la différenciation et la croissance cellulaires, et les réponses inflammatoires et immunitaires (L. Sun *et al.*, 2012). D'ailleurs, ces récepteurs sont déjà la cible d'environ 50% des médicaments actuels. Au total, il existe six classes de RCPGs : la classe A (*rhodopsin-like*), la classe B (*secretin receptor family*), la classe C (*metabotropic glutamate*), la classe D (*pheromone receptors*), la classe E (*cAMP receptors*) et la classe F (*frizzled/smoothened family*). Plus de 80% des RCPGs font partie de la classe A. Malgré la diversité fonctionnelle de ces différents récepteurs, leur organisation tridimensionnelle est commune avec sept domaines transmembranaires, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et des segments N- et C-terminaux de longueur variable. Les 7 domaines transmembranaires (7TMD) sont connectés entre eux par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. La longueur des RCPGs de la classe B varie entre 311 et 1490 acides aminés et le domaine N-terminal extracellulaire contient 10 acides aminés conservés dont six cystéines, et plusieurs sites potentiels de N-glycosylation. Les récepteurs du PACAP font partie de la classe B des RCPGs et ceux-ci sont caractérisés par un domaine N-terminal extracellulaire volumineux, responsable de la liaison avec les ligands endogènes. Cette famille de récepteur comprend à ce jour 15 membres qui lient à divers degrés différents ligands tels que la sécrétine, le glucagon, le GLP, le VIP, le PACAP, la GRH, le GIP, la corticolibérine (CRH), l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la calcitonine (CT). Par leur liaison et activation de leurs récepteurs respectifs, ces ligands ont montré leur potentiel et même leur capacité à traiter certaines maladies. Par exemple, le PACAP pour les maladies neurodégénératives (Brenneman, 2007), le VIP pour les maladies inflammatoires (Gomariz *et al.*, 2001), la GRH pour le nanisme (Campbell *et al.*, 1995), l'antagoniste de la CRH pour le stress chronique (Gilligan *et al.*, 2004), le GIP pour le diabète (Brubaker, 2007), et la PTH et la calcitonine pour l'ostéoporose (Mulder *et al.*, 2006).

## 2. Modèle d'activation

Pour que le PACAP puisse exercer ses diverses fonctions, il doit interagir avec ses récepteurs. Le modèle d'activation suggéré est le « *two-step binding model* ». En approchant la membrane cellulaire, le peptide adopte une structure secondaire bien définie. Par la suite, ses portions centrale et C-terminale se lient au domaine N-terminal du récepteur, permettant ainsi au segment N-terminal du PACAP d'interagir avec les domaines transmembranaires et d'initier la signalisation cellulaire (Figure 9) (Bourgault *et al.*, 2009b, Hoare, 2005). Ce long segment, bien que juxtaposé au site d'activation du récepteur, affiche une dimension telle qu'il est difficile de

concevoir un agoniste de petite taille capable à la fois d'interagir efficacement avec le domaine N-terminal de liaison et la pochette d'activation. Malgré cette difficulté, *Omeros Corporation* a réussi à identifier de petites molécules capables d'interagir avec des RCPGs de la classe B et de provoquer une stimulation. Celles-ci seraient des modulateurs allostériques qui interagiraient de manière différente que le modèle classique d'activation des RCPGs de la classe B (*Omeros-Corporation*, 2013).

**Figure 9: Représentation schématique du modèle d'activation suggéré pour le PACAP**



(1) La structure désordonnée du PACAP se lie de manière non spécifique au moyen d'interactions hydrophobes et électrostatiques à la membrane cellulaire, favorisant la formation d'une conformation en hélice- $\alpha$  des portions centrale et C-terminale du peptide. (2) La portion en hélice- $\alpha$  du PACAP interagit spécifiquement avec le domaine N-terminal du récepteur PAC1, permettant au domaine N-terminal du PACAP d'interagir avec le domaine transmembranaire du récepteur. (3 et 4) Il a été suggéré que le domaine N-terminal du PACAP montrerait deux conformations spécifiques. Le segment His<sup>1</sup>-Gly<sup>4</sup> adopterait un *Asx-turn* tandis que la portion Phe<sup>6</sup>-Tyr<sup>10</sup> serait caractérisée par un motif *N-capping* (Bourgault *et al.*, 2009a).

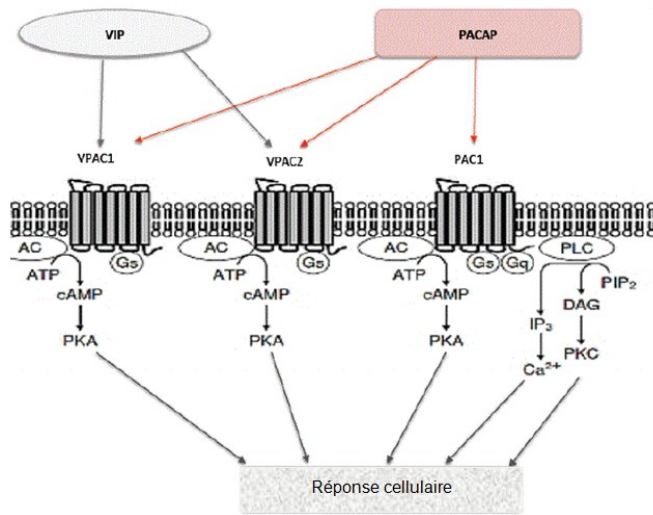
Ce modèle est appuyé par des études RMN qui ont analysé la structure du complexe formé par un variant d'épissage de PAC1, le domaine N-terminal du PAC1-Rs (variant d'épissage court du récepteur PAC1) lié à un antagoniste, le fragment PACAP(6-38). Ces travaux ont révélé que la portion C-terminale du PACAP se lie sous forme d'hélice- $\alpha$  au domaine N-terminal extracellulaire du récepteur par des interactions électrostatiques et hydrophobes (C. Sun *et al.*, 2007). D'ailleurs, des modifications structurales déstabilisant le noyau hélicoïdal du peptide, telles que la substitution des résidus des positions 20 et 21 par Gly, la substitution du lien

peptidique entre les résidus 21 et 22 par l'isostère  $\text{CH}_2\text{-NH}$ , ou l'incorporation d'un acide aminé de configuration D ou N-méthylé à la position 5 ou 7 ont un effet délétère significatif sur l'affinité de liaison, suggérant l'importance de cette structure secondaire (Bourgault *et al.*, 2009a, Bourgault *et al.*, 2009b, Robberecht *et al.*, 1992a, Vaudry *et al.*, 2009). Quant aux analyses NOE en  $^1\text{H}$ -RMN, elles montrent un contact entre le segment 29-34 de l'antagoniste et le court segment 117-119 du domaine extracellulaire du récepteur, mais aucune connectivité NOE entre la portion 6-9 du PACAP(6-38) et le domaine N-terminal du PAC1-Rs (C. Sun *et al.*, 2007).

### 3. Signalisation

Avant que le ligand ne vienne se lier au récepteur, la protéine G hétérotrimérique (sous-unité  $G\alpha$  liée aux sous-unités  $G\beta\gamma$  (dimère)) et la guanosine diphosphate (GDP) sont couplées au récepteur. Lorsqu'un ligand s'attache au domaine N-terminal du récepteur, un changement conformationnel se produit entraînant l'activation des protéines G trimériques en favorisant l'échange GDP/GTP (guanosine triphosphate) au niveau de  $G\alpha$ . Par la suite, il y a dissociation du dimère  $G\beta\gamma$  de  $G\alpha$  et chaque protéine/complexe protéique peut alors agir sur ses effecteurs respectifs et initier des réponses de signalisation intracellulaire. Par exemple, l'activation du récepteur PAC1 stimule l'adénylyl cyclase *via* la protéine  $G\alpha_s$  et entraîne une production d'AMPc. Ce récepteur est aussi en mesure d'activer la voie de la phospholipase C (PLC), *via* la protéine  $G\alpha_q$ , ce qui provoque une augmentation de l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ), d'où une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Figure 10). Une fois le signal envoyé, le GTP lié à  $G\alpha$  est hydrolysé en GDP et  $G\alpha$  devient inactive. Cela mène à la réassociation de la protéine  $G\alpha$  avec  $G\beta\gamma$  pour former de nouveau le complexe hétérotrimérique.

**Figure 10: Représentation schématique des voies de signalisation lors de la liaison du PACAP au récepteur et menant à une réponse cellulaire. Adaptée de Diané *et al.*, 2014.**



### 3. Activité biologique du PACAP

#### 1. Effets du PACAP sur le système nerveux central

Le PACAP possède de nombreuses fonctions dans le système nerveux central (SNC). Entre autres, il joue un rôle au niveau de l'hypothalamus comme neurotransmetteur et neuromodulateur pour réguler la sécrétion de neurohormones hypophysaires. Plus particulièrement, dans le lobe neural de la glande hypophyse, le PACAP stimule la libération d'ocytocine et de vasopressine par l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA (Lutz-Bucher *et al.*, 1996). Ce peptide induit également la phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cAMP Response Element-binding protein*) et stimule l'expression de c-Fos dans la majorité des neurones (Kopp *et al.*, 1997, Vaudry *et al.*, 1998). De plus, il provoque la libération de CRH au niveau du noyau paraventriculaire (PVN), ce qui mène à une élévation considérable de la concentration de corticostérone dans le plasma et à une augmentation de la réponse comportementale au stress (Agarwal *et al.*, 2005, Norrholm *et al.*, 2005). Dans l'hypothalamus basal médian, le PACAP réduit la libération de la GnRH et cause ainsi une diminution de la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH), ainsi qu'un ralentissement de la fréquence d'impulsion de la LH et un arrêt de l'ovulation (Anderson *et al.*, 1996). Plusieurs études ont aussi mis en évidence le rôle du PACAP au niveau de la glande pinéale et du rythme circadien. En effet, des variations circadiennes du contenu en PACAP ont été observées dans la glande pinéale du rat



(Fukuhara *et al.*, 1998). De plus, la grande densité des récepteurs de ce peptide présents dans la glande suggère une implication du système PACAPergique dans la régulation de la production de la mélatonine. D'ailleurs, l'exposition de pinéaloocytes à des concentrations croissantes de PACAP provoque la production d'AMPc et mène à une augmentation de l'activité de deux enzymes clés dans la biosynthèse de la mélatonine, soit la sérotonine-N-acétyltransférase et l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (Ribelayga *et al.*, 1997, Yuwiler *et al.*, 1995). En ce qui a trait au rôle du PACAP dans le développement neurotrophique, celui-ci a été mis en évidence par plusieurs équipes de recherche dont le groupe de Said qui a même suggéré qu'il pourrait prévenir les dommages au cerveau causés par différentes blessures (Harmar *et al.*, 2012). Il a aussi été démontré qu'une concentration élevée du récepteur PAC1 est présente dans la couche externe des cellules granulaires du cervelet pendant les deux premières semaines postnatales, une période intense de multiplication et de migration des cellules granulaires (Basille *et al.*, 2000, Zhou *et al.*, 1999). D'ailleurs, une étude a révélé que le traitement de cellules granulaires avec le PACAP améliore la survie cellulaire et stimule la croissance des neurites (Gonzalez *et al.*, 1997). Les actions neuroprotectrices ont, quant à elles, été démontrées dans plusieurs études où le PACAP protège des cellules granulaires cérébelleuses contre les effets toxiques de molécules telles que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, les céramides, le cisplatine et le 4-hydroxynonéanal (Aubert *et al.*, 2008, Vaudry *et al.*, 2003, Vaudry *et al.*, 2002a, Vaudry *et al.*, 2002b). L'effet neuroprotecteur du PACAP implique, comme son nom l'indique, l'activité de l'AC. Plus précisément, le peptide induit la phosphorylation d'ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) par Rap1 et Ras. Cette activation est nécessaire pour l'inhibition à long terme de l'activité de la caspase 3 et contribue à l'effet neuroprotecteur du PACAP. Aussi, il a été démontré que le PACAP38 protège les neurones de l'hippocampe de l'apoptose, en inhibant la voie de signalisation kinase c-Jun N-terminal 1 (JNK)/protéine activée par le stress et p38. Finalement, les récepteurs du PACAP sont aussi exprimés dans les sections du cerveau responsables du contrôle émotionnel telles que l'amygdale, le noyau de la strie terminale, l'hypothalamus, le locus coeruleus et la substance grise périaqueducule.

## **2. Effets du PACAP sur les autres organes**

Le PACAP est aussi présent dans les organes périphériques où il joue différents rôles. En effet, plusieurs études ont montré le rôle du PACAP dans la régulation de l'appétit, de la thermogénèse et dans les contrôles endocriniens et de la masse corporelle (Inglott *et al.*, 2011,

Matsuda *et al.*, 2007). Le PACAP est aussi retrouvé au niveau des fibres nerveuses innervant les poumons, où il agit comme un bronchodilatateur puissant et un vasodilatateur des vaisseaux sanguins pulmonaires (Kinhult *et al.*, 2000). De plus, étant donné la présence du PACAP et de son récepteur PAC1 dans les tissus cardiaques et les vaisseaux sanguins, il a été suggéré que ce peptide jouerait un rôle dans les fonctions cardiovasculaires. Effectivement, il a été démontré que le PACAP protège les cardiomyocytes contre l'apoptose induite par une ischémie/reperfusion (Gasz *et al.*, 2006, Roth *et al.*, 2009), et contre l'apoptose des cellules endothéliales suite à un stress oxydatif (Racz *et al.*, 2007). De plus, Otto *et al.* ont montré chez la souris que l'absence du récepteur PAC1 cause une insuffisance cardiaque droite après la naissance, démontrant ainsi l'importance de la signalisation associée à l'activation de PAC1 pour le maintien de la fonction cardiovasculaire au début de la vie postnatale (Otto *et al.*, 2004). Le peptide est également retrouvé dans le système gastro-intestinal, où il régule la sécrétion d'acide gastrique via l'activation de PAC1 exprimé dans les cellules entérochromaffines gastriques. De plus, le récepteur VPAC1 est présent dans les cellules D gastriques contenant de la somatostatine et sa stimulation inhiberait la sécrétion d'acide gastrique (Harmar *et al.*, 2012). D'ailleurs, dans l'estomac de rat, il a été observé que le PACAP relâché par des neurones entériques innervant la muqueuse provoque l'augmentation nocturne de la sécrétion d'acide gastrique (Zeng *et al.*, 1999). Au niveau du tractus gastro-intestinal, le PACAP et son récepteur PAC1 sont aussi présents dans l'œsophage, le duodénum, l'intestin grêle, le côlon et le foie.

Le PACAP joue aussi un rôle important dans le contrôle de l'immunité ainsi que de l'inflammation. En effet, l'activation du récepteur PAC1 présent dans les macrophages et les monocytes déclenche une protection suite par exemple à un choc septique occasionné par une endotoxine et cause une atténuation de la production de l'IL-6 provoquée par des lipopolysaccharides (Martinez *et al.*, 2002). Les récepteurs VPAC1 sont aussi fortement exprimés dans les cellules T, plus spécifiquement dans les cellules Th, tandis que les récepteurs VPAC2 ne sont que très peu ou pas exprimés dans les cellules Th non stimulées. Toutefois, leur expression serait régulée à la hausse et atteindrait des concentrations élevées suite à la stimulation de ces cellules (Harmar *et al.*, 2012). Les cellules T jouent un rôle central dans l'immunité induite par les cellules T *helper* et leur activation permet la sécrétion de cytokines qui modulent la réponse immunitaire. Finalement, la présence du PACAP dans les neurones sensoriels primaires et le récepteur PAC1 dans la corne dorsale de la moelle épinière suggère un rôle du récepteur PAC1 dans la réponse à la douleur. En effet, des souris *knock-out* du

récepteur PAC1 montrent des troubles de la réponse nociceptive à des stimuli chimiques, thermiques et mécaniques (Jongsma *et al.*, 2001, Mabuchi *et al.*, 2004).

#### **4. Relations structure-activité**

Depuis la découverte du PACAP, plusieurs études de structure-activité ont été effectuées afin de déterminer l'importance des résidus dans l'affinité et l'activité biologique du peptide. Plus précisément, celles-ci ont permis d'obtenir de l'information sur les résidus clés pouvant être impliqués dans la liaison et l'activation du récepteur PAC1, et elles ont facilité l'identification de certaines positions contribuant à la sélectivité du ligand vis-à-vis de ce dernier. À ce jour, aucun analogue strictement spécifique à PAC1 n'a été découvert et cette difficulté à développer un agoniste PAC1 spécifique est due au fait que le PACAP interagit avec une grande affinité avec les récepteurs VPAC1 et VPAC2. Le seul agoniste peptidique connu jusqu'à maintenant pour sa sélectivité pour le PAC1 est le Maxadilan. Ce dernier a été isolé des glandes salivaires du phlébotome *Lutzomyia longipalpis* (insecte de type moustique) et n'a aucune homologie de séquence avec le PACAP. La présence de 62 résidus et de deux ponts disulfures favorise une immunogénéicité significative pour le Maxadilan et compromet donc son utilisation en tant qu'agent neuroprotecteur (Bourgault *et al.*, 2009a, Moro *et al.*, 1997).

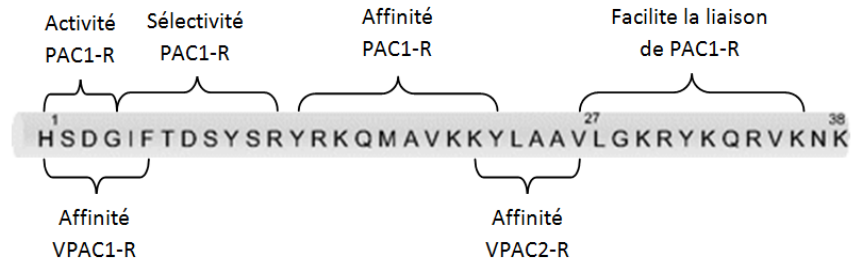
##### **1. Études par délétions**

Les effets de la délétion de certains segments des régions N- et C-terminales ont été évalués par des tests de liaison et d'activation afin d'approfondir nos connaissances sur l'importance de ces derniers dans l'activité biologique du PACAP. Ces expériences ont ainsi identifié le PACAP(1-22) comme étant la séquence minimale permettant une liaison au récepteur et assurant tout de même une activité agoniste. Par ailleurs, cette stratégie a conduit à la découverte d'un antagoniste soit le segment 6-38 du PACAP (Robberecht *et al.*, 1992b). Globalement, pour le PACAP, ce type d'étude a permis de conclure que la portion N-terminale du peptide est essentielle pour l'activation du récepteur PAC1 et qu'elle facilite la liaison du peptide au récepteur (Bourgault *et al.*, 2009a). Les travaux ont notamment montré que le retrait de His<sup>1</sup> diminue de 50 fois l'affinité du PACAP27 pour les récepteurs PAC1 humain et de rat (Gourlet *et al.*, 1991), tandis que la suppression de His<sup>1</sup> et de Ser<sup>2</sup> réduit de plus de 3000 fois la puissance du PACAP à stimuler l'AC dans des cellules pancréatiques de rat AR4-2J (Robberecht *et al.*, 1992a). Des délétions supplémentaires au niveau du segment N-terminal ont

donné lieu à plusieurs antagonistes, dont le PACAP(6-38) qui présente une affinité élevée pour le récepteur PAC1, sans toutefois être spécifique. Il est également important de noter que les analogues du PACAP38 tronqués ou substitués au niveau de la portion N-terminale possèdent une activité plus élevée que ceux du PACAP27. Par exemple, le PACAP(2-27) est 100 fois moins puissant que l'isoforme de 27 acides aminés pour activer l'AC tandis que le PACAP(2-38) ne s'avère que 10 fois moins puissant. Cette observation suggère que la portion 28-38 du PACAP aiderait à l'ancrage initial du peptide au récepteur PAC1.

Des délétions entreprises au niveau du segment C-terminal du PACAP27 ont permis la découverte de deux agonistes complets pour le récepteur PAC1, *i.e.* PACAP(1-26) et PACAP(1-24) (Gourlet *et al.*, 1996b). Cependant, leurs affinités sont réduites par rapport à celle de la molécule native (Vaudry *et al.*, 2009). Des délétions couvrant le segment Ala<sup>24</sup> à Tyr<sup>22</sup> ont quant à elles eu pour effet de diminuer la puissance du PACAP à induire la mobilisation du calcium dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur PAC1 et à promouvoir la différenciation de cellules de phéochromocytome de type PC12 (Bourgault *et al.*, 2008b). Il a ainsi été suggéré que le résidu Leu<sup>23</sup> jouerait un rôle important au niveau du récepteur PAC1 puisque le segment 1-22 de la molécule possède une affinité de liaison et une activité biologique beaucoup plus faibles que celles du PACAP(1-23) (Bourgault *et al.*, 2008b, Fournier *et al.*, 2016). Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par le fait que le résidu Leu<sup>23</sup> est hautement conservé parmi les peptides de la famille sécrétine/glucagon/somatolibérine (Bourgault *et al.*, 2009a). Les résultats ont aussi révélé que les analogues tronqués au niveau C-terminal présentent une baisse de puissance et une perte de l'affinité de liaison pour le récepteur PAC1. Finalement, des chimères ont aussi été synthétisées en combinant certains segments du PACAP et du VIP. Par exemple, l'ajout du segment 28-38 du PACAP au VIP, a donné un composé ayant une affinité 100 fois plus grande que le VIP pour PAC1, ce qui appuie l'idée que le segment 28-38 du PACAP renforce l'efficacité de liaison du peptide (Gourlet *et al.*, 1996a). Aussi, le VIP et le PACAP possèdent une homologie de séquence de 68% et leur différence se retrouve au niveau des régions 4-13 et 24-28. Étant donné que le VIP ne se lie pas au récepteur PAC1, les chimères VIP/PACAP ont montré que la sélectivité du PACAP impliquerait la région 4-13, qui comprend le motif de type N-capping, plutôt que le segment C-terminal (Schafer *et al.* 1999; Onoue *et al.* 2001). Mis ensemble, ces résultats indiquent que le segment hélicoïdal du PACAP est davantage responsable du processus de liaison à PAC1 tandis que la portion N-terminale joue plutôt un rôle déterminant dans l'activation du récepteur (Figure 11) (Bourgault *et al.*, 2011).

**Figure 11: Structure du PACAP38 indiquant les segments responsables de l'activité, de la sélectivité et de la liaison pour les différents récepteurs. Adaptée de Vaudry *et al.*, 2009.**



## 2. Ala-scan

Dans le cadre d'un Ala-scan, les sept premiers résidus du PACAP ont été successivement remplacés par une L-alanine afin d'évaluer l'apport respectif de chaque acide aminé de ce segment à l'affinité et à l'activité biologique du peptide. Cette étude a démontré que le noyau imidazole de His<sup>1</sup>, l'acide carboxylique de Asp<sup>3</sup> ainsi que le groupement phényle de Phe<sup>6</sup> sont des résidus clés pour la liaison et l'activation du récepteur (Bourgault *et al.*, 2009b, Fournier *et al.*, 2016). Par contre, aucun effet n'a été observé avec les substitutions de Ser<sup>2</sup> ou de Gly<sup>4</sup> (Bourgault *et al.*, 2011). On peut également noter qu'en position 2, le PACAP ne tolère pas l'incorporation d'un résidu volumineux puisque les analogues [Arg<sup>2</sup>]PACAP27 et [Phe<sup>2</sup>]PACAP27 agissent comme des agonistes faibles pour l'activation de l'adénylyl cyclase dans des cellules acineuses pancréatiques de rat AR-4-2J et présentent une diminution de leur affinité de liaison (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Robberecht *et al.*, 1992a, Vaudry *et al.*, 2009). Le remplacement de Thr<sup>7</sup> a produit un dérivé peptidique démontrant une affinité légèrement plus faible que le PACAP27 au niveau des récepteurs PAC1 et VPAC1, tandis que pour le récepteur VPAC2, une perte d'affinité majeure a été mesurée ( $pIC_{50} = 7,99 \pm 0,16$  pour le PACAP27 et  $pIC_{50} = 5,80 \pm 0,12$  pour [Ala<sup>7</sup>]PACAP27) (Doan *et al.*, 2011). Cet analogue, *i.e.* [Ala<sup>7</sup>]PACAP27, agit donc comme un agoniste sélectif pour les récepteurs PAC1 et VPAC1 (Bourgault *et al.*, 2011). En ce qui concerne la position Ile<sup>5</sup>, il semblerait qu'une chaîne latérale alkyle assez volumineuse soit requise pour favoriser la liaison du peptide, puisqu'une perte d'affinité et d'activité biologique a été observée pour les trois récepteurs suite à la substitution avec une alanine (Bourgault *et al.*, 2009b).

