

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

**DÉMONSTRATION DU RÔLE PARTICULIER DU SEGMENT C-  
TERMINAL 28-38 DU PITUITARY ADENYLATE CYCLASE-ACTIVATING  
POLYPEPTIDE (PACAP) ET CARACTÉRISATION DE MODULATEURS  
ALLOSTÉRIQUES INTRACELLULAIRES DU RÉCEPTEUR PAC1**

Par  
**Mathilde Pujol de Molliens**

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

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examineur interne	Pr Jacques Bernier INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Pre Audrey Claing Département de pharmacologie et de physiologie Université de Montréal
Examineur externe	Pr Louis-Éric Trudeau Département de neurosciences Université de Montréal
Directeur de recherche	Pr David Chatenet INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Pr Alain Fournier INRS-Institut Armand-Frappier



*«Dans la vie, rien n'est à craindre... Tout est à comprendre».*

Marie Curie



## Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mes directeurs de recherche, le Pr David Châtenet et le Pr Alain Fournier. Merci de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même :

David, je te suis particulièrement reconnaissante pour la liberté que tu laisses à tes étudiants dans le cadre de leur projet de recherche, et pour les nombreuses opportunités que tu nous offres pour assurer notre développement personnel. Ton soutien autant scientifique que moral a été pour moi un grand support. Un énorme merci pour ta grande disponibilité à répondre à mes nombreuses questions et surtout ton positivisme face aux problématiques rencontrées.

Alain, je tiens à te remercier pour ta grande sagesse et surtout d'avoir maintenu ta réputation de (je cite)

“ Père Fouettard de l'orthographe ”. Merci pour ta patience et les précieux conseils prodigués.

Un merci à tous nos collaborateurs, et en particulier aux Prs Terence Hébert et Kessen Patten, ainsi qu'aux membres de leur laboratoire respectif pour leur disponibilité et les riches conseils qu'ils m'ont donnés.

Un grand et personnel merci à Myriam Létourneau, cette sublime agente de recherche sans qui mon doctorat n'aurait pas pris cette tournure. Merci pour tous tes précieux conseils tant scientifiques que personnels. Un grand merci pour tous ces beaux moments de partage et cette belle ambiance que tu as pu mettre dans le laboratoire.

Une pensée particulière pour les membres des deux laboratoires, Étienne, Laura, Mustapha, Anh, Asma, Hassan. Également, aux belles rencontres que j'ai pu faire lors de mon parcours à l'INRS-IAF.

Enfin, un grand merci à ma famille, et tout particulièrement à mes parents et à mon conjoint qui ont su me soutenir et me dire les mots justes pour me pousser au bout de mes capacités.



## Résumé

Un accroissement du nombre de maladies neurodégénératives est observé depuis plusieurs années. On estime aujourd'hui que 55 000 Canadiens ont reçu un diagnostic de la maladie de Parkinson (MP). À ce jour, malgré les nombreux efforts investis dans la recherche, seuls des traitements palliatifs existent pour cette neuropathologie. Au cours de la dernière décennie, le *pituitary adenylyate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) est apparu comme un agent thérapeutique potentiel puisqu'il possède des actions neuroprotectrices dans divers modèles cellulaires et animaux de maladies neurodégénératives telles que la MP. Ce peptide, qui est capable de traverser la barrière hématoencéphalique, existe sous deux isoformes de 27 et 38 acides aminés et se lie à trois récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), *i.e.* PAC1, VPAC1 et VPAC2.

Les effets neuroprotecteurs du PACAP sont principalement associés à l'activation du récepteur PAC1. Cependant, son utilisation thérapeutique ne peut être envisagée, en partie, en raison des effets secondaires liés à l'activation des récepteurs VPAC1 et VPAC2. Le couple PACAP/PAC1 apparaît alors comme une cible prometteuse pour le traitement de la MP. Afin de développer un traitement basé sur l'utilisation du PACAP ou un de ses dérivés, il sera important de prendre en considération les risques possibles associés à leur administration prolongée. En effet, dans le cadre du traitement chronique d'une maladie neurodégénérative, la désensibilisation du système PACAPergique pourrait être observée. Ce phénomène est généralement associé à la phosphorylation du récepteur et à un recrutement des  $\beta$ -arrestines.

Notre premier objectif a été d'évaluer la capacité d'une librairie d'analogues du PACAP à activer certaines voies de signalisation associées à l'activation de PAC1 incluant  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_s$ , ainsi qu'à mobiliser les  $\beta$ -arrestines 1 et 2. Nous avons entre autres démontré que le segment C-terminal 28-38 et que les résidus Ser<sup>2</sup>, Phe<sup>6</sup>, Thr<sup>7</sup> et Tyr<sup>22</sup> sont des éléments importants de la liaison aux récepteurs et de l'effet neuroprotecteur du peptide. En particulier, les analogues du PACAP38 sont de meilleurs ligands neuroprotecteurs et ils activent mieux les  $\beta$ -arrestines que leurs pairs de 27 acides aminés. Ces données aideront à la conception de composés biaisés sélectifs pour PAC1, incapables d'activer les  $\beta$ -arrestines.

Devant la difficulté à développer des analogues sélectifs pour PAC1, nous avons cherché une manière innovante de résoudre ce problème. La transmission du signal au niveau intracellulaire est directement associée à des changements structuraux opérés au niveau des boucles intracellulaires d'un RCPG. De plus, il a récemment été montré que des peptides dérivés de ces boucles, appelés pepducines, pouvaient à eux seuls initier diverses cascades de signalisation suite à une reconnaissance spécifique de ce RCPG au niveau intracellulaire. Dans un deuxième volet de ce projet de doctorat, nous avons démontré la capacité de pepducines dérivées de PAC1 à activer spécifiquement ce récepteur et à induire une neuroprotection significative dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de la MP.

Mots clés : PACAP, PAC1, Parkinson, pepducines, RCPG, modulateur allostérique, agonistes biaisés



# Abstract

The number of medical cases of neurodegenerative diseases has increased dramatically during the last decades. Nowadays, it is estimated that 55 000 Canadians have received a Parkinson's disease diagnosis (PD). Despite many research efforts, only palliative treatments exist for this neuropathology. Nevertheless, over the last decade, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) appeared as a potential therapeutic agent because it induces anti-apoptotic actions in several cellular and animal models of neurodegenerative diseases like PD. This peptide, which is capable to cross the blood-brain barrier, exists in two isoforms of 27 and 38 amino acids that bind three G protein-coupled receptors (GPCRs), *i.e.* PAC1, VPAC1 and VPAC2.

PACAP's neuroprotective effects are mostly associated with the activation of the PAC1 receptor. However, its clinical use cannot be considered because of its side effects produced by VPAC receptors activation. Nonetheless, the PACAP/PAC1 pair represents a promising avenue for the development of therapeutic strategies to cure neurodegenerative disorders, or at least slow down their evolution. Another major problem that might be encountered with chronic treatments of neurodegenerative diseases is the desensitization of the related receptor system following prolonged administration of a drug. This phenomenon is generally associated with receptor phosphorylation and recruitment of  $\beta$ -arrestins.

Our first objective was therefore to evaluate the ability of PACAP analogues to activate signaling pathways associated with PAC1 activation, such as  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_s$ , and  $\beta$ -arrestins. In particular, we demonstrated that the PACAP C-terminal segment 28-38 and its Ser<sup>2</sup>, Phe<sup>6</sup>, Thr<sup>7</sup> and Tyr<sup>22</sup> residues are key components of PACAP receptors binding and neuroprotective action. Indeed, PACAP38 analogues are better neuroprotective ligands and they appear more potent to activate  $\beta$ -arrestins than their 27-amino acid counterparts. These data will help us to design biased and selective compounds for PAC1 that are not able to activate  $\beta$ -arrestins.

In order to overcome the difficulty to discover PAC1-selective compounds, we looked for an innovative way to solve this problem. Intracellular signaling is directly associated with structural modifications in the intracellular loops of a given GPCR. Furthermore, it has been recently shown that peptides derived from intracellular loops, called pepducins, can initiate by themselves various signaling pathways following the intracellular recognition of its parent GPCR. Thus, in a second part of this PhD project, we demonstrated the ability of PAC1-derived peptides to specifically target PAC1 and induce significant neuroprotection in *in vitro* and *in vivo* PD models.

Keyword: PACAP, PAC1, Parkinson, pepducin, intracellular modulator, biased agonist



# Table des Matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>III</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Table des Matières</b> .....	<b>VI</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>IX</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)</b> .....	<b>1</b>
1.1. Généralités.....	1
1.2. Signalisation des RCPGs.....	4
1.2.1. Signalisation par les protéines G.....	4
1.2.2. Phénomène de désensibilisation : signalisation par les GRK et les $\beta$ -arrestines...6	
1.3. Dynamisme structural des RCPGs.....	9
1.4. Modulation allostérique des RCPGs.....	11
1.4.1. Généralités.....	11
1.4.2. Les pepducines.....	13
1.4.3. Modulation allostérique des RCPGs de la classe B par les <i>receptor activity-modifying proteins</i> .....	16
<b>2. Le Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide et son système</b> .....	<b>17</b>
2.1. Généralités.....	17
2.2. Structure du PACAP.....	18
2.2.1. Structure primaire.....	18
2.2.2. Structure secondaire.....	20
2.3. Déterminants moléculaires et conformationnels du PACAP pour l'activation du récepteur PAC1.....	23
2.4. Les récepteurs du PACAP.....	26
2.4.1. Modèle d'activation des récepteurs.....	26
2.4.2. Dimérisation des récepteurs du PACAP.....	27
2.4.3. Les variants d'épissage du récepteur PAC1.....	28
2.4.4. Signalisation du récepteur PAC1 : effet antiapoptotique.....	31
2.5. Distribution tissulaire du PACAP et de ses récepteurs.....	34
2.6. Passage à travers la barrière hématoencéphalique.....	35
2.7. Activités biologiques.....	36
2.7.1. Effet sur le SNC.....	37
2.7.2. Organes périphériques.....	42
2.8. Limite d'utilisation du PACAP.....	44
2.8.1. Stabilité plasmatique.....	44
2.8.2. Effets secondaires.....	45
<b>3. La maladie de Parkinson</b> .....	<b>47</b>
3.1. Épidémiologie.....	47
3.2. Description anatomopathologique.....	49



3.3.	Symptômes liés à la MP .....	50
3.4.	Dégénérescence cellulaire durant la MP .....	51
3.4.1.	Apoptose des neurones dopaminergiques .....	51
3.4.2.	Stress oxydatif .....	53
3.4.3.	Neuroinflammation .....	55
3.4.4.	Excitotoxicité.....	57
3.5.	Modèles expérimentaux de la MP .....	58
3.5.1.	Agent neurotoxique : le MPTP.....	59
3.5.2.	Le poisson-zèbre comme modèle expérimental de la MP.....	60
3.6.	Thérapies et limitations.....	62
<b>4.</b>	<b>Mise en situation, hypothèses et objectifs de recherche .....</b>	<b>66</b>
<b>CHAPITRE 2 : ARTICLE 1.....</b>		<b>70</b>
1.	Résumé de l'article en français : .....	71
2.	Contribution de l'étudiant : .....	72
<b>CHAPITRE 3 : ARTICLE 2.....</b>		<b>113</b>
1.	Résumé de l'article en français : .....	114
2.	Contribution de l'étudiant : .....	115
<b>Chapitre 4 : DISCUSSION.....</b>		<b>155</b>
1.	<b>Les analogues du PACAP .....</b>	<b>158</b>
1.1.	Spécificité PAC1 versus VPAC1 et VPAC2.....	158
1.2.	Pharmacologie.....	160
1.2.1.	Position 2 : Motif <i>Asx-turn</i> .....	162
1.2.2.	Motif <i>N-capping</i> .....	163
1.2.3.	Position 22.....	165
1.2.4.	Effecteur responsable de l'effet neuroprotecteur du PACAP .....	165
2.	<b>Les pepducines du récepteur PAC1 .....</b>	<b>167</b>
2.1.	Spécificité PAC1 versus VPAC1 et VPAC2.....	167
2.2.	Pharmacologie.....	169
2.2.1.	<i>In vitro</i> .....	169
2.2.2.	<i>In vivo</i> .....	172
<b>CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>177</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>184</b>
<b>Article Annexe.....</b>		<b>218</b>



## *Liste des Figures*

<b>Figure 1 : Signalisation des protéines G par les récepteurs à 7 domaines transmembranaires.....</b>	<b>6</b>
<b>Figure 2 : Exemple de mécanisme de recrutement des <math>\beta</math>-arrestines.....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 3 : Mécanisme d'action des agonistes biaisés (T. Kenakin et al., 2013).....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 4 : Mécanisme d'action sélectif des modulateurs allostériques (T. Kenakin et al., 2013).....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 5 : Mécanisme d'activation des RCPGs par les pepducines (Carr et al., 2016). .....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 6 : Représentation structurale du motif Asx-turn proposée au niveau du segment N-terminal du PACAP (Doan et al., 2011).....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 7 : Représentation des motifs N-capping proposés pour le PACAP (Doan et al., 2011).....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 8 : Modèle d'activation suggéré pour les récepteurs PACAPergiques suite à l'interaction avec un ligand endogène (Bourgault et al., 2009a, Fournier et al., 2016). .....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 9 : Représentation des voies de signalisation associées à l'effet antiapoptotique du PACAP après activation du récepteur PAC1 (Destiny-Love Manecka et al., 2016).....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 10 : Passage du PACAP à travers la BHE.....</b>	<b>36</b>
<b>Figure 11 : Schéma simplifié des circuits neuronaux des GB à l'état normal (a) et dans la MP (b). (Maiti et al., 2017) .....</b>	<b>50</b>
<b>Figure 12 : Mécanisme de dégénérescence des neurones dopaminergiques par le MPTP (Maiti et al., 2017). .....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 13 : Structure primaire du PACAP avec identification des domaines responsables de la reconnaissance, de l'activation et de la sélectivité envers les récepteurs, et modifications apportées dans la séquence des isoformes de 27 et 38 acides aminés. ...</b>	<b>158</b>



## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1 : Liste des récepteurs de la classe B et de leurs ligands, avec leurs applications cliniques potentielles. Adapté de Archbold et al., 2011 et Wootten et al., 2017. ....</b>	<b>3</b>
<b>Tableau 2 : Séquences en acides aminés du PACAP38 humain et de celui d'autres espèces. ....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau 3 : Séquence en acides aminés des membres de la superfamille des neuropeptides PACAP/VIP. ....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 4 : Variants d'épissage présentant des modifications dans les boucles intracellulaires du récepteur PAC1 et les conséquences fonctionnelles de celles-ci chez l'homme. Adapté de Blechman et al., 2013, Dickson et al., 2009 et Lutz et al., 2006.....</b>	<b>30</b>
<b>Tableau 5 : Effets physiologiques du PACAP sur les différents systèmes de l'organisme.</b>	<b>43</b>
<b>Tableau 6 : Séquence des boucles intracellulaires des récepteurs PAC1-null, VPAC1 et VPAC2. ....</b>	<b>169</b>



# Abréviations

5-HT	Sérotonine
6-OHDA	6-Hydroxydopamine
7TMR	Récepteur à 7 domaines transmembranaires
$\beta$ 2-AR	Récepteur $\beta$ 2-adrénergique
$\beta$ ARK	Kinase du récepteur $\beta$ -adrénergique
AC	Adénylyl cyclase
ACh	Acétylcholine
Aib	Acide aminoisobutyrique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP2	Protéine adaptatrice 2
APP	Protéine précurseure de la $\beta$ -amyloïde
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated protein x</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHE	Barrière hématoencéphalique
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
CCR5	Récepteur à C-C chimiokine de type 5
Cha	L-cyclohexylalanine
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
COX-2	Cyclo-oxygénase 2
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CXCR1	Récepteur C-X-C chimiokine de type 1
CXCR2	Récepteur C-X-C chimiokine de type 2
CXCR4	Récepteur C-X-C chimiokine de type 4
DA	Dopamine
DAG	Diacylglycérol
DAT	Transporteur de la dopamine
DC	Dichroïsme circulaire
DPC	Dodécylphosphocholine
DPP-IV	Dipeptidyl peptidase-IV
ECL	Boucle extracellulaire
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
FRP2	<i>Formyl peptide receptor 2</i>
FSH-R	Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GB	Ganglions de la base
GDP	Guanosine diphosphate
GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide
GP	<i>Globus pallidus</i>
GPIIB	Glycoprotéine II B
GPe	<i>Globus pallidus externe</i>
GRF	Hormone de libération de l'hormone de croissance



GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GTP	Guanosine triphosphate
Hyp	Hydroxyproline
ICL	Boucle intracellulaire
i.c.v.	Intracérébroventriculaire
i.v.	Intraveineuse
IL-1 $\beta$	Interleukine-1 $\beta$
IL6	Interleukine 6
IL12	Interleukine 12
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphate
JNK	Kinase c-Jun N-terminale
j.p.f.	Jours post fertilisation
KO	Knock-out
L-DOPA	Levodopa ou 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine
LH	Hormone lutéinisante
LPS	Lipopolysaccharide
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LT	Lymphocyte T
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO-A/B	Monoamine oxydase A ou B
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC-4	Récepteur de la mélanocortine de type 4
MDMA	3,4-Méthylènedioxy-N-méthylamphétamine
METH	Méthamphétamine
MMP-3	Métalloprotéinase 3
MoA	Modulateur allostérique
MP	Maladie de Parkinson
MPDP	1-Méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium
MPP <sup>+</sup>	1-Méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP	1-Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NAM	Modulateur allostérique négatif
NEP	Endopeptidase neutre
NF- $\kappa$ B	<i>Necrotic factor-<math>\kappa</math>B</i>
mAChR	Récepteur muscarinique de l'acétylcholine
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NST	Noyau subthalamique
PAC1	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor 1</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PAM	Modulateur allostérique positif
PAR1	<i>Protease activated receptor 1</i>
PAR2	<i>Protease activated receptor 2</i>
PAR4	<i>Protease activated receptor 4</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PTH	Hormone parathyroïdienne
PTS-6	<i>Peptide transport system 6</i>



RAMP	<i>Receptor activity-modifying protein</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSA	Relation structure-activité
S1P <sub>3</sub>	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 3</i>
SAM	Modulateur allostérique silencieux
Sar	Sarcosine
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SN	Substance noire
SNC	Système nerveux central
SNCA	Gène de l' $\alpha$ -synucléine
SNP	Système nerveux périphérique
SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>
STAT-1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
TFE	Trifluoroéthanol
TH	Tyrosine hydroxylase
DTM	Domaine transmembranaire
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrotic factor <math>\alpha</math></i>
V2R	Récepteur de la vasopressine de type 2
VIP	Peptide vasoactif intestinal
VPAC1	<i>Vasoactive intestinal polypeptide/Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor 1</i>
VPAC2	<i>Vasoactive intestinal polypeptide/Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor 2</i>



# *Revue de la littérature*



# CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

### 1.1. Généralités

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), aussi appelés récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TMRs), sont la cible de plus de 40 % des médicaments sur le marché. Ils correspondent à une grande famille de protéines membranaires auxquelles peuvent se lier diverses hormones ou transmetteurs, permettant ainsi l'activation de seconds messagers et la mise en place de plusieurs cascades de signalisation intracellulaire. Ils sont composés d'un segment N-terminal, de 7 domaines transmembranaires (DTMs), de 3 boucles extracellulaires (ECLs), de 3 boucles intracellulaires (ICLs) et d'un domaine C-terminal. Ces récepteurs sont classés en différentes catégories sur la base de leur séquence primaire et de leurs caractéristiques biochimiques et structurales, ainsi que sur la nature de leur ligand endogène. Selon la classification de Gether, il existe 3 familles principales : la famille A (*rhodopsin-like* ou famille 1), la famille B (*secretin-like* ou famille 2) et enfin la famille C (glutamate ou famille 3) (Gether, 2000).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à des RCPGs de la classe B. Cette classe comprend, en autres, les récepteurs de la sécrétine, du peptide vasoactif intestinal (VIP), du *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), du facteur de libération de l'hormone de croissance (GRF), ou encore du glucagon. Ils présentent une très faible homologie de séquence (moins de 10 %) avec les RCPGs des classes A et C (Laburthe *et al.*, 1996, Wootten *et al.*, 2017). Ils sont caractérisés par un motif structural commun, à savoir, un domaine N-terminal extracellulaire relativement long composé de 100 à 160 acides aminés, dont 10 de ces résidus sont hautement conservés (telles 6 cystéines), et de nombreux sites de glycosylation (Laburthe *et al.*, 2007). Ce domaine est avant tout crucial pour la reconnaissance de leurs ligands endogènes qui se lient par un mécanisme en deux étapes. En effet, le ligand s'attache d'abord au domaine N-terminal du récepteur à l'aide de son segment C-terminal. Par ailleurs, il a été suggéré récemment que les domaines extracellulaires participeraient aussi au processus de liaison du ligand (Cao *et al.*, 2018). Par la suite, la molécule est transloquée dans la poche de liaison située au niveau des domaines transmembranaires afin d'entraîner l'activation des seconds messagers (Parthier *et al.*, 2009).