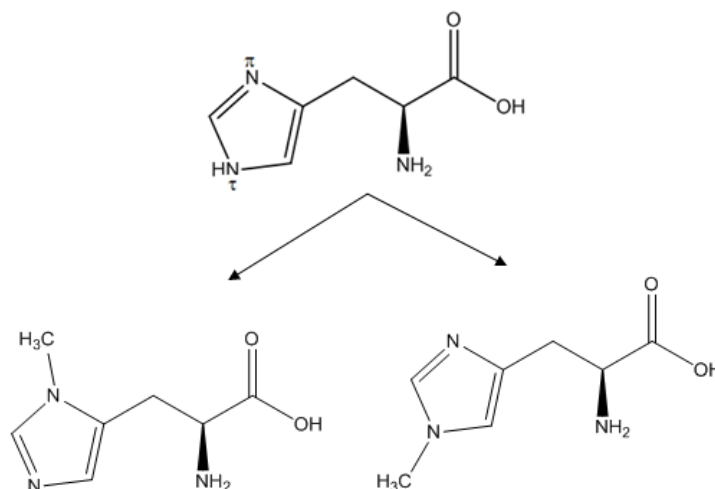
### 3. D-scan et N-méthyl-scan

Le D-scan consiste à substituer successivement chaque L-acide aminé d'un peptide ou d'un segment de peptide par son isomère de configuration absolue D. Cette substitution permet de mesurer l'impact de l'orientation de la chaîne latérale d'un acide aminé sur son affinité et son activité. Les résultats pour le D-scan montrent que le récepteur PAC1 est tolérant à des changements d'orientation des résidus His<sup>1</sup>, Ser<sup>2</sup> et Asp<sup>3</sup> puisque seule une légère diminution de la sélectivité envers le récepteur PAC1 est observable; l'activité biologique du peptide restant inchangée (Fournier *et al.*, 2016). Des résultats intéressants ont été obtenus pour la position 5 où l'analogue [D-Ile<sup>5</sup>]PACAP27 présente une sélectivité accrue envers le récepteur VPAC1 (Yung *et al.*, 2003). En ce qui concerne les positions 6 et 7, la substitution de ces acides aminés par leur stéréoisomère D a eu un effet délétère pour les trois récepteurs (Bourgault *et al.*, 2011, Bourgault *et al.*, 2009a, Doan *et al.*, 2011). Cette perte d'affinité est probablement due à une déstabilisation de la structure en hélice- $\alpha$ . Ceci est d'ailleurs étayé par les résultats obtenus avec le N-méthyl-scan (Bourgault *et al.*, 2009b). Le N-méthyl-scan consiste à remplacer tour à tour les résidus d'un peptide par un acide aminé N $\alpha$ -méthylé. Après addition dans la chaîne peptidique, ce résidu porte un lien amide N-méthylé ce qui a pour effet d'ajouter une restriction conformationnelle dans la molécule, d'éliminer la possibilité de pont H, de modifier l'angle de torsion du squelette moléculaire et de favoriser la formation d'un lien peptidique *cis* (Doan *et al.*, 2011). Des composés inactifs ou de très faibles agonistes partiels ont été obtenus lors de l'incorporation de cette modification sur le lien peptidique de Ile<sup>5</sup>, Phe<sup>6</sup> ou Thr<sup>7</sup>. En particulier, la substitution de Gly<sup>4</sup> par la sarcosine (Sar; N-méthyl-L-glycine) a totalement bloqué la capacité du peptide à activer le récepteur PAC1 et a diminué respectivement de 15 et 40 fois l'affinité du PACAP38 et du PACAP27 pour ce dernier. Ces résultats suggèrent ainsi que le proton porté par l'atome d'azote du lien amide de Gly<sup>4</sup> pourrait être impliqué dans une liaison H essentielle pour l'activation du récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b). En ce qui concerne la position 1, les résultats ont montré que l'amine N-terminale n'est pas essentielle pour l'activité biologique. Pour les positions 2 et 3 (Ser et Asp), la N-méthylation n'a pas eu d'effet significatif sur l'affinité de liaison pour les deux isoformes du PACAP (Doan *et al.*, 2011).

#### 4. Modifications aux positions 1, 3 et 6

Suite aux résultats obtenus avec les *Ala-scan*, *D-scan* et *N-méthyl-scan*, différentes modifications ont été introduites dans les peptides natifs aux positions 1, 3 ou 6. En premier lieu, l'implication des atomes d'azote de l'histidine-1 a été déterminée. Pour ce faire, l'incorporation d'un groupe méthyle a été effectuée de manière séquentielle sur les azotes du noyau imidazole. Les résultats démontrent que la méthylation de l'atome d'azote en position distale ( $N_\tau$ ) du noyau imidazole n'affecte pas la puissance du PACAP. Par contre, l'incorporation d'un groupe méthyle en position proximale de l'hétérocycle de His<sup>1</sup> ( $N_\pi$ ) réduit drastiquement l'efficacité du PACAP à activer le récepteur PAC1 (Figure 12) (Bourgault *et al.*, 2009b).

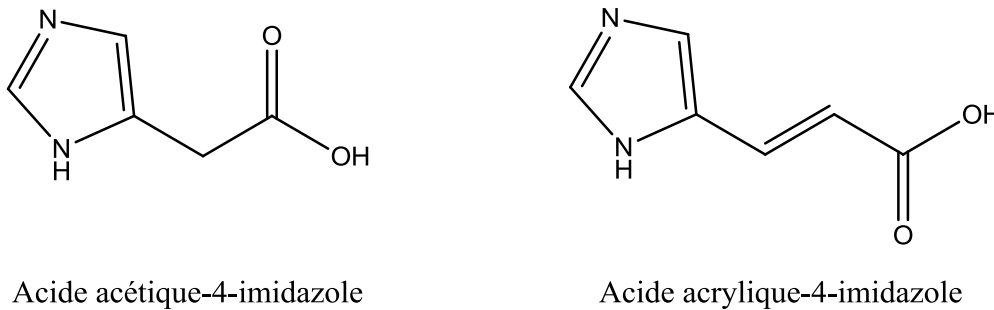
**Figure 12: Méthylation de l'histidine en position 1 sur l'azote distal ( $\tau$ ) ou proximal ( $\pi$ ).**



Comme décrit précédemment, ceci est vraisemblablement dû à l'impossibilité pour l'atome d'azote  $N_\pi$  de l'histidine de participer alors à une liaison H avec le proton amide de l'acide aspartique en position 3 afin de stabiliser un *Asx-turn*. De plus, la substitution d'His<sup>1</sup> par une phénylalanine, une modification visant à reproduire le caractère aromatique de l'histidine lorsque son noyau imidazole est sous une forme neutre, réduit l'efficacité du PACAP27 à stimuler l'AC. Donc, l'activation du récepteur PAC1 est perturbée lorsque le ligand est porteur d'un groupement aromatique volumineux en position 1, ou qu'il est incapable de faire une liaison hydrogène. Également, dans une étude de Ramos-Àlvarez *et al.*, la position 1 du PACAP38 a été substitué par l'acide acétique-4-imidazole ( $[Iaa^1]$ PACAP38) et l'acide acrylique-4-imidazole ( $[Iac^1]$ PACAP38) (Figure 13). Le  $[Iaa^1]$ PACAP38 possède une affinité similaire à celle du peptide

natif pour les récepteurs PAC1 et VPAC2 tandis qu'une légère diminution de l'affinité a été observée avec [ $^{125}$ I]PACAP38 pour les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2. Ces deux analogues sont des agonistes complets, ce qui suggère l'importance de l'azote du groupement indole capable de faire un pont H (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Toutefois, ce groupement est probablement trop volumineux et ceci donne lieu à une perte d'affinité.

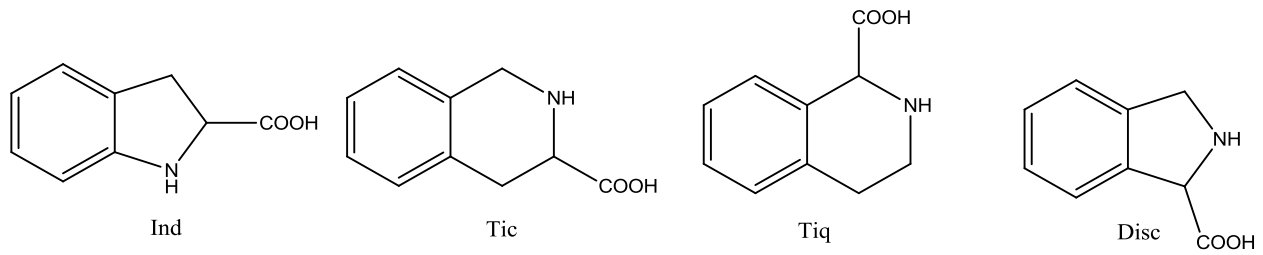
**Figure 13** Structure chimique de l'acide acrylique-4-imidazole et de l'acide acétique-4-imidazole.



Dans le PACAP27, l'acide aspartique (Asp) en position 3, porteur d'un groupe acide sur sa chaîne latérale, a été remplacé par une asparagine (Asn), un homologue isostère dont la fonction latérale est de type amide, et donc neutre. Cette modification a réduit l'affinité mais n'a pas altéré l'efficacité du peptide à stimuler la mobilisation du calcium (Bourgault *et al.*, 2009b). La présence d'une charge négative en position 3 serait donc importante pour la liaison du peptide. Aussi, l'élongation de la chaîne latérale d'Asp<sup>3</sup> de deux atomes de carbone par le remplacement de ce résidu par l'acide  $\alpha$ -aminoadipique a diminué drastiquement l'efficacité du PACAP. Par contre, la substitution de ce résidu avec l'acide glutamique n'a eu que peu d'effets (Bourgault *et al.*, 2009b). Ceci suggère que l'activation du récepteur permet pour la position 3 du PACAP une certaine souplesse quant à la longueur de la chaîne latérale puisque l'ajout d'un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>-) est toléré mais pas celui de deux (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). En dernier lieu, l'importance de l'aromaticité de la phénylalanine en position 6 a été évaluée. Dans un premier temps, ce résidu a été substitué par différents acides aminés possédant un caractère aromatique, mais induisant cependant une contrainte conformationnelle, tels que l'acide indole-2-carboxylique (Ind), l'acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique (Tic), l'acide tétrahydroisoquinoline carboxylique (Disc) et l'acide tétrahydroisoquinoline-1-carboxylique (Tiq) (Figure 14). Tous ces analogues se sont avérés dépourvus d'activité biologique (Bourgault *et al.*, 2009b).

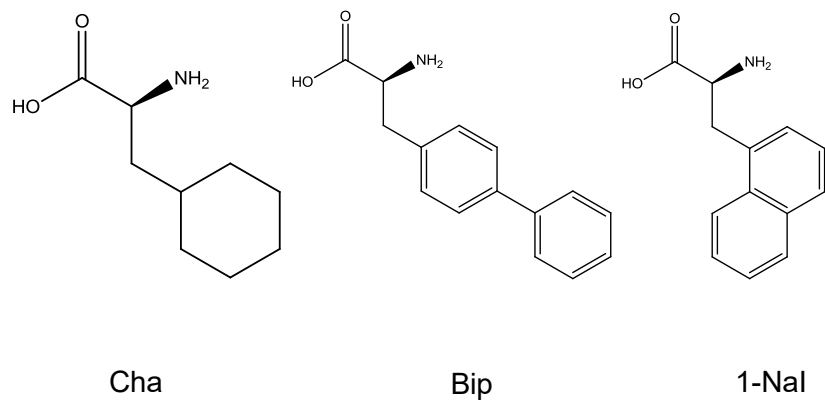


**Figure 14 Structure chimique des composés induisant une contrainte conformationnelle.**



Aussi, Phe<sup>6</sup> a été remplacée par un résidu non aromatique, la cyclohexylalanine (Cha), dont la taille s'apparente à celle de la phénylalanine. Cette modification n'a pas altéré significativement la puissance du PACAP38 ni celle du PACAP27. Par ailleurs, Phe<sup>6</sup> a été remplacée par deux acides aminés contenant deux noyaux aromatiques, la L-biphénylalanine (Bip) et la L-1-naphtylalanine (Nal) (Figure 15). Cette substitution a augmenté significativement la puissance. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que l'aromaticité n'est pas essentielle, mais que la présence d'une chaîne latérale hydrophobe en position 6 est un pré-requis pour concevoir des analogues du PACAP très affins et puissants sur le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009a).

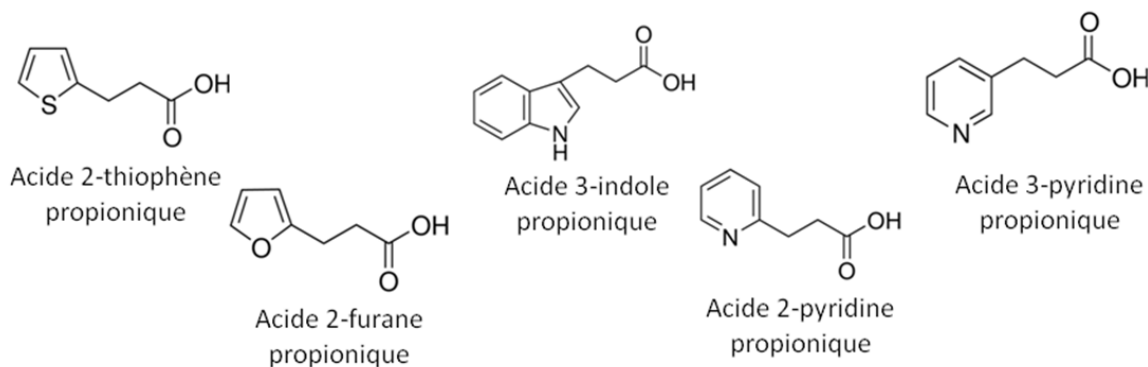
**Figure 15: Structure chimique des composés utilisés pour substituer la phénylalanine-6.**



## CHAPITRE 2 : HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DU PROJET

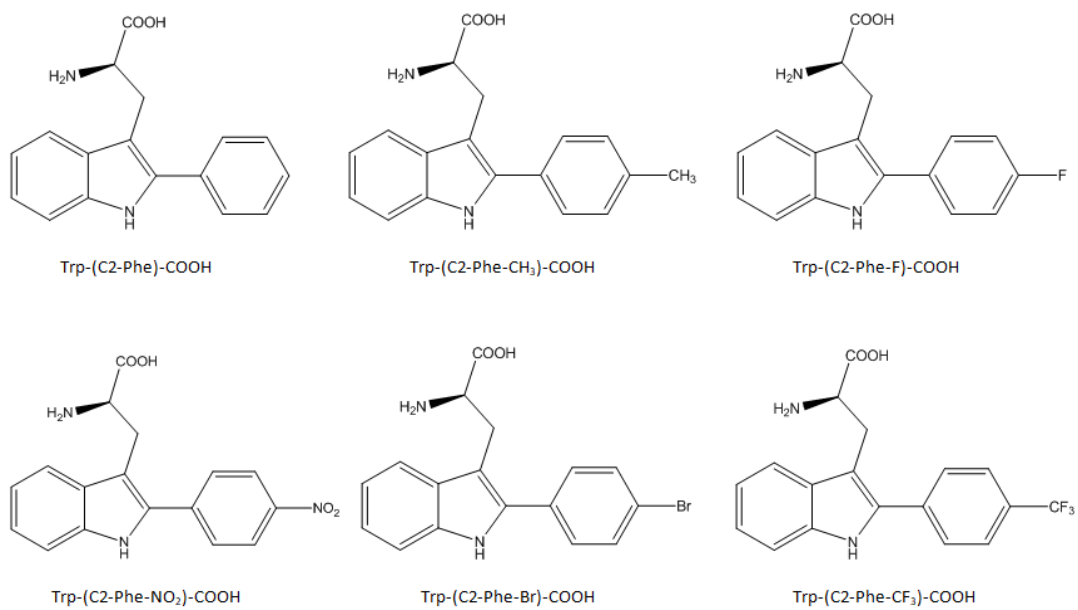
Sur la base des études de relations structure-activité, nous avons ciblé les positions 1 et 6 du PACAP27 afin d'évaluer leur contribution aux propriétés pharmacologiques du peptide. En effet, les études RSA ont démontré que ces acides aminés doivent posséder des caractéristiques physico-chimiques spécifiques pour promouvoir la liaison et l'activité biologique du PACAP. Plus précisément, il a été suggéré qu'en position 1 l'aromaticité du groupement imidazole ainsi que sa participation probable dans un pont H seraient cruciales pour l'affinité et l'activité du peptide tandis qu'en position 6, ce serait plutôt l'hydrophobicité du résidu qui jouerait un rôle dans la sélectivité du récepteur PAC1. Les modifications ont été effectuées sur le PACAP27 puisqu'il est plus résistant à la dégradation enzymatique plasmatique, qu'il traverse la BHE par diffusion passive et qu'il est plus court, donc plus facile à synthétiser. En premier lieu, nous avons substitué l'histidine en position 1 par différents acides propioniques portant sur le carbone  $\gamma$  un groupement mimant les propriétés physico-chimiques du noyau imidazole (aromaticité et pont H) (Figure 16).

**Figure 16: Dérivés de l'acide propionique mimant les propriétés physico-chimiques du noyau imidazole, utilisés pour la substitution de l'histidine-1.**



En deuxième lieu, nous avons remplacé la phénylalanine en position 6 par différents dérivés tryptophanyles modifiés à la position C2 du noyau indole (Figure 17). L'ajout de groupements aromatiques en C2 sur le noyau indole a été privilégié afin d'augmenter l'hydrophobicité de la position 6 du PACAP, une caractéristique contribuant à l'affinité pour le récepteur PAC1.

Figure 17: Dérivés tryptophanyles modifiés à la position C2 du noyau indole



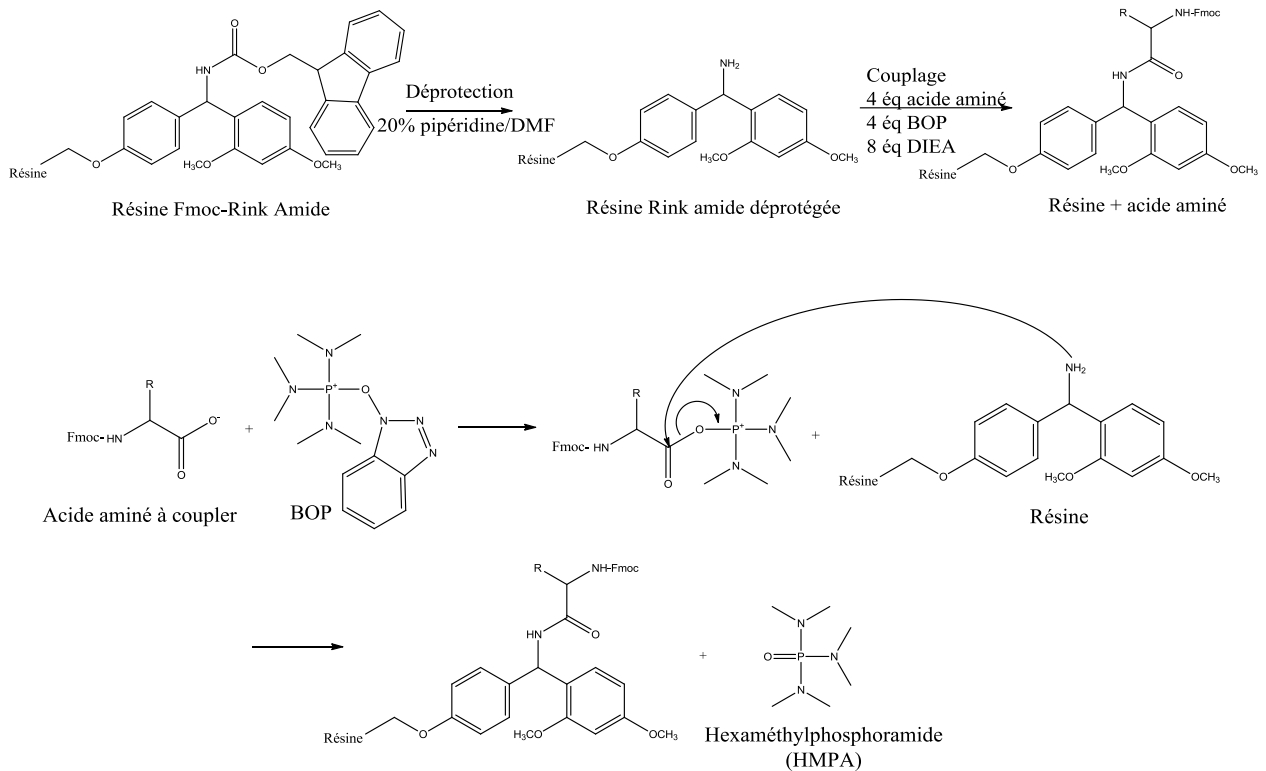
## CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE

### 1. Synthèse

#### Procédure générale

À moins d'indication autre, les solvants et réactifs utilisés pour les synthèses chimiques ont été obtenus auprès de l'un ou l'autre des fournisseurs suivants, soit Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CAN), Thermo Fisher Scientific (Mississauga, ON, CAN) et VWR International (Ville Mont-Royal, QC, CAN). Les synthèses ont été effectuées sur une résine de polystyrène portant une fonction Fmoc-Rink-amide (Matrix Innovation) selon un protocole basé sur la méthode de protection fluorénylméthoxycarboxyle/t-butyle (Fmoc/t-Bu) (Figure 18) (Stawikowski *et al.*, 2012) et en suivant une stratégie déjà utilisée dans le laboratoire (Bourgault *et al.*, 2009b). Avant d'exécuter le premier couplage, une étape de déprotection est nécessaire afin d'enlever le groupement protecteur Fmoc présent au départ sur la résine. Une solution à 20% de pipéridine dans le diméthylformamide (DMF) est utilisée pour cette opération qui dure 20 min. Une fois le groupe Fmoc enlevé, des étapes de lavage (2 × DMF, 2 × dichlorométhane (DCM), 1 × méthanol (MeOH), 2 × DCM et finalement 2 × DMF) sont effectuées afin de retirer les réactifs en excès. Par la suite, le couplage du premier acide aminé de la synthèse (le dernier de la séquence peptidique) est réalisé en milieu basique (4 équiv par rapport au taux de substitution de la résine de départ, en présence de 8 équiv de diisopropyléthylamine, DIEA), au moyen d'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)phosphonium (BOP, Matrix Innovation; 4 équiv), un agent de condensation qui active le groupement carboxylique. Cette méthodologie a été utilisée pour l'addition de chacun des N-Fmoc-acides aminés achetés chez divers fournisseurs (Chem-Impex, Albatros, Aapptec, Luxembourg, SynPep) composant le peptide (Tableau 3). À noter que la méthionine en position 17 du PACAP a été remplacée par son isostère, la norleucine, dans laquelle un groupe CH<sub>2</sub> substitue l'atome de soufre ce qui évite l'oxydation du PACAP et améliore sa stabilité (Dejda *et al.*, 2011).

**Figure 18: Résumé schématique des étapes de la synthèse peptidique**



**Tableau 3: Fmoc-AA-OH utilisés pour la synthèse des différents analogues du PACAP**

HSDGIFTDSYSRYRKQ-Nle-AVKKYLA AVL		
Acide aminé	Abréviation	Fmoc-aa utilisé
Alanine (Ala)	A	Fmoc-Ala-OH
Arginine (Arg)	R	Fmoc-Arg(pbf)-OH
Acide aspartique (Asp)	D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
Glycine (Gly)	G	Fmoc-Gly-OH
Histidine (His)	H	Fmoc-His(trt)-OH
Isoleucine (Ile)	I	Fmoc-Ile-OH
Lysine (Lys)	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Norleucine (Nle)	Nle	Fmoc-Nle-OH
Phénylalanine (Phe)	F	Fmoc-Phe-OH
Sérine (Ser)	S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
Tyrosine (Tyr)	Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Valine (Val)	V	Fmoc-Val-OH

Le succès des différents couplages est vérifié au moyen du test de Kaiser, un test qualitatif utilisant la ninhydrine pour révéler la présence d'amines libres (Wellings *et al.*, 1997). La réaction de couplage est reprise si le test s'avère positif (couleur bleue due à la présence du complexe de Ruhemann formé par l'oxydation de l'amine). Les étapes de déprotection et

d'addition d'un résidu sont ensuite répétées jusqu'à la finalisation du peptide. Après déprotection de l'amine N-terminale (les synthèses progressent du C- vers le N-terminal), lavages (DMF, DCM et MeOH) et séchage, la résine portant le peptide qui y est attaché *via* son résidu C-terminal est traitée pendant 3 h avec une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) contenant un agent trappant les carbocations (*scavenger*) de manière à maximiser le maintien de l'intégrité chimique du peptide (95% TFA, 2,5% triisopropylsilane (TIS) et 2,5% H<sub>2</sub>O). À cette étape, le peptide est clivé du support polymérique et les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales des acides aminés sont également enlevés, libérant ainsi les fonctions chimiques de chaque résidu. La masse moléculaire ainsi que la pureté des analogues peptidiques ont été respectivement déterminées par spectrométrie de masse (SM) de type MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight*) et chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

## 2. Purification et caractérisation des peptides

Tous les produits bruts ont été purifiés par HPLC préparative en phase inverse (RP-HPLC, *reversed phase*-HPLC) au moyen d'un gradient linéaire d'acétonitrile 50% (ACN) dans un mélange TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%, v/v), à un débit de 20 mL/min. La purification a été effectuée au moyen d'une colonne C<sub>18</sub> (Chromatographic Specialties Inc., Brockville, ON, CAN) connectée à un système Waters PrepLC500A équipé d'un détecteur d'absorbance Waters 440 (Mississauga, ON, CAN). Les analyses de spectrométrie de masse MALDI-TOF, utiles pour identifier les fractions contenant le peptide attendu lors de la purification par RP-HPLC, ont été réalisées avec un système Voyager DE de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) en utilisant l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique comme matrice. Les fractions enrichies en peptide dont la masse correspond à celle du produit ciblé ont été réunies et lyophilisées après avoir préalablement retiré l'ACN par évaporation. La pureté des peptides synthétiques recueillis a finalement été déterminée par chromatographie RP-HPLC analytique. Une fraction de pureté  $\geq 95\%$  a été considérée comme appropriée pour la réalisation des divers essais biologiques.