Les RCPGs de la classe B lient essentiellement des peptides hormonaux. Ces derniers contiennent au minimum 27 résidus et leurs structures primaires et secondaires sont relativement homogènes : on retrouve donc des similarités dans leur séquence, et leur structure secondaire est caractérisée par une forte propension à se replier en hélice  $\alpha$  (Hoare, 2005). Bon nombre des récepteurs de cette classe sont une cible pour le développement de diverses thérapies (**Tableau 1**) contre par exemple le diabète de type 2, l'obésité, les maladies cardiovasculaires ou encore les troubles neurologiques. Malheureusement, il est très difficile de produire un médicament efficace de nature peptidique se liant à ces RCPGs (Archbold *et al.*, 2011, de Graaf *et al.*, 2017). En effet, les peptides fixant les RCPGs de la classe B contiennent des pharmacophores qui sont dispersés tout au long de sa structure primaire et ces derniers sont donc difficiles à mimer au moyen de molécules organiques de petite taille.

**Tableau 1 : Liste des récepteurs de la classe B et de leurs ligands, avec leurs applications cliniques potentielles. Adapté de Archbold et al., 2011 et de Wootten et al., 2017.**

Récepteurs	Ligands	Études cliniques
Récepteur de la calcitonine	Calcitonine	Ostéoporose
Récepteur de l'amyline	Amyline, Calcitonine, Adrénomédulline <i>α</i> -Calcitonine gene-related peptide (CGRP), β-CGRP	Diabète, obésité
Récepteur du CGRP	CGRP	Migraine
AM <sub>1</sub>	Adrénomédulline	Maladies cardiovasculaires, cancer
AM <sub>2</sub>	Adrénomédulline	Maladies cardiovasculaires
CRF <sub>1</sub>	Facteur de libération de la corticotropine, Urocortine 1, Sauvagine	Anxiété, dépression, syndrome du côlon irritable, maladie de l'intestin irritable
CRF <sub>2</sub>	Facteur de libération de la corticotropine, Urocortine 1, Urocortine 2, Urocortine 3, Sauvagine	Arrêt cardiaque, hypertension
GHRH	Facteur de libération de l'hormone de croissance	Lipodystrophie liée au VIH, nanisme
GLP-1	<i>Glucagon like peptide-1</i>	Diabète, obésité
GLP-2	<i>Glucagon like peptide-2</i>	Syndrome de l'intestin court, la maladie de Crohn, ostéoporose
PAC1	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)</i>	Neurodégénérescence, nociception, homéostasie du glucose
PTH1	Hormone parathyroïdienne	Ostéoporose, hypoparathyroïdisme
PTH2	Peptide tubéroinfundibulaire (TIP39)	Nociception
Récepteur de la sécrétine	Sécrétine	Autisme, schizophrénie, ulcères duodénaux, gastrite
VPAC1	PACAP, VIP	Inflammation, neurodégénérescence
VPAC2	PACAP, VIP	Inflammation, rythme circadien

## 1.2. Signalisation des RCPGs

L'interaction d'un ligand avec son récepteur engendre l'activation de signaux intracellulaires. Ils existent ainsi plusieurs types de protéines adaptatrices qui interagissent avec les RCPGs, notamment les protéines G hétérotrimériques et les  $\beta$ -arrestines.

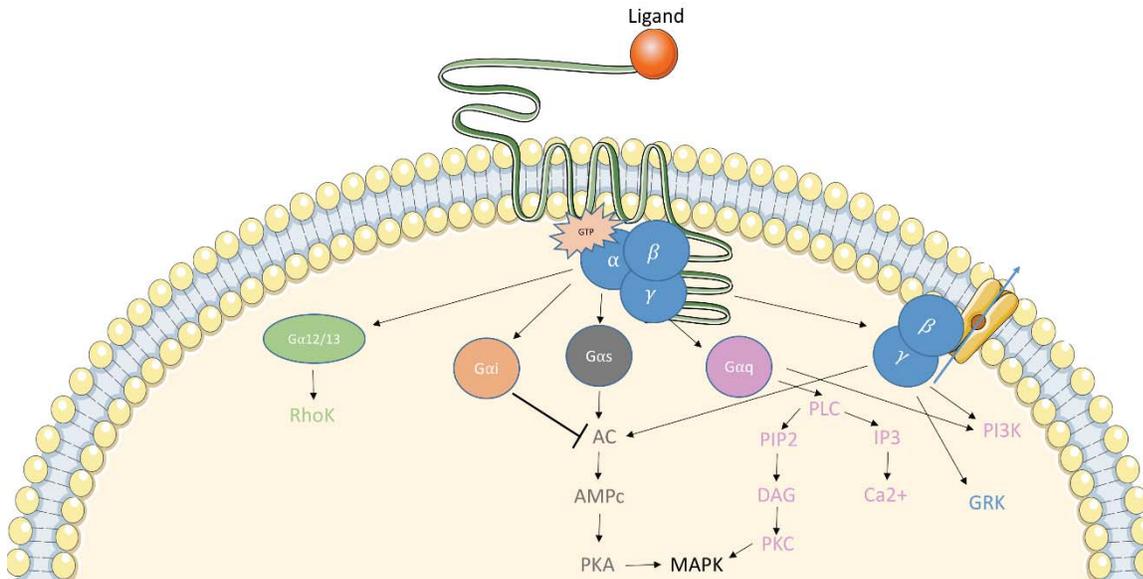
### 1.2.1. Signalisation par les protéines G

Les protéines GTPase (ou protéines G) sont constituées de 3 sous-unités,  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ , qui forment un complexe stable au repos. L'activation du récepteur par son agoniste diminue l'affinité de la sous-unité  $G\alpha$  pour la guanosine diphosphate (GDP) provoquant ainsi son remplacement par une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Ceci a pour effet d'entraîner la dissociation du complexe de la protéine G ( $G\alpha$  d'une part et  $G\beta\gamma$  d'autre part) provoquant ainsi l'activation de divers seconds messagers qui conduiront à une réponse biologique.

La signalisation des protéines G est régie par l'activité GTPase intrinsèque de  $G\alpha$ . Il existe plusieurs types de sous-unités  $\alpha$ , à savoir :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{i/o}$  et  $G\alpha_{12/13}$ . Le couplage des protéines G au récepteur déclenche la stimulation de divers seconds messagers tels que la phospholipase C (PLC), l'adénylyl cyclase (AC), ou encore les *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Les récepteurs de la classe B sont principalement couplés avec  $G\alpha_s$  (Wootten *et al.*, 2017), laquelle est responsable de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). En effet, l'activation de l'AC, suite à la stimulation de  $G\alpha_s$  catalyse la transformation de l'ATP (adénosine triphosphate) en AMPc qui, à son tour, induit l'activation d'autres protéines, comme la protéine kinase A (PKA), une enzyme jouant un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire par son action sur les MAPKs. Mise à part  $G\alpha_s$ , ces RCPGs peuvent également activer à des degrés divers d'autres protéines G (**Figure 1**). Ainsi, il a été montré que le récepteur de la sécrétine est effectivement couplé à  $G\alpha_s$ , mais qu'en présence de fortes concentrations du ligand endogène, il y a plutôt un renversement du couplage en faveur de  $G\alpha_q$  (Wootten *et al.*, 2017). Il a également été supposé que les récepteurs VPAC1 et VPAC2 peuvent coupler la protéine  $G\alpha_i$  (Langer, 2012).

Chaque sous-unité  $\alpha$  est responsable de l'induction de seconds messagers qui lui sont propres, certains pouvant même avoir des actions opposées. À titre d'exemple, la sous-unité  $G\alpha_s$  est responsable de la stimulation de l'AC tandis que la sous-unité  $G\alpha_{i/o}$  provoque plutôt son inhibition. L'activation de  $G\alpha_q$  permet, quant à elle, la stimulation de la PLC. Cette dernière induit

la production d'inositol-1,4,5-triphosphates ( $IP_3$ ) lequel va interagir avec ses récepteurs situés à la surface du réticulum endoplasmique (RE), afin de favoriser l'ouverture de canaux calciques et donc une augmentation de la concentration du calcium intracytosolique (Marchant *et al.*, 1997). Lors de cette cascade, la lyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) par la PLC produit également du diacylglycérol (DAG) qui, comme le calcium, active la protéine kinase C (PKC), laquelle stimule ensuite les MAPKs (Cargnello *et al.*, 2011). Enfin, la protéine  $G\alpha_{12/13}$  permet l'activation des Rho kinases suite à la phosphorylation des Rho GTPases (Suzuki *et al.*, 2003). Pour ce qui est des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , on sait qu'elles peuvent se lier et interagir avec des canaux ioniques. Elles peuvent notamment stimuler certains effecteurs comme la PI3K (phosphoinositide 3-kinase), la PLC, l'AC, les MAPKs ou encore les GRKs (*G protein-coupled receptor kinases*) (Engelhardt *et al.*, 2007, Khan *et al.*, 2013) (**Figure 1**). Pour finir, il est intéressant de noter dans le cadre du deuxième volet de ce doctorat qu'il a été démontré que les ICLs des RCPGs de la classe B sont impliquées dans le couplage de l'une ou l'autre des protéines G (Culhane *et al.*, 2015). Par exemple, pour le récepteur PTH1, la région N-terminale de ICL3 serait impliquée dans l'interaction avec  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_q$  tandis que la région C-terminale de ICL2, en particulier le segment -Glu-Lys-Lys-Tyr-, serait important seulement pour le couplage à  $G\alpha_q$  (Huang *et al.*, 1996, Iida-Klein *et al.*, 1997).



**Figure 1 : Signalisation des protéines G par les récepteurs à 7 domaines transmembranaires.**

Une fois le ligand fixé au récepteur, le GDP est catalysé en GTP, provoquant ainsi la dissociation du complexe  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  et l'activation des seconds messagers. AC, adénylyl cyclase ; AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; DAG, diacylglycérol ; GRK, *G protein-coupled receptor kinase* ; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5-triphosphate ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PKA, protéine kinase A ; PKC, protéine kinase C ; PLC, phospholipase C ; RhoK, Rho kinase.

### 1.2.2. Phénomène de désensibilisation : signalisation par les GRK et les $\beta$ -arrestines

Les  $\beta$ -arrestines ont été découvertes en 1987 au cours de travaux portant sur la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par une kinase : la kinase du récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ ARK ou GRK2) (Benovic *et al.*, 1987). Lors de cette étude, des stimulations répétées des récepteurs ont conduit à une réduction du signal comparativement à la réponse initiale (Rajagopal *et al.*, 2018). Cette observation suggérait alors une activation de seconds messagers, autres que les protéines G, causant une désensibilisation des récepteurs et une réduction de la réponse cellulaire. Il fut également montré que cette désensibilisation était associée à une réduction du nombre de récepteurs à la surface membranaire. De nombreuses études ont par la suite montré que les RCPGs interagissent avec des protéines nommées  $\beta$ -arrestines, suite à leur activation et phosphorylation par les GRKs (Lohse *et al.*, 1992).

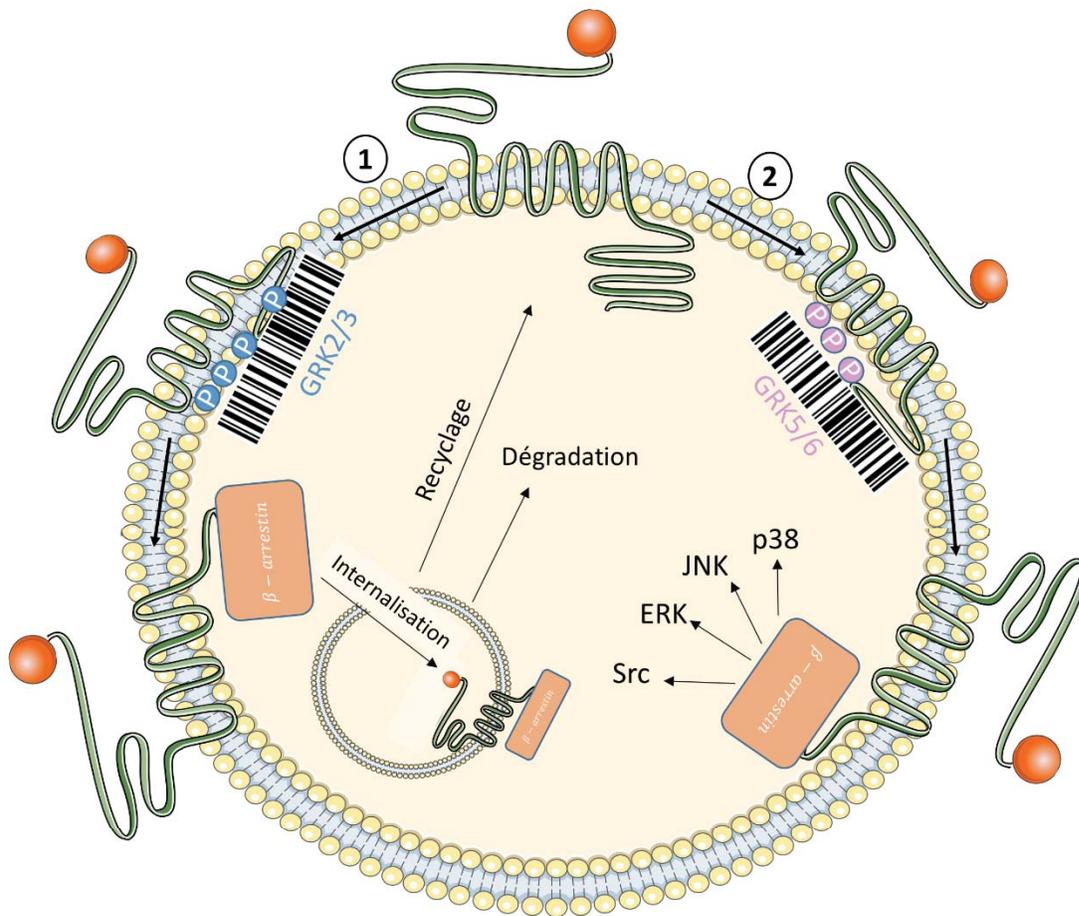
Il existe 7 sous-types de GRKs classés en 3 familles sur la base de leur homologie de séquence et de leur fonctionnalité : GRK1/7, GRK2/3 et les GRK4/5/6 (Premont *et al.*, 2007). Les GRK2/3 et les GRK5/6 sont exprimées de manière ubiquitaire. Il faut savoir que leurs

niveaux d'expression sont altérés lors de certaines maladies et que leurs pertes de fonction provoquent des altérations significatives dans la signalisation des récepteurs. Par exemple, le niveau d'expression de GRK2 est augmenté lors d'un arrêt cardiaque et son inhibition restaure la fonction du récepteur  $\beta$ -adrénergique (Raake *et al.*, 2008). Bien que dans un premier temps, ces protéines aient été considérées comme étant la première étape de désensibilisation, celles-ci joueraient aussi un rôle dans la restauration des processus mitochondriaux *via* la transcription d'ADN mitochondrial, la régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et la production d'ATP (Sorriento *et al.*, 2013). La phosphorylation du récepteur par les GRKs se produit sur des résidus sérine/thréonine situés dans la région C-terminale et/ou dans la troisième boucle cytoplasmique. Une fois le récepteur phosphorylé, la  $\beta$ -arrestine vient s'y fixer et généralement il s'ensuit l'internalisation de ce complexe. À noter qu'il semble que le mode de recrutement des  $\beta$ -arrestines soit lié aux sous-types de GRKs et à la phosphorylation qu'elles entraînent (Reiter *et al.*, 2012). Il a ainsi été montré pour les récepteurs de l'angiotensine II de type 1A, de la vasopressine de type 2 ( $V_2R$ ), de l'hormone folliculo-stimulante (FSH-R), et du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ( $\beta_2$ -AR) que le recrutement des  $\beta$ -arrestines provoquant l'activation subséquente de ERK nécessite la phosphorylation des récepteurs par GRK5 et GRK6 (Reiter *et al.*, 2012). En revanche, comme observé pour les récepteurs  $V_2R$  et de l'histamine, ce sont plutôt les GRK2/3 qui seraient impliquées dans leur désensibilisation et internalisation. À la lumière de ces résultats, il semble donc que la phosphorylation du récepteur au niveau de son domaine C-terminal et des boucles intracellulaires par les GRKs agisse comme un code-barres, régulant ainsi la nature des fonctions intracellulaires des  $\beta$ -arrestines (Reiter *et al.*, 2012). Deux types d'interactions distinctes entre une  $\beta$ -arrestine et un récepteur ont pu être démontrés. En effet, les récepteurs de la classe A, comme le récepteur  $\beta_2$ -AR, interagissent de manière transitoire avec les  $\beta$ -arrestines et sont rapidement recyclés à la membrane cellulaire (Shenoy *et al.*, 2011). Ceux de la classe B, comme celui de la vasopressine, engendrent plutôt une interaction plus soutenue et sont généralement dégradés après internalisation (Shenoy *et al.*, 2011). Enfin, une étude utilisant la technique de *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET) a montré que la  $\beta$ -arrestine 2 adopte des conformations différentes selon la nature du récepteur impliqué dans l'interaction, ce qui reflète le rôle des  $\beta$ -arrestines 2 dans l'activation ou l'inhibition des signaux en aval (M. H. Lee *et al.*, 2016).

Il existe 4 types d'arrestines, soit les arrestines 1 et 4 qui sont retrouvées dans les yeux et les arrestines 2 et 3 (appelées  $\beta$ -arrestines 1 et 2) qui sont exprimées de manière ubiquitaire (Lefkowitz *et al.*, 2005). Les récepteurs de la classe B sont couplés de manière égale aux  $\beta$ -arrestines 1 et 2 et la liaison des  $\beta$ -arrestines à ce type de récepteurs cause notamment leur

désensibilisation et leur internalisation (Ranjan *et al.*, 2017). En effet, l'encombrement stérique que provoque la  $\beta$ -arrestine au niveau du récepteur bloque l'interaction de celui-ci avec les protéines G, causant ainsi un arrêt de la signalisation intracellulaire et par conséquent, la « désensibilisation » du récepteur. Toutefois, il faut savoir que l'internalisation n'est pas nécessaire pour la désensibilisation du récepteur, mais que celle-ci est requise pour la déphosphorylation et la resensibilisation de ce dernier (Lefkowitz *et al.*, 1998). De nombreuses études ont montré que les RCPGs sont internalisés par un mécanisme faisant appel aux vésicules de clathrine et à l'intervention de protéines adaptatrices comme AP2 (protéine adaptatrice 2) (Goodman *et al.*, 1996, Laporte *et al.*, 1999). Cependant, d'autres mécanismes ont aussi été décrits, comme la formation de vésicules bordées de cavéoline (cavéoles) ou la structuration de simples invaginations lipidiques (Ostrom *et al.*, 2004). Il a également été montré que les  $\beta$ -arrestines peuvent interagir avec les phosphoinositides tels que PIP<sub>2</sub>, situés au niveau de la membrane plasmique (Watt *et al.*, 2002), afin de moduler l'endocytose des récepteurs et leur recyclage (Toth *et al.*, 2012). Des expérimentations ont ainsi démontré que la mutation de la poche de liaison des phosphoinositides au niveau de la  $\beta$ -arrestine 2 confère à cette dernière ( $\beta$ -arrestine2 RRK/Q) la capacité d'interagir avec les RCPGs et les clathrines, sans internalisation du récepteur (Gaidarov *et al.*, 1999)

Au cours de la dernière décennie, il a été montré que les  $\beta$ -arrestines sont responsables de l'activation de certaines voies de signalisation. En effet, de nombreuses kinases et autres protéines régulatrices interagissent avec les  $\beta$ -arrestines. Ainsi, ces dernières se comportent comme des adaptateurs pour les tyrosines kinases de la famille Src, et des régulateurs de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), de la kinase c-Jun N-terminale (JNK) et des modules p38 de MAPK (Shenoy *et al.*, 2003) (**Figure 2**). Enfin, il est établi que certains RCPGs de la classe B comme les récepteurs PTH1 ou V<sub>2</sub>R, sont capables d'induire une activation prolongée des protéines G bien qu'ils interagissent étroitement avec les  $\beta$ -arrestines (Feinstein *et al.*, 2013, Ferrandon *et al.*, 2009, Wehbi *et al.*, 2013). Ainsi, le groupe de Lefkowitz a évalué si les protéines G et les  $\beta$ -arrestines pouvaient former un « mégaplex » avec les récepteurs de la classe B. Pour ce faire, ils ont créé un récepteur chimérique  $\beta_2$ V<sub>2</sub>R, en substituant la queue C-terminale du récepteur  $\beta_2$ -AR par celle du récepteur V<sub>2</sub>R. Celui-ci s'est montré capable de former un « mégaplex » avec la protéine G $\alpha_s$  et la  $\beta$ -arrestine 1 et d'induire un échange GTP-GDP significatif (Thomsen *et al.*, 2016).