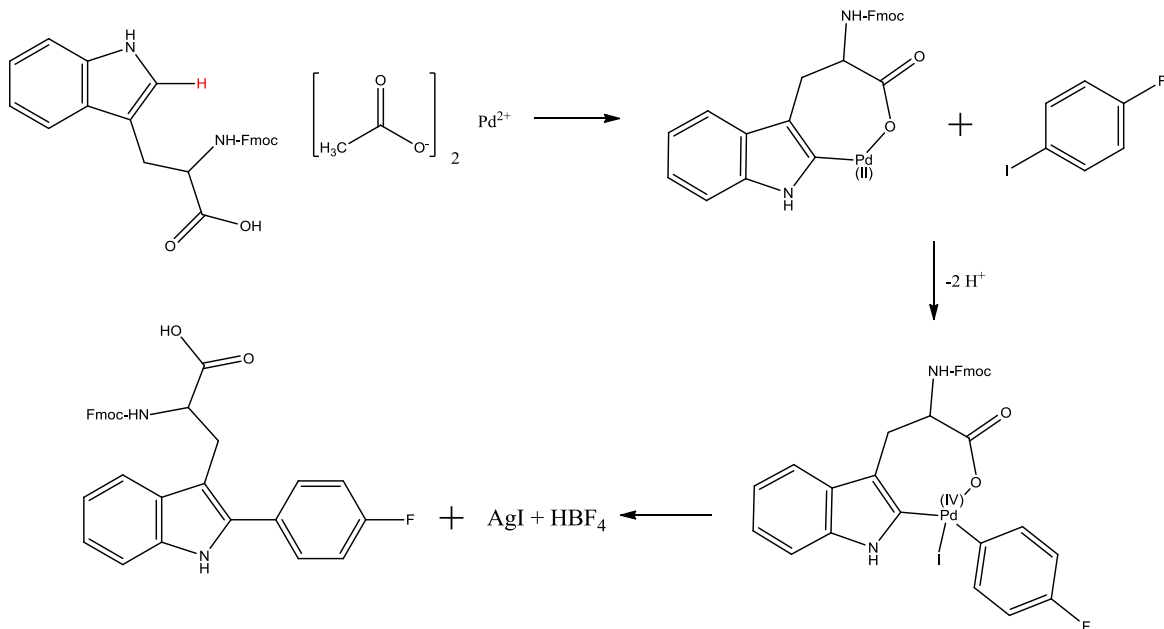
**Tableau 4 : Masses obtenues pour les analogues modifiés en position 1 ou 6**

Analogues	Masse	
	Attendue	Obtenue
PACAP27	3147	3149
[Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	3129	3125
[Thiophène <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	3130	3134
[Furane <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	3114	3116
[Indole <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	3163	3157
[2-Pyridine <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	3125	3128
[3-Pyridine <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	3125	3124
[Trp <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	3169	3166
[Trp(C2-Phe) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	3244	3241
[Trp(C2-Phe-CH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	3260	3256
[Trp(C2-Phe-NO <sub>2</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	3289	3289
[Trp(C2-Phe-F) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	3261	3260
[Trp(C2-Phe-Br) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	3323	3323
[Trp(C2-Phe-CF <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	3287	3285

### 3. C2-arylation

L'arylation en C2 du noyau indole du dérivé Fmoc-tryptophane (Fmoc-Trp-OH) a été effectuée à partir de l'adaptation d'un protocole décrit en 2013 par le groupe de Fernando Albericio (Preciado *et al.*, 2013). Notamment, nous avons modifié la procédure en réalisant la réaction par chauffage en bain d'huile plutôt que par chauffage par exposition aux micro-ondes. L'avantage de cette approche réside dans la capacité de préparer des quantités relativement importantes (échelle de 2 mmol) de dérivés de Fmoc-Trp-OH (Chem Impex, Wood Dale, IL, USA). Comme décrit dans la Figure 19, la première étape de la réaction consiste à déprotoner la position C2 du noyau indole et la fonction carboxylique de l'acide aminé, et de former un complexe cyclique au moyen d'acétate de palladium. Ensuite, par addition oxydative, un iodure d'aryle peut s'attacher à l'atome de Pd du complexe. Un ion d'argent provenant d'un sel vient alors capter l'iode permettant ainsi par élimination réductive le relâchement du produit arylé et la régénération du catalyseur Pd(II).

**Figure 19: Représentation schématique de l'arylation en C2 du noyau indole du Fmoc-tryptophane**



Plus précisément, comme illustré ici avec le 4-fluoroiodobenzène comme iodure d'aryle, les étapes suivantes ont été effectuées: l'acide aminé Fmoc-Trp-OH (2 mmol), l'acide 2-nitrobenzoïque (3 mmol) et le tétrafluoroborate d'argent (2,2 mmol) sont dissous dans 10 mL de DMF dans un ballon tricol de 50 mL. Par la suite, de l'acétate de palladium (II) (0,2 mmol) suivi immédiatement de 4-fluoroiodobenzène (4 mmol) sont ajoutés dans le ballon. La réaction est exécutée sous argon à 60°C (bain d'huile) pour environ 20 h. Après cette période, le contenu du ballon est vidé dans un béccher contenant de l'acétate d'éthyle (EtOAc; 500 mL). La solution est agitée vigoureusement avant d'être décantée et filtrée sur Célite. Le filtrat est ensuite lavé avec différentes solutions soit a) une solution aqueuse saturée en  $NH_4Cl$  (3 × 75 mL), laquelle permet entre autres la protonation de l'acide aminé et favorise son maintien dans la phase organique; b) un mélange 50:50 de  $NaHCO_3$  0,1 M et de saumure (2 × 100 mL); c)  $HCl$  0,1M (2 × 75 mL); et finalement d) de la saumure (3 × 75 mL). La phase organique est ensuite séchée avec du  $MgSO_4$  anhydre et la solution est filtrée avant d'être évaporée. Le produit brut est alors séché sous vide au moyen d'une pompe mécanique puis solubilisé dans une petite quantité de  $CHCl_3$  (~ 10 mL). Le produit est précipité avec du *n*-hexane (50 mL) et il est ensuite isolé après décantation. Finalement, le produit est caractérisé par chromatographie sur couche mince (CCM) de silice (système  $CHCl_3$ -EtOAc-AcOH (8:4:0,5), par spectrométrie de masse MALDI-TOF (avec une matrice d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque), et par chromatographie RP-HPLC



analytique sur une colonne de phase C<sub>18</sub>. Pour cette dernière technique, le produit est dissous dans l'ACN avant l'injection d'un aliquot (20 µL). Le produit est élué au moyen d'un gradient linéaire d'ACN (0-100%), en 30 min, où la phase initiale est un mélange TFA/H<sub>2</sub>O (0,06%, v/v). Le débit est ajusté à 1 mL/min. En complément, la spectroscopie <sup>1</sup>H-RMN (dans le diméthylsulfoxyde deutéré; DMSO-d<sub>6</sub>) a été utilisée, permettant ainsi de confirmer que le bon produit a été obtenu et ce, avec une pureté relativement élevée. En effet, en prenant par exemple le singulet du proton indole des dérivés (autour de 11,2 ppm), déblindé par la présence d'un substituant aromatique en C2 du noyau indole, on note sa nette prédominance par rapport au singulet du proton indole du Fmoc-Trp-OH résiduel (10,9 ppm) (Annexe 2). De plus, par la présence du proton indolique, cette méthode nous permet de confirmer que la réaction de C2-arylation a bien été obtenue et non celle de N-arylation.

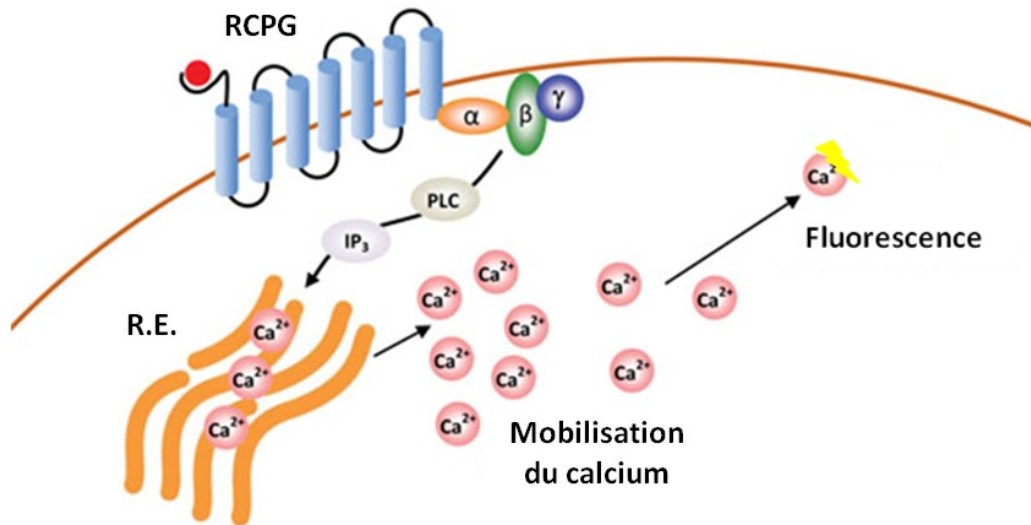
#### 4. Test de liaison

L'analogue N-acétyl-PACAP27 (Ac-PACAP27), plus stable que la molécule-mère tout en étant équipotent, a été radiomarké à l'iode-125. Pour ce faire, le peptide est mis en présence de Na<sup>125</sup>I et de chloramine T, un oxydant qui produit alors du <sup>125</sup>I<sup>+</sup>. Cet ion, par substitution électrophile, se lie à la position méta du noyau aromatique d'une tyrosine (en ortho du substituant hydroxyle). Après 1 min, on stoppe la réaction en ajoutant un agent réducteur, le métabisulfite de sodium. La solution est ensuite injectée sur une cartouche d'extraction sur phase inverse C<sub>18</sub> et celle-ci est lavée successivement avec 3 × TFA/H<sub>2</sub>O 0,1% afin d'éliminer l'iode radioactif non lié. Le peptide radiomarké est finalement récupéré par élution au moyen d'un mélange d'ACN 60% dans TFA/H<sub>2</sub>O 0,1%. Chaque volume de lavage et d'élution est récupéré et analysé au moyen d'un compteur-gamma. Le niveau de radioactivité, mesuré en coups par minute (CPM), indique quelle fraction éluee peut être conservée pour les mesures d'affinité. Les tests de liaison sont effectués sur des cellules d'ovaires de hamster (CHO) transfectées (30000 cellules/puits) avec l'un ou l'autre des récepteurs du PACAP (PAC1, VPAC1 ou VPAC2). Les cellules sont exposées à des concentrations croissantes de peptide, en présence d'une quantité fixe (0,05 nM) d'<sup>125</sup>I-Ac-PACAP27. Après 2 h d'incubation à température ambiante, les cellules sont d'abord lavées avec du tampon puis lysées avec une solution aqueuse de NaOH à 0,1M. La radioactivité liée est mesurée et les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison spécifique du marqueur radioactif. La liaison non spécifique est déterminée en utilisant le PACAP38 à une concentration de 10<sup>-5</sup> M.

## 5. Test de mobilisation calcique

Le Fluo-4 Direct est une sonde fluorescente permettant d'évaluer la mobilisation du calcium intracellulaire. L'utilisation de cette sonde comporte plusieurs avantages. Par exemple, elle est compatible avec les milieux contenant du sérum de sorte qu'on peut ajouter directement le Fluo-4, sans traitement préalable. Ce composé possède une grande fenêtre d'analyse puisque le bruit de fond est faible et une forte intensité de fluorescence est observable. La procédure venant avec la trousse *Fluo-4 Direct Calcium Assay* a été suivie pour réaliser cette expérience (Invitrogen, Molecular Probes). Pour ce test, des cellules CHO (50000 cellules/puits) transfectées avec le récepteur PAC1 sont ensemencées dans une plaque à 96 puits dont les parois sont noires et le fond clair. Après 24 h d'incubation, la solution de Fluo-4 est ajoutée directement aux puits, sans retrait du milieu, ni lavages, et la plaque est incubée à 37°C pour 60 min à l'abri de la lumière. La mobilisation calcique est mesurée au moyen d'un lecteur de plaques d'imagerie fluorimétrique Flex Station III de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA). Les solutions de peptide sont préparées dans des plaques de 96 puits de manière à avoir des concentrations finales allant de  $10^{-12}$  M à  $10^{-5}$  M. Les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage de réponse (fluorescence) obtenu avec le PACAP27 à une concentration de  $10^{-5}$  M. Lorsque le ligand se lie au récepteur, s'il y a activation de la voie calcique, l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) diffuse dans le cytosol et se lie au récepteur de l' $IP_3$  ( $IP_3R$ ) afin de favoriser leur ouverture et permettre le relâchement du calcium intracellulaire présent dans le réticulum endoplasmique. En présence de calcium, la molécule de Fluo-4 Direct produit de la fluorescence (Figure 20).

**Figure 20: Représentation schématique de la mobilisation calcique se déroulant suite à l'activation de la voie de signalisation de la phospholipase C. Adaptée de Enzo Life Sciences.**



## 6. Test AMPc

Pour ce test, des cellules HEK-293 (*human embryonic kidney cells* – 15000 cellules/puits) sont déposées dans des plaques dont les parois et le fond sont blancs. L'utilisation de ces cellules a été privilégiée puisqu'il s'agit de cellules humaines, que les biosenseurs qui sont utilisés ont été développés dans ces cellules et qu'elles ne possèdent pas le gène de résistance à l'antibiotique généticine (G418). Cela permet de s'assurer que les cellules présentes sont bien transfectées. En effet, les cellules transfectées possèdent à présent le gène de résistance au G418 et elles ne mourront donc pas lors de l'incubation avec le milieu contenant cet antibiotique. Les cellules sont transfectées en utilisant la lipofectamine, pour une période de 24 h, avec le récepteur PAC1 et la protéine EPAC (*Exchange Protein Activated by cAMP*) porteuse de la Rénilla luciférase (Rluc) et de la protéine GFP (*green fluorescent protein*). Après ce temps, le milieu est changé par du milieu DMEM contenant 5% de sérum de veau foetal et les antibiotiques G418, pénicilline et streptomycine. Après une incubation additionnelle de 24 h, le milieu est retiré et une solution de PBS (*phosphate buffered saline*) contenant 0,1% de glucose est ajoutée à chaque puits avant de poursuivre l'incubation pour encore 2 h, soit le temps nécessaire pour ralentir le métabolisme des cellules. Dans l'intervalle, les solutions de peptide sont préparées pour avoir des concentrations finales allant de  $10^{-13}$  M à  $10^{-5}$  M. Suivant cette incubation de 2 h, les solutions de peptide sont ajoutées aux puits et les cellules sont incubées cette fois-ci à la

température de la pièce pour 20 min. Finalement, la coelentérazine (1mM dans l'EtOH) est ajoutée aux cellules et l'incubation est poursuivie pour 10 min.

L'activation d'EPAC, qui est une mesure de la production d'AMPc, est évaluée au moyen d'un lecteur de plaque TECAN M1000 (Morrisville, NC, USA) fonctionnant à deux longueurs d'onde distinctes. Ainsi, si la voie de l'AMPc est activée par la liaison d'un ligand, l'AMPc produite va se lier à la protéine EPAC et engendrer un changement conformationnel de celle-ci, lequel mènera au rapprochement de l'enzyme Rluc et de la protéine GFP qui y sont attachées. Étant donné que la longueur d'onde d'émission de Rluc est de 400 nm et que la GFP absorbe à cette même longueur d'onde, en présence d'AMPc, la proximité de la Rluc et de la GFP permet à cette dernière d'absorber une partie de la luminescence émise par Rluc et à son tour, elle émet une luminescence à 515 nm (Figure 21 et 22) (Couturier *et al.*, 2012). L'appareil mesure l'émission de lumière dans le magenta (Rluc) et le vert (GFP) et un ratio du signal est calculé pour chaque puits. La différence de bioluminescence (*delta bioluminescence resonance energy transfer* – BRET) est mesurée en soustrayant un blanc, et les résultats sont normalisés par rapport au signal le plus élevé obtenu avec le PACAP27. Les tests sont réalisés en duplicata pour chaque concentration de peptide.

**Figure 21: Changement conformationnel de la protéine EPAC en présence de l'AMPc (schéma produit par Mathilde Pujol de Molliens, INRS – IAF)**

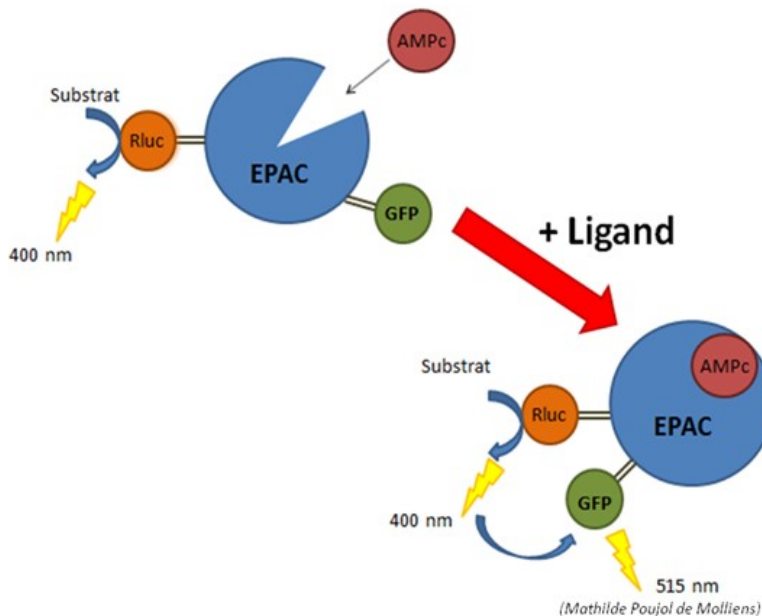
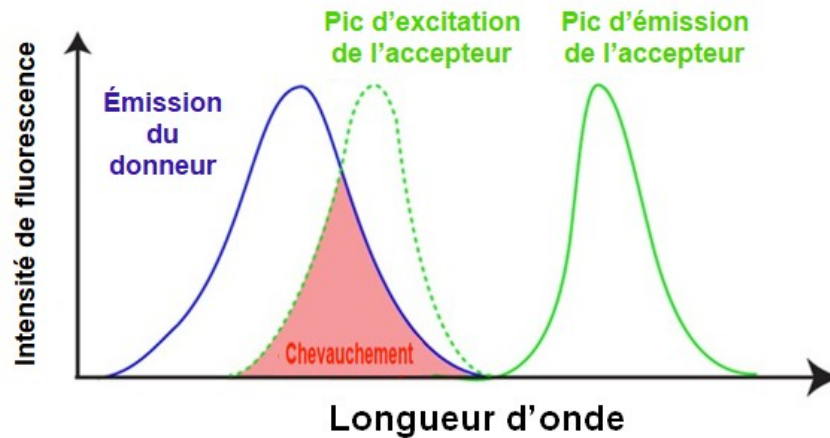


Figure 22: Principe de donneur (D) – accepteur (A) observé avec la technologie BRET entre l'enzyme Rluc et la protéine GFP. Adaptée de Couturier et al., 2012.



## 7. Activation de la protéine Gαq

Des cellules HEK-293 (15000 cellules/puits) sont déposées dans des plaques de 96 puits dont les parois et le fond sont blancs. Elles sont ensuite transfectées, pour une période de 24 h, avec le récepteur PAC1 (500 ng par 200 µL de solution) et la protéine Gαq (1µg par 200 µL de solution) porteuse de la Rluc et de la protéine GFP, en utilisant le réactif TransIT (Mirus Bio). Après ce temps, le milieu est changé par du milieu DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal et les antibiotiques G418, pénicilline et streptomycine. Après une incubation additionnelle de 24 h, le milieu est retiré et une solution de PBS contenant 0,1% de glucose est ajoutée à chaque puits avant de poursuivre l'incubation pour encore 2 h. Dans l'intervalle, les solutions de peptide sont préparées pour avoir des concentrations finales allant de  $10^{-13}$  M à  $10^{-5}$  M. Après l'incubation, les solutions de peptide sont ajoutées et incubées à la température de la pièce pour 30 min. À la 25<sup>e</sup> min de ce temps d'incubation, 10 µL d'une solution de coelentérazine 1mM dans l'éthanol est ajoutée à chaque puits. Le recrutement de Gαq est mesuré à l'aide d'un lecteur de plaques TECAN M1000 (Morrisville, NC, USA) fonctionnant à deux longueurs d'onde distinctes. Les résultats sont normalisés par rapport au signal le plus élevé obtenu avec le PACAP27.

## CHAPITRE 4: RÉSULTATS ET DISCUSSION

C'est par le biais de trois récepteurs, soit PAC1, VPAC1 et VPAC2, que le PACAP produit des effets biologiques variés. Plus particulièrement, ce peptide est un facteur vasorelaxant puissant dans de nombreux organes tels que les yeux, le cerveau et les testicules. Il agit aussi comme neuromodulateur dans le cerveau, provoque la bronchodilatation, induit la relaxation des muscles lisses, et régule la motilité gastrique et le processus sécrétoire dans le tractus gastro-intestinal (Arimura, 1998, Linden *et al.*, 1995, Zeng *et al.*, 1999). Le peptide joue également un rôle au niveau de la libération de l'insuline et il cause la rétention d'eau (Ahren, 2008). Ces effets viennent principalement de l'activation des récepteurs de type VPAC.

Depuis sa découverte, plusieurs études ont également mis en évidence des propriétés neuroprotectrices pour le PACAP. Notamment, ce peptide protège les cellules granulaires cérébelleuses contre la mort cellulaire programmée se produisant pendant le développement du cervelet. Par exemple, une exposition de ces cellules au PACAP, pour une durée de 24 h, mène à une survie concentration-dépendante (Gonzalez *et al.*, 1997). De plus, il protège les cellules granulaires cultivées d'une mort induite par l'éthanol, et ce, même après que le traitement soit effectué 2 h après l'exposition (Vaudry *et al.*, 2002b). Il est connu que les EROs jouent un rôle critique dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). En lien avec cette observation, des travaux ont montré le rôle protecteur du PACAP, via le récepteur PAC1, pour des cellules mises en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ainsi, le peptide inhibe l'effet délétère du  $H_2O_2$  sur la membrane mitochondriale et supprime totalement la fragmentation de l'ADN (Vaudry *et al.*, 2002a). Ce rappel d'activités biologiques rattachées au PACAP suggère que ce peptide est prometteur pour un usage thérapeutique afin de traiter, entre autres, les maladies neurodégénératives et les atteintes cérébrales telles que les AVCs et les traumatismes crâniens.

Il a été décrit que la neuroprotection produite par le PACAP est liée principalement à des effets antiapoptotiques et que ceux-ci sont médiés par le récepteur PAC1. Ce dernier se retrouve très majoritairement au niveau du SNC, contrairement aux récepteurs VPAC qui eux se retrouvent surtout en périphérie. Puisque l'effet antiapoptotique du PACAP provient de l'activation de PAC1, le développement de dérivés activant sélectivement ce récepteur est donc d'un intérêt incontestable. De plus, de par leur sélectivité, ces composés montreraient peu ou pas d'effets secondaires provenant principalement de l'activation des récepteurs VPAC2. Toutefois, à cause de sa nature protéique, le PACAP est vulnérable à la dégradation enzymatique. Par exemple,

suite à son injection iv, l'isoforme PACAP38 est rapidement dégradée par la DPP-IV au niveau de sa portion N-terminale, une région essentielle pour l'activation du récepteur. De plus, les métabolites générés, soit PACAP(3-38) et PACAP(5-38), se comportent comme des antagonistes ce qui limite encore davantage l'activité de l'isoforme native.

Dans le but d'obtenir des informations supplémentaires sur les propriétés physico-chimiques cruciales pour la sélectivité au récepteur PAC1, mais également dans le but ultime de développer des agonistes hautement affins et actifs pour PAC1, nous avons exploré deux avenues complémentaires. En premier lieu, nous avons ciblé la position 1 du PACAP27 en remplaçant l'histidine-1 au moyen de différents dérivés de l'acide propionique porteurs de groupes mimant les propriétés physico-chimiques du noyau imidazole (liaison H et aromaticité). En deuxième lieu, nous avons remplacé la phénylalanine en position 6 avec différents substituants tryptophanyles modifiés par arylation au niveau du carbone-2 (C2) du noyau indole. Les composés obtenus ont été ensuite caractérisés pharmacologiquement au moyen de tests de liaison et d'activité biologique.

## 1. Développement d'analogues modifiés en position 1

Les études de structure-activité telles que l'*Ala-scan* et le *D-scan* ont mis en lumière l'implication de plusieurs acides aminés pour l'affinité et l'activité du PACAP envers ses récepteurs. Entre autres, le noyau imidazole de l'His<sup>1</sup>, le groupement acide carboxylique de l'Asp<sup>3</sup>, la chaîne alkyle de l'Ile<sup>5</sup> et la fonction phényle de Phe<sup>6</sup> sont apparus comme des pharmacophores clés (Bourgault *et al.*, 2009b). En particulier, concernant l'histidine-1, des études effectuées avec des fragments du PACAP ont mis en évidence le rôle distinctif de ce résidu (Robberecht *et al.*, 1992a). En effet, sa délétion provoque une diminution drastique de la puissance et de l'affinité des peptides. Considérant ces observations, des transformations ont été introduites à la position 1 du PACAP, telles que la substitution d'His par Phe et l'incorporation de l'acide acrylique-4-imidazole (Iac) ou de l'acide acétique-4-imidazole (Iaa) (Hou *et al.*, 1994, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Ces travaux ont suggéré la contribution significative de l'aromaticité du groupement imidazole et sa participation probable à un pont H. Faisant suite à ces études, nous avons donc substitué l'histidine de la position 1 par des dérivés variés de l'acide propionique obtenus par addition sur le carbone gamma de diverses fonctions chimiques reproduisant le caractère aromatique du noyau imidazole et sa capacité intrinsèque à former un pont H. À noter que cette substitution de l'histidine en position 1 par de tels dérivés entraîne l'absence d'un groupement

NH<sub>2</sub> en N-terminal. L'isoforme PACAP27 a été privilégiée au PACAP38 en raison de sa taille qui facilite sa synthèse, de sa résistance à la dégradation enzymatique plasmatique, et de sa capacité à traverser la BHE par diffusion passive. Enfin, pour limiter les risques d'oxydation de la méthionine présente en position 17, cet acide aminé a été remplacé par la norleucine, un isostère exempt d'un atome de soufre.

## 1. Test de liaison

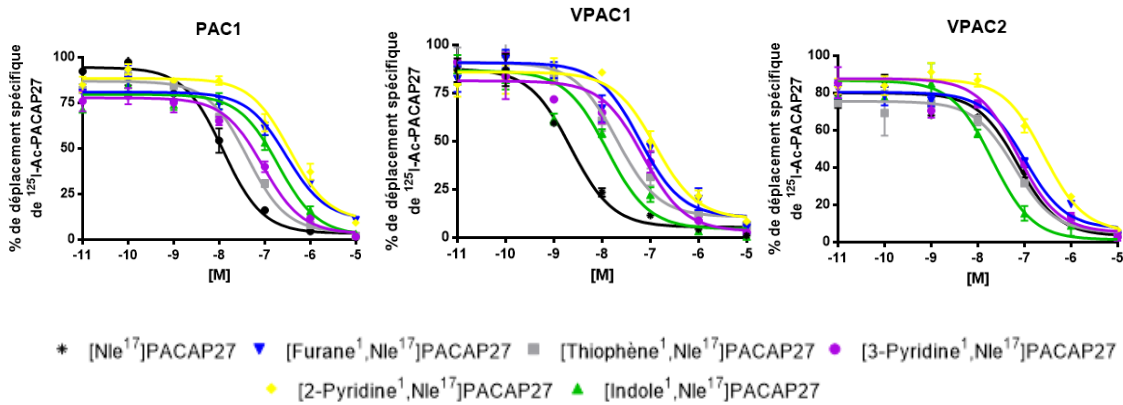
Les tests d'affinité ont été effectués avec tous les analogues mais aucun de ceux-ci n'a démontré une sélectivité significative envers le récepteur PAC1. En fait, de manière générale, les substitutions ont plutôt donné des dérivés avec une affinité plus faible que celle du peptide endogène, et ce, pour tous les récepteurs (Figure 23). Toutefois, les différentes modifications ont eu un effet plus variable au niveau des récepteurs PAC1 et VPAC1 que de VPAC2. À l'exception des dérivés [Indole<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 et [2-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27, les modifications ne semblent pas avoir un grand impact sur la liaison pour VPAC2. Il est donc possible que les récepteurs PAC1 et VPAC1 soient plus sensibles à une déstabilisation de la conformation de type *Asx-turn* postulée pour les acides aminés 1 à 4. Le dérivé [2-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 est l'analogue démontrant l'affinité la plus faible avec des pIC<sub>50</sub> respectifs de 6,46 ± 0,11, 6,90 ± 0,13 et 6,58 ± 0,11, pour les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 (Tableau 5). En regardant de plus près les résultats, on remarque que le composé [3-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 possède une affinité plus élevée pour les trois récepteurs comparativement au dérivé [2-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27, ce qui suggère que la position de l'atome d'azote dans le cycle est importante pour une bonne liaison. De plus, en comparant le thiophène avec le dérivé furane, où l'atome de soufre est remplacé par un atome d'oxygène, le thiophène montre une meilleure affinité envers les trois récepteurs, suggérant l'importance de la nature de l'hétéroatome dans le cycle sur la liaison au récepteur. Cette observation est peut-être liée à sa capacité à former une liaison H. Toutefois, un pont H impliquant le soufre devrait être faible dû à son électronégativité plus petite comparativement à celle de l'oxygène ou de l'azote. Néanmoins, une étude a déjà démontré par l'utilisation de la spectroscopie laser à haute résolution combinée à des calculs physico-chimiques qu'un pont H impliquant le soufre pouvait en fait être aussi fort qu'un pont H faisant intervenir par exemple l'oxygène (Biswal, 2015). De plus, on ne peut négliger l'idée que l'effet observé proviendrait de la formation d'un complexe- $\pi$  (recouvrement d'orbitales) impliquant le système d'électrons  $\pi$  du groupement aromatique (Zhang *et al.*, 2005). Donc, un premier postulat est que la structure secondaire présente au



niveau des quatre premiers acides aminés serait stabilisée par l'une ou l'autre de ces interactions. Néanmoins, on ne peut pas éliminer l'hypothèse que les effets observés sur l'affinité seraient reliés à une modification directe de l'interaction au niveau intermoléculaire (ligand-récepteur) plutôt qu'à un changement des caractéristiques structurales du segment N-terminal du PACAP (intramoléculaire) qui perturberait la liaison.

Le dérivé [Indole<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 se caractérise par une plus grande affinité pour VPAC2 comparativement à PAC1 et VPAC1. De plus, son affinité pour VPAC2 s'avère supérieure à celle observée pour le PACAP27. Il est généralement admis que la portion N-terminale du PACAP joue un rôle dans l'activation du récepteur tandis que le segment C-terminal est responsable de la liaison. Il est donc particulier de constater que les modifications effectuées dans la région N-terminale ont non seulement des effets délétères sur l'activité biologique mais aussi sur la liaison du PACAP27 aux récepteurs. Des études antérieures ont déjà démontré l'implication d'His<sup>1</sup> dans la liaison. En effet, une baisse d'affinité du PACAP27 a été observée dans un test de liaison sur des membranes de neuroblastomes humains NB-OK-1 suite à l'élimination de l'histidine-1 (Robberecht *et al.*, 1992b). Il est possible que les modifications apportées causent une déstabilisation du motif *Asx-turn* proposé au niveau des quatre premiers acides aminés du PACAP, empêchant à son tour le bon positionnement des acides aminés pour le motif *N-capping* du peptide, et déstabilisant ainsi son hélice- $\alpha$  induite lors de sa reconnaissance par le domaine extracellulaire du récepteur. Dans ces circonstances, le PACAP ne pourrait adopter un bon positionnement pour la liaison et l'activation de PAC1. Supportant cette hypothèse, une étude effectuée sur la corticolibérine a démontré que les six premiers acides aminés de la portion N-terminale ne sont pas nécessaires pour la signalisation au niveau de son récepteur de classe B et qu'en réalité ce serait la conservation de la structure en hélice qui serait cruciale (Grace *et al.*, 2010). On note aussi un comportement particulier pour les dérivés porteurs d'un noyau pyridine puisque le dérivé [2-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 est toujours moins affin que son homologue [3-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 envers les trois récepteurs. Cette observation suggère que la position de l'hétéroatome dans le cycle attaché à l'acide propionique serait un élément clé à considérer lors du développement de nouveaux analogues.

**Figure 23: Inhibition de la liaison du marqueur  $^{125}\text{I}$ -Ac-PACAP27 sur des cellules CHO transfectées avec les récepteurs PAC1, VPAC1 ou VPAC2, avec des concentrations croissantes ( $10^{-11}$  M à  $10^{-5}$  M) des analogues modifiés en position 1.**



**Tableau 5 : Concentration produisant 50% d'inhibition de la liaison spécifique de  $^{125}\text{I}$ -Ac-PACAP27 pour le  $[\text{Nle}^{17}]$ PACAP27 et ses analogues modifiés en position 1.**

Analogues	Affinité de liaison ( $\text{pIC}_{50}$ ) <sup>1</sup>		
	PAC1	VPAC1	VPAC2
$[\text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$7,91 \pm 0,13$	$8,64 \pm 0,11$	$7,14 \pm 0,09$
$[\text{Thiophène}^1, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$7,39 \pm 0,06^*$	$7,69 \pm 0,16^{**}$	$7,22 \pm 0,11$
$[\text{Indole}^1, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$6,71 \pm 0,11^{**}$	$7,90 \pm 0,21^*$	$7,69 \pm 0,13^*$
$[\text{Furane}^1, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$6,52 \pm 0,14^{**}$	$7,22 \pm 0,15^{**}$	$6,99 \pm 0,10$
$[\text{2-Pyridine}^1, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$6,46 \pm 0,11^{**}$	$6,90 \pm 0,13^{***}$	$6,58 \pm 0,11^*$
$[\text{3-Pyridine}^1, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$7,04 \pm 0,12^{**}$	$7,15 \pm 0,13^{***}$	$7,14 \pm 0,16$

<sup>1</sup> Log négatif de l' $\text{IC}_{50}$ .

t-test : \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  sont statistiquement significatifs comparativement au  $[\text{Nle}^{17}]$ PACAP27.

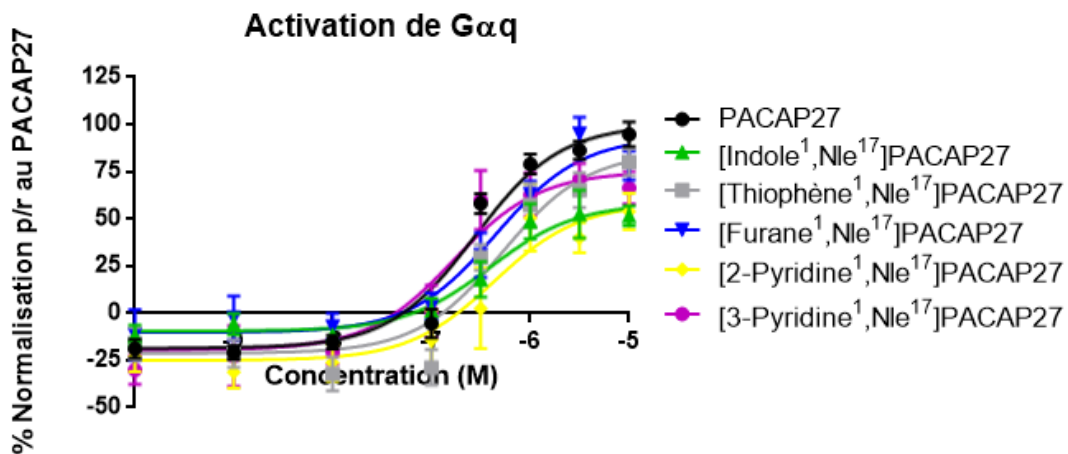
## 2. Activation de la protéine Gαq

Par la suite, la capacité des différents analogues à activer la voie Gαq a été mesurée afin de déterminer l'impact des modifications sur cette voie de signalisation. Les tests ont été seulement effectués sur des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur PAC1 puisque c'est ce récepteur qui est principalement responsable de la neuroprotection et qu'il est couplé à la protéine Gαq. À l'exception des dérivés indole et 2-pyridine où une diminution significative de l'efficacité est observée, ces modifications ont eu peu d'impact sur l'activation de Gαq. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres études où, par exemple, la N-acétylation

n'a pas altéré l'affinité ou la puissance du peptide natif (Bourgault *et al.*, 2008a, Bourgault *et al.*, 2009b, Robberecht *et al.*, 1992a). De plus, en accord avec les observations faites au cours des tests de liaison, le dérivé [3-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 s'est avéré plus puissant ( $pEC_{50} = 6,78 \pm 0,20$  et  $6,37 \pm 0,27$  pour les dérivés 3-pyridine et 2-pyridine, respectivement) que son analogue [2-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 pour activer Gαq, bien que ces deux composés agissent tous deux comme des agonistes partiels ( $E_{max} = 75\%$  et  $58\%$  pour les dérivés 3-pyridine et 2-pyridine, respectivement) (Figure 24, Tableau 6). Tous les autres composés se sont avérés moins puissants que le PACAP27 et seul le dérivé [Indole<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 ( $E_{max} = 58\%$ ) a été incapable de produire une réponse maximale semblable à celle du PACAP27. Encore une fois, la position de l'hétéroatome apparaît comme un paramètre important pour l'activation du récepteur PAC1. D'ailleurs, des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la méthylation séquentielle des deux atomes d'azote du noyau imidazole de l'histidine-1 affecte de manière distincte l'activité biologique du peptide. Ainsi, la méthylation de l'azote en position distale (Nτ) n'affecte pas la puissance du PACAP tandis que celle effectuée en position proximale (Nπ) entraîne une diminution drastique de la capacité du ligand à activer le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b). Pour les dérivés furane et thiophène, seule une légère diminution de la puissance et de l'efficacité est observable. Ce résultat est étonnant étant donné que le dérivé furane montre une faible affinité envers le récepteur PAC1. Ces analogues pourraient donc être des agonistes biaisés de sorte que leur liaison au récepteur stabiliserait une conformation précise de celui-ci et activerait préférentiellement une voie de signalisation. Enfin, l'analyse des résultats obtenus pour les analogues [Indole<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 et [2-Pyridine<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27, e.g. diminution de près de 40% de l'efficacité à activer Gαq, suggère qu'un groupement aromatique volumineux en position 1 est délétère pour l'activation de Gαq dans des cellules HEK-293. Ces résultats sont encore une fois en accord avec ceux obtenus lors de la substitution d'His avec Phe, où la capacité du PACAP27 à stimuler l'activité de l'adénylyl cyclase dans les membranes de cellules de l'hippocampe du cerveau de rat est considérablement réduite (Hou *et al.*, 1994). Ceci est vraisemblablement dû à l'encombrement stérique engendré par celui-ci, lequel empêcherait le positionnement adéquat de l'hétéroatome pour établir une des deux liaisons hydrogène proposées pour l'Asx-turn. Dans un même ordre d'idée, la substitution successive des quatre premiers acides aminés du PACAP avec des résidus N-méthylés, des inhibiteurs connus de liaison H, a produit des antagonistes ou des agonistes partiels faibles. En outre, ces résultats peuvent aussi être corrélés avec la perte d'affinité observée avec le récepteur PAC1. En effet, en comparant le peptide porteur du 3-pyridine à celui avec le 2-pyridine, on constate que le dérivé 3-pyridine est l'analogue ayant une affinité plus élevée pour

PAC1 et qu'il est aussi plus puissant dans l'activation de Gαq. Néanmoins, une affinité plus élevée ne veut pas nécessairement dire une puissance plus grande; d'autant plus que les tests de liaison et les mesures d'activité sont réalisés dans des modèles cellulaires différents. Par exemple, le [Thiophène<sup>1</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 est l'analogue ayant l'affinité la plus élevée pour le récepteur PAC1, mais il n'active pas Gαq avec la plus grande puissance. Dans ce cas, il s'agit probablement d'un agoniste biaisé. Plusieurs autres voies de signalisation peuvent en fait être activées par les RCPGs suite à la liaison du peptide au récepteur telle l'activation de la voie de la protéine Gas.

**Figure 24: Courbes concentration-réponse montrant l'effet des analogues modifiés en position 1 sur l'activation de Gαq dans des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur PAC1.**



**Tableau 6 : Résultats obtenus pour l'activation de Gαq pour les analogues modifiés en position 1.**

Analogues	EC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (nM)	pEC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	E <sub>max</sub> <sup>3</sup> (%)
PACAP27	274 (193-389) <sup>4</sup>	6,56 ± 0,08	100 ± 5
[Thiophène <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	519 (251-1072) <sup>4</sup>	6,29 ± 0,16****	86 ± 9
[Indole <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	391 (179-856) <sup>4</sup>	6,41 ± 0,17**	58 ± 6
[Furane <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	446 (226-882) <sup>4</sup>	6,35 ± 0,15****	94 ± 8
[2-Pyridine <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	427 (127-1434) <sup>4</sup>	6,37 ± 0,27**	58 ± 12
[3-Pyridine <sup>1</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	165 (65-419) <sup>4</sup>	6,78 ± 0,20****	75 ± 8

<sup>1</sup>Concentration produisant 50% de l'activation de Gαq. <sup>2</sup>Log négatif de l'EC<sub>50</sub>. <sup>3</sup>Pourcentage d'efficacité maximale par rapport au PACAP27 à 10<sup>-5</sup>M. <sup>4</sup> Intervalle de confiance à 95%. t-test : \*\* P < 0,01, \*\*\*\*P < 0,0001 sont statistiquement significatifs comparativement au PACAP27.

En conclusion, nos résultats montrent que l'aromaticité n'est pas suffisante pour avoir un analogue PAC1-sélectif puisque tous les composés sont moins affins que le PACAP27. De plus, il ressort que la position de l'hétéroatome du substituant à la position 1 et sa capacité à faire un pont H seraient cruciales pour la liaison et l'activation du récepteur. Malgré le fait que tous les analogues étaient aromatiques et pouvaient participer à la formation d'un pont H, aucun n'est apparu hautement sélectif pour PAC1. Néanmoins, on peut conclure que le groupe imidazole joue un rôle majeur puisque la substitution d'His<sup>1</sup> avec l'acide acrylique-4-imidazole ou l'acide acétique-4-imidazole a donné lieu à des analogues prometteurs. Plus spécifiquement, le dérivé [Iaa<sup>1</sup>]PACAP38 est aussi affiné que le PACAP38 envers PAC1, tandis que l'analogue [Iac<sup>1</sup>]PACAP38, malgré une légère perte d'affinité, se lie au récepteur PAC1 et VPAC1 (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). À la lumière des résultats actuels, il serait donc indiqué de substituer l'His<sup>1</sup> avec l'acide propionique-4-imidazole et d'effectuer des tests de liaison et d'activité biologique. Cette voie avait d'ailleurs été envisagée dès le début de notre étude mais le coût très élevé de l'acide propionique-4-imidazole nous a amenés à laisser de côté ce dérivé jusqu'à ce que soient mieux documentés les effets des modifications que nous avons apportées à la position 1 du PACAP.

Par ailleurs, des substitutions multiples pourraient être réalisées telles que le remplacement simultané des positions 1 (par les différents acides propioniques) et 7 (par une alanine). En effet, l'Ala-*scan* a montré des résultats prometteurs pour la position 7 puisque le dérivé [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 se lie et active efficacement les récepteurs PAC1 et VPAC1 et montre une faible affinité de liaison et pas d'activation pour VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). De plus, notons que dans le but d'identifier un agoniste du PACAP démontrant une sélectivité envers le récepteur PAC1, le groupe de Jensen a synthétisé près d'une cinquantaine d'analogues, dont plusieurs comprenaient des substitutions multiples sur le PACAP38. Par exemple, ils ont remplacé l'histidine-1 avec Iac, la sérine-2 avec D-Ser et la tyrosine-22 avec L-Ala, et ils ont obtenu un dérivé montrant une sélectivité améliorée envers le récepteur PAC1, tout en n'affichant qu'une légère perte d'activité biologique (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Il serait alors approprié de modifier simultanément la position 1 par différents acides propioniques et la position 22 par une alanine. Enfin, il a aussi été démontré que le segment 28-38 facilite la liaison du PACAP au récepteur PAC1. À cet égard, il serait indiqué d'appliquer au PACAP38 les modifications introduites dans l'isoforme PACAP27. Il faut cependant rappeler que la portion 28-38 de l'isoforme de 38 acides aminés du PACAP joue un rôle important au niveau de l'interaction du peptide avec les peptidases et que cette avenue risque donc de rendre les

analogues plus vulnérables à la dégradation enzymatique (Bourgault *et al.*, 2008a). Des tests de stabilité métabolique devraient alors être inclus dans la démarche.

## 2. Développement d'analogues modifiés en position 6

Notre laboratoire a mis en évidence l'importance de la position 6 dans l'affinité et l'activité du PACAP envers ses récepteurs (Bourgault *et al.*, 2008a, Bourgault *et al.*, 2009b). Plus particulièrement, il a été suggéré que l'hydrophobicité serait une propriété physico-chimique clé dans la sélectivité vis-à-vis du récepteur PAC1. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons modifié la position 6 du PACAP avec plusieurs dérivés tryptophanyles modifiés par C2-arylation du noyau indole. L'ajout de groupement du type phényl-X (où X = H, CH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, Br, F ou CF<sub>3</sub>) sur le carbone en C2 de l'indole accroît l'encombrement stérique ainsi que l'hydrophobicité de la chaîne latérale, tout en augmentant le caractère aromatique du résidu.

### 1. C2-arylation

Les synthèses des dérivés de l'acide aminé fluorénylméthoxycarbonyl-tryptophane (Fmoc-Trp-OH) transformé par C2-arylation ont été effectuées en adaptant une procédure publiée par le groupe de Fernando Albericio (Preciado *et al.*, 2013). Nous avons modifié la méthode en réalisant la réaction par chauffage en bain d'huile plutôt que par chauffage par exposition aux micro-ondes. L'avantage très distinctif de notre approche réside dans la capacité de préparer des quantités relativement importantes (notre échelle : 2 mmol) de dérivés de Fmoc-Trp-OH, comparativement à ce qui a été décrit par Albericio *et coll.* dont l'échelle de synthèse a été limitée à 0,117 mmol. Après isolation, les composés ont été caractérisés par diverses méthodes afin de vérifier leur identité et leur niveau de pureté. En premier lieu, tous les produits ont été analysés par chromatographie sur couche mince sur silice (phase normale) au moyen d'un mélange CHCl<sub>3</sub>-EtOAc-AcOH (8:4:0,5) comme phase mobile. La séparation du composé de départ (Fmoc-Trp-OH) et des produits de type Fmoc-Trp(C2-aryle)-OH est significative puisque l'ajout d'un groupement aromatique sur le noyau indole augmente son hydrophobicité. En deuxième lieu, des analyses par HPLC ont été réalisées afin d'estimer le niveau de complétion de la réaction de C2-arylation pour chacun des composés Fmoc-tryptophanyles arylés. Les chromatogrammes ont montré que du Fmoc-Trp-OH est encore présent dans le produit de réaction (Annexe 1). Cependant, bien que les quantités résiduelles n'aient pas été précisément mesurées, notamment parce que les coefficients d'extinction molaire du composé de départ et

des produits d'arrivée sont distincts, les niveaux ont été jugés tels qu'ils ne seraient pas un obstacle pour l'usage des produits arylés lors de la synthèse des analogues du PACAP. En fait, il a été assumé que le processus de purification suivant la synthèse des peptides éliminerait les fractions ne correspondant pas à la masse souhaitée; ce qui a été démontré suite à la caractérisation finale des analogues peptidiques porteurs d'un tryptophanyle en 6. En troisième lieu, les masses des molécules ont été mesurées par spectrométrie MALDI-TOF en utilisant l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque comme matrice. La technique a fourni la masse moléculaire des produits et également suggéré que chacun des composés possédait une pureté très satisfaisante.

**Tableau 7: Masses et temps de rétention en HPLC analytique obtenus pour les analogues modifiés en position 6.**

Analogues	Masse		Temps de rétention min
	Attendue	Obtenue	
Fmoc-Trp-OH	426,5	426,9	18,23
Fmoc-Trp(C2-Phe)-OH	502,3	503,6	18,95
Fmoc-Trp(C2-Phe-NO <sub>2</sub> )-OH	548,3	549,6	18,93
Fmoc-Trp(C2-Phe-Br)-OH	582,2	581,5	19,55
Fmoc-Trp(C2-Phe-F)-OH	521,2	520,7	19,02
Fmoc-Trp(C2-Phe-CH <sub>3</sub> )-OH	518,0	518,1	19,27
Fmoc-Trp(C2-Phe-CF <sub>3</sub> )-OH	571,3	570,7	19,53

En dernier lieu, l'utilisation de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (<sup>1</sup>H-RMN à 400 MHz) a confirmé la structure chimique des dérivés de même que leur pureté. En effet, aucune présence marquée de signaux résiduels provenant de contaminants n'est observée. Finalement, les valeurs de déplacement chimique (δ) des protons des molécules synthétiques ont été comparées à celles proposées suite à une analyse au moyen du logiciel ChemDraw. Comme souligné, tous les résultats de la spectroscopie <sup>1</sup>H-RMN sont concluants et ceux-ci sont présentés à l'annexe 2.