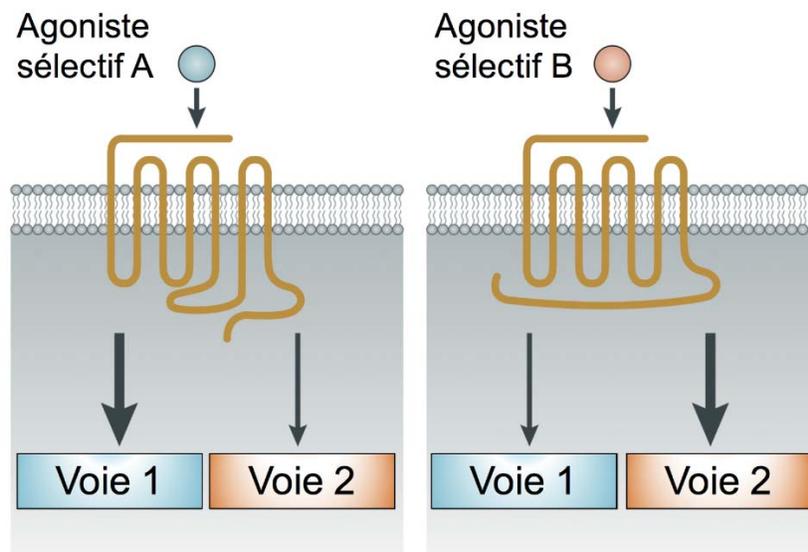
**Figure 2 : Exemple de mécanisme de recrutement des  $\beta$ -arrestines.**

Le récepteur est phosphorylé par les GRKs. La phosphorylation du récepteur agit comme un code-barres pour le recrutement de la  $\beta$ -arrestine : 1) La  $\beta$ -arrestine est recrutée au récepteur et celui-ci est internalisé pour être ensuite dégradé ou recyclé à la membrane cellulaire. 2) La phosphorylation du récepteur par les GRKs entraîne le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et l'activation de diverses voies de signalisation. Adapté de Reiter *et al.*, 2012.

### 1.3. Dynamisme structural des RCPGs

Historiquement, les RCPGs étaient considérés comme des commutateurs bimodaux « *on* ou *off* » possédant deux types de conformation : active ou inactive. Cette idée venait du postulat que les agonistes stabilisaient les récepteurs dans une seule et unique conformation, connue sous le nom d'état actif (T. Kenakin *et al.*, 2013). Au cours des dernières années, l'observation d'affinités semblables de certains ligands pour leur récepteur, mais favorisant de manière spécifique et distincte certains seconds messagers, a remis en question ce concept d'activation *on/off* des RCPGs (Geppetti *et al.*, 2015). Ceci a été confirmé entre autres par des études structurales qui ont mis en évidence la grande dynamique de ces systèmes (T. Kenakin, 2005).

Notamment, les RCPGs subissent d'importants changements conformationnels cytoplasmiques en présence de leurs ligands. Plus précisément le mouvement du 6<sup>e</sup> domaine transmembranaire conduit au réarrangement des autres DTMs et des ICLs, exposant ainsi la poche de liaison des seconds messagers (Hilger *et al.*, 2018). Par exemple, pour le récepteur  $\beta$ 2-AR, il existe une interaction transitoire entre le DTM6 et  $G\alpha_s$  qui est dépendante de la liaison du ligand (Rasmussen *et al.*, 2011). Également, une autre étude sur le récepteur de la calcitonine suggère que la puissance et l'efficacité du ligand sont associées aux changements conformationnels des protéines G (Furness *et al.*, 2016). Ainsi, lorsqu'un ligand se fixe à son RCPG, ce dernier subit un changement conformationnel qui permet la transduction de signaux intracellulaires, suite aux recrutements des protéines G et des  $\beta$ -arrestines (Whalen *et al.*, 2011). Cette hypothèse révisée a conduit au concept original d'agonistes « biaisés » (**Figure 3**), un terme décrivant la capacité d'un ligand à influencer préférentiellement certaines voies de signalisation, en favorisant la stabilisation de certains états conformationnels du récepteur.



**Figure 3 : Mécanisme d'action des agonistes biaisés (T. Kenakin *et al.*, 2013).**

L'agoniste de référence A active préférentiellement la voie de signalisation 1, tandis que l'agoniste B induit un stimulus biaisé pour l'activation de la voie 2 en référence à l'agoniste A. Cette figure est traduite de T. Kenakin *et al.*, 2013.

## 1.4. Modulation allostérique des RCPGs

### 1.4.1. Généralités

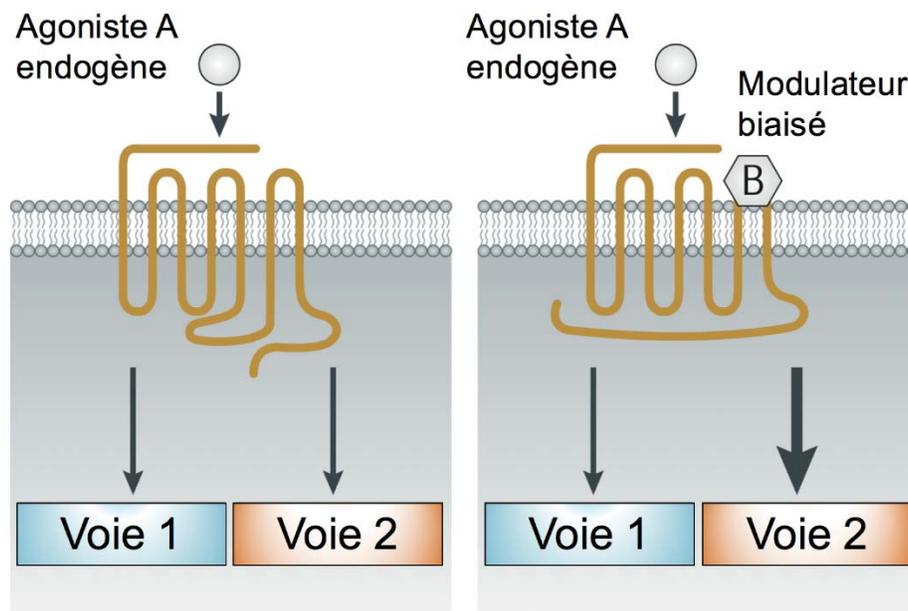
Par définition, les RCPGs sont considérés comme des protéines allostériques. En effet, ces protéines possèdent un site de fixation pour leur(s) ligand(s) endogène(s), appelé site de fixation orthostérique, qui est distinct du site responsable de la fixation des effecteurs signalétiques comme les protéines G ou les  $\beta$ -arrestines (Bartuzi *et al.*, 2017b). Il est maintenant clairement établi que les RCPGs possèdent des sites de fixation topographiquement distincts du site de liaison orthostérique, appelés sites de liaison allostériques, qui peuvent être reconnus par diverses molécules, incluant des peptides et des protéines (T. P. Kenakin, 2012). En conséquence, l'activité du ligand endogène peut être régulée par des modulateurs allostériques (MoAs) qui provoquent un changement conformationnel du récepteur. La liaison d'un MoA confère donc au récepteur un spectre unique d'états conformationnels et module ainsi ses propriétés pharmacologiques. Par exemple, certains ligands allostériques développés pour le récepteur  $\beta$ 2-AR ont montré que l'on peut augmenter ou diminuer de 15 000 fois l'affinité de liaison de l'isoprénaline (aussi connue sous le nom d'isoprotérénol), un agoniste  $\beta$ -adrénergique (Staus *et al.*, 2016). Dans les faits, au niveau pharmacologique, un MoA peut avoir plusieurs effets sur l'activation du récepteur et peut réguler celui-ci de différentes façons :

- Positivement : appelé PAM, pour « *positive allosteric modulator* », il améliore l'affinité et/ou l'activité du ligand endogène.
- Négativement : appelé NAM, pour « *negative allosteric modulator* », il diminue l'affinité et/ou l'activité du ligand endogène.
- Intrinsèquement : un dérivé ago-allostérique (ago-PAM) est ainsi capable d'induire une activité agoniste sans ligand endogène.
- Silencieusement (SAM) : il n'a pas d'effet sur l'affinité et/ou l'activité du ligand endogène. Cependant, sa présence permet d'augmenter la thermostabilité du récepteur et ainsi augmenter le temps de signalisation du ligand endogène.

L'avantage de tels composés est de moduler les réponses, sans bloquer la fonction du récepteur, afin d'améliorer l'effet thérapeutique de certains composés et/ou de minimiser des effets secondaires associés à l'activation de certaines voies de signalisation. Par exemple, un PAM pourrait potentialiser la réponse d'une hormone faiblement exprimée, tandis qu'un NAM serait utile pour supprimer des effets délétères et/ou l'activité de trop grande amplitude d'un

agoniste. Par exemple, VU0364770 et ADX88178, tous deux des PAMs du récepteur mGlu4, potentialisent l'effet antiparkinsonien de la levodopa (L-DOPA) (Nickols *et al.*, 2014). Par ailleurs, certains MoAs peuvent affecter de façon différente l'activation des voies de signalisation en fonction du ligand utilisé. Cet effet, qualifié de « *probe-dependence* », permet à un récepteur, en présence d'un MoA, de répondre autrement lorsque différents médicaments sont liés (Bartuzi *et al.*, 2017a). Par exemple, le MoA du récepteur muscarinique de l'acétylcholine (mAChR), LY2033298, agit comme un PAM ou un NAM du sous-type M2, dépendamment des agonistes utilisés (Valant *et al.*, 2012) (**Figure 4**).

D'un point de vue thérapeutique, le concept d'allostérie est très attractif. En effet, les sites allostériques étant faiblement conservés, ce type de modulateurs permet d'ajuster les fonctions biologiques avec une grande sélectivité en ciblant préférentiellement certains sous-types de récepteurs. Mis à part les ago-PAMs, les MoAs sont généralement inactifs en l'absence de ligand endogène, permettant ainsi de limiter les effets secondaires potentiels (del Sol *et al.*, 2009).



**Figure 4 : Mécanisme d'action sélectif des modulateurs allostériques (T. Kenakin *et al.*, 2013).**

Le ligand endogène active les voies de signalisation 1 et 2. En présence du modulateur allostérique B, le récepteur change de conformation et l'agoniste A active préférentiellement la voie de signalisation 2. Cette figure est traduite de T. Kenakin *et al.*, 2013.

### 1.4.2. Les pepducines

Les pepducines ont été développées au début des années 2000 par Covic *et al.*, suite au besoin de concevoir des outils visant à mieux comprendre le récepteur PAR1 (*protease activated receptor 1*), un RCPG impliqué dans le processus de la coagulation sanguine (Covic *et al.*, 2002a). Cette approche permet de moduler l'activité d'un récepteur en exploitant l'interaction des boucles intracellulaires avec les seconds messagers. En effet, les ICLs sont des éléments cruciaux pour le transfert de l'information du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (Rasmussen *et al.*, 2011). Des peptides dérivés des ICLs ont donc été développés pour moduler les signaux des récepteurs avec une grande sélectivité en agissant comme des agonistes ou des antagonistes allostériques (Carr *et al.*, 2014, Kaneider *et al.*, 2007, Leger *et al.*, 2006, Tchernychev *et al.*, 2010).

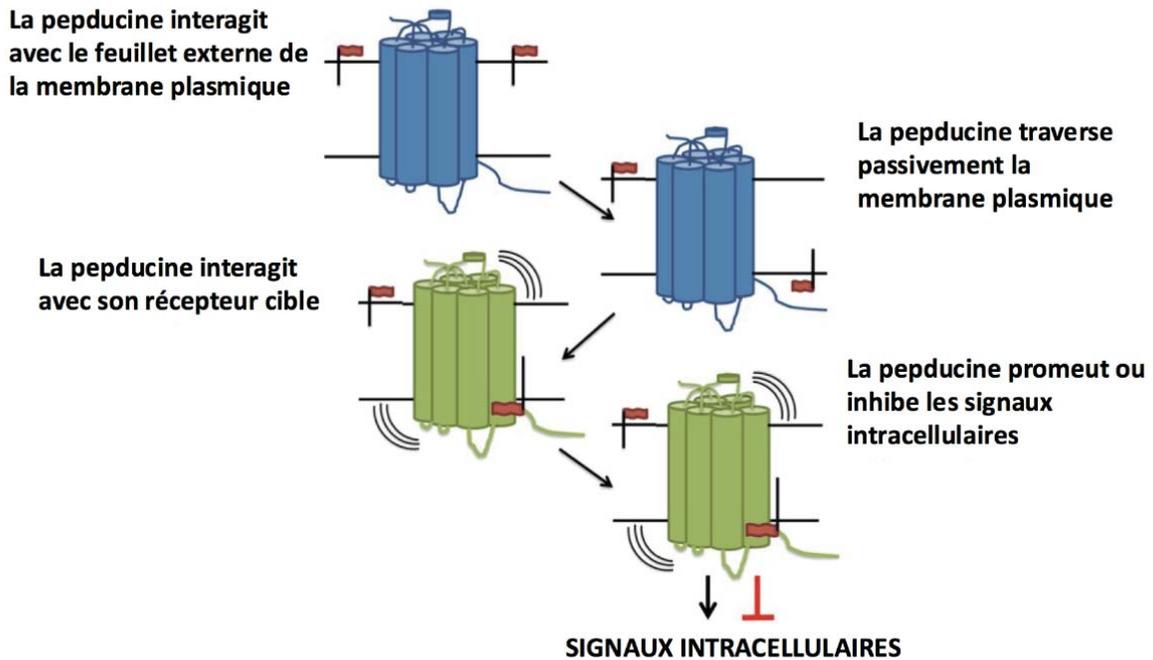
Une pepducine est un peptide dont la séquence est dérivée d'une des ICLs ou du domaine C-terminal d'un récepteur, et auquel est lié un segment hydrophobe, par exemple l'acide palmitique, un acide gras saturé composé de 16 carbones (O'Callaghan *et al.*, 2012). La palmitoylation, bien que fréquente, n'est pas la seule stratégie utilisée et d'autres lipides tels que l'acide myristique ou l'acide lithocholique peuvent également être attachés à une pepducine pour assurer son ancrage à la membrane lipidique (O'Callaghan *et al.*, 2012). Bien que le processus par lequel les pepducines traversent la membrane lipidique ne soit pas encore clairement établi, des expériences suggèrent que celles-ci s'incorporent dans le feuillet externe de la bicouche lipidique à l'aide de son segment hydrophobe. Un nouvel équilibre se créerait entre les feuillettes internes et externes de la membrane et ce phénomène permettrait un mouvement de flip-flop et le transfert passif de la pepducine dans la cellule (Carr *et al.*, 2016a, Wielders *et al.*, 2007). En particulier, en exploitant les environnements redox distincts entre les milieux extra- et intracellulaires, et l'utilisation de sondes FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), il a été mis en évidence que le passage des pepducines est dépendant de la queue hydrophobe (Tsuji *et al.*, 2013). Une fois ancrée à la surface interne de la membrane cellulaire, la pepducine viendrait alors reconnaître son récepteur apparenté et ainsi provoquer son activation (Winther *et al.*, 2018). Des hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer le type d'interaction et le mode d'activation entre une pepducine et son récepteur duquel elle est dérivée. Il est ainsi suggéré que les pepducines interagissent avec leur récepteur parent sur la base de leur homologie de séquence et d'interactions spécifiques avec certains domaines de ce dernier (Winther *et al.*, 2018). Les pepducines viendraient notamment transformer la conformation du récepteur en modifiant la géométrie des ICLs (O'Callaghan *et al.*, 2012). Zhang

*et al.* ont révélé par RMN que la pepducine dérivée de la troisième boucle intracellulaire du récepteur PAR1 vient interagir directement avec l'hélice intracellulaire H8, située dans le C-terminal, et le motif adjacent (D/N)PXXYYY pour activer le récepteur (P. Zhang *et al.*, 2015). Il s'ensuivrait une stabilisation conformationnelle du récepteur causant une régulation positive ou négative des signaux intracellulaires. En effet, comme décrit dans la section 1.3, il est maintenant reconnu que le changement de conformation des RCPGs est nécessaire pour permettre la transduction du signal lorsque le ligand s'y fixe (Hofmann *et al.*, 2009). Ainsi, par la stabilisation du récepteur, les pepducines créeraient de nouvelles plateformes d'interaction pour les seconds messagers, ce qui assurerait la transduction des signaux en l'absence de ligand endogène (**Figure 5**). D'autre part, de nombreux RCPGs sont présents sous forme d'homo et/ou d'hétérodimères (Yu *et al.*, 2014). Ces derniers peuvent influencer l'affinité et l'activité du ligand de même que celles des seconds messagers. Sachant que les ICLs participent à la formation des dimères (Navarro *et al.*, 2010), l'autre mécanisme d'action qui est proposé établit que les pepducines mimeraient la présence d'un second récepteur et donc la formation d'un dimère. Par exemple, PAR1 et PAR4 forment un hétérodimère lors d'une thrombose et il a été tout particulièrement démontré que la pepducine dérivée de l'ICL3 de PAR4 est capable d'inhiber PAR1 uniquement lorsque les récepteurs sont coexprimés (Leger *et al.*, 2006).

D'autre part, ces peptides sont généralement très spécifiques. La pepducine P1pal-12 dérivée de l'ICL3 du récepteur PAR1 démontre une grande spécificité envers ce récepteur en inhibant l'agrégation plaquettaire induite par le ligand endogène du récepteur PAR1, mais pas celle induite par les ligands des récepteurs PAR4, du thromboxane, de l'adénosine diphosphate, du collagène ou du complexe glycoprotéique GPIIb/IX/V (Covic *et al.*, 2002b). Aussi, la troisième boucle intracellulaire des récepteurs FPR1 et FPR2, tous deux impliqués dans le chimiotactisme des leucocytes, ne diffère que par seulement deux acides aminés. Néanmoins, il a été observé qu'une pepducine dérivée du FPR2, avec sa lysine en position 231 remplacée par une glutamine, soit le résidu 231 du récepteur FPR1, perd toute activité au niveau du récepteur FPR2. Également, la pepducine F2pal10, dérivée du récepteur FPR2, est capable d'activer ce même récepteur, mais non FPR1 (Forsman *et al.*, 2013). Ainsi, ces données suggèrent que les pepducines sont généralement très spécifiques à leur récepteur parent.

Finalement, plusieurs études ont montré l'efficacité *in vivo* de pepducines dans de nombreux modèles (Covic *et al.*, 2002a, Leger *et al.*, 2006, Michael *et al.*, 2013, Tchernychev *et al.*, 2010). Par ailleurs, ce concept a déjà donné lieu pour quelques RCPGs à des composés actuellement étudiés en clinique. Par exemple le vorapaxar, une pepducine dérivée du récepteur PAR1 est

présentement évaluée pour sa capacité à réduire les accidents cardiovasculaires, les infarctus du myocarde et les ischémies cérébrales récurrentes (Abdel-Latif *et al.*, 2012, Gryka *et al.*, 2017). Autre exemple, le PZ-128, une autre pepducine dérivée du récepteur PAR1, est actuellement testé en clinique dans un objectif de prévention des complications thrombotiques aiguës lors d'interventions coronariennes percutanées (Gurbel *et al.*, 2016).



**Figure 5 : Mécanisme d'activation des RCPGs par les pepducines (Carr *et al.*, 2016a).**  
 Cette figure est traduite de Carr *et al.*, 2016.

### 1.4.3. Modulation allostérique des RCPGs de la classe B par les *receptor activity-modifying proteins*

Il est maintenant établi que les RAMPs modifient la spécificité des ligands, le trafic cellulaire et la signalisation des RCPGs de la classe B, modulant ainsi leur fonction (Hay *et al.*, 2016). À ce jour, trois membres ont été identifiés chez les mammifères, soit RAMP1, RAMP2 et RAMP3 (McLatchie *et al.*, 1998). Ces protéines membranaires peuvent interagir avec de nombreux RCPGs incluant ceux de la calcitonine, du CGRP, du PTH (PTH1 et PTH2), du VIP (VPAC1 et VPAC2), du CRF (CRF1), du glucagon ou encore de la sécrétine (Hay *et al.*, 2016). Cependant aucune interaction n'a encore été démontrée pour le récepteur PAC1.

Ces protéines sont composées d'un domaine transmembranaire unique, d'un large domaine N-terminal de 90 à 100 acides aminés et d'un court segment C-terminal ( $\approx 9$  acides aminés) (Hay *et al.*, 2016). Elles sont principalement connues pour influencer la liaison des ligands à leurs récepteurs. En particulier, les RAMPs sont connues pour interagir avec le CLR (calcitonin receptor-like receptor) et modifier la liaison de ses ligands. En effet, RAMP1 est indispensable pour la liaison du CGRP tandis que RAMP2 et -3 favorisent la liaison de l'amyline (McLatchie *et al.*, 1998). À l'opposé, il a été démontré que RAMP2 empêche la liaison de GLP-1 à son récepteur (Weston *et al.*, 2015).

Il est aussi établi que ces protéines modifient la signalisation intracellulaire des RCPGs avec lesquels elles interagissent. Par exemple, la coexpression du CRF1 avec RAMP2 augmente l'activation des protéines  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_{12}$  ainsi que la réponse calcique, suite à l'interaction du CRF et de l'urocortine (Wootten *et al.*, 2013). Il a également été reporté que la signalisation basale de  $G\alpha_i$  du récepteur VPAC2 est modifiée en présence de RAMP1 (Wootten *et al.*, 2013). Aussi, la coexpression de RAMP2 avec VPAC1 augmente quant à elle l'hydrolyse des phosphoinositides induite par le VIP sans altérer la signalisation de l'AMPc, suggérant ainsi que ces protéines peuvent agir comme des modulateurs allostériques (Booe *et al.*, 2015, Christopoulos *et al.*, 2003).

Pour finir, les RAMPs agissent également comme des protéines chaperons. Par exemple, leur présence est indispensable pour l'expression du CLR à la surface membranaire. Elles seraient également impliquées dans l'internalisation des RCPGs puisque le recrutement des  $\beta$ -arrestines au niveau du CLR est dépendant de la présence de RAMP1 (Heroux *et al.*, 2007).

## 2. Le *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* et son système

### 2.1. Généralités

Le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) est une hormone peptidique découverte en 1989 sur la base de sa capacité à stimuler la formation d'AMPc dans les cellules hypophysaires antérieures de rat (Miyata *et al.*, 1989). Ce peptide existe sous deux isoformes fonctionnelles : une de 38 acides aminés (PACAP38) possédant une extrémité C-terminale amide et un site de clivage interne (Gly<sup>28</sup>-Lys<sup>29</sup>-Arg<sup>30</sup>) permettant de générer une seconde isoforme de 27 acides aminés (PACAP27), également amidée. Il a été montré chez les mammifères que le PACAP38 est la forme prédominante au niveau du système nerveux central (SNC) et des organes périphériques (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Depuis sa découverte, le PACAP a fait l'objet d'une attention particulière en raison de sa similarité de structure primaire avec le peptide vasoactif intestinal (VIP). Il existe 68 % d'homologie entre le VIP et le PACAP27, permettant de classer ce dernier dans la superfamille sécrétine/glucagon/VIP (Segre *et al.*, 1993). Le PACAP se lie à trois RCPGs nommés PAC1, VPAC1 et VPAC2. À ce jour, il a été démontré que VPAC1 et VPAC2 sont reconnus par les deux isoformes du PACAP et le VIP, alors que PAC1 est davantage sélectif pour le PACAP, avec une affinité et une activité biologique 1000 fois supérieures à celles du VIP (Bourgault *et al.*, 2009b, Harmar *et al.*, 1998, D. Vaudry *et al.*, 2000b).

Le PACAP est le dernier membre de cette famille à avoir été identifié, alors qu'il semble en être le précurseur. En effet, il a été identifié dans de nombreuses espèces (vertébrés ou invertébrés), et également chez les ascidies, un groupe évolutif précédant les vertébrés (McRory *et al.*, 1997). De plus, la structure primaire du PACAP est strictement conservée chez les mammifères (**Tableau 2**), contrairement aux autres membres de cette superfamille (On *et al.*, 2016, Sherwood *et al.*, 2000, D. Vaudry *et al.*, 2009a).

Tableau 2 : Séquences en acides aminés du PACAP38 humain et de celui d'autres espèces.

Espèce	Séquence	Homologie
Humain	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKNK	
Souris	-----	100 %
Rat	-----	100 %
Mouton	-----	100 %
Poulet	-I-----	97 %
Lézard	-----	100 %
Grenouille	-----I---	97 %
Saumon	-----R--YR-	92 %
Poisson-zèbre (a)	---V-----T---	92 %
Poisson-zèbre (b)	-----I-----	96 %

Les résidus en rouge sont différents de ceux retrouvés chez le PACAP38 humain. Le poisson-zèbre possède deux isoformes du PACAP représentées par (a) et (b). Modifié d'après On *et al.*, 2016 et Vaudry *et al.*, 2009.

## 2.2. Structure du PACAP

### 2.2.1. Structure primaire

Comme décrit précédemment, la structure primaire du PACAP27 présente 68 % d'homologie avec celle du VIP, un neuropeptide découvert lors de la purification de la sécrétine à partir d'intestins de porc (Said *et al.*, 1970). Un alignement des séquences peptidiques des différents membres de la superfamille sécrétine/glucagon/VIP a mis en évidence la présence d'un domaine N-terminal hautement conservé tandis que les domaines centraux et C-terminaux peuvent différer (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Un acide aminé aromatique (His ou Tyr) est ainsi retrouvé en position 1, et chez presque tous les membres, un résidu hydroxylé est généralement observé en position 7 (Thr ou Ser). On note également la présence d'un résidu chargé négativement (Asp ou Glu) en position 3 et des acides aminés peu volumineux aux positions 2 et 4 (Ala, Gly ou Ser) (**Tableau 3**) (Fournier *et al.*, 2016). La phénylalanine en position 6 est, pour sa part, strictement conservée (**Tableau 3, en bleu**) suggérant ainsi le rôle crucial de cet acide aminé dans l'activité biologique de ces différents peptides. Finalement, le domaine 28-38 est peu conservé entre les divers membres de cette famille et des différences sont aussi observées entre les espèces, suggérant ainsi que ce domaine n'est pas essentiel à l'activité biologique. En revanche, des études ont mis en évidence que ce segment facilite la liaison au

récepteur PAC1 (Hou *et al.*, 1994, Robberecht *et al.*, 1992a, Robberecht *et al.*, 1992b, Sun *et al.*, 2007).

Pour le PACAP38, au niveau du segment C-terminal, on observe la présence de 7 résidus lysine et 4 résidus arginine, ce qui lui confère un caractère fortement basique. De plus, les nombreux résidus aliphatiques ou aromatiques disséminés tout au long du squelette peptidique rendent également la molécule hydrophobe. Les deux isoformes du PACAP possèdent un groupement amide au niveau de leur extrémité C-terminale et la forme amidée de 27 acides aminés est générée *via* le clivage du PACAP38 par des prohormone convertases au niveau du tripeptide Gly<sup>28</sup>-Lys<sup>29</sup>-Arg<sup>30</sup> (Miyata *et al.*, 1990).

**Tableau 3 : Séquence en acides aminés des membres de la superfamille des neuropeptides PACAP/VIP .**

<b>PACAP38</b>	HSDGI <b>F</b> TDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL <b>G</b> KRYKQ <b>R</b> VKNK-NH <sub>2</sub>
<b>PACAP27</b>	HSDGI <b>F</b> TDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>
<b>VIP</b>	HSDA <b>V</b> <b>F</b> TDNY <b>T</b> RLRKQMAVKKYL <b>N</b> S <b>I</b> L <b>N</b> -NH <sub>2</sub>
<b>Sécrétine</b>	HSDG <b>T</b> <b>F</b> <b>T</b> SELSRLR <b>E</b> GAR <b>L</b> Q <b>R</b> LLQ <b>G</b> LV-NH <sub>2</sub>
<b>GRF</b>	<b>Y</b> ADAI <b>F</b> TNSYSK <b>V</b> L <b>G</b> QLSARKLL <b>Q</b> DIMSR <b>Q</b> GES <b>N</b> Q <b>E</b> RGAR <b>A</b> RL-NH <sub>2</sub>
<b>Hélodermine</b>	HSDAI <b>F</b> <b>T</b> EEYSK <b>L</b> LAK <b>L</b> AL <b>Q</b> KYL <b>A</b> S <b>I</b> L <b>G</b> SRT <b>S</b> PPP-NH <sub>2</sub>
<b>Glucagon</b>	HS <b>Q</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>F</b> <b>T</b> SDYSK <b>Y</b> LDSRRA <b>Q</b> DFV <b>Q</b> WLMNT-NH <sub>2</sub>
<b>GLP-2</b>	HADGS <b>F</b> SDE <b>M</b> NTILD <b>N</b> LAARD <b>F</b> IN <b>W</b> LI <b>Q</b> TK <b>I</b> TD-NH <sub>2</sub>
<b>GIP</b>	<b>Y</b> AE <b>G</b> <b>T</b> <b>F</b> <b>I</b> SDYS <b>I</b> AMDK <b>I</b> H <b>Q</b> QDFVN <b>W</b> LL <b>A</b> Q <b>K</b> G <b>K</b> ND <b>W</b> K <b>H</b> N <b>I</b> T <b>Q</b> -NH <sub>2</sub>

Le résidu phénylalanine (en bleu, indispensable à la liaison aux récepteurs et à leur activation) est présent chez toutes les espèces. Les résidus en rouge sont différents de ceux retrouvés dans le PACAP38.

Adapté de Vaudry *et al.*, 2009.

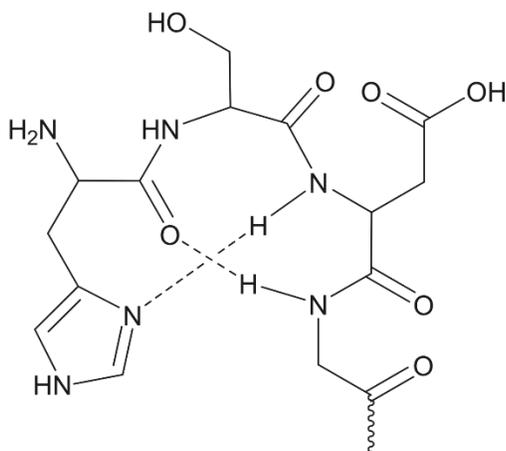
### 2.2.2. Structure secondaire

La structure secondaire du PACAP a été déterminée non seulement par des méthodes *in silico*, mais également avec des outils tels que le dichroïsme circulaire (DC) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Inooka *et al.*, 1992, Wray *et al.*, 1993). Ainsi, des études par DC ont mis en évidence que le PACAP27 adopte des conformations totalement aléatoires lorsque le peptide est en solution aqueuse, mais qu'il se replie en une structure en hélice  $\alpha$  quand il est dans un milieu mimant un environnement membranaire (Bourgault *et al.*, 2008b, Inooka *et al.*, 1992, Wray *et al.*, 1993). Ces données ont été supportées par des études structurales par RMN qui ont montré que le PACAP possède une région en hélice dont la longueur et le positionnement varient légèrement selon le milieu utilisé. Notamment, il a été montré suite à l'ajout de trifluoroéthanol (TFE), un cosolvant stabilisant les ponts H intramoléculaires d'un peptide en solution aqueuse, qu'une hélice  $\alpha$  se forme dans le PACAP entre les résidus 9-26 ou 7-27 avec une discontinuité au niveau des lysines 20 et 21 (Wray *et al.*, 1993). Aussi, des études RMN réalisées cette fois-ci dans un mélange méthanol/H<sub>2</sub>O à 25 % ont mis en évidence 3 domaines distincts au niveau du segment 9-27 : une conformation similaire à celle d'un coude  $\beta$  au niveau des résidus Ser<sup>9</sup> à Arg<sup>12</sup>, une structure de type hélice  $\alpha$  pour les régions 12-20 et 22-25 et certains segments mobiles et désordonnés (21-22 et 25-27) (Inooka *et al.*, 1992). De façon similaire, d'autres travaux, utilisant la spectroscopie RMN et un milieu composé de micelles de dodécylphosphocholine (DPC), ont révélé que le PACAP27 adopte une structure hélicoïdale s'étendant de Ile<sup>5</sup> à Ile<sup>27</sup> et que celle-ci est précédée d'un domaine N-terminal ne présentant aucune géométrie précise (Bourgault *et al.*, 2009b). Finalement, toujours par RMN, il a été montré que le domaine C-terminal 28-38 du PACAP38 se replie en hélice et qu'il est connecté au reste de la molécule par une charnière flexible (Wray *et al.*, 1993).

#### 2.2.2.1. *Asx-turn*

Bien que les études menées dans un milieu mimant un environnement membranaire suggèrent que le segment N-terminal du PACAP ne possède pas une géométrie ordonnée (Bourgault *et al.*, 2009b), certaines évaluations proposent que celui-ci adopte une conformation bioactive en coude  $\beta$ , nommé *Asx-turn*, au niveau des résidus 1 à 4 (Chou *et al.*, 1974, Doan *et al.*, 2011). Notamment, les études de relations structure-activité (RSA) ont montré, suite à l'incorporation en position 2 d'acides aminés contraints tels que la proline, l'hydroxyproline (Hyp)

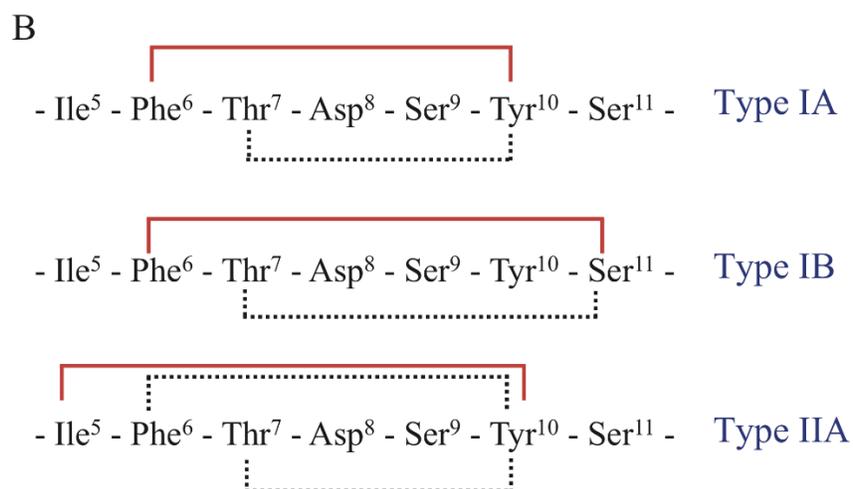
ou l'acide aminoisobutyrique (Aib), que les analogues correspondants sont des peptides aussi puissants que le PACAP endogène (Bourgault *et al.*, 2009b). De plus, la RMN de  $[Pro^2]PACAP_{27}$  révèle qu'il y a une structure en coude  $\beta$  entre His<sup>1</sup> et Gly<sup>4</sup> (Bourgault *et al.*, 2009b). Il est aussi suggéré par les études de RSA que l'un des atomes d'azote du noyau imidazole de l'His<sup>1</sup> serait impliqué dans la formation d'un pont hydrogène. Plus précisément, la structure en *Asx-turn* apparaît stabilisée par des liaisons hydrogènes entre His<sup>1</sup> et Asp<sup>3</sup>, et entre His<sup>1</sup> et Gly<sup>4</sup> (**Figure 6**). En effet, la substitution de Asp<sup>3</sup> par une N-Me-Asp réduit considérablement l'affinité et l'activité du PACAP (Doan *et al.*, 2011). D'autre part, la substitution de Gly<sup>4</sup> par une alanine n'a aucun effet tandis que son remplacement par une sarcosine (Sar), une glycine N-méthylée, produit des antagonistes du récepteur PAC1, supportant ainsi l'implication de l'atome d'azote dans la formation d'une liaison H et le concept du coude *Asx-turn* (Bourgault *et al.*, 2009b).



**Figure 6 : Représentation structurale du motif *Asx-turn* proposée au niveau du segment N-terminal du PACAP (Doan *et al.*, 2011).**

#### 2.2.2.2. Motif N-capping

Il est maintenant établi que les ligands des récepteurs de la classe B adoptent un motif structural commun, le N-capping, qui s'avère fondamental pour la reconnaissance du peptide par le récepteur et l'activation de ce dernier (Neumann *et al.*, 2008). Cet arrangement spatial est généralement retrouvé au début de l'hélice  $\alpha$  et il est caractérisé par la présence de ponts hydrogènes et d'interactions hydrophobes (**Figure 7**). Dans le PACAP, cette structure est retrouvée entre les résidus 6 et 10, et 7 et 10. En effet, il existe des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales de Phe<sup>6</sup> et Tyr<sup>10</sup> et un pont H entre la chaîne latérale de Thr<sup>7</sup> et le proton amide du squelette peptidique de la Tyr<sup>10</sup> (**Figure 7, type IA**) (Doan *et al.*, 2011). Des études RSA supportent ce postulat puisque la substitution de la phénylalanine en position 6 par une alanine réduit considérablement l'affinité du PACAP pour les 3 types de récepteurs, soit PAC1, VPAC1 et VPAC2, tandis que sa substitution par la L-cyclohexylalanine (Cha), un résidu hydrophobe non aromatique, n'a pas d'effet sur l'affinité de liaison. Par ailleurs, le remplacement de Tyr<sup>10</sup> par une L-alanine réduit significativement l'affinité de liaison pour le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2011). Des études RMN du fragment 1-21 du PACAP ont aussi révélé que les résidus 5, 6 et 10 forment un amas hydrophobe qui participe à la formation du motif N-capping (Inooka *et al.*, 1992). Le résidu Thr<sup>7</sup> serait impliqué dans l'affinité et l'activité de liaison du PACAP envers ses récepteurs. En effet, pendant que [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 démontre des affinité et activité comparables à celles du PACAP38 pour le récepteur PAC1, cet analogue lie et active VPAC1 de manière efficace, mais n'a qu'une faible affinité de liaison et une activité très limitée envers VPAC2, suggérant que le PACAP nécessite la formation d'une liaison hydrogène impliquant le résidu hydroxyle de la Thr<sup>7</sup> pour la liaison au récepteur VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). En particulier, il a été suggéré que Thr<sup>7</sup> dans le VIP est un élément clé de la liaison spécifique au récepteur VPAC2 (Igarashi *et al.*, 2002). Cela consolide l'hypothèse quant à l'implication de ce motif dans la stabilisation structurale du PACAP au moment de la liaison au récepteur et que le motif N-capping peut être différent d'un récepteur à l'autre. Par ailleurs, il existe 3 types de motifs N-capping impliquant différentes interactions hydrophobes et liaisons hydrogènes (**Figure 7**) (Neumann *et al.*, 2008).



**Figure 7 : Représentation des motifs N-capping proposés pour le PACAP (Doan *et al.*, 2011).**

La ligne rouge représente les interactions hydrophobes entre les groupements des chaînes latérales, tandis que les pointillés montrent les liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales et les protons du squelette amide.

### 2.3. Déterminants moléculaires et conformationnels du PACAP pour l'activation du récepteur PAC1

Le PACAP se lie à trois RCPGs nommés PAC1, VPAC1 et VPAC2. Plusieurs études ont amélioré notre compréhension des déterminants moléculaires et conformationnels requis pour l'activation du récepteur PAC1. Notamment, une étude réalisée par Bourgault *et al.* a mis en évidence l'importance de la région N-terminale (His<sup>1</sup> à Gly<sup>4</sup>) pour l'activité biologique du PACAP (Bourgault *et al.*, 2009b). En effet, diverses études réalisées avec plusieurs ligands de RCPGs de la classe B ont montré que la délétion de la portion N-terminale génèrent des antagonistes compétitifs, suggérant ainsi que ces résidus N-terminaux sont essentiels à l'activation de leurs récepteurs (Parthier *et al.*, 2009). Il a notamment été observé que l'histidine en position 1 est indispensable pour l'activité et l'affinité du PACAP, comme le démontrent les affinités et activités réduites des fragments 2-27 et 2-38 du PACAP (Bourgault *et al.*, 2009a, Robberecht *et al.*, 1992a). De plus, d'autres travaux dans des modèles de cellules pancréatiques ou dans des membranes de l'hippocampe de rat ont confirmé que l'élimination progressive des résidus en N-terminal cause une réduction drastique de l'activité biologique du PACAP (Gourlet *et al.*, 1991, Hou *et al.*, 1994, Robberecht *et al.*, 1992a). Par ailleurs, ces études ont permis de conclure que certains fragments C-terminaux du PACAP se comportent comme des antagonistes et qu'en particulier, l'antagoniste PACAP(6-38) possède des caractéristiques d'affinité en faisant un outil

pharmacologique très utile (Robberecht *et al.*, 1992b). En effet, il lie de manière significative le récepteur PAC1. Cependant, il n'est pas spécifique à ce dernier puisqu'il possède aussi des affinités de liaison, bien que réduites, pour VPAC1 et VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009a).

L'utilisation du *Ala-scan* et du *D-scan*, de même que l'introduction de modifications ciblées au moyen par exemple d'isostères, a mis en évidence l'importance de certains résidus dans l'affinité de liaison du PACAP et l'activation du récepteur PAC1 versus les récepteurs VPACs. Il a ainsi été montré que la fonction imidazole de His<sup>1</sup>, le groupe carboxylique d'Asp<sup>3</sup> et le noyau aromatique de Phe<sup>6</sup> sont indispensables pour la liaison et l'activation de PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). Aussi, comme observé avec l'*Ala-scan*, la substitution de Gly<sup>4</sup> par une L-alanine n'a provoqué aucune variation évidente de liaison et/ou d'activation, mais son changement par un résidu glycine N-méthylé a inhibé la capacité du PACAP à activer le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b). De façon similaire, même si la substitution de Ser<sup>2</sup> par une Ala n'affecte pas la capacité de liaison et d'activation du PACAP envers PAC1 et VPAC1, elle réduit de manière significative sa capacité de liaison et d'activation pour VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Hou *et al.*, 1994, Robberecht *et al.*, 1992a). Ces résultats ont été appuyés par les conclusions de travaux dans lesquels Ser<sup>2</sup> a été remplacée par des acides aminés contraints tels que la proline ou l'hydroxyproline (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). En outre, la présence de ponts H entre le carbonyle de His<sup>1</sup> et le proton amide de Gly<sup>4</sup>, ainsi qu'entre l'atome d'azote en position 3 du noyau imidazole de His<sup>1</sup> et le proton amide de Asp<sup>3</sup>, conférerait au peptide une conformation bioactive spécifique en « *Asx-turn* » qui serait responsable de l'activation des récepteurs du système PACAPergique (Doan *et al.*, 2011).

Comme décrit à la section 2.2.2.2, une autre structure, le motif *N-capping*, participerait également à la conformation bioactive du PACAP. Notamment, le remplacement des résidus en position 6 et 10 du PACAP par une L-alanine a atténué considérablement l'affinité de liaison envers le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). De même, la substitution de Phe<sup>6</sup> et Thr<sup>7</sup> par leur isomère de configuration absolue D, a réduit l'activité du PACAP tandis que le remplacement de Thr<sup>7</sup> par une L-alanine a rendu le peptide dépourvu de toute activité agoniste pour VPAC2. Le remplacement de Phe<sup>6</sup> par son isostère non aromatique L-Cha a donné un analogue équipotent, montrant ainsi que l'aromaticité n'est pas un paramètre essentiel à respecter pour cette position et que c'est plutôt l'hydrophobicité qui doit être privilégiée, tandis qu'une substitution avec un résidu aromatique volumineux, telle la L-biphénylalanine, a produit des superagonistes du récepteur PAC1, tout en atténuant l'affinité et l'activité au niveau des récepteurs VPACs (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011).