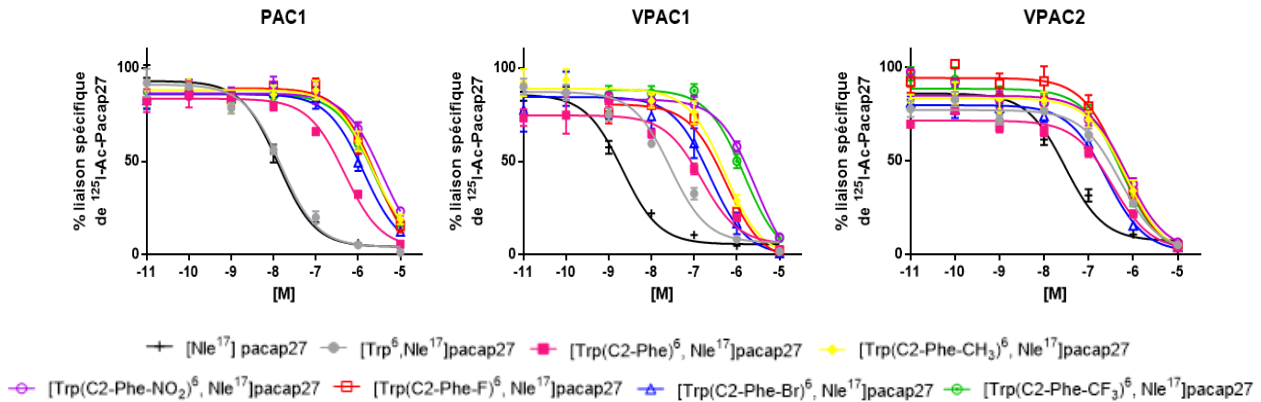
## 2. Test de liaison

Nos tests de liaison ont tout d'abord démontré que le dérivé [Trp<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 possède une affinité pour PAC1 similaire à celle du PACAP 27, et des affinités significativement plus faibles pour VPAC1 et VPAC2. Nous avons également observé que, de manière générale, la C2-arylation donne lieu à des effets délétères sur la liaison aux trois récepteurs, mais davantage pour VPAC1 (Figure 25). Il semble donc que l'augmentation de l'encombrement, de

l'hydrophobicité et/ou de la densité électronique intervienne dans la liaison avec VPAC1 et que ces modifications altéreraient le positionnement du motif *N-capping*. Ces résultats supportent l'hypothèse que l'hydrophobicité du résidu à la position 6 est un facteur influençant la sélectivité pour PAC1. Cependant, la dimension de la chaîne latérale hydrophobe doit être limitée car, comme montré avec l'analogue [Trp(C2-Phe)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>] PACAP27, le simple ajout d'un groupement phényle sur le noyau indole du tryptophane entraîne une baisse d'affinité pour les trois récepteurs. De plus, l'addition de groupes supplémentaires sur le phényle, qu'ils soient électrodonneur (-CH<sub>3</sub>) ou électroattracteurs (-NO<sub>2</sub>; -F; -Br; -CF<sub>3</sub>), cause une perte additionnelle de l'affinité de liaison. Plus particulièrement, le [Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 est l'analogue pour lequel la C2-arylation a été la plus délétère, puisqu'il présente l'affinité la plus faible vis-à-vis des trois récepteurs, probablement en raison de sa taille qui provoque un encombrement stérique important. Globalement, le remplacement de Phe avec Trp a donné un analogue avec une affinité similaire à celle du PACAP27 vis-à-vis PAC1 et ceci suggère l'importance de l'hydrophobicité dans la sélectivité du récepteur. D'ailleurs, ce résultat corrobore ceux obtenus précédemment par notre groupe suite à quelques modifications appliquées à la position 6. En effet, le remplacement de la phénylalanine-6 par des acides aminés plus hydrophobes et aromatiques, soit la biphenylalanine (Bip) et la 1-naphtylalanine (Nal), a donné des analogues plus affins que le peptide endogène pour PAC1, et une affinité et une activité plus faible envers VPAC1 et VPAC2. À l'opposé, la substitution avec Ala s'est montrée défavorable tant au niveau de l'affinité que de l'activité. Ensuite, en complément à cette étude, l'implication de l'aromaticité par rapport à l'hydrophobicité a été vérifiée par la substitution de Phe<sup>6</sup> par la cyclohexylalanine (Cha). Cette modification n'a pas entraîné une diminution significative de l'affinité envers le récepteur PAC1, ce qui démontre l'implication de l'hydrophobicité dans l'affinité du peptide et un rôle marginal voire absent pour l'aromaticité de cette position. Il est à propos de mentionner que toutes ces modifications améliorent légèrement plus l'affinité sur l'isoforme PACAP38 que celles effectuées sur le PACAP27 (Bourgault *et al.*, 2009b).



**Figure 25 : Inhibition de la liaison du marqueur  $^{125}\text{I}$ -Ac-PACAP27 sur des cellules CHO transfectées avec les récepteurs PAC1, VPAC1 ou VPAC2, avec des concentrations croissantes ( $10^{-11}$  M à  $10^{-5}$  M) des analogues modifiés à la position 6.**



**Tableau 8 : Concentration produisant 50% d'inhibition de la liaison spécifique de  $^{125}\text{I}$ -Ac-PACAP27 pour le  $[\text{Nle}^{17}]$ PACAP27 et ses analogues modifiés en position 6.**

Peptides	Affinité de liaison ( $\text{pIC}_{50}$ ) <sup>1</sup>		
	PAC1	VPAC1	VPAC2
$[\text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$7,89 \pm 0,08$	$8,69 \pm 0,09$	$7,53 \pm 0,08$
$[\text{Trp}^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$7,82 \pm 0,08$	$7,56 \pm 0,11$ ****	$6,29 \pm 0,09$ ****
$[\text{Trp}(\text{C2-Phe})^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$6,32 \pm 0,12$ ****	$6,82 \pm 0,14$ ****	$6,47 \pm 0,08$ ****
$[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CH}_3)^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$5,67 \pm 0,15$ ****	$6,28 \pm 0,10$ ****	$6,16 \pm 0,11$ ****
$[\text{Trp}(\text{C2-Phe-NO}_2)^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$5,44 \pm 0,15$ ****	$5,56 \pm 0,11$ ****	$6,14 \pm 0,09$ ****
$[\text{Trp}(\text{C2-Phe-F})^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$5,58 \pm 0,18$ ****	$6,26 \pm 0,10$ ****	$6,28 \pm 0,11$ ****
$[\text{Trp}(\text{C2-Phe-Br})^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$5,87 \pm 0,12$ ****	$6,63 \pm 0,16$ ****	$6,59 \pm 0,09$ ****
$[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CF}_3)^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27	$5,63 \pm 0,11$ ****	$5,83 \pm 0,11$ ****	$6,25 \pm 0,11$ ****

<sup>1</sup> Log négatif de l' $\text{IC}_{50}$ .

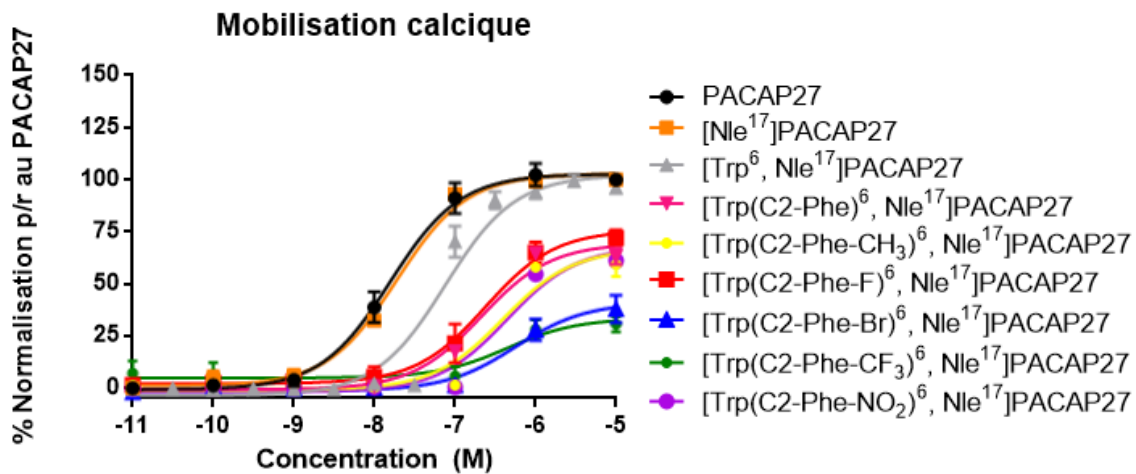
t-test : \*\*\*\*  $P < 0,0001$  sont statistiquement significatifs comparativement au  $[\text{Nle}^{17}]$ PACAP27.

### 3. Test de mobilisation calcique

Suite aux tests de liaison, des mesures de mobilisation calcique ont été effectuées puisqu'il est connu que les deux isoformes du PACAP induisent une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Delpoite *et al.*, 1995). Les récepteurs sont couplés à la protéine Gαq qui peut, lors de la liaison du ligand, activer la voie de la PLC/IP<sub>3</sub> engendrant ainsi une augmentation du calcium intracellulaire. Nos résultats indiquent que l'arylation en C2 du noyau indole de la position 6 est délétère puisque tous les analogues montrent une diminution de la

puissance avec des  $EC_{50}$  allant de 76 nM pour le dérivé  $[Trp^6, Nle^{17}]PACAP27$  à 564 nM pour le composé  $[Trp(C2-Phe-Br)^6, Nle^{17}]PACAP27$  (Figure 26). Hormis  $[Trp^6, Nle^{17}]PACAP27$  qui présente une efficacité semblable à celle du PACAP27, tous les autres analogues se comportent comme des agonistes partiels. Notamment, les dérivés  $[Trp(C2-Phe-CH_3)^6, Nle^{17}]PACAP27$  et  $[Trp(C2-Phe-NO_2)^6, Nle^{17}]PACAP27$  n'ont été capables de produire que 70% de l'effet observé avec le PACAP27 (Tableau 9); la plus grande perte d'efficacité étant enregistrée pour l'analogue  $[Trp(C2-Phe-CF_3)^6, Nle^{17}]PACAP27$  avec seulement 33% de l'efficacité maximale atteinte. Encore une fois, l'encombrement stérique apparaît comme un facteur limitant pour la mobilisation calcique étant donné que toutes les substitutions ont eu des effets délétères. Néanmoins, l'analogue  $[Trp^6, Nle^{17}]PACAP27$  est prometteur puisqu'il possède une efficacité similaire au PACAP27, malgré une légère perte de puissance.

**Figure 26: Courbes concentration-réponse illustrant l'effet des différentes modifications sur la mobilisation du calcium dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur PAC1. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de réponse (fluorescence) obtenu pour le PACAP27 à  $10^{-5}$  M.**



**Tableau 9: Résultats obtenus pour la mobilisation calcique pour les analogues modifiés en position 6.**

<b>Analogues</b>	<b>EC<sub>50</sub><sup>1</sup> (nM)</b>	<b>pEC<sub>50</sub><sup>2</sup></b>	<b>E<sub>max</sub><sup>3</sup> (%)</b>
PACAP27	16 (10-23) <sup>4</sup>	7,81 ± 0,09	103 ± 3
[Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	20 (14-25) <sup>4</sup>	7,72 ± 0,06	103 ± 2
[Trp <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	76 (54-107) <sup>4</sup>	7,12 ± 0,07**	102 ± 4
[Trp(C2-Phe) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	212 (137-329) <sup>4</sup>	6,67 ± 0,09****	69 ± 3
[Trp(C2-Phe-CH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	391 (181-846) <sup>4</sup>	6,41 ± 0,16****	67 ± 5
[Trp(C2-Phe-NO <sub>2</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	445 (253-784) <sup>4</sup>	6,35 ± 0,12****	68 ± 4
[Trp(C2-Phe-F) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	239 (123-463) <sup>4</sup>	6,62 ± 0,14***	76 ± 5
[Trp(C2-Phe-Br) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	564 (205-1553) <sup>4</sup>	6,25 ± 0,21****	41 ± 5
[Trp(C2-Phe-CF <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ] PACAP27	442 (77-2517) <sup>4</sup>	6,35 ± 0,36****	33 ± 5

<sup>1</sup>Concentration produisant 50% de la mobilisation calcique. <sup>2</sup>Log négatif de l'EC<sub>50</sub>. <sup>3</sup>Pourcentage d'efficacité maximale par rapport au PACAP27 à 10<sup>-5</sup> M. <sup>4</sup>Intervalle de confiance à 95%.

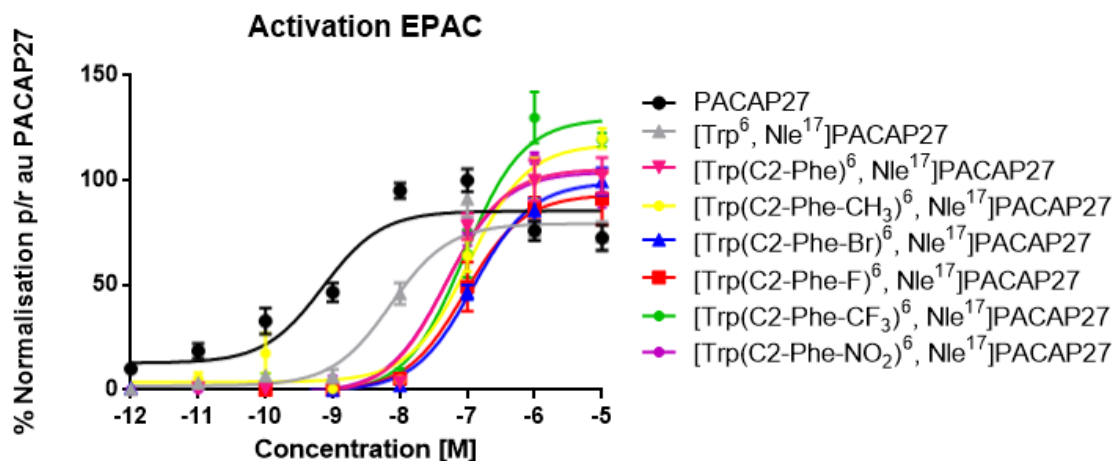
t-test : \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001 \*\*\*\* P < 0,0001 sont statistiquement significatifs comparativement au PACAP27.

#### 4. Activation de la protéine EPAC

Les récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 sont couplés principalement à la protéine G<sub>s</sub>, laquelle régule la concentration intracellulaire d'AMPc *via* la stimulation de l'AC. L'activation d'EPAC est une mesure de la production d'AMPc. La protéine EPAC possède un domaine de liaison de l'AMPc qui agit comme commutateur moléculaire pour détecter le niveau d'AMPc (Cheng *et al.*, 2008). De manière générale, nos différents analogues apparaissent moins puissants que le peptide endogène. Encore une fois, le dérivé [Trp<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 semble le moins affecté par la substitution puisque son pEC<sub>50</sub> est de 8,14 ± 0,11 (PACAP27: 9,15 ± 0,13) et son efficacité (E<sub>max</sub>) de 79% ± 3 (PACAP27: 85% ± 3). La substitution de la phénylalanine d'origine par un tryptophane n'a donc pas eu d'effets considérables sur ces paramètres pharmacologiques. Les autres modifications donnent cependant lieu à des analogues en moyenne 100 fois moins puissants que le PACAP27 (Figure 27). Bien que tous se comportent comme des agonistes complets, ces composés, à l'exception de [Trp(C2-Phe-F)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27, semblent plus efficaces pour augmenter la production d'AMPc. L'ajout d'un groupement phényle sur l'indole a eu un effet défavorable sur l'activation d'EPAC puisque le dérivé affiche un EC<sub>50</sub> de 49 nM, comparativement à 7 nM pour la molécule-mère et 0,7 nM pour le PACAP27 (Tableau 10). La transformation suivante produite par la substitution de Trp<sup>6</sup> avec une fonction tolyle (φ - CH<sub>3</sub>) a donné un analogue équipotent (selon l'allure visuelle des courbes) ou légèrement moins

puissant (selon l'analyse GraphPad de Prism) que le  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CH}_3)^6, \text{Nle}^{17}]\text{PACAP27}$ ; mais montrant cependant une augmentation apparente de l'efficacité. En effet, la valeur de  $E_{\text{max}}$  mesurée pour cet analogue ( $117\% \pm 5$ ) à  $10^{-5}$  M est supérieure à celle du PACAP27 à cette même concentration. Toutefois, on constate que la valeur de  $E_{\text{max}}$  du PACAP27, à son plateau observé à  $10^{-7}$  M, correspond à celle mesurée pour le  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CH}_3)^6, \text{Nle}^{17}]\text{PACAP27}$  à  $10^{-5}$  M. Dans ce type de bioessai, cette décroissance de  $E_{\text{max}}$  après un plateau est un phénomène déjà décrit dans la littérature et il est expliqué par l'internalisation du récepteur (Jorgensen *et al.*, 2007). Quoi qu'il en soit, la perte de puissance observée pour tous les analogues suggère une mauvaise orientation de la chaîne latérale. Plus précisément, l'ajout d'un groupement sur le noyau indole du tryptophane-6 nuit à la formation du motif *N-capping*, lequel permet la stabilisation de l'hélice- $\alpha$  et la liaison/activation du récepteur. Malgré la perte de puissance, l'encombrement stérique n'empêche donc pas l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC. De plus, les analogues  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CH}_3)^6, \text{Nle}^{17}]\text{PACAP27}$  et  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CF}_3)^6, \text{Nle}^{17}]\text{PACAP27}$  montrent des efficacités nettement supérieures à celle du peptide natif. En complément à cette étude, et afin de mieux comprendre l'activation de cette voie, il serait utile d'évaluer l'activation de la protéine Gas.

**Figure 27: Courbes concentration-réponse illustrant l'effet des différentes modifications introduites à la position 6 du PACAP27 sur l'activation d'EPAC dans des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur PAC1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réponse normalisé par rapport au PACAP27 à  $10^{-5}$  M.**



**Tableau 10: Résultats obtenus pour l'activation d'EPAC pour les analogues modifiés en position 6.**

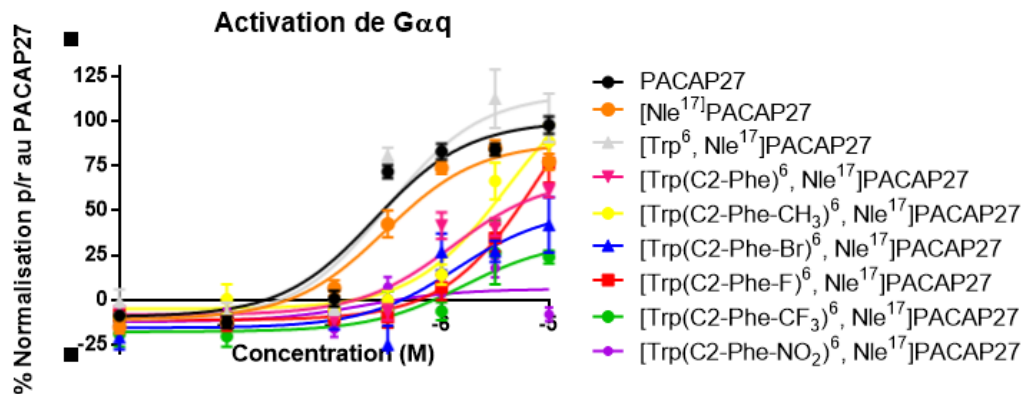
Analogues	EC <sub>50</sub> (nM) <sup>1</sup>	pEC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	E <sub>max</sub> <sup>3</sup> (%)
PACAP27	0,7 (0,4-1,3) <sup>4</sup>	9,15 ± 0.13	85 ± 3
[Trp <sup>6</sup> ,Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	7 (4-12) <sup>4</sup>	8,14 ± 0.11***	79 ± 3
[Trp(C2-Phe) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	49 (32-77) <sup>4</sup>	7,31 ± 0.09****	106 ± 4
[Trp(C2-Phe-CH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	104 (64-172) <sup>4</sup>	6,98 ± 0.11****	117 ± 5
[Trp(C2-Phe-NO <sub>2</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	48 (33-70) <sup>4</sup>	7,32 ± 0.08****	104 ± 3
[Trp(C2-Phe-F) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	91 (52-160) <sup>4</sup>	7,16 ± 0.12****	93 ± 5
[Trp(C2-Phe-Br) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	122 (92-162) <sup>4</sup>	6,91 ± 0.06****	99 ± 3
[Trp(C2-Phe-CF <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	90 (57-141) <sup>4</sup>	7,05 ± 0.09****	130 ± 5

<sup>1</sup>Concentration produisant 50% de l'activation d'EPAC. <sup>2</sup>Log négatif de l'EC<sub>50</sub>. <sup>3</sup>Pourcentage d'efficacité maximale par rapport au PACAP27 à 10<sup>-5</sup> M. <sup>4</sup> Intervalle de confiance à 95%. t-test : \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001 sont statistiquement significatifs comparativement au PACAP27.

## 5. Activation de la protéine Gαq

Il a été clairement montré que le PACAP est capable de mobiliser le calcium intracellulaire *via* l'activation de la protéine Gαq. À cet égard, nous avons testé tous nos analogues pour l'activation de Gαq. Également, puisque le contexte cellulaire entre les CHO et les HEK-293 est différent, ce test permet de faire un lien avec les résultats obtenus dans le test de mobilisation calcique.

**Figure 28: Courbes concentration-réponse illustrant l'effet des différentes modifications introduites à la position 6 du PACAP27 sur le recrutement de Gαq dans des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur PAC1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réponse normalisé par rapport au PACAP27 à 10<sup>-5</sup> M.**



**Tableau 11: Résultats obtenus pour l'activation de Gαq pour les analogues modifiés en position 6**

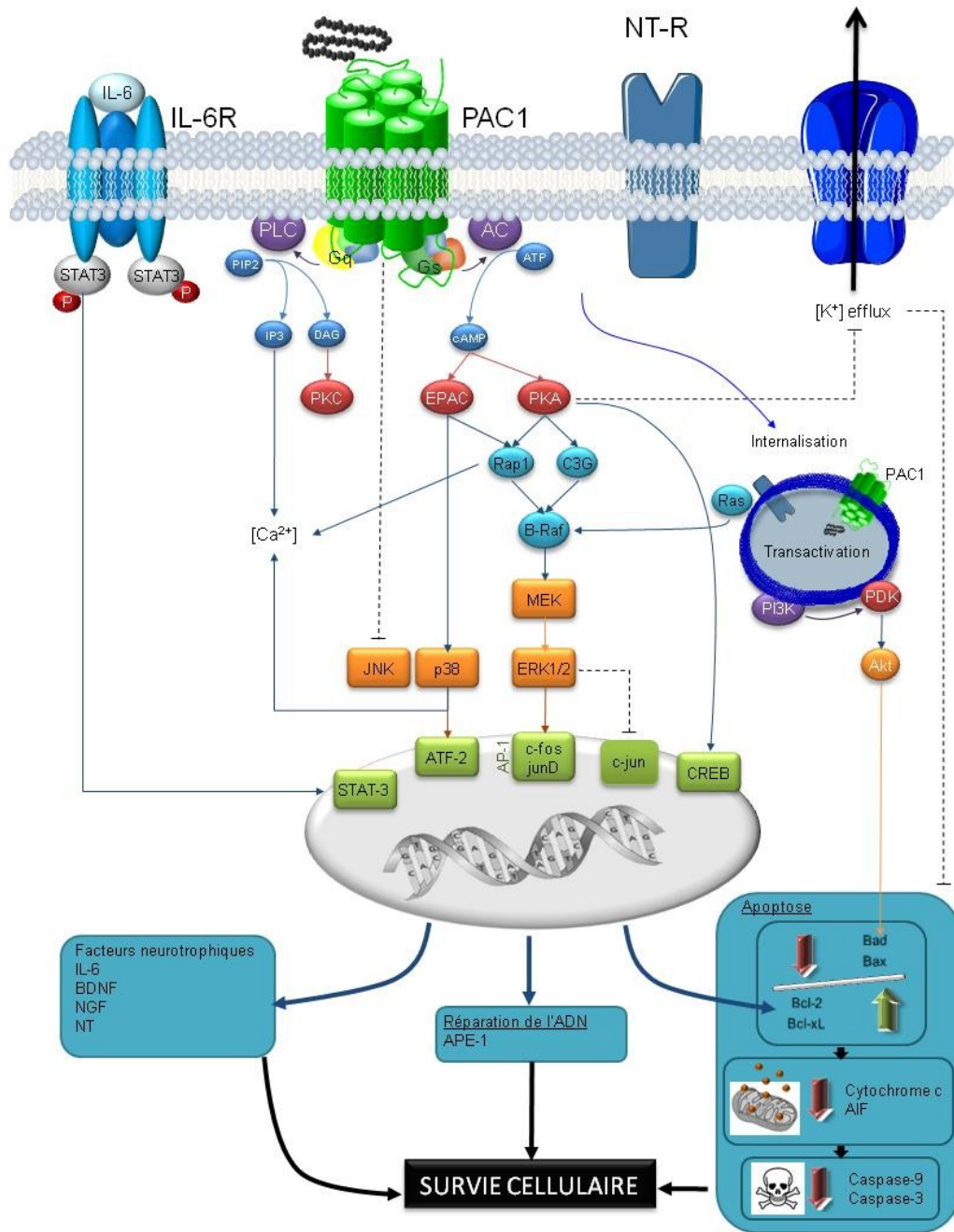
Analogues	EC <sub>50</sub> (nM) <sup>1</sup>	pEC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	E <sub>max</sub> <sup>3</sup> (%)
PACAP27	239 (179-320) <sup>4</sup>	6,62 ± 0,06	100 ± 4
[Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	298 (206-430) <sup>4</sup>	6,53 ± 0,08	88 ± 4
[Trp <sup>6</sup> ,Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	312 (176-555) <sup>4</sup>	6,51 ± 0,12	115 ± 8
[Trp(C2-Phe) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	>1000	5,90 ± 0,14****	68 ± 7
[Trp(C2-Phe-CH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	>1000	5,39 ± 0,16****	88 ± 20
[Trp(C2-Phe-NO <sub>2</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	---	---	---
[Trp(C2-Phe-F) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	>1000	5,10 ± 0,18****	76 ± 34
[Trp(C2-Phe-Br) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	>1000	5,86 ± 0,33***	51 ± 15
[Trp(C2-Phe-CF <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> , Nle <sup>17</sup> ]PACAP27	>1000	5,79 ± 0,32***	34 ± 12

<sup>1</sup>Concentration produisant 50% de l'activation de Gαq. <sup>2</sup>Log négatif de l'EC<sub>50</sub>. <sup>3</sup>Pourcentage d'efficacité maximale par rapport au PACAP27 à 10<sup>-5</sup> M. <sup>4</sup>Intervalle de confiance à 95%. t-test : \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001 sont statistiquement significatifs comparativement au PACAP27.

Comme indiqué dans le Tableau 11, le PACAP27 est relativement tolérant à la substitution de Phe avec Trp, le composé [Trp<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 agissant comme un agoniste complet. Plus précisément, ce dernier possède une puissance semblable au PACAP27 (EC<sub>50</sub> = 239 nM et 312 nM pour PACAP27 et [Trp<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27, respectivement) et une efficacité légèrement supérieur (E<sub>max</sub> = 100% pour le PACAP27 et E<sub>max</sub> = 115% pour le dérivé tryptophane) à celle observée pour le ligand endogène. Les autres analogues sont par contre tous caractérisés par une perte notable (EC<sub>50</sub> > 1000 nM) de leur puissance à activer Gαq (Tableau 11, Figure 28). L'ajout d'un phényle sur le noyau indole du tryptophane a également entraîné une altération de leur efficacité. Ainsi, le composé [Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)<sup>6</sup>,Nle<sup>17</sup>]PACAP27 s'est avéré incapable d'induire l'activation de Gαq alors que les analogues [Trp(C2-Phe)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27, [Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 et [Trp(C2-Phe-Br)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 n'ont pu activer que partiellement Gαq, leur efficacité variant de 34 à 68% de la réponse induite par le PACAP27. Les deux derniers composés semblent quant à eux se comporter comme de faibles agonistes. L'ensemble de ces résultats suggère que l'encombrement stérique au niveau de la chaîne latérale du résidu 6 limiterait l'activation de Gαq, mais pas d'EPAC. Également, il est possible que ce soit plutôt la mauvaise orientation de la chaîne latérale qui causerait la perte d'activité au niveau de Gαq. La détermination des structures secondaire et tertiaire des analogues permettrait d'éclaircir cet aspect.

Il est connu que la mobilisation calcique peut se produire *via* l'activation de la voie de signalisation Gαq et PLC/IP<sub>3</sub>. Toutefois, en regardant les courbes concentration-réponse pour Gαq et la mobilisation calcique, quelques différences y sont présentes. En premier lieu, [Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 n'active pas Gαq, alors qu'une mobilisation calcique est observable. Cela suggère que la mobilisation calcique provient probablement de l'activation d'une autre voie de signalisation. Plus précisément, le calcium pourrait provenir de Rap1 *via* l'activation de la protéine Gas (Figure 29) (Vaudry *et al.*, 2009). Il en est de même avec [Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 et [Trp(C2-Phe-Br)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 qui se comportent comme des agonistes très faibles vis-à-vis la voie Gαq mais qui maintiennent malgré tout une capacité significative pour la mobilisation calcique. Cependant, il est aussi possible que ces différences soient dues à l'utilisation de lignées cellulaires différentes pour le test de mobilisation calcique et celui de l'activation de la protéine Gαq.

Figure 29 : Schéma montrant différentes voies de signalisation du PACAP suite à l'activation du récepteur PAC1 (Bourgault et al., 2011).





## 6. Biais

Suite aux résultats d'activité biologique, des diagrammes de Kiviat (diagrammes en toile d'araignée) ont été réalisés afin de voir si une corrélation existe entre la structure et l'activation des différentes voies de signalisation. Cette méthode permet d'afficher des données variables sous forme d'un seul digramme où chaque axe correspond soit au logR ou au  $E_{\max}$  pour chacun des tests d'activité biologique (Gaq et EPAC) et l'échelle sur chaque axe représente un rapport du pourcentage d'effet maximal ou de la puissance de l'analogue normalisé par rapport au PACAP27. L'avantage principal de faire ce type de diagramme est qu'il est facile de voir l'activation préférentielle ou non d'une voie par rapport à une autre pour chacun des analogues.

La figure 30 montre le comportement des  $E_{\max}$  observés ainsi que celui des logs de R (représentation relative à la puissance d'activation) pour l'activation de Gaq et d'EPAC. Très peu de différences sont observables lorsque l'on compare les logs de R des analogues, contrairement aux  $E_{\max}$ . On remarque toutefois que pour tous les analogues, l'activation d'EPAC semble favorisée. En regardant les différents diagrammes, la première chose que l'on peut voir est que le motif pour l'activation de la protéine Gaq est beaucoup plus variable que celui d'EPAC. Ainsi, on constate que les dérivés  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-Br})^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27,  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CF}_3)^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27 et  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-NO}_2)^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27 sont beaucoup moins efficaces à activer Gaq que  $[\text{Trp}^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27,  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe})^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27,  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-F})^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27 et  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CH}_3)^6$  tandis que tous les analogues sont capables d'activer EPAC, malgré une petite variabilité au niveau de leur efficacité. Ces résultats suggèrent que la taille du substituant pourrait être un paramètre important pour l'activation de Gaq. Également, il est possible de regrouper certains analogues selon leur profil. Plus précisément, les dérivés  $\text{CF}_3$  et Br possèdent une bonne activation d'EPAC et peu d'activation pour Gaq; le  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-CH}_3)^6$  et le  $[\text{Trp}(\text{C2-Phe-F})^6, \text{Nle}^{17}]$ PACAP27 activent Gaq avec une efficacité semblable; et finalement le PACAP27 et le dérivé Trp ont des profils similaires pour l'activation d'EPAC et de Gaq. On remarque donc que les analogues porteurs de l'atome de fluor ou du groupement méthyle ont un motif semblable. La nature des effets électroniques est différente puisque le groupe méthyle est un groupement électrodonneur tandis que le fluor est un électroattracteur. Il en est de même pour les dérivés  $\text{NO}_2$  et F qui sont tous deux des groupements électroattracteurs mais qui possèdent des profils différents. Ce paramètre n'est donc pas déterminant quant au biais observé. Quoiqu'il en soit, malgré la présence de différents motifs, un dénominateur commun aux analogues est leur propension à activer préférentiellement

EPAC. Il sera donc éventuellement avantageux d'accomplir dans le laboratoire des tests BRET pour évaluer l'activation de Gas et ainsi obtenir des renseignements additionnels afin d'expliquer cette tendance.

Figure 30: Diagrammes en toile d'araignée pour tous les analogues modifiés en position 6 pour EPAC et Gαq en utilisant le Emax et le logR.

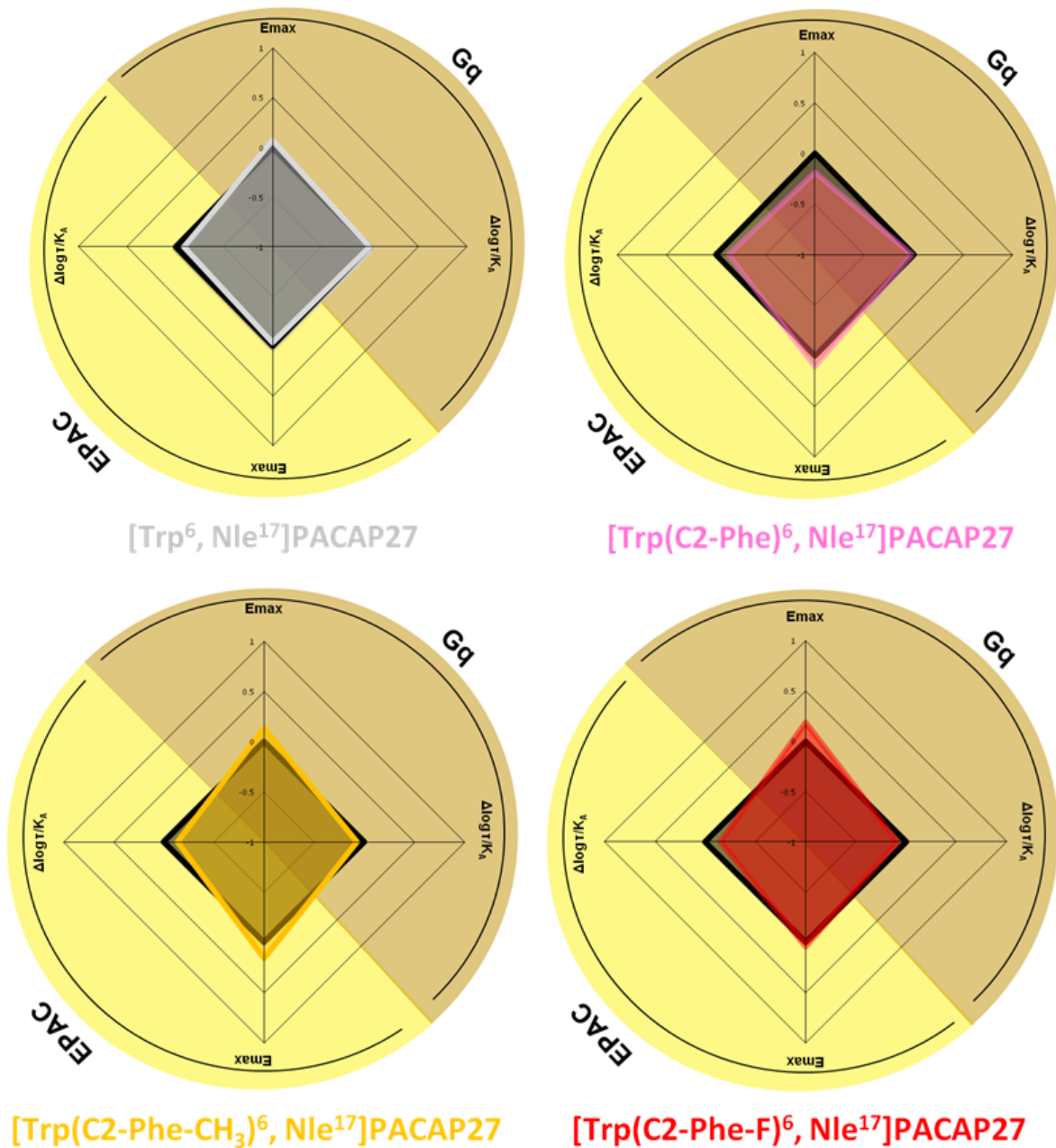
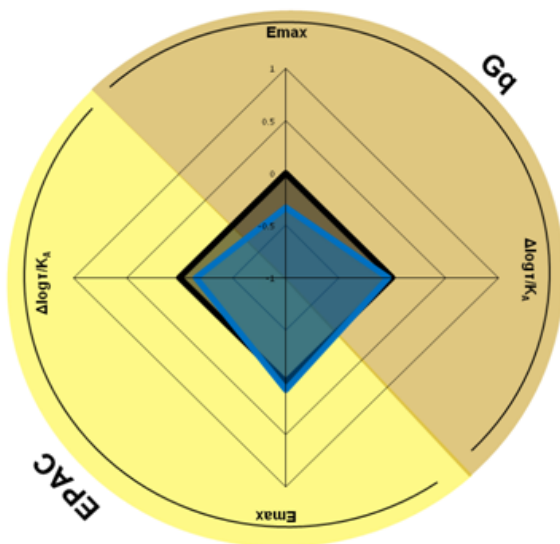
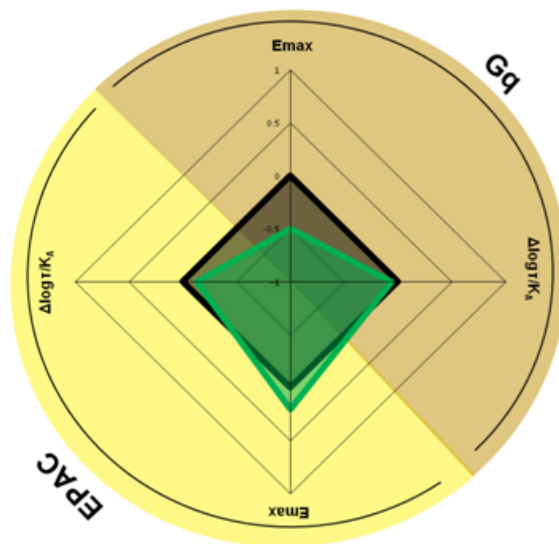


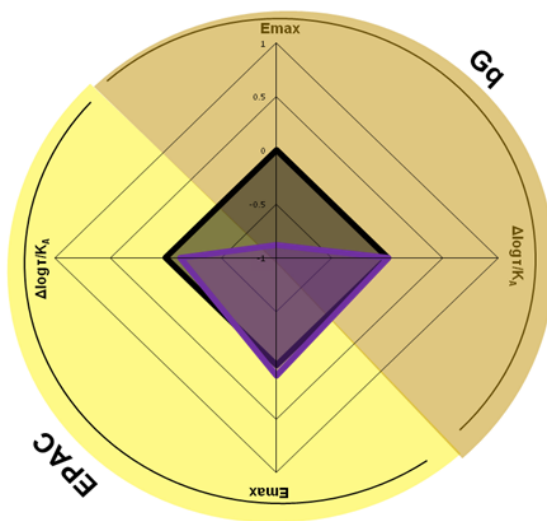
Figure 30 (suite): Diagrammes en toile d'araignée pour tous les analogues modifiés en position 6 pour EPAC et Gq en utilisant le Emax et le logR.



[Trp(C2-Phe-Br)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27



[Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27



[Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27

Afin d'avoir une idée plus précise du biais, plusieurs calculs ont été effectués à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 6* comparant l'activation de Gαq avec celle d'EPAC. Les calculs ont révélé un biais plutôt dirigé vers l'activation d'EPAC, et ce, de manière évidente pour tous les analogues. En complément futur, dans l'optique d'obtenir des informations supplémentaires sur les voies de signalisation en amont, il sera utile d'étudier l'activation de la protéine Gαs par la méthode BRET. Aussi, il sera nécessaire de jeter un coup d'œil sur les mécanismes en aval, soit plus précisément ERK 1/2 et p38, par la méthode d'immunobuvardage de type Western.

## CHAPITRE 5 : CONCLUSION

En conclusion, les RCPGs de la classe B sont des cibles incontournables pour la découverte de nouveaux traitements de plusieurs maladies telles que le diabète de type II, l'ostéoporose, les migraines, les maladies neurodégénératives, et les maladies cardiovasculaires (Zhao *et al.*, 2016). Cependant, on ne peut minimiser les difficultés associées au développement d'agonistes de cette classe de RCPGs puisque la présence d'un domaine N-terminal extracellulaire d'une longueur relativement importante, où s'effectue l'ancrage du ligand, juxtaposé à une pochette d'activation située au niveau de la membrane cellulaire, rend ces récepteurs particulièrement complexes pour l'identification de petites molécules mimant l'action biologique des ligands peptidiques. Bien qu'*Omeros Corporation* ait récemment réussi à identifier de tels composés, pour le récepteur de l'hormone parathyroïdienne-1 par exemple, les ligands peptidiques demeurent d'un intérêt considérable puisque ceux-ci contiennent à la fois l'adresse et le message pour un récepteur donné (Omeros-Corporation, 2013). Parmi les cibles à privilégier, le système PACAPergique, et plus particulièrement la combinaison PACAP/récepteur PAC1, affiche un potentiel thérapeutique précieux compte tenu des propriétés de neuroprotection associées à ce système.

Ce projet de recherche a permis d'élargir les connaissances actuelles sur le potentiel thérapeutique du PACAP. Plus particulièrement, il a contribué à une meilleure compréhension des propriétés physico-chimiques permettant l'amélioration de la sélectivité du peptide pour son récepteur PAC1. En tenant compte des nombreuses études effectuées sur le PACAP, dont plusieurs sont issues de notre laboratoire, nous avons ciblé deux positions que nous considérons cruciales pour la liaison et l'activation du récepteur, soit les résidus 1 et 6. En premier lieu, l'histidine en position 1 a été remplacée successivement par cinq analogues de l'acide propionique dont le carbone gamma est porteur d'une structure moléculaire aromatique, aussi capable par la présence d'un hétéroatome de former une liaison H. En deuxième lieu, la phénylalanine en position 6 a été substituée par différents dérivés tryptophanyles modifiés par C2-arylation. Parmi ces analogues, le [Trp<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 a montré des affinités similaires au récepteur PAC1 et VPAC1 à celles observées pour la molécule-mère. Cependant, son affinité pour le récepteur VPAC2 s'avère réduite de près de 35 fois, ce qui montre une sélectivité PAC1/VPAC1 qui pourrait être exploitée pour produire un analogue présentant à la fois des propriétés antiapoptotiques et anti-inflammatoires. De plus, il agit comme un agoniste complet pour l'activation de Gαq dans les cellules HEK-293.

Bien que les travaux focalisant sur la position 1 n'aient pas mené à un analogue d'intérêt majeur, ces modifications ont apporté des informations très utiles concernant les propriétés physico-chimiques jouant un rôle dans l'affinité et l'activité du peptide pour ses récepteurs. Plus spécifiquement, la présence d'un hétéroatome ayant la capacité de faire un pont H, et le positionnement de celui-ci dans le cycle semble être cruciaux pour une liaison au récepteur et une activité biologique. En effet, le dérivé 3-pyridine possède une affinité plus grande que le dérivé 2-pyridine pour les trois récepteurs. Ces résultats appuient l'hypothèse proposant que le peptide adopte une conformation bien définie lorsqu'il s'approche du récepteur et en particulier, qu'il y aurait la formation d'un coude de type *Asx-turn* au niveau des 4 premiers résidus du ligand. Dans cette structure, l'histidine en position 1 participe à un pont H avec l'acide aspartique de la position 3. Ce postulat doit cependant être davantage examiné, notamment au moyen d'études conformationnelles, car il n'est pas exclu que ce soit la présence de l'*Asx-turn* lui-même qui soit importante pour la bonne liaison et l'activation du récepteur. L'adoption de cette géométrie serait donc un phénomène se situant en amont du processus d'interaction avec le récepteur. Ainsi, toute déstabilisation de cette structure pourrait avoir un impact négatif sur le motif *N-capping* qui, à son tour, provoquerait une déstabilisation de l'hélice- $\alpha$ . À cet égard, l'étude de Grace *et al.* a démontré pour la corticolibérine que ce ne sont pas les 6 premiers acides aminés qui sont importants pour l'interaction avec son récepteur de la classe B, mais plutôt le maintien de l'hélice- $\alpha$  (Grace *et al.*, 2010).

De manière générale, les substitutions en position 6 par des dérivés tryptophanyles suggèrent que le caractère hydrophobe est déterminant pour la liaison au récepteur PAC1 et son activation. La chaîne latérale en position 6 doit cependant respecter certaines limites au niveau de sa dimension. Il est probable que les groupements ajoutés, étant trop volumineux, empêchent le bon positionnement des chaînes latérales pour le motif *N-capping* et par le fait même nuisent à une bonne liaison. Des études additionnelles effectuées sur le composé [Trp<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27 permettront de confirmer le potentiel de cet analogue du PACAP pour être utilisé comme gabarit pour le développement d'une molécule thérapeutique. Plus précisément, il faudra faire des tests de survie afin de voir si l'analogue protège les neurones d'une mort cellulaire induite par exemple par un agent neurotoxique tel le MPP<sup>+</sup>. Également, puisque les motifs *Asx-turn*, *N-capping* et hélice- $\alpha$  apparaissent comme des éléments conformationnels clés pour l'activité du PACAP au niveau du récepteur PAC1, il faudra déterminer son arrangement spatial au moyen des spectroscopies <sup>1</sup>H-RMN en 2 dimensions NOESY (*Nuclear Overhauser effect spectroscopy*) et/ou ROESY (*Rotating frame Overhauser effect spectroscopy*). Ces

techniques permettent d'établir une image 3D du peptide en évaluant l'intensité des transferts d'énergie observés entre des noyaux protons ( $^1\text{H}$ ) lorsqu'ils sont localisés à proximité dans l'espace, suite au repliement de la molécule (Claridge *et al.*, 2009). En ajout, la stabilité métabolique du peptide devra être confirmée. En effet, il a déjà été montré que le PACAP27 est vulnérable à la dégradation enzymatique, particulièrement par la DPP-IV, et il est probable que les substitutions aux positions 6 et 17 n'aient pas amélioré la stabilité du peptide. Dans les circonstances, l'acétylation en N-terminal du PACAP pourrait être une solution pour contrer ce problème. De fait, cette stratégie de N-acétylation du PACAP a déjà été exécutée dans le laboratoire et il a été clairement établi que cette modification de la fonction N-terminale protège le peptide contre sa dégradation par la DPP-IV (Bourgault *et al.*, 2008a). En outre, comme suggéré pour les modifications en position 1, il sera utile d'effectuer les substitutions sur l'isoforme PACAP38 puisque le segment 28-38 facilite la liaison au récepteur PAC1. Toutefois, étant donné sa plus grande vulnérabilité envers certaines peptidases, la stabilité des analogues devra être vérifiée. Finalement, il est essentiel d'explorer les effets de modifications multiples sur le PACAP. Par exemple, en substituant la position 6 par un résidu tryptophane et la thréonine-7 au moyen d'une L-alanine. Ces choix de position et de substitution reposent sur l'observation lors d'un *Ala-scan* que l'analogue [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 présente une sélectivité améliorée pour le récepteur PAC1. En fait, cet analogue se lie et active efficacement les récepteurs PAC1 et VPAC1, tout en n'affichant qu'une faible affinité de liaison et aucune activation au niveau de VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b).