D'autres études au niveau des segments central et C-terminal du PACAP ont établi l'importance de Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>14</sup>, Val<sup>19</sup>, Lys<sup>20</sup>, Tyr<sup>22</sup> et Leu<sup>23</sup> pour la stabilisation de la structure secondaire du PACAP et son activité (Bourgault *et al.*, 2008b, Doan *et al.*, 2011, Gonzalez-Muniz *et al.*, 2001, Inooka *et al.*, 1992, Komi *et al.*, 2007, Kumar *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2007, Wray *et al.*, 1993). En particulier, comme démontré avec l'analogue [ $\Psi$ CH<sub>2</sub>-NH<sup>21-22</sup>]PACAP38, l'ajout d'un lien pseudo-amide entre les résidus 21 et 22, une altération moléculaire déstabilisant la structure hélicoïdale d'un ligand, a réduit considérablement l'affinité de liaison envers le récepteur PAC1 et l'activité biologique du peptide (Bourgault *et al.*, 2008a). Aussi, le remplacement de Tyr<sup>22</sup> par une lysine a produit des analogues du PACAP27 qui se sont avérés VPAC1 sélectifs (Yung *et al.*, 2003). En revanche, les travaux de Ramos-Alvarez *et al.* ont indiqué que [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 est actif tant avec PAC1 que VPAC1 (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Cependant, bien que l'alanine soit identifiée comme un excellent promoteur d'hélice  $\alpha$ , le peptide [Ala<sup>22</sup>]PACAP(6-38) ne semble pas reconnaître le récepteur PAC1 (Sun *et al.*, 2007), suggérant en conséquence l'importance de la présence combinée de Tyr<sup>22</sup> et du segment N-terminal pour la reconnaissance du ligand par le récepteur PAC1.

Enfin, certaines données montrent que le segment 28-38 facilite la liaison au récepteur PAC1 et son activation. Par exemple, le fragment 14-27 du PACAP n'est que faiblement capable de se lier au récepteur PAC1, mais il apparaît que cette perte est moins marquée avec le segment 14-38 (Vandermeers *et al.*, 1992). Il en est de même avec le fragment 3-38 qui présente une capacité de liaison réduite de 100 fois par rapport au ligand endogène, mais dont la diminution d'affinité est moins prononcée qu'avec le PACAP(3-27) (Bourgault *et al.*, 2009a). Également, un peptide chimérique formé de l'addition du fragment 28-38 du PACAP38 au VIP s'est révélé capable de se lier au récepteur PAC1 100 fois mieux que le VIP lui-même (Gourlet *et al.*, 1996a). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le segment 28-38 facilite l'ancrage du PACAP au récepteur PAC1 (Hou *et al.*, 1994, Robberecht *et al.*, 1992b, Vandermeers *et al.*, 1992).

Pour finir, des travaux au moyen d'analogues sélectifs PAC1/VPAC1 ont montré l'effet neuroprotecteur de certains des composés (Doan *et al.*, 2011). Notamment, cette étude a réaffirmé l'importance de His<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup> et Phe<sup>6</sup> dans l'affinité de liaison et l'activité biologique du PACAP envers PAC1 versus les récepteurs VPACs, ainsi que l'importance du groupe hydroxyle de la thréonine en position 7 pour la reconnaissance et l'activation du récepteur VPAC2. La variété de ces analogues constitue donc une source majeure d'informations pour la conception d'analogues PAC1 spécifiques.

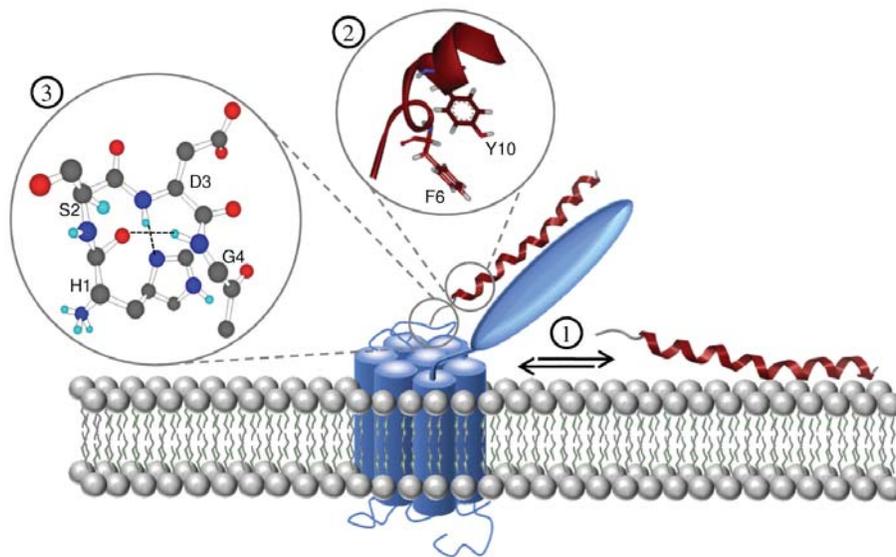
## 2.4. Les récepteurs du PACAP

### 2.4.1. Modèle d'activation des récepteurs

Il est maintenant reconnu que les ligands des récepteurs de la classe B se lient aux récepteurs par un modèle d'activation appelé « *two-step binding model* ». Rappelons que les RCPGs de cette classe sont caractérisés par un domaine N-terminal volumineux de 100 à 160 acides aminés qui correspond à un déterminant spécifique pour la liaison du ligand. En effet, comme démontré lors d'études de liaison de ligands chimériques ou tronqués, il y a une participation indépendante des domaines N- et C-terminaux des ligands. Par exemple, les peptides tronqués en N-terminal, et ce, même après le retrait de 5 acides aminés produisant ainsi le PACAP(6-38), génèrent des antagonistes ayant des affinités significatives par rapport à celle du ligand endogène, ce qui démontre que le segment N-terminal du PACAP est essentiel pour l'activation, mais pas pour la liaison (Robberecht *et al.*, 1992b). D'un autre côté, les peptides tronqués en C-terminal sont capables d'activer les récepteurs, mais avec des affinités grandement réduites (Bourgault *et al.*, 2008b, Gourlet *et al.*, 1996b, Nicole *et al.*, 2000, Yung *et al.*, 2003). Il est donc incontestable que le domaine en hélice  $\alpha$  couvrant le centre et la région C-terminale du PACAP joue, tout comme pour les autres ligands de la famille sécrétine/glucagon/VIP, un rôle clé dans le mécanisme de reconnaissance du ligand avec le récepteur, tandis que la portion N-terminale, où la flexibilité de ce segment assurerait la formation du motif *Asx-turn*, agit comme l'élément déclencheur pour l'activation du récepteur. Des études de RMN réalisées avec l'antagoniste PACAP(6-38) et le variant court du récepteur PAC1 ont montré que le segment C-terminal du PACAP se lie sous forme d'hélice  $\alpha$  à la région N-terminale du récepteur par le biais d'interactions hydrophobes et électrostatiques (Sun *et al.*, 2007). En effet, cette équipe a observé qu'il y a une interaction entre la portion 29-34 du PACAP(6-38) et le tripeptide 117-119 du domaine N-terminal du récepteur. De plus, cette même analyse par une mesure des effets nucléaires Overhauser n'a révélé aucune connectivité entre le segment 6-9 de l'antagoniste et une quelconque région du récepteur.

Bien qu'il y ait peu d'homologies de séquences entre les différents domaines extracellulaires des RCPGs de la classe B, certains résidus et ponts disulfures sont strictement conservés. Globalement, les ligands se lient en conformation hélicoïdale à la même face des domaines extracellulaires, excepté pour le récepteur PAC1 où le segment N-terminal du PACAP reste libre et montre une grande flexibilité. Ainsi, bien que le modèle précis d'activation des récepteurs

PACAPergiques présente encore quelques incertitudes, il semblerait que la structure hélicoïdale du PACAP soit stabilisée par des interactions hydrophobes et électrostatiques au niveau de la membrane cellulaire, ce qui garantirait une reconnaissance spécifique des régions centrale et C-terminale du ligand par le domaine N-terminal extracellulaire du récepteur. Il a notamment été suggéré que les glycosaminoglycane présents à la surface membranaire feraient partie du processus de stabilisation conformationnel du PACAP (Tchoumi Neree *et al.*, 2014). Ensuite, l'interaction avec le récepteur favoriserait la formation d'un coude  $\beta$  contenant un noyau hydrophobe et correspondant au motif *N-capping*, ainsi que la formation d'une structure de type *Asx-turn*, stabilisée par des ponts H, laquelle serait responsable de l'activation du récepteur (**Figure 9**) (Bourgault *et al.*, 2009b, Fournier *et al.*, 2016).



**Figure 8 : Modèle d'activation suggéré pour les récepteurs PACAPergiques suite à l'interaction avec un ligand endogène (Bourgault *et al.*, 2009a, Fournier *et al.*, 2016).**

(1) Le PACAP interagit avec la membrane cellulaire par le biais d'interactions hydrophobes et électrostatiques, favorisant ainsi la structuration du PACAP, notamment en hélice  $\alpha$ ; la portion hélicoïdale du peptide s'associe spécifiquement avec le domaine N-terminal du récepteur, ce qui permet au segment N-terminal flexible du ligand d'interagir avec les domaines extracellulaire et transmembranaire du récepteur, (2) et (3) Stabilisation structurale de la portion N-terminale du PACAP avec la formation des motifs *Asx-turn* et *N-capping*, ce qui conduit à l'activation du récepteur.

#### 2.4.2. Dimérisation des récepteurs du PACAP

Il est maintenant établi que les RCPGs peuvent former des oligomères jouant un rôle important dans les profils physiologiques et pharmacologiques des récepteurs comme la spécificité de leurs ligands respectifs, leur signalisation intracellulaire ou encore leur internalisation (Roed *et*

*al.*, 2012). Il a été démontré que les trois récepteurs du PACAP peuvent former des dimères. Tout d'abord, il a été mis en évidence que le récepteur PAC1 est retrouvé sous la forme d'un homodimère à la surface membranaire de cellules CHO transfectées. L'interaction avec le PACAP entraîne la dé-dimérisation de ce récepteur et sa relocalisation sous forme de dimère au niveau du noyau laquelle serait associée à l'activation de l'AMPc (Yu *et al.*, 2013). Cette même équipe a également observé que la dimérisation de PAC1 serait dépendante du motif HSDCIF retrouvé dans la région N-terminale du récepteur (Yu *et al.*, 2012). De plus, dans des cellules CHO, ils ont notamment mis en évidence que l'activation de PAC1 natif avec le PACAP provoquerait une meilleure réponse anti-apoptotique à une privation de sérum que les cellules transfectées avec un mutant M-PAC1 incapable de former des dimères (Yu *et al.*, 2012). Finalement, il a été conclu que les dimères de PAC1 seraient dotés d'une activité basale indépendante du ligand (Yu *et al.*, 2014).

Il a également été démontré par BRET que les récepteurs VPAC1 et VPAC2 peuvent former des homo- et des hétérodimères (Harikumar *et al.*, 2006). Cependant, la coexpression de ces récepteurs dans des CHO ou dans des COS ne semble pas influencer la liaison des ligands, ni la signalisation ou l'internalisation des récepteurs (Harikumar *et al.*, 2006, Langer *et al.*, 2006). D'autre part, il a été montré que le récepteur VPAC2 forme des hétérodimères avec le récepteur de la sécrétine (Harikumar *et al.*, 2006). Il a aussi été établi que les récepteurs VPAC1 et VPAC2 forment des hétéromères avec les RAMPs, ce qui influence la liaison et la signalisation des ligands (Langer, 2012).

#### 2.4.3. Les variants d'épissage du récepteur PAC1

Le gène du récepteur PAC1 possède 18 exons (Chatterjee *et al.*, 1997). Dix de ces exons sont exprimés de manière constitutive tandis que les autres sont régulés par épissage alternatif (Blechman *et al.*, 2013). Les nombreux variants d'épissage alternatif fonctionnel de PAC1 lui confèrent différentes activités biologiques (Lutz *et al.*, 2006). Plus précisément, 4 types d'épissage influencent les fonctions du récepteur PAC1 : (1) des différences au niveau de la région N-terminale par la suppression de 7, 21 (variant court ou  $\delta 5,6$  pour les exons épissés) ou 57 (variant très court également appelé  $\delta 4,5,6$  pour les exons épissés) acides aminés, qui altèrent la spécificité et l'affinité du ligand ; (2) la présence de 3 cassettes distinctes, deux de 28 acides aminés (hip ou d'un variant de hop1) et une de 27 acides aminés (variant de hop2) dans la troisième boucle intracellulaire, qui modifie le couplage des protéines G et l'interaction avec

d'autres seconds messagers ; (3) des variations d'acides aminés dans les domaines transmembranaires II et IV, qui changent le processus d'hétérodimérisation du récepteur avec les GRKs par exemple et (4) des variations au niveau de la région 5'UTR, qui a une incidence sur l'expression de l'ARNm du récepteur (Blechman *et al.*, 2013, Chatterjee *et al.*, 1996, Spengler *et al.*, 1993).

Dans le cerveau adulte, et notamment dans l'hypophyse, le variant *null*, qui ne contient aucune délétion ou insertion d'exons, est la forme la plus abondante, tandis que le récepteur PAC1, ayant le variant de *hop1*, prédomine dans les testicules et les glandes surrénales, ce qui suppose différentes actions pour ces variants (Blechman *et al.*, 2013, D. Vaudry *et al.*, 2009a). En effet, de nombreuses différences sont observées au niveau de l'activation des seconds messagers tels que l'AC, la PLC ou le calcium intracellulaire en fonction du variant. Par exemple, dans les cultures de neuroblastes corticaux, il a été rapporté que le PAC1-*null* stimule seulement l'AC tandis que l'isoforme PAC1-*hop1* enclenche l'activation d'AC et de la PLC (Braas *et al.*, 1996, DiCicco-Bloom *et al.*, 2000). En revanche, d'autres études démontrent que les deux isoformes sont capables d'activer la PLC de sorte que des différences peuvent vraisemblablement se manifester en fonction des modèles cellulaires utilisés pour ces travaux (Blechman *et al.*, 2013). En comparaison, l'isoforme PAC1-*hop1 $\delta$ 5,6*, contenant des délétions au niveau N-terminal et l'insertion d'une cassette dans la troisième boucle intracellulaire est capable d'induire une élévation du calcium cytoplasmique tandis que l'isoforme PAC1-*hiphop* en est incapable (Blechman *et al.*, 2013). En outre, l'épissage alternatif du PAC1 peut modifier l'affinité de liaison du ligand et l'activation des messagers intracellulaires. Par exemple, le PACAP38 a une affinité plus élevée pour le récepteur PAC1 court que le PACAP27, et active plus facilement la PLC. Également, la forme courte de PAC1 affichant une suppression de 57 acides aminés dans le domaine extracellulaire N-terminal révèle des affinités de liaison réduites pour le PACAP38 et le PACAP27, mais similaires pour le VIP (Dautzenberg *et al.*, 1999, Journot *et al.*, 1995, Lutz *et al.*, 2006, Pantaloni *et al.*, 1996). Dans le Tableau ci-dessous (**Tableau 4**), nous avons répertorié les différences fonctionnelles pour les variants du récepteur PAC1 humain. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au récepteur PAC1-*null* en raison de sa présence dans le système nerveux central (SNC) et aussi de son implication dans les troubles du SNC (King *et al.*, 2017, E. H. Lee *et al.*, 2014, D. Vaudry *et al.*, 2009a).

**Tableau 4 : Variants d'épissage du récepteur PAC1 et les conséquences fonctionnelles de celles-ci chez l'homme. Adapté de Blechman *et al.*, 2013, de Dickson *et al.*, 2009 et de Lutz *et al.*, 2006.**

Variants	Épissage alternatif	Propriétés de liaison	Conséquences fonctionnelles		
			Gαs (AMPC)	Gαq (PLC ou IP <sub>3</sub> )	Ca <sup>2+</sup>
<b>PAC1-null</b>	Contenant les exons 2 à 13 et 16 à 18	PACAP38≈PACAP27≫VIP	PACAP38≤PACAP27≫VIP	PACAP38≫PACAP27>VIP	PACAP38>PACAP27≫VIP
<b>PAC1-Hop1</b>	Insertion de l'exon 15 dans la 3 <sup>e</sup> boucle IC	PACAP38≈PACAP27≫VIP	PACAP38≤PACAP27	PACAP38≥PACAP27	ND
<b>PAC1-Hip</b>	Insertion de l'exon 14 dans la 3 <sup>e</sup> boucle IC	PACAP38≈PACAP27	PACAP38≤PACAP27	PACAP38> PACAP27≈VIP	ND
<b>PAC1-HipHop</b>	Insertion des exons 14 et 15 dans la 3 <sup>e</sup> boucle IC	PACAP38≈PACAP27≫VIP	PACAP38≤PACAP27	PACAP38≥PACAP27	ND
<b>PAC185,6</b>	Délétion des exons 5 et 6	ND	PACAP38≥VIP	PACAP38>VIP	PACAP38>PACAP27≫VIP
<b>PAC184,5,6</b>	Délétion des exons 4,5,6	PACAP38≈PACAP27>VIP	PACAP38≈PACAP27≫VIP	Pas d'activation	PACAP38>PACAP27≫VIP
<b>PAC1-Hop185</b>	Délétion de l'exon 5 dans le segment N-terminal et insertion de l'exon 15 dans la 3 <sup>e</sup> boucle IC	ND	PACAP38≈PACAP27≫VIP	PACAP38≫PACAP27≈VIP	ND
<b>PAC1-Hip85</b>	Délétion de l'exon 5 dans le segment N-terminal et insertion de l'exon 14 dans la 3 <sup>e</sup> boucle IC	PACAP38≥VIP	PACAP38>VIP	pas d'activation	ND
<b>PAC1-Hop185,6</b>	Délétions des exons 5 et 6 dans le segment N-terminal et insertion de l'exon 15 dans la 3 <sup>e</sup> boucle IC	ND	PACAP38≥VIP	PACAP38> VIP	PACAP38>PACAP27≫VIP
<b>PAC1-Hip85,6</b>	Délétions des exons 5 et 6 dans le segment N-terminal et insertion de l'exon 14 dans la 3 <sup>e</sup> boucle IC	PACAP38≈VIP	PACAP38≈VIP	PACAP38≥VIP	ND

ND, non défini ; δ type d'exon épissé

#### 2.4.4. Signalisation du récepteur PAC1 : effet antiapoptotique

Il a été démontré que le PACAP exerce un effet neuroprotecteur tant dans des conditions physiologiques que pathologiques. Par exemple, face à de nombreux agents induisant l'apoptose, le PACAP possède la propriété de contrer la mort cellulaire programmée. En effet, *via* le récepteur PAC1, le PACAP produit un effet antiapoptotique suite à l'activation de deux protéines G, soit  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_s$  qui vont réguler divers seconds messagers (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). Les voies de signalisation associées à l'effet antiapoptotique du PAC1 sont présentées dans la **Figure 10**.

Dans de nombreux modèles cellulaires, il a été observé que le PACAP induit un effet neuroprotecteur *via* la voie AMPc/PKA, comme confirmé par l'abolition de cette activité en présence d'inhibiteurs de cette voie (Mei *et al.*, 2004, Onoue *et al.*, 2002, D. Vaudry *et al.*, 2000a, Wang *et al.*, 2005). Aussi, des études, réalisées avec une lignée cellulaire issue d'un phéochromocytome de rat (cellules PC12) et des cellules granulaires cérébrales, ont montré l'implication de ERK dans l'effet antiapoptotique du PACAP suite à l'activation de l'AMPc (Journot *et al.*, 1998, Villalba *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2005). Plusieurs intermédiaires interviennent dans cette cascade de signalisation comme PKA et Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) qui vont stimuler des GTPases telles que Ras et Rap1, entraînant de ce fait l'activation de la cascade des MAPK (Journot *et al.*, 1998, Villalba *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2005). Ultimement, ERK intervient au niveau de facteurs de transcription spécifiques à des protéines antiapoptotiques telles que Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Cette dernière est bien connue pour son action régulatrice de l'apoptose *via* l'inhibition de Bax (*Bcl-2 associated X protein*). L'implication de Bcl-2 dans l'effet antiapoptotique du PACAP a été démontrée chez des souris ayant subi une ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Ohtaki *et al.*, 2006). Également, l'activation de Bcl-2 par le PACAP a été mise en évidence dans des cellules granulaires de cervelet de rat (Aubert *et al.*, 2006). Il a aussi été rapporté que le facteur de transcription C-jun est suractivé dans plusieurs modèles animaux traités à l'éthanol ou au glutamate, ou ayant subi une ischémie (Botia *et al.*, 2011, Dohi *et al.*, 2002, Racz *et al.*, 2006a). D'autre part, le PACAP régule C-jun *via* l'inhibition de JNK (*C-jun N-terminal kinase*) par la PKA dans des cellules PC-12 (Hur, 2005). Aussi, il se pourrait que l'inhibition de JNK par PKA ait un rôle indirect dans l'inhibition de BAD (*Bcl-2-associated death promoter*) après une ischémie bien que l'action du PACAP n'ait pas été clairement démontrée (Fan *et al.*, 2010, Kamada *et al.*, 2007).