# ANNEXE 1

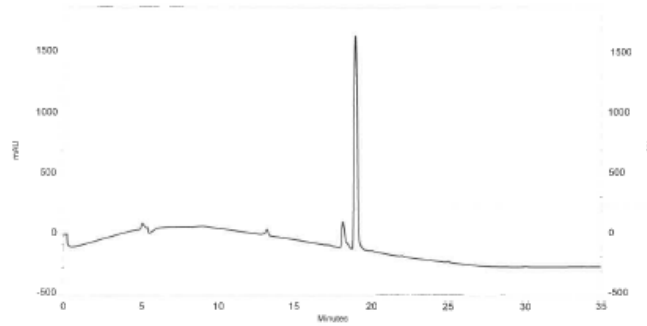
## Spectres HPLC des différents tryptophanes modifiés en C2

### Fmoc-Trp(C2-Phe)-OH

HPLC BECKMAN 32KARAT mm  
Pompes: Module 128  
Detecteur PDA: Module 168  
Echantillonneur: Module 508

Colonne: Phenomenex Jupiter C18 5um 300A 250 X 4.6  
Solvants: A) H2O 0.06%TFA B)ACN  
Debit: 1ml/min

Nom de l'échantillon: Fmoc-NH-Trp(C2-Phe)  
Methode: C:\32karat\Methods\HPLC\0-100\_30min.met  
Nom du fichier: C:\32karat\Data\HPLC\Laura\C-arylation Trp\Fmoc-NH-Trp(C2-Phe)  
Vial: 68  
Volume d'injection: 20  
Heure de l'analyse: 2016-01-20 21:34:17



Det 168-215nm

Results

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	5,10	875362,00	0,97
2	8,95	34466297,00	38,36
3	13,20	18789304,00	20,91
4	18,17	4994307,00	5,56
5	18,95	2722701,00	30,30
6	20,03	2524040,00	2,81
7	21,97	963788,00	1,09
Totals		89860299,00	100,00

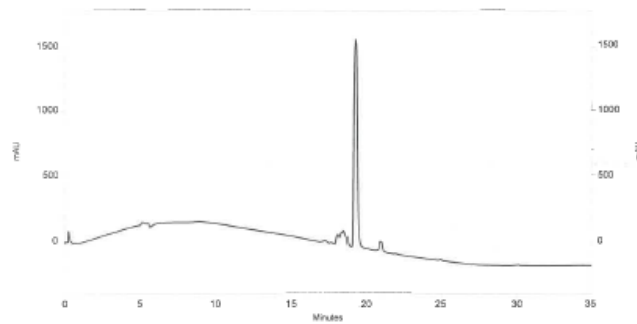


# Fmoc-Trp(C2-Phe-CH<sub>3</sub>)-OH

HPLC BECKMAN 32KARAT mm  
Pompes: Module 128  
Detecteur PDA: Module 168  
Echantillonneur: Module 508

Colonne: Phenomenex Jupiter C18 5um 300A 250 X 4.6  
Solvants: A) H2O 0.06%TFA B)ACN  
Debit: 1ml/min

Nom de l'échantillon: Fmoc-NH-Trp (C2-Phe-CH3) #2  
Méthode: C:\32karat\Methods\HPLC\0-100\_30min.met  
Nom du fichier: C:\32karat\Data\HPLC\Laura\C-arylation Trp\Fmoc-NH-Trp (C2-Phe-CH3)  
#2  
Vial: 33  
Volume d'injection: 10  
Heure de l'analyse: 2016-01-21 11:53:39



Det 168-215nm  
Results

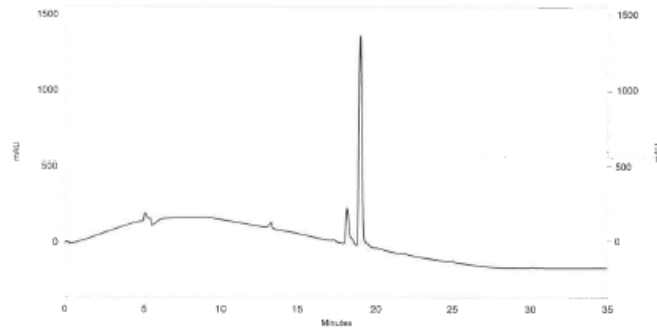
Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	5,20	762010,00	0,93
2	8,97	42928791,00	52,25
3	17,32	1653733,00	2,01
4	17,72	906903,00	1,10
5	18,57	5608044,00	6,83
6	19,27	27365373,00	33,31
7	20,90	2161876,00	2,63
8	21,92	775670,00	0,94
Totals		82162320,00	100,00

# Fmoc-Trp(C2-Phe-F)-OH

HPLC BECKMAN 32KARAT mm  
 Pompes: Module 128  
 Detecteur PDA: Module 168  
 Echantillonneur: Module 508

Colonne: Phenomenex Jupiter C18 5um 300A 250 X 4.6  
 Solvants: A) H2O 0.06%TFA B)ACN  
 Debit: 1ml/min

Nom de l'échantillon: Fmoc-NH-Trp(C2-Phe-F) vial 1 de 2  
 Methode: C:\32karat\Methods\HPLC\0-100\_30min.met  
 Nom du fichier: C:\32karat\Data\HPLC\Laura\C-arylation Trp\Fmoc-NH-Trp(C2-Phe-F) vial 1 de 2  
 Vial: 65  
 Volume d'injection: 20  
 Heure de l'analyse: 2016-01-20 19:37:43



Det 168-215nm  
 Results

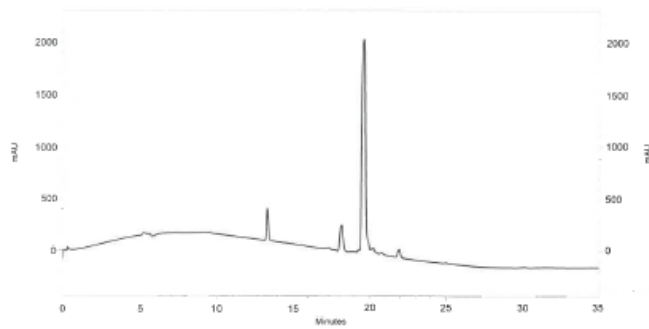
Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	5,13	1015856,00	1,22
2	8,92	34290194,00	41,08
3	13,28	16356918,00	19,59
4	17,30	1900499,00	2,28
5	18,18	5454731,00	6,53
6	19,02	23492984,00	28,14
7	21,97	967649,00	1,16
Totals		83476831,00	100,00

# Fmoc-Trp(C2-Phe-Br)-OH

HPLC BECKMAN 32KARAT mm  
Pompes: Module 128  
Detecteur PDA: Module 168  
Echantillonneur: Module 508

Colonne: Phenomenex Jupiter C18 5um 300A 250 X 4.6  
Solvants: A) H2O 0.06%TFA B)ACN  
Debit: 1ml/min

Nom de l'échantillon: Fmoc-NH-Trp (C2-Phe-Br) vial 2 de 2 #2  
Methode: C:\32karat\Methods\HPLC\0-100\_30min.met  
Nom du fichier: C:\32karat\Data\HPLC\aura\C-arylation Trp\Fmoc-NH-Trp (C2-Phe-Br)  
vial 2 de 2 #2  
Vial: 32  
Volume d'injection: 10  
Heure de l'analyse: 2016-01-21 11:14:54



Det 168-215nm  
Results

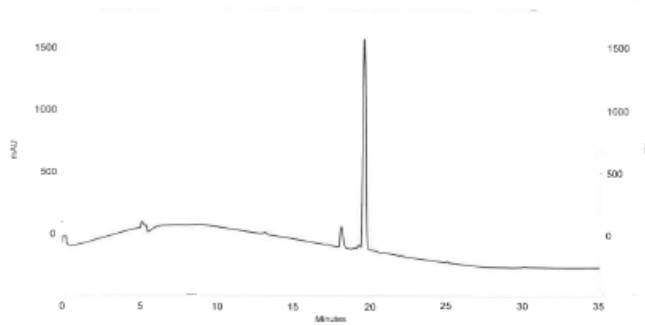
Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	5,25	774203,00	0,82
2	9,18	28890181,00	30,52
3	13,32	14719281,00	15,55
4	17,33	2232769,00	2,36
5	18,20	4800725,00	5,07
6	18,87	766473,00	0,81
7	19,55	36248732,00	38,29
8	20,17	1906091,00	2,01
9	20,75	1804434,00	1,91
10	21,90	2231590,00	2,36
11	31,82	284836,00	0,30

# Fmoc-Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)-OH

HPLC BECKMAN 32KARAT mm  
Pompes: Module 128  
Dectecteur PDA: Module 168  
Echantillonneur: Module 508

Colonne: Phenomenex Jupiter C18 5um 300A 250 X 4.6  
Solvants: A) H2O 0.06%TFA B)ACN  
Debit: 1ml/min

Nom de l'échantillon: Fmoc-NH-Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>) vial 1 de 2  
Methode: C:\32karat\Methods\HPLC\0-100\_30min.mct  
Nom du fichier: C:\32karat\Data\HPLC\Laura\C-arylation Trp\Fmoc-NH-Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)  
vial 1 de 2  
Vial: 69  
Volume d'injection: 20  
Heure de l'analyse: 2016-01-20 22:13:08



Det: 168-215nm  
Results

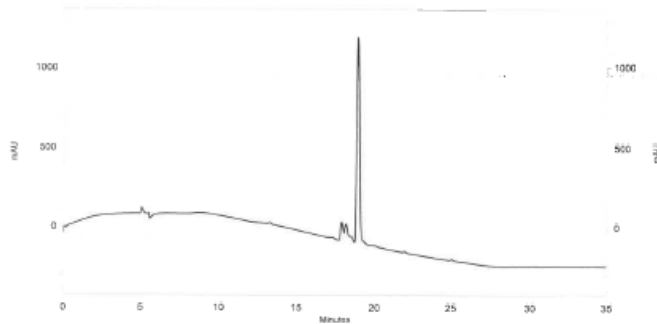
PK #	Retention Time	Area	Area Percent
1	5,12	907667,00	1,04
2	8,88	35156427,00	40,40
3	13,22	16051370,00	18,44
4	17,27	1942107,00	2,23
5	18,18	3750473,00	4,31
6	19,53	27776260,00	31,92
7	21,98	1137634,00	1,31
8	30,17	307526,00	0,35
Totals		87029464,00	100,00

# Fmoc-Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)-OH

HPLC BECKMAN 32KARAT mm  
 Pompes: Module 128  
 Detecteur PDA: Module 168  
 Echantillonneur: Module 508

Colonne: Phenomenex Jupiter C18 5um 300A 250 X 4.6  
 Solvants: A) H2O 0.06%TFA B)ACN  
 Debit: 1ml/min

Nom de l'échantillon: Fmoc-NH-Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>) vial 1 de 2 #2  
 Methode: C:\32karat\Methods\HPLC\0-100\_30min.met  
 Nom du fichier: C:\32karat\Data\HPLC\Laura\C-arylation Trp\Fmoc-NH-Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)  
 vial 1 de 2 #2  
 Vial: 61  
 Volume d'injection: 20  
 Heure de l'analyse: 2016-01-20 17:02:25



Det 168-215nm

Results	Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
	1	6,80	4441268,00	7,06
	2	8,75	20644637,00	32,80
	3	13,27	12943782,00	20,56
	4	17,92	1752141,00	2,78
	5	18,18	2942461,00	4,67
	6	18,93	19636726,00	31,20
	7	21,98	580378,00	0,92
Totals			62941393,00	100,00

## ANNEXE 2

### Spectres RMN et assignation des déplacements chimiques

#### Fmoc-Trp-OH

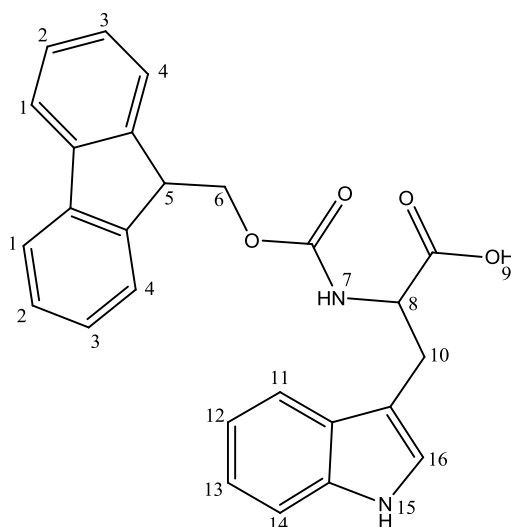
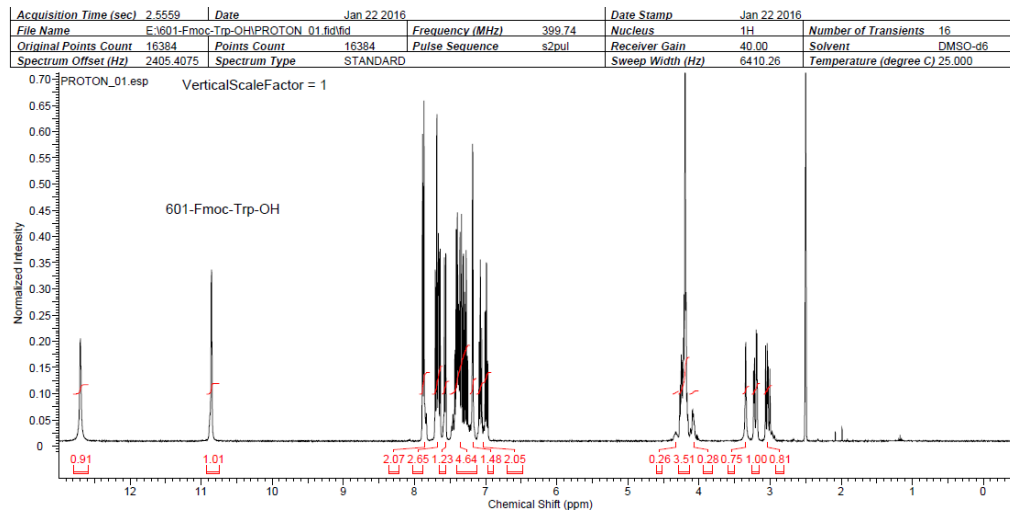


Tableau 12: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp-OH

# protons	Protons	Déplacements chimiques (ppm)	
		Prédit	Obtenu
1	CH	7,87	7,87
2	CH	7,38	7,36
3	CH	7,28	7,26
4	CH	7,55	7,56
5	CH	4,46	4,09
6	CH <sub>2</sub>	4,70	4,18
7	NH	8,03	7,89
8	CH	4,72	4,20
9	OH (acide carboxylique)	11,0	12,70
10	CH <sub>2</sub>	3,31; 3,06	3,34; 3,06
11	CH	7,60	7,58
12	CH	7,11	6,99
13	CH	7,11	7,07
14	CH	7,32	7,32
15	NH (indole)	10,1	10,86
16	CH	7,18	7,18

**Figure 31: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp-OH**



**Fmoc-Trp(C2-Phe)-OH**

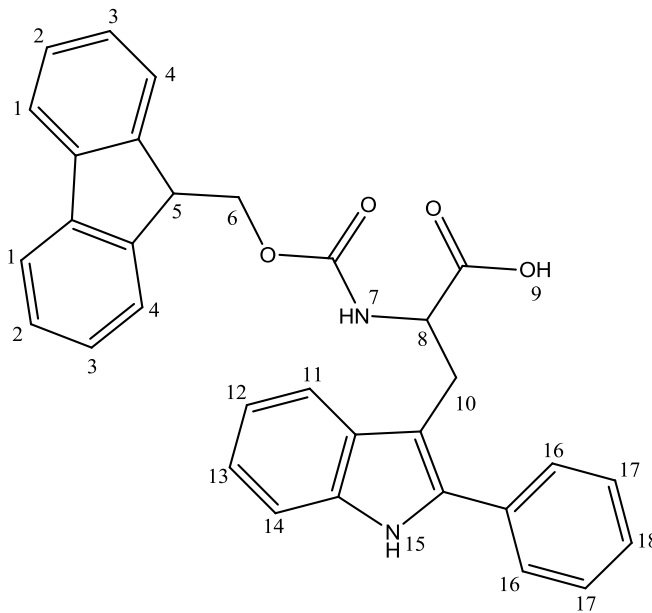
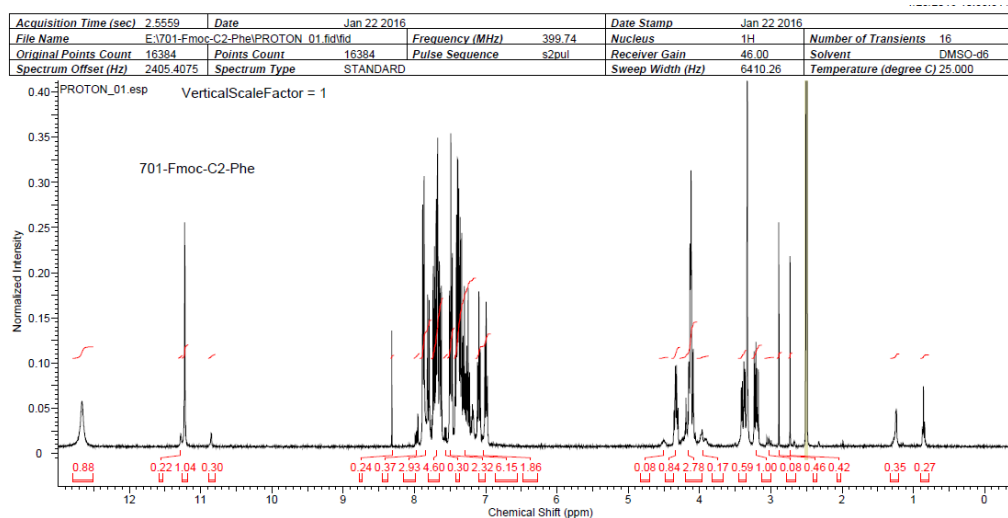


Tableau 13: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe)-OH

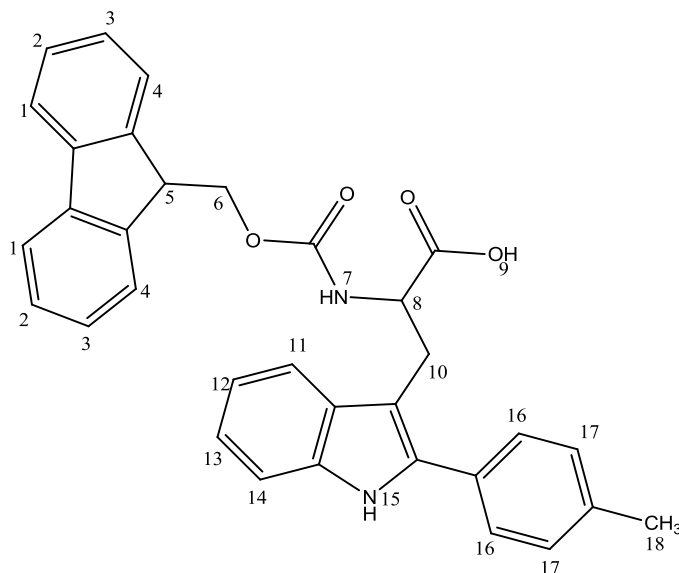
# protons	Protons	Déplacements chimiques (ppm)	
		Prédit	Obtenu
1	CH	7,87	7,87
2	CH	7,38	7,38
3	CH	7,28	7,30
4	CH	7,55	7,68
5	CH	4,46	4,16
6	CH <sub>2</sub>	4,70	7,32
7	NH	8,03	8,32
8	CH	4,72	4,34
9	OH (acide carboxylique)	11,0	12,66
10	CH <sub>2</sub>	3,31; 3,06	3,33; 3,21
11	CH	7,57	7,68
12	CH	7,09	7,10
13	CH	7,09	7,10
14	CH	7,45	7,62
15	NH (indole)	11,36	11,22
16	CH	7,43	7,41
17	CH	7,51	7,49
18	CH	7,41	7,39

Figure 32: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe)-OH





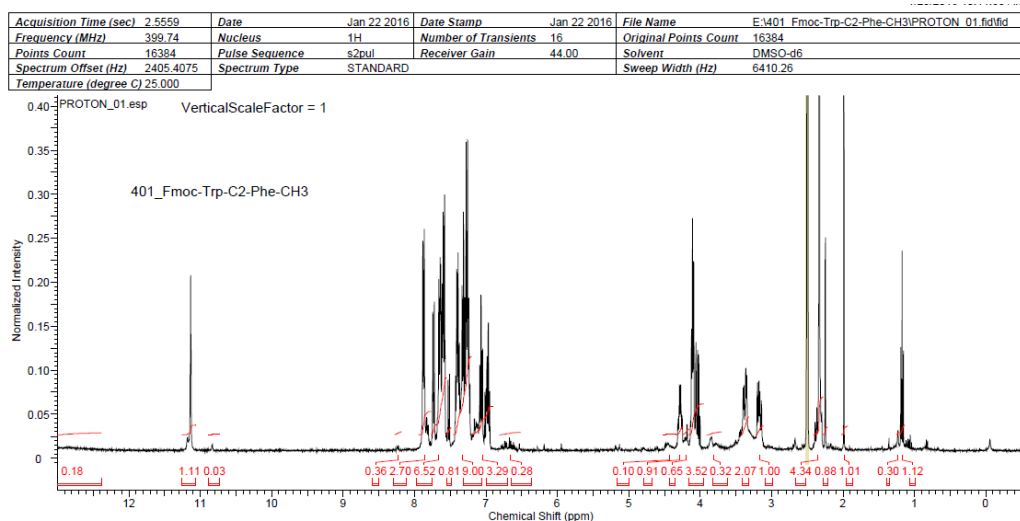
**Fmoc-Trp(C2-Phe-CH<sub>3</sub>)-OH**



**Tableau 14: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CH<sub>3</sub>)-OH**

# protons	Protons	Déplacements chimiques (ppm)	
		Prédit	Obtenu
1	CH	7,87	7,86
2	CH	7,38	7,39
3	CH	7,28	7,26
4	CH	7,55	7,58
5	CH	4,46	4,11
6	CH <sub>2</sub>	4,70	4,27
7	NH	8,03	7,88
8	CH	4,72	4,29
9	OH (acide carboxylique)	11,0	-
10	CH <sub>2</sub>	3,31; 3,06	3,36; 3,16
11	CH	7,57	7,64
12	CH	7,09	6,97
13	CH	7,09	7,07
14	CH	7,45	7,51
15	NH (indole)	11,36	11,14
16	CH	7,67	7,72
17	CH	7,29	7,31
18	CH <sub>3</sub>	2,34	2,33

Figure 33: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CH<sub>3</sub>)-OH



Fmoc-Trp(C2-Phe-F)-OH

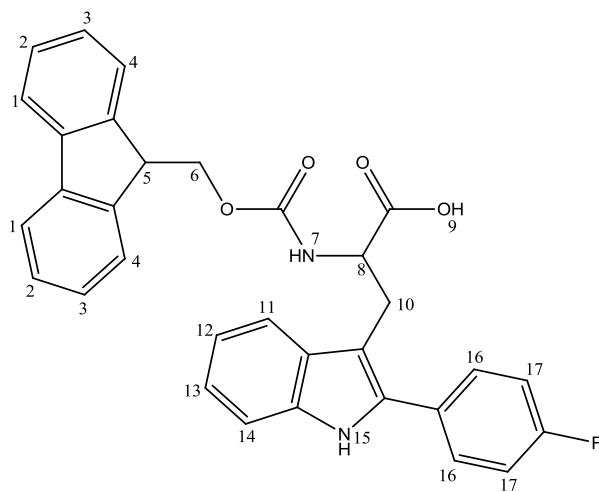
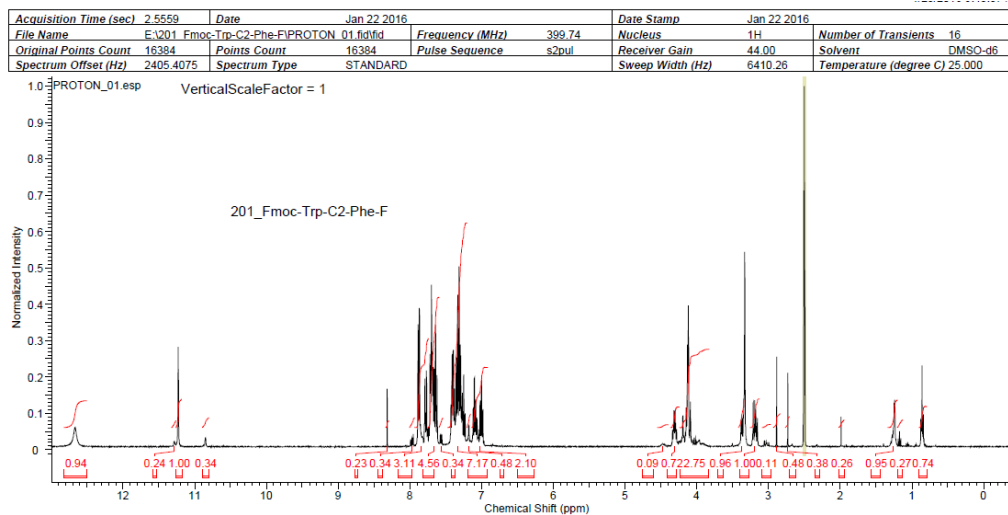


Tableau 15: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-F)-OH

# protons	Protons	Déplacements chimiques (ppm)	
		Prédit	Obtenu
1	CH	7,87	7,79
2	CH	7,38	7,31
3	CH	7,28	7,18
4	CH	7,55	7,64
5	CH	4,46	4,12
6	CH <sub>2</sub>	4,70	4,24
7	NH	8,03	7,87
8	CH	4,72	4,32
9	OH (acide carboxylique)	11,0	12,67
10	CH <sub>2</sub>	3,31; 3,06	3,33; 3,19
11	CH	7,57	7,67
12	CH	7,09	7,10
13	CH	7,09	7,10
14	CH	7,45	7,40
15	NH (indole)	11,36	11,23
16	CH	8,15	8,32
17	CH	7,30	7,25

Figure 34: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-F)-OH



## Fmoc-Trp(C2-Phe-Br)-OH

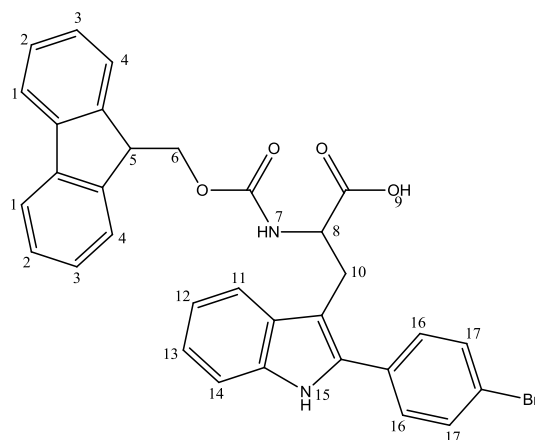
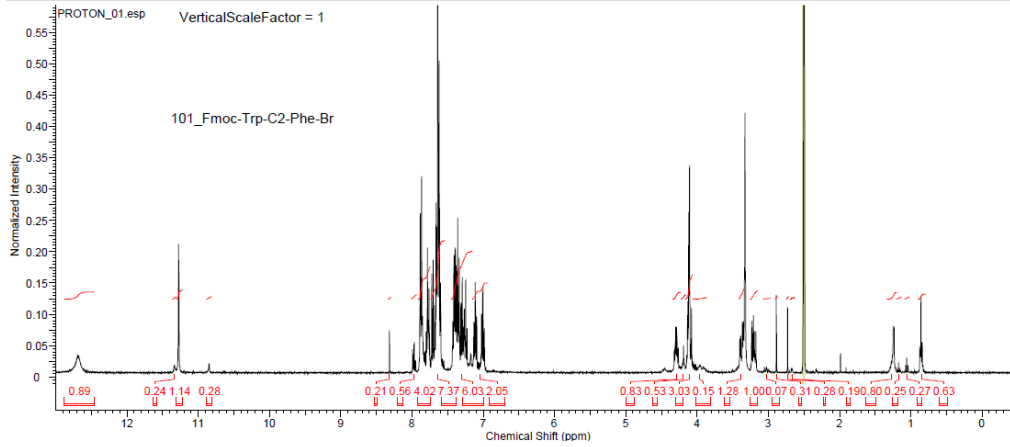