D'une part, l'activation de la PKA par le PACAP dans des cellules granulaires cérébrales de rat a montré une inhibition de l'influx potassique associé à un effet neuroprotecteur (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016, Mei *et al.*, 2004). D'autre part, dans de nombreux modèles cellulaires, il a été démontré que l'apoptose est souvent associée à une réduction du potassium intracellulaire (Yu *et al.*, 1999a, Yu *et al.*, 1999b, Yu *et al.*, 1997). Ainsi, l'inhibition du courant potassique par le PACAP réduit l'activité caspasique et participe à l'effet neuroprotecteur du peptide. Récemment, il a été démontré, *in vitro* et *in vivo*, que l'effet neuroprotecteur du PACAP est associé à l'expression du gène de la sélénoprotéine T par la voie AMPc/PKA et que cette action mène à l'inhibition des ERO (Castex *et al.*, 2016, Grumolato *et al.*, 2008).

Au niveau transcriptionnel, comme révélé par exemple lors d'une dégénérescence rétinienne induite par le glutamate, le PACAP *via* ERK active le facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) qui possède des effets dans la survie neuronale (Landeira *et al.*, 2018, Racz *et al.*, 2006b). Aussi, dans des cellules de Schwann, CREB est activée par la voie PI3K/Akt *via* la stimulation de la protéine  $G_{\alpha_q}$  (Castorina *et al.*, 2015, May *et al.*, 2010). Suite à l'activation de cette protéine G, deux types de seconds messagers sont activés : la PI3K et la phospholipase C. La PLC induit l'hydrolyse d'un facteur plasmatique membranaire qui produit alors de l'inositol-1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) et du diacylglycérol (DAG) (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). L' $IP_3$  est principalement rattaché à l'activation du calcium intracellulaire qui, dans les cellules PC12, est associée à l'effet neuroprotecteur du PACAP (Mustafa *et al.*, 2010). À titre d'exemple, dans des neurones olfactifs, le calcium participe à l'inhibition de l'ouverture des canaux potassiques et à l'action neuroprotectrice du PACAP observée dans ce modèle (Han *et al.*, 2005). En parallèle, la libération du DAG entraîne la stimulation de la PKC qui, comme montré dans des cellules PC12, induit la stimulation de ERK et promeut la survie cellulaire (Barrie *et al.*, 1997, Journot *et al.*, 1995, Lazarovici *et al.*, 1998, D. L. Manecka *et al.*, 2013, Villalba *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2005). Par ailleurs, la phosphorylation de ERK serait associée à l'activation de la voie PLC/PKC et à l'endocytose du récepteur PAC1 dans les HEK293 (May *et al.*, 2014). Il a ainsi été récemment observé que la suppression de l'expression de l'ARN messenger de la  $\beta$ -arrestine 2 réduit significativement l'internalisation du récepteur PAC1 de même que la stimulation prolongée de ERK1/2, démontrant ainsi une composante endosomale, issu de l'activation du récepteur PAC1 et dépendante des  $\beta$ -arrestines (Shintani *et al.*, 2018). Pour finir, il a aussi été suggéré que la dimérisation et l'internalisation du récepteur PAC1 sont associées à l'effet anti-apoptotique (Yu *et al.*, 2014).

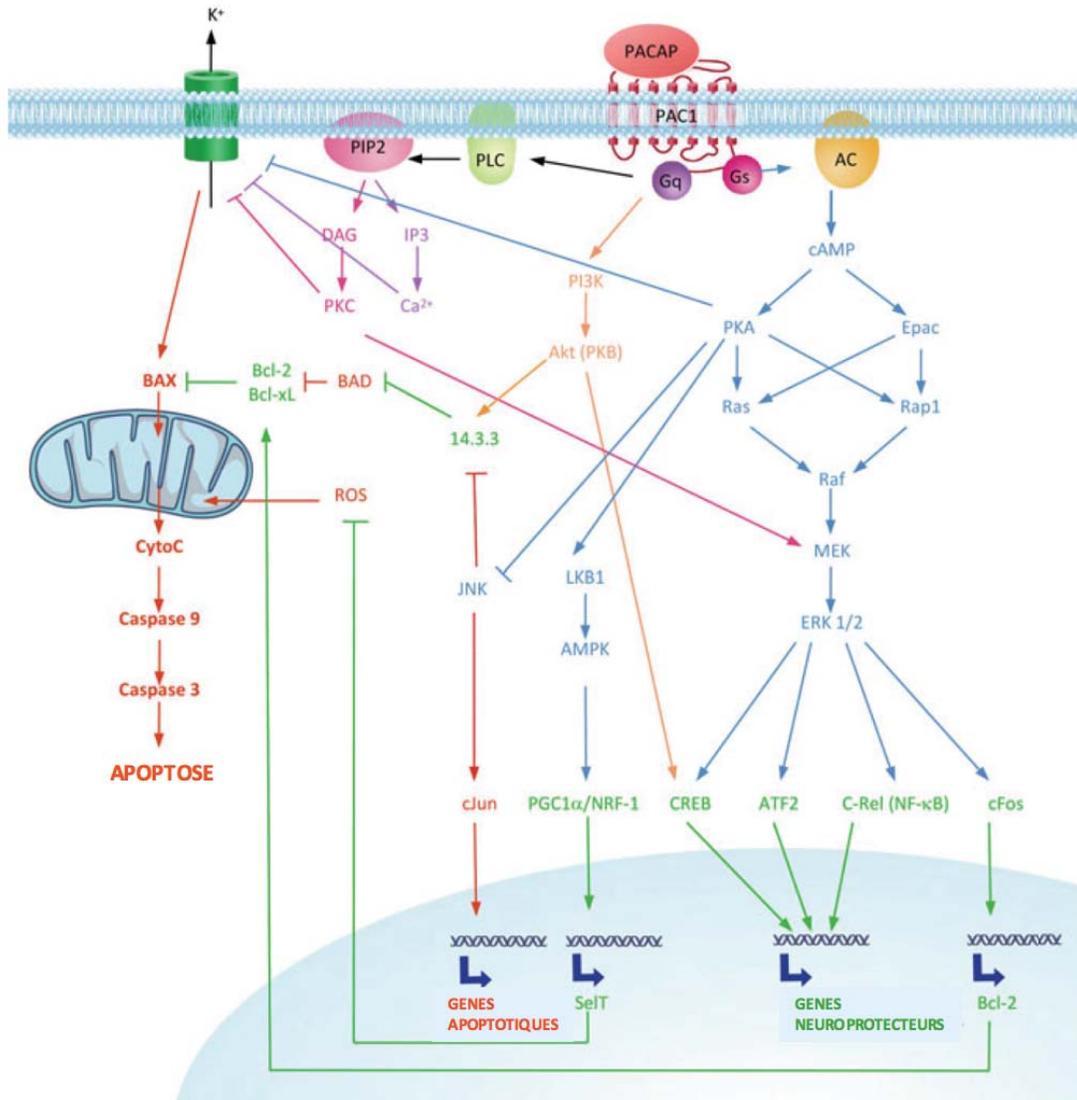


Figure 9 : Représentation des voies de signalisation associées à l'effet antiapoptotique du PACAP après activation du récepteur PAC1 (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016).

## 2.5. Distribution tissulaire du PACAP et de ses récepteurs

Le PACAP est un peptide pléiotrope et cette propriété est reflétée par sa distribution tissulaire. En effet, ce dernier présente les caractéristiques d'une hormone hypothalamique, d'un neuromodulateur, d'un facteur neurotrophique ou encore d'un neurotransmetteur. Il est exprimé dans tout le système nerveux central (SNC), notamment dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le cervelet et dans la matière grise (Arimura *et al.*, 1991, Arimura *et al.*, 1994, Hannibal, 2002). Des ARN messagers et des fibres immunoréactives du PACAP ont été mises en évidence au niveau des capillaires sanguins du système-porte hypothalamo-hypophysaire (Hannibal *et al.*, 1995a, Hannibal *et al.*, 1995b, Kivipelto *et al.*, 1992, Koves *et al.*, 1991, Koves *et al.*, 1990, Mikkelsen *et al.*, 1995, Tamada *et al.*, 1994). De plus, dans le SNC, l'isoforme prédominante du PACAP est celle de 38 acides aminés, le PACAP27 ne représentant que 10 % du contenu PACAPergique dans le tissu cérébral (Arimura *et al.*, 1991, Ghatei *et al.*, 1993, Masuo *et al.*, 1993). Dans le système nerveux périphérique (SNP), le PACAP est exprimé dans les neurones sensoriels ainsi que dans les neurones sympathiques et parasympathiques préganglionnaires (Sundler *et al.*, 1996). Le PACAP est également présent au niveau des appareils digestifs, respiratoires et cardiovasculaires, et dans de nombreux organes périphériques tels que les glandes surrénales et les testicules, ce qui suggère une grande diversité de fonctions (D. Vaudry *et al.*, 2009a).

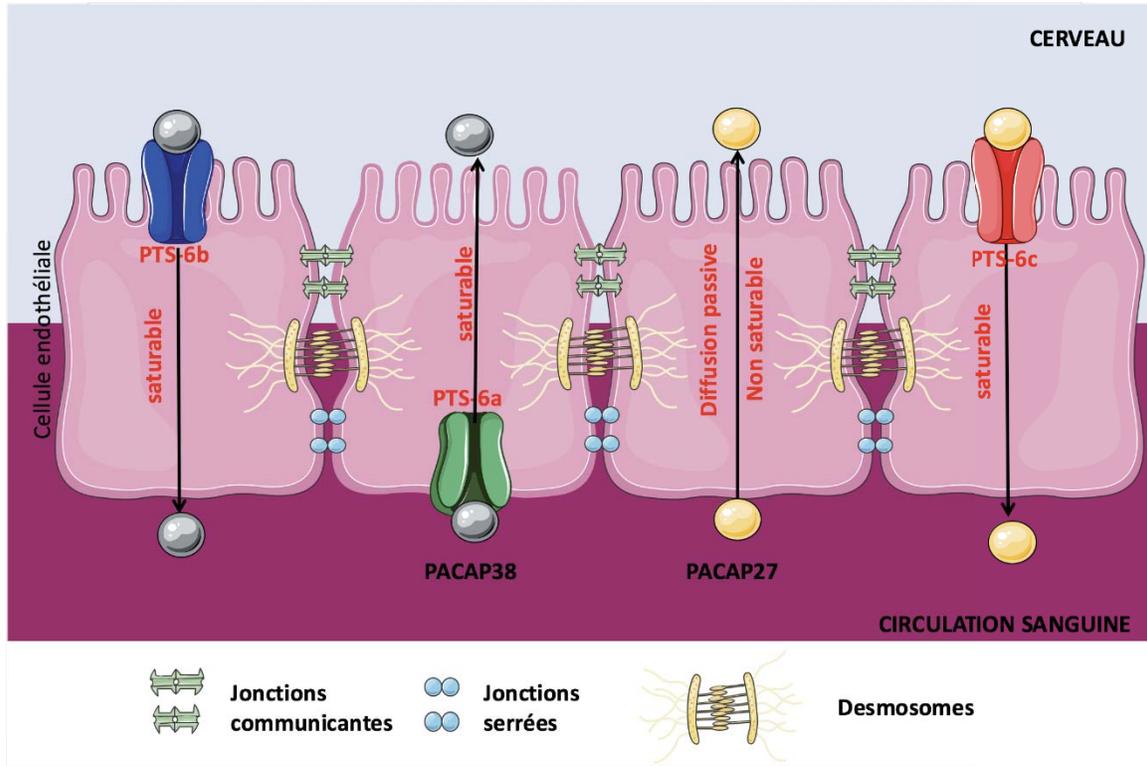
Les récepteurs du PACAP, tout comme celui-ci, sont largement distribués dans le cerveau et les organes périphériques. D'une part, au niveau du SNC, le récepteur PAC1, et en particulier PAC1-*null*, est retrouvé dans de nombreuses zones telles que le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex cérébral, le cervelet, le thalamus et la substance noire (SN) (Blechman *et al.*, 2013, Cauvin *et al.*, 1991, Masuo *et al.*, 1991, Masuo *et al.*, 1992, Suda *et al.*, 1991, D. Vaudry *et al.*, 2009a). D'autre part, les récepteurs VPACs sont exprimés dans des zones plus localisées du cerveau comme le cortex cérébral, le thalamus, l'hypothalamus et le cervelet (Basille *et al.*, 1993, Joo *et al.*, 2004, D. Vaudry *et al.*, 2009a, Vertongen *et al.*, 1997). Par ailleurs, il faut noter que les niveaux d'ARN messager (ARNm) encodant pour le récepteur PAC1 sont plus élevés que ceux encodant pour les récepteurs VPACs (Basille *et al.*, 2000). Aussi, au niveau cellulaire, les gènes des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 sont retrouvés dans les neurones, et des ARNm ont été aussi détectés dans les cellules gliales et les astrocytes (Grimaldi *et al.*, 1999, Hashimoto *et al.*, 1996, Joo *et al.*, 2004). En revanche, seul PAC1 est exprimé par les oligodendrocytes (Tatsuno *et al.*, 1990).

Au niveau périphérique, les ARNm des récepteurs ont principalement été trouvés dans les glandes endocrines (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Toutefois, la distribution des différents récepteurs serait tissus-dépendantes. En effet, des sites de liaison PAC1 sont principalement observés dans l'hypophyse, la glande surrénale, l'utérus, l'intestin, le pancréas, les testicules et les ovaires (D. Vaudry *et al.*, 2000b). En revanche, le récepteur VPAC1 est principalement retrouvé dans la plupart des tissus épithéliaux, et également dans le foie, les reins, la prostate, la rate, les poumons et les glandes mammaires. Quant au récepteur VPAC2, comme pour les récepteurs PAC1 et VPAC1, une densité significative est retrouvée dans les ganglions cardiaques et les tissus aortiques (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Aussi, le récepteur VPAC2 est abondamment exprimé dans de nombreux organes musculaires (Harmar *et al.*, 2004, D. Vaudry *et al.*, 2000b). Notamment, seul l'ARNm du récepteur VPAC2 a été détecté dans les cellules vasculaires des muscles lisses, suggérant que le récepteur VPAC2 serait à l'origine des effets vasodilatateurs observés dans ces tissus avec le PACAP (Miyata *et al.*, 1998).

## 2.6. Passage à travers la barrière hématoencéphalique

La barrière hématoencéphalique (BHE), composée de cellules endothéliales unies entre elles par des jonctions serrées, limite l'entrée de molécules provenant de la circulation sanguine dans le SNC. La BHE représente un obstacle majeur au développement de molécules à visée thérapeutique pour des pathologies touchant le système nerveux, et notamment pour le traitement des maladies neurodégénératives. En 1993, il a été démontré, chez la souris, que le PACAP, sous ces deux formes moléculaires, peut traverser cette barrière, et ce, dans les deux directions (Banks *et al.*, 1993). Dans cette même étude, il a été montré qu'un pourcentage plus élevé de PACAP27, comparé au PACAP38, accède au cerveau, après administration par voie intraveineuse (i.v.), bien que la vitesse d'influx du PACAP38 soit supérieure (Banks *et al.*, 1993). Une autre étude, réalisée en 2002, a montré que le PACAP38 traverse la BHE rapidement au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe (Nonaka *et al.*, 2002). La différence entre les deux isoformes est probablement due à leurs paramètres pharmacocinétiques. En effet, le PACAP38 peut se lier à la céruloplasmine, un facteur plasmatique, ce qui réduit sa fraction libre disponible (Tams *et al.*, 1999). Enfin, le PACAP38 pénètre le SNC par un système de transport saturable le *peptide transport system 6* (PTS-6a), tandis que le PACAP27 traverse la BHE de manière passive (Banks *et al.*, 1993). Les deux isoformes du PACAP sont également transportées du cerveau vers la circulation sanguine par des transporteurs saturables indépendants appelés

PTS-6b pour le PACAP38 et PST-6c pour le PACAP27 (**Figure 8**) (Banks, 2016, Dogrukol-Ak *et al.*, 2009).



**Figure 10 : Passage du PACAP à travers la BHE.**

Le passage du PACAP38 se fait principalement par le transporteur saturable PTS-6a, de la circulation sanguine au cerveau et le PTS-6b, du cerveau vers la circulation sanguine. Le PACAP27 traverse la BHE par diffusion passive vers le cerveau et par le transporteur PTS-6c, vers la circulation sanguine.

## 2.7. Activités biologiques

La distribution du PACAP et de ses récepteurs dans l'organisme suggère de nombreuses activités biologiques. Il est connu que ce peptide joue un rôle essentiel dans l'adaptation des organismes vivants, notamment au niveau du SNC. Ce peptide a également de nombreux effets au niveau des organes périphériques et son implication est retrouvée dans divers systèmes tels que respiratoire, digestif, cardiovasculaire et immunitaire. Au vu de la diversité des effets biologiques du PACAP, nous ne présentons qu'une revue partielle de littérature et ne citons que quelques exemples. Un résumé des effets biologiques du PACAP est fourni dans le **Tableau 5**. Par ailleurs, comme plusieurs revues présentent ses effets de manière exhaustive, le lecteur est invité à les consulter (Yukio Ago *et al.*, 2016, Canipari *et al.*, 2016, Delgado, 2016, Tamas

Juhasz *et al.*, 2016, Moody *et al.*, 2011, D. Vaudry *et al.*, 2009a, Vu *et al.*, 2016, Watanabe *et al.*, 2016).

### 2.7.1. Effet sur le SNC

Dans la littérature, ce peptide pléiotrope est décrit comme étant une hormone, un neuromodulateur, un neurotransmetteur ou encore comme un facteur trophique. Les sections suivantes vont donc définir certaines caractéristiques de ses actions.

#### 2.7.1.1. Développement embryonnaire

Le PACAP est étroitement impliqué dans le développement neuronal puisqu'il est un régulateur de la prolifération des précurseurs neuronaux et de leur différenciation, migration, maturation et survie (Watanabe *et al.*, 2016). En effet, le PACAP et son récepteur PAC1 sont exprimés lors du développement des régions neurogéniques de l'épithélium ventral, du gyrus denté et de l'hippocampe (Skoglosa *et al.*, 1999). Par exemple, durant le développement du cortex cérébral et de la moelle épinière, l'expression du récepteur PAC1 est augmentée. Durant le développement du cerveau de rat (E20-E21), l'ARNm du récepteur PAC1 est fortement exprimé dans le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cervelet (Basille *et al.*, 2000). Il a également été démontré que l'administration de PACAP chez les souris entraîne une prolifération des progéniteurs neuronaux dans la zone subventriculaire (Watanabe *et al.*, 2016) et le ventricule latéral du gyrus denté (Mercer *et al.*, 2004), ainsi qu'une augmentation significative de l'épaisseur du cervelet (D. Vaudry *et al.*, 1999). Chez des souris dont le gène du PACAP a été invalidé, la survie des cellules nouvellement divisées dans le gyrus denté et l'hippocampe est grandement réduite (Y. Ago *et al.*, 2011). En résumé, le PACAP a un effet sur la prolifération, la survie, la différenciation, la croissance des neurites, et la mobilité des cellules cérébelleuses granulaires (Watanabe *et al.*, 2016). L'ensemble de ces résultats suggère donc que le PACAP a un effet dans la neurogénèse (Mercer *et al.*, 2004).

### 2.7.1.2. Facteurs de neuromodulation et neurotransmetteurs

Dans le SNC adulte, le PACAP est retrouvé en grande quantité dans l'hypothalamus (Arimura *et al.*, 1995). Chez le rat, l'injection de PACAP par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) provoque une sécrétion de vasopressine dans le plasma (Murase *et al.*, 1993) et induit la neurosécrétion d'ocytocine, ce qui suggère une action en tant que neuromodulateur des neurones hypothalamiques magnocellulaires (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Son action en tant que neuromodulateur est confirmée par son effet sur la régulation de la sécrétion de neurohormones hypophysiotropes telle que l'hormone lutéinisante (LH) (Anderson *et al.*, 1996). De plus, *in vivo*, le PACAP peut induire la sécrétion de catécholamines des glandes surrénales isolées ou des cellules chromaffines en culture (Przywara *et al.*, 1996). D'autre part, dans les glandes surrénales, le PACAP est exprimé dans l'espace présynaptique des terminaisons nerveuses splanchniques et est cosécrété avec l'acétylcholine (ACh) dans l'espace post synaptique, tandis que les cellules chromaffines expriment les récepteurs du PACAP et de l'ACh. Ainsi, le PACAP remplit toutes les conditions pour être considéré comme un neurotransmetteur.

### 2.7.1.3. Effets sur le comportement

Il a été démontré que le PACAP peut influencer plusieurs aspects comportementaux, tels que la régulation de la faim, le rythme circadien, la mémorisation, la réponse au stress ou encore la nociception. Tout d'abord, dans la région hypothalamique contrôlant l'alimentation, de nombreux neurones exprimant le PACAP sont retrouvés (Masuo *et al.*, 1993). En accord avec cette observation, il a été démontré que des souris ayant reçu du PACAP par voie i.c.v. avaient un appétit significativement réduit (Mounien *et al.*, 2009). D'ailleurs, une augmentation de la concentration en PACAP a été observée dans l'hypothalamus, le télencéphale et le tronc cérébral de rat en état de famine, en particulier chez les mâles, alors que chez les femelles cette observation n'a été faite que dans l'hypothalamus et de manière moins importante (Kiss *et al.*, 2007).