Tableau 16: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-Br)-OH

# protons	Protons	Déplacements chimiques (ppm)	
		Prédit	Obtenu
1	CH	7,87	7,85
2	CH	7,38	7,36
3	CH	7,28	7,25
4	CH	7,55	7,60
5	CH	4,46	4,10
6	CH <sub>2</sub>	4,70	4,19
7	NH	8,03	8,32
8	CH	4,72	4,30
9	OH (acide carboxylique)	11,0	12,69
10	CH <sub>2</sub>	3,31; 3,06	3,33; 3,29
s11	CH	7,57	7,64
12	CH	7,09	7,11
13	CH	7,09	7,11
14	CH	7,45	7,40
15	NH (indole)	11,36	11,27
16	CH	7,78	7,78
17	CH	7,66	7,66

Figure 35 : Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-Br)-OH

Acquisition Time (sec)	2.5559	Date	Jan 22, 2016	Date Stamp	Jan 22, 2016
File Name	E:\1101_Fmoc-Trp-C2-Phe-Br\PROTON_01.fid\fid	Frequency (MHz)	399.74	Nucleus	<sup>1</sup> H
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul
Spectrum Offset (Hz)	2405.4075	Spectrum Type	STANDARD	Receiver Gain	46.00
				Sweep Width (Hz)	6410.26
				Temperature (degree C)	25.000



Fmoc-Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)-OH

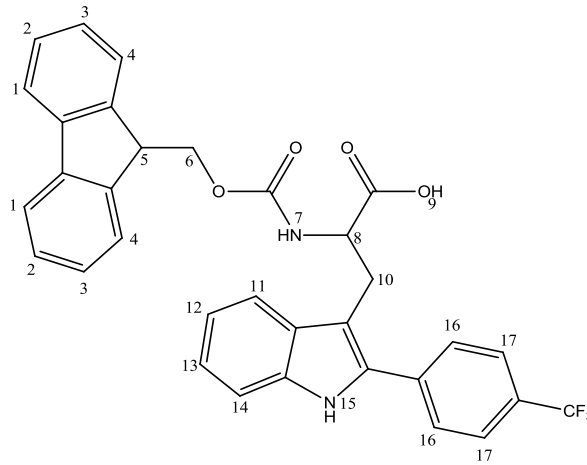
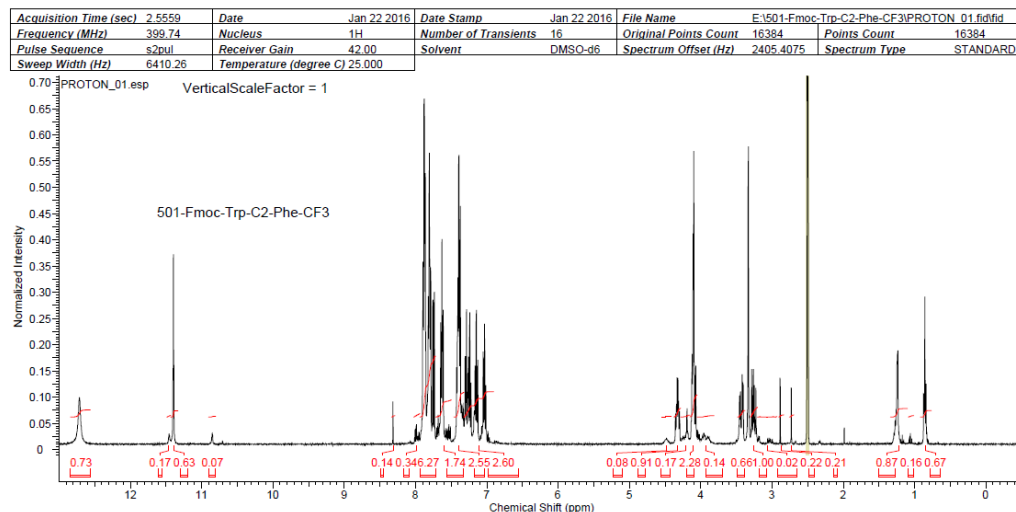


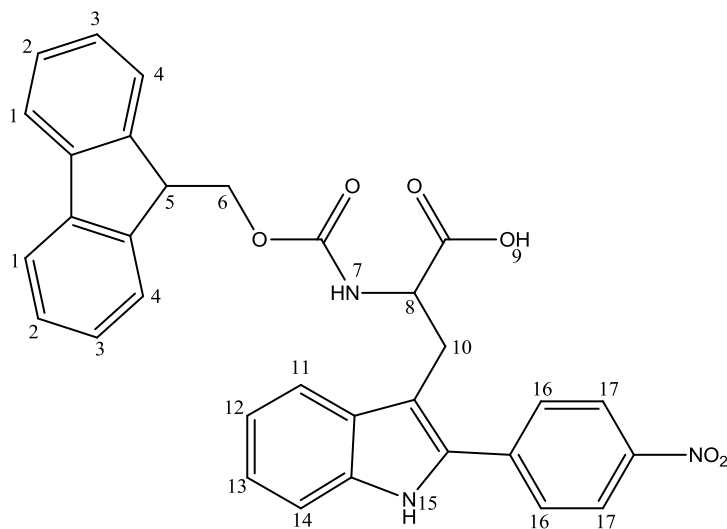
Tableau 17: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)-OH

# protons	Protons	Déplacements chimiques (ppm)	
		Prédit	Obtenu
1	CH	7,87	7,88
2	CH	7,38	7,39
3	CH	7,28	7,28
4	CH	7,55	7,61
5	CH	4,46	4,10
6	CH <sub>2</sub>	4,70	4,24
7	NH	8,03	8,32
8	CH	4,72	4,33
9	OH (acide carboxylique)	11,0	12,71
10	CH <sub>2</sub>	3,31; 3,06	3,33; 3,06
11	CH	7,57	7,53
12	CH	7,09	7,15
13	CH	7,09	7,15
14	CH	7,45	7,63
15	NH (indole)	11,36	11,40
16	CH	7,72	7,81
17	CH	7,68	7,74

Figure 36: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-CF<sub>3</sub>)-OH



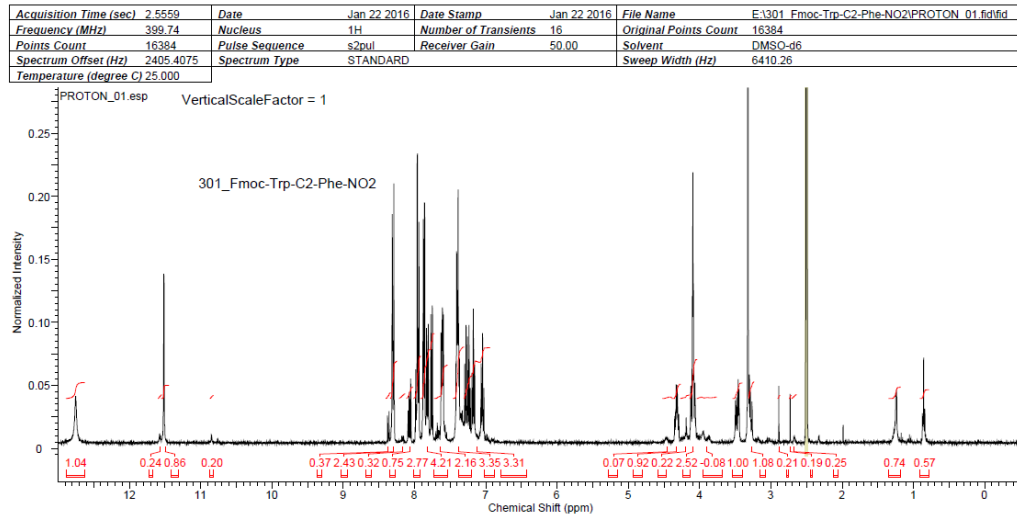
**Fmoc-Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)-OH**



**Tableau 18: Déplacements chimiques prédits et obtenus pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)-OH**

# protons	Protons	Déplacements chimiques (ppm)	
		Prédit	Obtenu
1	CH	7,87	7,86
2	CH	7,38	7,39
3	CH	7,28	7,28
4	CH	7,55	7,61
5	CH	4,46	4,09
6	CH <sub>2</sub>	4,70	4,19
7	NH	8,03	8,03
8	CH	4,72	4,31
9	OH (acide carboxylique)	11,0	12,75
10	CH <sub>2</sub>	3,31; 3,06	3,32; 2,89
11	CH	7,57	7,68
12	CH	7,09	7,04
13	CH	7,09	7,04
14	CH	7,45	7,41
15	NH (indole)	11,36	11,51
16	CH	8,05	8,07
17	CH	8,32	8,29

**Figure 37: Spectre RMN pour le Fmoc-Trp(C2-Phe-NO<sub>2</sub>)-OH**





## BIBLIOGRAPHIE

- A Adams B, W Lescheid D, D Vickers E, W Crim L & Sherwood N (2002) *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in sturgeon, whitefish, grayling, flounder and halibut: cDNA sequence, exon skipping and evolution.* 27-37 p
- Agarwal A, Halvorson LM & Legradi G (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Brain Res Mol Brain Res* 138(1):45-57.
- Agence-de-la-santé-publique-du-Canada (2014) *Mapping Connections: An understanding of neurological conditions in Canada.* <https://www.canada.ca/en/public-health/services/reports-publications/mapping-connections-understanding-neurological-conditions.html> (Consulté en novembre 2016)
- Ahren B (2008) Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the pancreatic endocrine system. *Ann N Y Acad Sci* 1144:28-35.
- Anderson ST, Sawangjaroen K & Curlewis JD (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide acts within the medial basal hypothalamus to inhibit prolactin and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137(8):3424-3429.
- Arimura A (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 48(5):301-331.
- Arimura A (2007) PACAP: the road to discovery. *Peptides* 28(9):1617-1619.
- 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.
- Aubert N, Vaudry D, Falluel-Morel A, Desfeux A, Fisch C, Ancian P, de Jouffrey S, Le Bigot JF, Couvineau A, Laburthe M, Fournier A, Laudénbach V, Vaudry H & Gonzalez BJ (2008) PACAP prevents toxicity induced by cisplatin in rat and primate neurons but not in proliferating ovary cells: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol Dis* 32(1):66-80.
- Aurora R & Rose GD (1998) Helix capping. *Protein Sci* 7(1):21-38.
- Ayyar VS (2011) History of growth hormone therapy. *Indian J Endocrinol Metab* 15 Suppl 3:S162-165.
- Barnum CJ, Chen X, Chung J, Chang J, Williams M, Grigoryan N, Tesi RJ & Tansey MG (2014) Peripheral administration of the selective inhibitor of soluble tumor necrosis factor (TNF) XPro(R)1595 attenuates nigral cell loss and glial activation in 6-OHDA hemiparkinsonian rats. *J Parkinsons Dis* 4(3):349-360.
- Basille M, Vaudry D, Coulouarn Y, Jegou S, Lihmann I, Fournier A, Vaudry H & Gonzalez B (2000) Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development. *J Comp Neurol* 425(4):495-509.
- Beal MF (2003) Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:120-131.

- Bennett MR (1999) One hundred years of adrenaline: the discovery of autoreceptors. *Clin Auton Res* 9(3):145-159.
- Biswal HS (2015) Hydrogen Bonds Involving Sulfur: New Insights from ab Initio Calculations and Gas Phase Laser Spectroscopy. 10.1007/978-3-319-14163-3\_2:15-45.
- Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY & Schally AV (1969) The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun* 37(4):705-710.
- 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, 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.
- Brenneman DE (2007) Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides* 28(9):1720-1726.
- Brubaker PL (2007) Incretin-based therapies: mimetics versus protease inhibitors. *Trends Endocrinol Metab* 18(6):240-245.
- 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.
- Chartrel N, Tonon M-C, 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.
- Cheng X, Ji Z, Tsalkova T & Mei F (2008) Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40(7):651-662.
- Chou PY & Fasman GD (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13(2):222-245.
- Claridge TDW & SciVerse ScienceDirect (Service en ligne) (2009) *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Elsevier,, Oxford, UK, 2nd. 1 ressource en ligne (xiv, 383 p p Disponible par SciVerse ScienceDirect <http://proxy.bibliotheques.uqam.ca/login?url=http://www.sciencedirect.com/science/books/eries/14601567/27> (Consulté e Date Accessed)

- Couturier C & Deprez B (2012) Setting Up a Bioluminescence Resonance Energy Transfer High throughput Screening Assay to Search for Protein/Protein Interaction Inhibitors in Mammalian Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:100.
- Dejda A, Bourgault S, Doan ND, Letourneau M, Couvineau A, Vaudry H, Vaudry D & Fournier A (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.
- 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.
- Delgado M & Ganea D (2001) Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol* 167(2):966-975.
- Delporte C, Poloczek P, de Neef P, Vertongen P, Ciccarelli E, Svoboda M, Herchuelz A, Winand J & Robberecht P (1995) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide stimulate two signaling pathways in CHO cells stably transfected with the selective type I PACAP receptor. *Mol Cell Endocrinol* 107(1):71-76.
- Diané As, Payne G & Gray S (2014) Multifaces of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP): From Neuroprotection and Energy Homeostasis to Respiratory and Cardiovascular Systems. *Journal of Metabolic Syndrome* 03(04).
- Doan ND, Bourgault S, Dejda A, Letourneau M, Detheux M, Vaudry D, Vaudry H, Chatenet D & Fournier A (2011) Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem Pharmacol* 81(4):552-561.
- 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.
- Ericson-Neilsen W & Kaye AD (2014) Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *Ochsner J* 14(2):203-207.
- Fizanne L, Sigaudou-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.
- Forloni G, Terreni L, Bertani I, Fogliarino S, Invernizzi R, Assini A, Ribizzi G, Negro A, Calabrese E, Volonte MA, Mariani C, Franceschi M, Tabaton M & Bertoli A (2002) Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol Aging* 23(5):957-976.
- Forsyth IA & Edwards CR (1972) Human prolactin, its isolation, assay and clinical applications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1(3):293-314.
- Fournier A, Bourgault S & Chatenet D (2016) The Pharmacophoric Determinants of PACAP. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham10.1007/978-3-319-35135-3\_8. p 111-132.
- Fukuhara C, Inouye SI, Matsumoto Y, Tsujimoto G, Aoki K & Masuo Y (1998) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide rhythm in the rat pineal gland. *Neurosci Lett* 241(2-3):115-118.

- Ganea D & Delgado M (2002) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(3):229-237.
- Gasz B, Racz B, Roth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamas A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F, Jr., Toth G, Lengvari I & Reglodi D (2006) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 27(1):87-94.
- Ghzili H, Grumolato L, Thouennon E, Tanguy Y, Turquier V, Vaudry H & Anouar Y (2008) Role of PACAP in the physiology and pathology of the sympathoadrenal system. *Front Neuroendocrinol* 29(1):128-141.
- Gilligan PJ & Li YW (2004) Corticotropin-releasing factor antagonists: recent advances and exciting prospects for the treatment of human diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel* 7(4):487-497.
- Goldenberg MM (2008) Medical management of Parkinson's disease. *P T* 33(10):590-606.
- Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J & Delgado M (2001) Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des* 7(2):89-111.
- 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.
- Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A & Vaudry H (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78(2):419-430.
- Gourlet P, Vandermeers A, Robberecht P & Deschodt-Lanckman M (1997) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) degradation by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.11. *Biochem Pharmacol* 54(4):509-515.
- 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, 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.
- 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.
- Guillemin R & Gerich JE (1976) Somatostatin: physiological and clinical significance. *Annu Rev Med* 27:379-388.

- Hamdy RC (2002) The thyroid gland: a brief historical perspective. *South Med J* 95(5):471-473.
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA & Said SI (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br J Pharmacol* 166(1):4-17.
- Hoare SR (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* 10(6):417-427.
- 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.
- Inglott MA, Farnham MM & Pilowsky PM (2011) Intrathecal PACAP-38 causes prolonged widespread sympathoexcitation via a spinally mediated mechanism and increases in basal metabolic rate in anesthetized rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(6):H2300-2307.
- Inooka H, Endo S, Kitada C, Mizuta E & Fujino M (1992) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by <sup>1</sup>H 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.
- Jongsma H, Pettersson LM, Zhang Y, Reimer MK, Kanje M, Waldenstrom A, Sundler F & Danielsen N (2001) Markedly reduced chronic nociceptive response in mice lacking the PAC1 receptor. *Neuroreport* 12(10):2215-2219.
- Jorgensen R, Kubale V, Vrecl M, Schwartz TW & Elling CE (2007) Oxyntomodulin differentially affects glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin recruitment and signaling through Galpha(s). *J Pharmacol Exp Ther* 322(1):148-154.
- Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Uribe R-M & Charli J-L (2015) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary–thyroid axis. *Journal of Endocrinology* 226(2):T85-T100.
- Kahn CR & Roth J (2004) Berson, Yalow, and the JCI: the agony and the ecstasy. *J Clin Invest* 114(8):1051-1054.
- Kakar SS, Malik MT & Winters SJ (2002) Gonadotropin-releasing hormone receptor: cloning, expression and transcriptional regulation. *Prog Brain Res* 141:129-147.
- Kalia LV & Lang AE (2015) Parkinson's disease. *Lancet* 386(9996):896-912.
- Kimura C, Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Itoh Y, Onda H, Miyata A, Jiang L, R. Dahl R, H. Stibbs H, Arimura A & Fujino M (1990) A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: Molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. 81-89 p
- Kinhult J, Andersson JA, Uddman R, Stjarne P & Cardell LO (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide 38 a potent endogenously produced dilator of human airways. *Eur Respir J* 15(2):243-247.
- Kopp M, Meissl H & Korf HW (1997) The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced phosphorylation of the transcription factor CREB (cAMP response element

- binding protein) in the rat suprachiasmatic nucleus is inhibited by melatonin. *Neurosci Lett* 227(3):145-148.
- Kresge N, Simoni RD & Hill RL (2005) The Isolation of Adrenocorticotrophic Hormone by Three Pioneers in Molecular Endocrinology: Choh Hao Li, Abraham White, and Cyril Norman Hugh Long. *Journal of Biological Chemistry* 280(3):e2.
- Lee EH & Seo SR (2014) Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB Rep* 47(7):369-375.
- 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.
- Lutz-Bucher B, Monnier D & Koch B (1996) Evidence for the presence of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neurohypophysis that are positively coupled to cyclic AMP formation and neurohypophyseal hormone secretion. *Neuroendocrinology* 64(2):153-161.
- 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.
- Mabuchi T, Shintani N, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Hashimoto H, Muratani T, Minami T, Baba A & Ito S (2004) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. *J Neurosci* 24(33):7283-7291.
- Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M & Akbar MD (2016) The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid Med Cell Longev* 2016:8590578.
- 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.
- Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Castel H, Leprince J, Fournier A, Dejda A, Vaudry H & Tonon MC (2007) Role of PACAP and VIP in astroglial functions. *Peptides* 28(9):1753-1760.
- Matsuda K & Maruyama K (2007) Regulation of feeding behavior by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vertebrates. *Peptides* 28(9):1761-1766.
- 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.
- McRory J & Sherwood NM (1997) 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. *Molecular and Cellular Endocrinology* 108(1):169-177.

- Meiser J, Weindl D & Hiller K (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* 11(1):34.
- 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.
- 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.
- Mulder JE, Kolatkar NS & LeBoff MS (2006) Drug insight: Existing and emerging therapies for osteoporosis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2(12):670-680.
- Mustafa T, Walsh J, Grimaldi M & Eiden LE (2010) PAC1hop receptor activation facilitates catecholamine secretion selectively through 2-APB-sensitive Ca(2+) channels in PC12 cells. *Cell Signal* 22(10):1420-1426.
- 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.
- Norrholm SD, Das M & Legradi G (2005) Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Regul Pept* 128(1):33-41.
- Omeros-Corporation (2013) *Omeros Identifies Small Molecules for Class B GPCR*. <http://www.prnewswire.com/news-releases/omeros-identifies-small-molecules-for-class-b-gpcr-187090361.html> (Consulté en juin 2017 )
- 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.
- Otto C, Hein L, Brede M, Jahns R, Engelhardt S, Grone HJ & Schutz G (2004) Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation* 110(20):3245-3251.
- P. Michael Conn PD & William F. Crowley J, M.D. (1994) GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE AND ITS ANALOGS. *Annual Review of Medicine* 45(1):391-405.
- 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. *European Journal of Biochemistry* 215(2):439-448.
- Pisegna JR & Oh DS (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a novel peptide with protean implications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14(1):58-62.
- Preciado S, Mendive-Tapia L, Albericio F & Lavilla R (2013) Synthesis of C-2 arylated tryptophan amino acids and related compounds through palladium-catalyzed C-H activation. *J Org Chem* 78(16):8129-8135.
- Przywara DA, Guo X, Angelilli ML, Wakade TD & Wakade AR (1996) A non-cholinergic transmitter, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, utilizes a novel mechanism to evoke catecholamine secretion in rat adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 271(18):10545-10550.
- Racz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F, Jr., Tamas A, Jozsa R, Lubics A, Kiss P, Roth E, Ferencz A, Toth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvari I, Somogyvari-Vigh A & Reglodi D

- (2007) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 153(1-3):115-123.
- Ramos-Alvarez I, Mantey SA, Nakamura T, Nuche-Berenguer B, Moreno P, Moody TW, Maderdrut JL, Coy DH & Jensen RT (2015) A structure-function study of PACAP using conformationally restricted analogs: Identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. *Peptides* 66:26-42.
- Ramsey CP & Tansey MG (2014) A survey from 2012 of evidence for the role of neuroinflammation in neurotoxin animal models of Parkinson's disease and potential molecular targets. *Exp Neurol* 256:126-132.
- Reglodi D, Renaud J, Tamas A, Tizabi Y, Socias SB, Del-Bel E & Raisman-Vozari R (2015) Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol* 10.1016/j.pneurobio.2015.10.004.
- Reglodi D, Tamas A, Lengvari I, Toth G, Szalontay L & Lubics A (2006) Comparative study of the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1070:518-524.
- Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Szalontay L & Lengvari I (2004) Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* 123(1-3):85-94.
- Ribelayga C, Pevet P & Simonneaux V (1997) Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res* 777(1-2):247-250.
- 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.
- Roth E, Weber G, Kiss P, Horvath G, Toth G, Gasz B, Ferencz A, Gallyas F, Jr., Reglodi D & Racz B (2009) Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1163:512-516.
- Saeed U, Compagnone J, Aviv RI, Strafella AP, Black SE, Lang AE & Masellis M (2017) Imaging biomarkers in Parkinson's disease and Parkinsonian syndromes: current and emerging concepts. *Transl Neurodegener* 6:8.
- Seaborn T, Masmoudi-Kouli O, Fournier A, Vaudry H & Vaudry D (2011) Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr Pharm Des* 17(3):204-214.
- Shen S, Gehlert DR & Collier DA (2013) PACAP and PAC1 receptor in brain development and behavior. *Neuropeptides* 47(6):421-430.



- Stawikowski M & Fields GB (2012) Introduction to peptide synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 18:Unit 18 11.
- 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.
- Sun L & Ye RD (2012) Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacol Sin* 33(3):342-350.
- Tamas A, Lubics A, Lengvari I & Reglodi D (2006) Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann N Y Acad Sci* 1070:570-574.
- Thorner MO, Chapman IM, Gaylinn BD, Pezzoli SS & Hartman ML (1997) Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging. *Recent Prog Horm Res* 52:215-244; discussion 244-216.
- 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.
- 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.
- Vale W, Spiess J, Rivier C & Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213(4514):1394-1397.
- 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, Anouar Y, Fournier A & Vaudry H (1998) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience* 84(3):801-812.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A & Vaudry H (2000) 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.
- Watts AG (2015) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The structure of the neuroendocrine hypothalamus: the neuroanatomical legacy of Geoffrey Harris. *J Endocrinol* 226(2):T25-39.
- Wellings DA & Atherton E (1997) Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol* 289:44-67.
- Wilcox G (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26(2):19-39.
- 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.
- 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.
- Yung SL, Dela Cruz F, Hamren S, Zhu J, Tsutsumi M, Bloom JW, Caudle M, Rocznik 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.
- Yuwiler A, Brammer GL & Bennett BL (1995) Interaction between adrenergic and peptide stimulation in the rat pineal: pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Neurochem* 64(5):2273-2280.
- Zeng N, Athmann C, Kang T, Lyu RM, Walsh JH, Ohning GV, Sachs G & Pisegna JR (1999) PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *J Clin Invest* 104(10):1383-1391.
- Zhang RB, Somers KR, Kryachko ES, Nguyen MT, Zeegers-Huyskens T & Ceulemans A (2005) Hydrogen bonding to pi-systems of indole and 1-methylindole: is there any OH...phenyl bond? *J Phys Chem A* 109(35):8028-8034.
- Zhao LH, Yin Y, Yang D, Liu B, Hou L, Wang X, Pal K, Jiang Y, Feng Y, Cai X, Dai A, Liu M, Wang MW, Melcher K & Xu HE (2016) Differential Requirement of the Extracellular Domain in Activation of Class B G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* 291(29):15119-15130.
- Zhou CJ, Shioda S, Shibamura M, Nakajo S, Funahashi H, Nakai Y, Arimura A & Kikuyama S (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors during development: expression in the rat embryo at primitive streak stage. *Neuroscience* 93(1):375-391.
- Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA & Sinha Roy R (2003) The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J Biol Chem* 278(25):22418-22423.