Le PACAP a également un effet sur le rythme circadien, comme suggéré par les variations d'expression de l'ARNm du récepteur PAC1 observé durant la journée, avec des pics à midi et minuit (Cagampang *et al.*, 1998). Le PACAP stimule notamment l'expression de la mélatonine chez le rat (Simonneaux *et al.*, 1993) et interagit avec le glutamate pour moduler l'horloge circadienne (Chen *et al.*, 1999).

L'implication du PACAP dans l'apprentissage a été mise en évidence à l'aide de souris invalidées pour le PAC1, lesquelles étaient caractérisées par un déficit d'apprentissage associatif en condition de peur, sans cependant présenter de déficit d'apprentissage déclaratif lors de l'utilisation de la piscine de Morris (Otto *et al.*, 2001). De plus, des rats traités avec du PACAP par voie i.c.v. ont affiché une plus grande facilité de mémorisation à éviter un choc électrique que les animaux contrôles, démontrant ainsi une implication du système PACAPergique dans ce processus (Adamik *et al.*, 2005). Il a été mis en évidence que le niveau d'expression de ce peptide dans le liquide céphalorachidien, le gyrus frontal supérieur et le gyrus temporal moyen est diminué et qu'il est inversement corrélé à la déficience cognitive légère associée à la maladie d'Alzheimer (MCI-MA). De plus, l'expression du récepteur PAC1 est augmentée dans le gyrus frontal supérieur chez les patients MCI-MA, mais pas les patients diagnostiqués pour la MA (Han *et al.*, 2015). Récemment, le PACAP a également démontré des effets bénéfiques dans les processus de reconnaissance d'un nouvel objet et dans le labyrinthe en T chez un modèle de souris de la maladie d'Huntington (R6/1) ayant un déficit cognitif. Ces résultats étaient associés à la restauration de l'expression du récepteur PAC1 dans l'hippocampe, lequel est diminué lors de cette maladie (Cabezas-Llobet *et al.*, 2018).

Le PACAP et le récepteur PAC1 sont également impliqués dans la régulation du stress (King *et al.*, 2017). Anatomiquement parlant, le PACAP et son récepteur PAC1 sont exprimés dans plusieurs régions cérébrales régulant le stress (Ramikie *et al.*, 2016). Il a été mis en évidence qu'un stress chronique entraîne une élévation d'ARNm du PACAP et de PAC1 dans le noyau du lit de la strie terminale et serait associé à l'anxiété (Hammack *et al.*, 2009, Mustafa, 2013, Ramikie *et al.*, 2016). Il a également été montré que l'infusion de PACAP dans le noyau du lit de la strie terminale ou le noyau central de l'amygdale imite plusieurs effets reliés à une exposition au stress comme le relargage de glucocorticoïdes (Hammack *et al.*, 2015). Il a été observé que les patients diagnostiqués pour un trouble de stress posttraumatique ont des hauts niveaux sanguins de PACAP. De plus, ces niveaux sont corrélés à la réponse au réflexe de sursaut acoustique (Dias *et al.*, 2013). Aussi, les femmes semblent plus sensibles à ce syndrome où les niveaux de PACAP38 retrouvés dans le sang sont en excellente corrélation avec les manifestations cliniques bien que des niveaux sanguins élevés soient aussi retrouvés chez les hommes (Ressler *et al.*, 2011). Pour finir, il a été rapporté qu'un polymorphisme nucléotidique est retrouvé dans le gène de PAC1 et que celui-ci est significativement corrélé au diagnostic du syndrome de stress posttraumatique, en particulier chez la femme (Ressler *et al.*, 2011).

Enfin, plusieurs évidences de l'implication du PACAP dans la nociception ont été signalées. Notamment, le PACAP et ses récepteurs sont retrouvés dans le système trigéminocervical, lequel est responsable de la sensibilité aux migraines (Edvinsson *et al.*, 2018). En effet, l'administration i.v. de PACAP38 provoque des maux de tête chez les patients sains *via* la dilatation de l'artère méningée moyenne extracrânienne (Amin *et al.*, 2014, Edvinsson *et al.*, 2018). De même, chez la souris ou le rat, l'administration intrathécale du PACAP à de faibles doses cause une diminution de la latence des coups de queue tandis que des doses élevées provoquent des comportements entraînant des morsures et des égratignures, suggérant une condition de douleur. Donc, le PACAP agirait comme neurotransmetteur sensoriel dans la nociception (Davis-Taber *et al.*, 2008).

#### 2.7.1.4. Effets neuroprotecteurs

Les actions du PACAP au niveau du SNC sont multiples. Néanmoins, ce peptide est principalement connu pour ses effets neuroprotecteurs. Son efficacité dans plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* de troubles et traumatismes neurologiques comme la maladie de Parkinson (MP), la maladie d'Alzheimer (MA), l'ischémie cérébrale, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) a déjà été démontrée. En effet, le PACAP protège les cellules cérébrales contre l'apoptose induite par de nombreux agents toxiques tel que le MPP<sup>+</sup>, le MPTP, la 6-OHDA, la roténone, le peroxyde d'hydrogène, la protéine  $\beta$ -amyloïde, l'éthanol, le lipopolysaccharide (LPS), ou encore les céramides (Reglodi *et al.*, 2011). En particulier, le PACAP a été étudié dans le cas de la maladie de Parkinson puisqu'il possède une influence sur la synthèse des catécholamines et plus précisément, sur l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme permettant la synthèse de la dopamine (DA) (Houchi *et al.*, 1994, Moser *et al.*, 1999). Par exemple, son action *in vitro* et *in vivo* au niveau du mésencéphale est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la TH (Takei *et al.*, 1998). *In vitro*, il a été établi que le PACAP protège des cellules PC12 contre une surexpression d' $\alpha$ -synucléine, une protéine mutée qui forme des agrégats lors de la MP (Chung *et al.*, 2005), et la toxicité de la roténone (Wang *et al.*, 2005). Dans des neuroblastomes humains de type SH-SY5Y, le PACAP induit une neuroprotection prononcée contre la toxicité du salsolinol, un composé endogène psychoactif formé par la condensation de l'ACh et de la DA (Brown *et al.*, 2013), tandis que dans des modèles parkinsoniens de rat, il protège les neurones dopaminergiques et réduit les déficits neurologiques et comportementaux (R. Yang *et al.*, 2015). De plus, ce peptide assure un effet neuroprotecteur contre de nombreux agents neurotoxiques conduisant à des phénotypes

ressemblant à la maladie de Parkinson tels que le MPTP, la 6-OHDA et la roténone (Deguil *et al.*, 2010, Lamine *et al.*, 2016, Reglodi *et al.*, 2018, Reglodi *et al.*, 2004b, Wang *et al.*, 2005). Plus précisément, le PACAP limite les altérations comportementales induites par la 6-OHDA et réduit considérablement la perte des neurones dopaminergiques (Reglodi *et al.*, 2004a, Reglodi *et al.*, 2004b). Chez le rat, une injection de 6-OHDA provoque l'apoptose d'environ 50 % des neurones de l'aire tegmentale ventrale. Toutefois, lorsque ce traitement est effectué en présence de PACAP, aucune perte de neurones n'est observée dans cette région (Reglodi *et al.*, 2004b). De façon similaire, le PACAP induit un effet neuroprotecteur contre l'action du MPTP chez la souris et cet effet positif a été associé à l'expression du récepteur de la dopamine D2 (Wang *et al.*, 2008). Par ailleurs, il s'avère que l'expression du transporteur de monoamine vésiculaire de type 2, lequel est essentiel pour le transport de divers neurotransmetteurs incluant la dopamine, est augmentée dans le striatum en présence du peptide (Wang *et al.*, 2008).

Finalement, l'inflammation, une condition aggravante de la MP, est observée au cours de la maladie, car il y a une suractivation des microglies qui produisent alors des facteurs pro-inflammatoires affectant les neurones dopaminergiques (Jenner *et al.*, 1996). Le PACAP protège les SH-SY5Y contre l'inflammation induite par le LPS ou l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) en inhibant la production de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) et en activant la protéine CREB (Brown *et al.*, 2014).

Le PACAP a aussi manifesté son efficacité dans des modèles cellulaires de la MA. Ainsi, le PACAP27 protège les cellules PC12 contre la toxicité de la protéine  $\beta$ -amyloïde (Onoue *et al.*, 2002). Cette protéine, générée à partir d'un précurseur (APP) après clivage par la  $\beta$ -sécrétase, forme des plaques au niveau du cerveau des patients souffrant de la MA (Seeman *et al.*, 2011). Cependant, il a été démontré que le PACAP peut favoriser le clivage de l'APP en sAPP, un facteur neurotrophique et neuroprotecteur (Lannfelt *et al.*, 1995), favorisant ainsi la survie des neuroblastomes en culture (Kojro *et al.*, 2006). *In vivo*, des souris transgéniques APP, un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, ne sont pas capables de discriminer un nouvel objet d'un objet familier tandis que des souris ayant reçu du PACAP par inhalateur passent 30 % plus de temps avec un nouvel objet que leurs pairs non traités (Rat *et al.*, 2011). Tout comme pour la MP, le stress oxydatif fait aussi partie du développement de la MA et, dans un cas comme dans l'autre, le PACAP est capable de protéger des cellules granulaires cérébrales contre la toxicité d'ERO tel le peroxyde d'hydrogène (D. Vaudry *et al.*, 2002). Dans des cultures primaires de cellules neurogliales mésencéphaliques de rat, le PACAP produit un effet bénéfique en inhibant la production d'ERO induite par le LPS (S. Yang *et al.*, 2006)

Pour finir, lors de traumatismes cérébraux, l'expression du PACAP et de son récepteur PAC1 est augmentée dans les cellules neuronales, suggérant son implication dans les mécanismes de protection (Gillardon *et al.*, 1998, Stumm *et al.*, 2007). Par exemple, lors d'une ischémie cérébrale, le PACAP a montré un effet neuroprotecteur, même après 48 h, avec une réduction de l'activité caspasique et une réduction de la taille de l'infarctus cérébral d'environ 50 % (Lazarovici *et al.*, 2012), ce qui prouve sa puissance comme substance antiapoptotique et son potentiel pour un usage thérapeutique. Cette action fait intervenir diverses voies de signalisation qui sont d'ailleurs décrites à la section 2.4.3. En résumé, ces nombreuses études témoignent de la pertinence d'utiliser le PACAP comme gabarit moléculaire pour la mise au point d'un agent curatif pour le traitement de maladies neurodégénératives et d'atteintes cérébrales provenant notamment de traumatismes.

### 2.7.2. Organes périphériques

Le PACAP présente aussi de nombreuses actions périphériques. En effet, ses activités ont été décrites dans la plupart des systèmes biologiques (reproducteur, gastro-intestinal, squelettique, immunitaire, etc.) et celles-ci sont résumées dans le **Tableau 5**. Ici, nous ne présentons qu'un bref aperçu des sites d'expression et des activités biologiques qui ont été identifiés pour le PACAP. Le lecteur est invité à parcourir les revues référencées pour plus d'information.

**Tableau 5 : Effets physiologiques du PACAP sur les différents systèmes de l'organisme.**

Systeme	Localisation/Activités biologiques du PACAP	Référence
<b>Reproducteur</b>	<p>Expression :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dans les gonades et l'utérus ;</li> <li>• Lors du développement des acrosomes dans les spermatozoïdes de rat ;</li> <li>• Durant la spermatogénèse chez les rongeurs et l'humain ;</li> <li>• Dans les ovocytes et les cellules folliculaires chez le poisson-zèbre ;</li> <li>• Constante durant le cycle ovarien dans les fibres nerveuses du hile ovarien ;</li> <li>• Dans le placenta humain au moment du terme.</li> </ul> <p>Activités biologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Provoque la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig ;</li> <li>• Stimule la synthèse de progestérone ;</li> <li>• Active l'AMPc dans les cellules de Sertoli ;</li> <li>• Stimule le relargage de VEGF dans les cellules folliculo-stellaires de l'hypophyse.</li> </ul>	(Canipari <i>et al.</i> , 2016)
<b>Respiratoire</b>	<p>Activités biologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Provoque la relaxation des muscles lisses de la trachée et une bronchodilatation chez le rongeur ;</li> <li>• Maintient le tonus vasculaire pulmonaire après la naissance ;</li> <li>• Un déficit en PACAP induit une hypertension pulmonaire, un déficit respiratoire ;</li> <li>• Agit sur le corps carotidien et contrôle la respiration.</li> </ul>	(D. Vaudry <i>et al.</i> , 2009a)
<b>Gastro-intestinal</b>	<p>Expression :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dans l'œsophage, l'estomac, le duodénum, l'intestin et le foie ;</li> <li>• Récepteur PAC1 exprimé dans les cellules entérochromaffines ;</li> <li>• Récepteur VPAC1 exprimé dans les cellules gastriques ;</li> <li>• Exprimé lors de la phase céphalique durant la sécrétion d'acide gastrique.</li> </ul> <p>Activités biologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Provoque le relargage d'insuline par les cellules <math>\beta</math> ;</li> <li>• Régule la fonction des cellules <math>\beta</math> pancréatiques ;</li> <li>• Stimule la sécrétion de glucagon ;</li> <li>• Stimule le relargage d'amylase dans le pancréas exocrine ;</li> <li>• En condition pathologique, le PACAP est impliqué dans la douleur abdominale de la pancréatite ;</li> <li>• Après ingestion, le PACAP stimule le récepteur VPAC1 au niveau des cellules gastriques et provoque la sécrétion de somatostatine ;</li> <li>• Stimule la sécrétion de salive ;</li> <li>• Impliqué dans la relaxation des muscles lisses gastriques.</li> </ul>	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
<b>Cardiovasculaire</b>	<p>Expression :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les vaisseaux sanguins sont enrichis en fibres exprimant le PACAP ;</li> <li>• Les récepteurs PACAPergiques sont exprimés au niveau des artères.</li> </ul> <p>Activités biologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypertenseur après le relargage des catécholamines ;</li> <li>• Action vasodilatatrice sur des cellules musculaires lisses artérielles ;</li> <li>• Vasorelaxant au niveau de l'aorte et de l'artère coronaire ;</li> <li>• Provoque une diminution de la pression artérielle ;</li> <li>• Cause une bradycardie chez le cobaye ;</li> <li>• Provoque une tachycardie sur des préparations de cœur isolé de rat et de cobaye ;</li> <li>• Cause une fibrillation artérielle spontanée chez les chiens anesthésiés ;</li> <li>• Provoque une arythmie sur des cœurs isolés de cobayes ;</li> <li>• Augmente le débit cardiaque et la force de contraction ventriculaire.</li> </ul>	(D. Vaudry <i>et al.</i> , 2009a)
<b>Squelettique</b>	<p>Expression :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exprimé dans les canaux cartilagineux du cartilage épiphysaire porcin ;</li> <li>• Des fibres nerveuses exprimant le PACAP traversent la matrice des os durant leur formation.</li> </ul> <p>Activités biologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Impliqué dans la formation du cartilage hyalin ;</li> <li>• Réduction de l'expression du PACAP dans les articulations des cartilages durant une ostéarthrose ;</li> <li>• Influence la différenciation des ostéoblastes.</li> </ul>	(Tamas Juhász <i>et al.</i> , 2016)
<b>Immunitaire</b>	<p>Expression :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exprimé par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le thymus et les organes lymphoïdes périphériques ;</li> <li>• Exprimé par les astrocytes et les microglies.</li> </ul> <p>Activités biologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Entraîne la prolifération des astrocytes ;</li> <li>• Stimule la production d'IL-1, IL-6, protéines inflammatoires des macrophages, neurotrophine-3, CCL5/RANTES (régule l'activation des lymphocytes T) ;</li> <li>• Effets anti-inflammatoires sur les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les microglies ;</li> <li>• Inhibe l'activation de facteurs pro-inflammatoires dans des microglies activées en culture comme le TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-1 <math>\beta</math>, COX-2.</li> </ul>	(Yukio Ago <i>et al.</i> , 2016, Delgado, 2016)

## 2.8. Limite d'utilisation du PACAP

Bien que le PACAP puisse être considéré comme un agent thérapeutique potentiel pour réduire la perte neuronale lors d'un trouble neurologique, son usage n'est pas envisagé, car il présente une faible biodisponibilité, une stabilité limitée et des effets secondaires probables considérant sa non-spécificité envers le récepteur PAC1.

### 2.8.1. Stabilité plasmatique

Dans la circulation systémique, il a été mis en évidence que le PACAP est rapidement dégradé par des enzymes telles que des carboxypeptidases et des endopeptidases, de sorte que la demi-vie du PACAP38 est de moins de 2 min chez la souris, et entre 2 et 10 min chez l'homme, en fonction de l'âge (Birk *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007, Robberecht *et al.*, 1992b). Notamment, le PACAP est principalement clivé par la dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV), une aminopeptidase qui génère des fragments C-terminaux en scindant des segments dipeptidiques du côté N-terminal du peptide (Zhu *et al.*, 2003). Particulièrement, suite à ce clivage au niveau du PACAP38, deux antagonistes non spécifiques du récepteur PAC1 sont générés, soit le PACAP(3-38) et le PACAP(5-38). Cette activité enzymatique est donc problématique, car non seulement elle diminue la quantité de peptide actif disponible, mais aussi, elle produit des molécules qui réduiront les effets neuroprotecteurs associés à l'isoforme endogène (Vandermeers *et al.*, 1992, Zhu *et al.*, 2003).

La DPP-IV est exprimée de manière ubiquitaire, mais on la retrouve plus particulièrement active dans les poumons, les reins, le foie et les glandes surrénales (Mentlein, 1999), de même que dans le SNC, où elle est surtout présente au niveau de la BHE (Mentlein, 1999). Cette peptidase est cependant plus affine pour le PACAP38 que pour le PACAP27, avec une affinité réduite de 15 fois pour ce dernier (Lambeir *et al.*, 2001). Il est important de mentionner que des inhibiteurs de la DPP-IV sont actuellement utilisés en clinique, notamment en prévention du risque de crise cardiaque pour les patients atteints de diabète de type II (Bassi *et al.*, 2018). Des inhibiteurs sont également évalués en tant qu'anti-inflammatoires, entre autres en thérapie des maladies inflammatoires de l'intestin (Salaga *et al.*, 2018).

Le PACAP38 est également dégradé par l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP) exprimée à la surface cellulaire ; l'affinité de cette endopeptidase est cependant limitée à cette isoforme. En effet, une étude *in vitro* a montré que seul le PACAP38 est en mesure de produire des fragments tronqués en C-terminal sous l'action de cette enzyme (Gourlet *et al.*, 1997).

En conséquence, plusieurs avenues ont été envisagées afin d'augmenter la stabilité du PACAP. Premièrement, la sensibilité du peptide vis-à-vis de la DDP-IV a été réduite en acétylant l'amine N-terminale. Cette modification a ainsi conduit à des temps de demi-vie supérieurs à 240 min pour les deux isoformes du PACAP, alors qu'elles n'étaient précédemment que de 23 et 39 min, respectivement (Bourgault *et al.*, 2008a). Deuxièmement, comme certaines endopeptidases ciblent des doublets dibasiques comme Arg<sup>14</sup>-Lys<sup>15</sup> et Lys<sup>20</sup>-Lys<sup>21</sup>, lesquels sont retrouvés dans la séquence du PACAP, des substitutions visant à protéger ces sites ont été introduites dans la séquence (Bourgault *et al.*, 2008a). Deux analogues, *i.e.* l'acétyl-[Ala<sup>15</sup>, Ala<sup>20</sup>]PACAP38-propylamide et l'acétyl-PACAP27-propylamide ont alors été conçus sur la base de ces stratégies et, comme attendu, ils ont présenté une résistance totale face à la dégradation par la DDP-IV et une augmentation de la stabilité plasmatique avec des temps de demi-vie plasmatique de 25 min et de plus de 120 min, respectivement (Bourgault *et al.*, 2008a). Par ailleurs, l'analogue acétyl-[Ala<sup>15</sup>, Ala<sup>20</sup>]PACAP38-propylamide a montré des effets neuroprotecteurs comparables à ceux du ligand endogène chez des rats ayant subi une ischémie cérébrale (Dejda *et al.*, 2011).

### 2.8.2. Effets secondaires

Le PACAP et ses récepteurs sont exprimés de manière ubiquitaire dans de nombreux organes et tissus. Le système PACAPergique est notamment présent au niveau du système cardiovasculaire où il a été observé que le PACAP est un vasodilatateur qui provoque une tachycardie de manière concentration-dépendante (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Chez des volontaires sains, l'injection i.v. du peptide (10 pmol/kg/min) provoque une augmentation significative du rythme cardiaque (Dorner *et al.*, 1998). Sur des oreillettes isolées de cobaye, le PACAP27 et le PACAP38 provoquent une bradycardie de manière dose-dépendante (Seebeck *et al.*, 1996) tandis que l'isoforme de 27 résidus induit une arythmie, lorsqu'appliquée sur des cœurs de cobaye (Chang *et al.*, 2005). De même, chez le chien, le PACAP27 cause une fibrillation auriculaire (Hirose *et al.*, 1997). Notamment, l'utilisation chez le porc d'un agoniste du récepteur VPAC2 déclenche une vasodilatation des artères biliaires qui peut être inhibée au

moyen du PG-99-465, un antagoniste du récepteur VPAC2, confirmant ainsi l'implication de ce récepteur dans cet effet (Grant *et al.*, 2006).

Il a été montré que le PACAP est impliqué dans des effets pro et antinociceptifs (Tajti *et al.*, 2015). Par exemple, une injection systémique du peptide provoque chez un animal des comportements associés à la douleur (Edvinsson *et al.*, 2018). Également, chez certains patients recevant une injection i.v. de PACAP, des migraines ont été observées (Schytz *et al.*, 2009). Une étude complémentaire conduite avec le VIP a démontré que les volontaires sains avaient la même perception de la douleur, ainsi qu'une augmentation du débit sanguin après injection de PACAP38 ou de VIP, confirmant ainsi que ces effets passent par les récepteurs VPACs (Schytz *et al.*, 2010). Toujours en lien avec les effets délétères associés à l'activation des récepteurs VPACs par le PACAP, il a été rapporté que l'administration d'un agoniste spécifique de VPAC2 aggrave les dommages neuronaux observés après un accident vasculaire cérébral chez les rats (Darsalia *et al.*, 2013). Ces quelques observations sur la nocivité possible d'agonistes non sélectifs du PACAP confirment que le développement d'analogues PAC1-sélectifs est une stratégie prometteuse en termes d'efficacité neuroprotectrice et de limitation d'effets secondaires. Notamment, notre équipe a récemment conçu un analogue PAC1/VPAC1 sélectif, l'Ac-[Phe(pI)<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27, qui a montré dans un modèle parkinsonien de souris, par rapport au PACAP38, une réduction significative des effets sur le système cardiovasculaire, tout en maintenant une activité neuroprotectrice comparable à celle du ligand endogène (Lamine *et al.*, 2016).

Pour finir, il faut noter que la large distribution du PACAP et de ses récepteurs entraîne des effets sur de nombreux systèmes biologiques. À cet égard, il faut tenir compte que le PACAP agit sur le système endocrinien, en régulant la sécrétion de plusieurs hormones, et sur le système gastro-intestinal qui, en conditions pathologiques, peut être à l'origine de douleurs abdominales (Vu *et al.*, 2016).

### 3. La maladie de Parkinson

#### 3.1. Épidémiologie

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une détérioration du contrôle moteur (bradykinésie, tremblements, rigidité musculaire, altération de la marche et de la posture), des troubles cognitifs comme un déficit de l'attention, une altération de la mémoire de travail, une dépression, des problèmes de sommeil, des problèmes de langages ou encore une impulsivité (Berardelli *et al.*, 2001, Jankovic, 2008, Solari *et al.*, 2013). Aujourd'hui, la MP affecte 1-2 % des plus de 65 ans et 4-5 % des personnes âgées de plus de 85 ans (Dorsey *et al.*, 2007, Maiti *et al.*, 2017). Une plus grande incidence de la maladie de Parkinson est rapportée dans les pays développés et les hommes sont 1,5 fois plus touchés que les femmes (Davie, 2008). Compte tenu du vieillissement de la population, la prévalence de la maladie poursuit sa croissance. Cependant, bien qu'il y ait un lien évident entre le vieillissement et la progression de la MP, cette pathologie est reconnue comme étant multifactorielle. En effet, l'altération de certains gènes pourrait expliquer l'origine de la MP. Toutefois, l'apparition de cas sporadiques idiopathiques tend à impliquer d'autres causes, tels des facteurs environnementaux, de sorte que l'étiologie de la maladie reste encore méconnue (Cannon *et al.*, 2011, Lubbe *et al.*, 2014).

Les formes héréditaires de la MP ne constituent que de 5 à 10 % des cas, la plupart étant associés à la présence de mutations dans les gènes des protéines participant au trafic cellulaire (Klein *et al.*, 2012). D'autres types de mutation génétique sont également retrouvés dans les cas sporadiques (Lubbe *et al.*, 2014). Des mutations dans le gène de la protéine Parkin (PARK2), qui code pour une ubiquitine ligase responsable de la dégradation des protéines agrégées se formant habituellement au cours de la MP (Peker *et al.*, 2018), et des mutations dans le gène de *PTEN-induced kinase 1* (PINK1) qui régule le trafic mitochondrial, ont notamment été observées. En condition physiologique, la protéine Parkin est connue pour son activité antiapoptotique. En effet, cette dernière, par interaction avec la membrane mitochondriale, diminue son gonflement et le relargage du cytochrome C provoquant ainsi une réduction de la stimulation des caspases et donc de l'apoptose. Dans le contexte de la maladie de Parkinson, l'effet antiapoptotique de Parkin est aboli par sa mutation (Darios *et al.*, 2003). L'importance de ces deux enzymes provient de leur participation au processus de dégradation des mitochondries par autophagie (mitophagie) (Hunn *et al.*, 2015).

On retrouve aussi des mutations dans le gène SNCA encodant pour l'α-synucléine. Ceci provoque son oligomérisation et son accumulation dans les cellules, ce qui serait une des principales caractéristiques de la maladie de Parkinson (Fuchs *et al.*, 2008, Mata *et al.*, 2010). À noter que des mutations dans le gène LRRK2 encodant pour la *leucine-rich repeat kinase 2* seraient rattachées à 40 % des cas sporadiques de la MP (Healy *et al.*, 2008). De plus, des mutations observées dans le gène de la « protéine 7 de la MP », une déglycose connue sous les appellations de DJ-1 et PARK7, seraient associées au début précoce de la MP (Ariga *et al.*, 2013). Enfin, des mutations dans l'ADN mitochondrial ont été observées dans les tissus cérébraux de patients atteints de la MP (Davidzon *et al.*, 2006, Luoma *et al.*, 2004), et on estime qu'il y aurait également des mutations dans des gènes liés à l'autophagie qui seraient impliquées dans le développement de la maladie (Lubbe *et al.*, 2014).

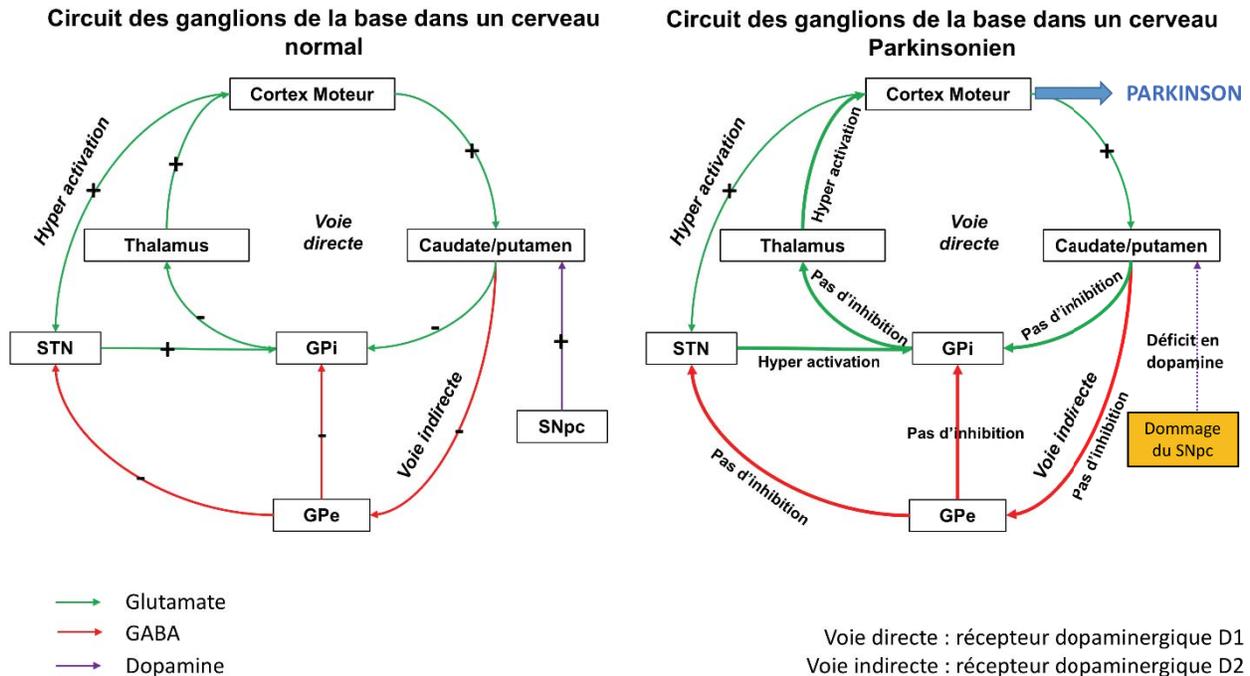
Comme souligné précédemment, des facteurs environnementaux pourraient aussi être associés au développement de certaines formes de la MP. À titre d'exemples, la vie en milieu rural, la consommation d'eau de puits ou encore le régime alimentaire peuvent notamment favoriser l'exposition à des métaux, à des solvants et à des pesticides (Cannon *et al.*, 2011). La pression qu'exerce le désir d'amplifier les rendements dans le secteur de l'agriculture favorise une utilisation accrue d'engrais et de pesticides et en parallèle, une augmentation de la maladie est observée chez les agriculteurs (1,8 fois plus importante que le reste de la population). Les évaluations épidémiologiques suggèrent donc que la MP peut être provoquée par l'exposition à divers composés industriels tels que des herbicides, fongicides, insecticides (par exemple, les organochlorés et les phosphates alkylés) (Seidler *et al.*, 1996), le manganèse (Jankovic, 2005), le paraquat (McCormack *et al.*, 2002) et la roténone (Betarbet *et al.*, 2000). L'exposition chronique à des solvants tels que l'éthanol, le méthanol ou certains nettoyants comme le trichloréthylène influencerait également la pathogenèse de la MP (Cannon *et al.*, 2011, Jollow *et al.*, 2009). Il a ainsi été montré que des travailleurs dont la tâche exigeait des expositions répétées à des hydrocarbures tels le tétrachlorure de carbone et les fluoroalkanes étaient considérés à risque (Jaques *et al.*, 2001).

Enfin, l'usage de drogues comme la méthamphétamine (METH), l'héroïne et la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), de même que l'ingestion de produits laitiers contaminés avec des pesticides ou des polychlorobiphényles, peut initier la MP (Cleeter *et al.*, 1992, Curtin *et al.*, 2015). En résumé, la liste des facteurs de risque demeure incomplète, mais il est acquis que certaines conditions de vie sont des facteurs prédisposants au développement de la MP.

### 3.2. Description anatomophysiopathologique

La MP est généralement caractérisée par des mouvements moteurs désordonnés dus à la destruction des neurones dopaminergiques dans la *pars compacta* de la substance noire (SNpc) (Jankovic, 2008). Au cours du développement de la maladie, des inclusions cytoplasmiques neuronales éosinophiles peuvent apparaître et entraîner la mort des neurones dans plusieurs aires cérébrales telles que la SN, le noyau basal de Meynert, et le *locus caeruleus* (Pollanen *et al.*, 1993, Wakabayashi *et al.*, 2007). Appelées corps de Lewy, ces inclusions sont principalement composées d' $\alpha$ -synucléine et de protéines agrégées associées aux mutations génétiques de la MP, comme décrit dans la section précédente (Wakabayashi *et al.*, 2007). Les corps de Lewy s'accumulent dans les noyaux basaux de Meynert riches en neurones cholinergiques et ceux-ci seraient associés au déclin cognitif lors de la MP (Liu *et al.*, 2015).

Il faut savoir que les mouvements moteurs sont contrôlés par les ganglions de la base (GB) formés du *striatum*, du *globus pallidus* (GP), de la SN et du noyau subthalamique (NST). Les neurones de la SN projettent leurs axones vers le *striatum*, via la voie mésostriatale, donnant ainsi lieu à un réseau dense de voies efférentes. Des études neuropathologiques ont clairement démontré que les aspects clés qui définissent la sensibilité neuronale de la MP sont : la longueur axonale, le calibre axonal et le degré de myélinisation (Braak *et al.*, 2008). De plus, lors de la maladie de Parkinson, l'absence de DA implique un dysfonctionnement des GB (**Figure 11**). En effet, la disparition de ce neurotransmetteur altère la fonction du circuit cortico-striatal. Ainsi, la perte de DA dans le SNpc et le *striatum* amène une réduction du contrôle inhibiteur des neurones striataux sur le GP et le thalamus. En conséquence, cela entraîne une hyperactivation des voies de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et du glutamate, ce qui induit de manière directe ou indirecte une hyperexcitation du thalamus. Finalement, le cortex moteur est dérégulé ce qui cause une altération de la coordination motrice et provoque le parkinsonisme (Maiti *et al.*, 2017).



**Figure 11 : Schéma simplifié des circuits neuronaux des GB à l'état normal (a) et dans la MP (b). (Maiti et al., 2017)**

GPI : *globus pallidus interne* ; GPe ; *globus pallidus externe* ; SNpc ; substance noire *pars compacta* ; STN ; noyau subthalamique. Cette figure a été traduite de Maiti et al., 2017. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 3.3. Symptômes liés à la MP

La progression des symptômes de la MP prend de 15 à 20 ans, voire plus, varie d'une personne à une autre et comprend des atteintes motrices et non motrices. Ainsi, dès le début de la maladie, les patients montrent des troubles moteurs : 70 % d'entre eux présentent des tremblements au repos, caractérisés principalement par des tremblements des mains et des pieds, généralement unilatéraux (Bhidayasiri, 2005). Ils manifestent également une rigidité musculaire qui se caractérise par des crampes ou des douleurs dans les muscles et les articulations (Berardelli et al., 1983). La bradykinésie est aussi très commune et elle entraîne une diminution des expressions faciales, des problèmes de coordination, des troubles de l'écriture et un ralentissement du débit de la parole (Berardelli et al., 2001). L'ensemble de ces perturbations motrices est caractérisé par un déficit en DA qui dérègle l'activité des GB, comme décrit dans le chapitre 1, section 3.2. On retrouve également d'autres symptômes moteurs comme une difficulté à avaler et à mâcher (Kalf et al., 2011), une dystonie musculaire (Tolosa et al., 2006), un dysfonctionnement de la sexualité (hypersexualité, problèmes d'érection et/ou

d'éjaculation) (Bronner *et al.*, 2011), et un changement dans la parole dû aux tremblements (Kalf *et al.*, 2011).

La dépression est aussi un problème commun observé chez les parkinsoniens, ce qui réduit considérablement leur qualité de vie et peut conduire à des comportements suicidaires (Kano *et al.*, 2011). En effet, une réduction des récepteurs sérotoninergiques a été observée dans le cortex préfrontal des patients atteints de la MP, et celle-ci serait corrélée avec la sévérité des tremblements au repos et de la dépression (Doder *et al.*, 2003, Guttman *et al.*, 2007, Tan *et al.*, 2011). Environ la moitié des personnes atteintes de la MP présente des dysfonctionnements cognitifs et des démences, lesquels sont corrélés avec la perte de neurones cholinergiques (Caballol *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2015). Enfin, 80 % des parkinsoniens ont des troubles du sommeil causés non seulement par les différents troubles moteurs, mais également par des hallucinations et/ou des cauchemars (Mao *et al.*, 2017). Pour finir, d'autres manifestations non motrices incommodes ont été décrites telles qu'un dysfonctionnement cardiaque, des troubles gastro-intestinaux et des problèmes urogénitaux. Cependant, elles ne proviendraient pas directement de la pathologie, mais seraient plutôt liées à des effets secondaires associés à la prise de certains médicaments (Pathak *et al.*, 2006, Poewe, 2008).

### 3.4. Dégénérescence cellulaire durant la MP

Les causes de la dégénérescence cellulaire lors de la MP sont multiples, et ce chapitre en résume sommairement les événements responsables. Il a cependant été rapporté que le déclenchement de l'apoptose durant la MP est causé par plusieurs facteurs comme l'agrégation protéique causée par des mutations génétiques, la neuroinflammation, le stress oxydatif, un dysfonctionnement mitochondrial ou encore un stress du RE (Maiti *et al.*, 2017). Cependant la chronologie de ces événements ne semble pas avoir été entièrement élucidée.

#### 3.4.1. Apoptose des neurones dopaminergiques

Une des principales caractéristiques de la MP est la dégénérescence des neurones dopaminergiques produite par mort cellulaire programmée, *c.-à-d.* l'apoptose. Les premiers indices de l'implication de l'apoptose dans la mort de ces neurones datent de 1991 suite à l'utilisation du 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), le métabolite actif du MPTP (Dipasquale *et al.*, 1991). La participation de l'apoptose au cours de la MP était initialement controversée due

aux limitations techniques de détection de l'époque (Dauer *et al.*, 2003, Hirsch *et al.*, 1999, Maiti *et al.*, 2017, Vila *et al.*, 2003). Toutefois, par la suite, des études *post mortem* réalisées sur des échantillons de cerveaux murins et humains ont mis en évidence une condensation de la chromatine, le clivage de l'ADN et le déclenchement anormal de la cascade de signalisation de l'apoptose par les mitochondries (Hirsch *et al.*, 2009, Vila *et al.*, 2008). Notamment, lors de l'apoptose des neurones dopaminergiques, il a été décrit que la caspase-3 est un effecteur majeur (Hartmann *et al.*, 2000), ainsi que les caspases 8 et 9, comme démontré par immunomarquage dans des échantillons de neurones dopaminergiques nigrostriataux (Hartmann *et al.*, 2000, Viswanath *et al.*, 2001). De plus, une surexpression de l' $\alpha$ -synucléine, telle qu'observée dans des cas sporadiques de la MP, est corrélée *in vivo* avec une activation des caspases 3 et 9 dans les neurones dopaminergiques de rat (Yamada *et al.*, 2004). Aussi, la surexpression de l' $\alpha$ -synucléine dans des neurones en culture déclenche l'apoptose (Saha *et al.*, 2000), tandis que sa sous-expression protège les neurones de la toxicité du MPTP *in vivo* (Hayashita-Kinoh *et al.*, 2006). Certaines mutations, comme celle du gène LRRK2, causent l'apoptose dans des cultures de neurones primaires, des neuroblastomes ou des cellules nerveuses de la drosophile. Aussi, l'abolition de l'expression de DJ-1 provoque une augmentation des ERO et un déclenchement de l'apoptose (Ariga *et al.*, 2013).

Par ailleurs, même si les mécanismes provoquant l'activation massive de l'apoptose ne sont pas encore entièrement connus, il est établi que la voie apoptotique mitochondriale joue un rôle majeur. En effet, la voie apoptotique mitochondriale Bax-dépendante est impliquée dans la mort des neurones dopaminergiques induite par le MPTP (Perier *et al.*, 2007). Notamment, celle-ci est déclenchée par la translocation de p53 dans le noyau par JNK, laquelle est activée après l'administration par exemple de MPTP ou de 6-OHDA (Ries *et al.*, 2008, Saporito *et al.*, 1999). De plus, les mutations génétiques retrouvées dans la MP causent la mort des neurones par la voie apoptotique mitochondriale provoquée par l'activation de Bax (Seo *et al.*, 2002). L'agrégation d' $\alpha$ -synucléine ou la mutation de LRRK2 entraîne ainsi le relargage du cytochrome C et le déclenchement de l'apoptose (Iaccarino *et al.*, 2007, Parihar *et al.*, 2008). En marge de la mitochondrie, le RE joue aussi un rôle dans le déclenchement de l'apoptose lors de la MP puisque cette organelle est essentielle à la synthèse, au repliement et aux modifications post-traductionnelles des protéines.

Des kinases, telle la Cdk5, participent aussi au processus d'évolution de la MP. En effet, Cdk5 devient surexprimée chez les souris traitées avec le MPTP. Cette kinase réduirait l'activité du facteur de transcription prosurvie MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), l'action de l'enzyme

réparatrice de l'ADN Ape1 (*apurinic/aprimidinic endonuclease 1*) et augmenterait le stress oxydatif par l'inhibition de l'enzyme antioxydante Prx2 (péroxyrédoxine 2). Pour finir, elle régulerait l'activité de certaines ubiquitine ligases, l'agrégation protéique et serait en partie responsable de la formation des corps de Lewy (Binukumar *et al.*, 2015).

En résumé, l'ensemble des signaux apoptotiques tels que l'activation des récepteurs de mort (*FAS receptor; Tumor Necrosis Factor-Receptor 1*), l'apparition des protéines de la famille Bcl-2 (Hoang *et al.*, 2009), la production de protéines cytoplasmiques (Apaf-1, caspases...) (Viswanath *et al.*, 2001), la fragmentation mitochondriale, ou encore la mobilisation de p53, sont observés dans la maladie de Parkinson et plus précisément dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Venderova *et al.*, 2012). Toutefois, la mort des neurones dopaminergiques lors de la MP peut également être causée par autophagie ou par nécrose. Ces sujets ne sont pas abordés dans ce document, mais leurs mécanismes respectifs sont décrits dans quelques revues (Maiti *et al.*, 2017, Venderova *et al.*, 2012).

#### 3.4.2. Stress oxydatif

Que ce soit dans les cas idiopathiques ou génétiques de la MP, on retrouve une augmentation du stress oxydatif. Il faut savoir que le stress oxydatif se produit lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production d'ERO et l'activité antioxydante des cellules. Entre autres, dans la SN des patients parkinsoniens, les niveaux de lipides (Bosco *et al.*, 2006), protéines et ADN (Nakabeppu *et al.*, 2007) oxydés sont augmentés alors que les concentrations de glutathion sont réduites (Zeevalk *et al.*, 2008). Les causes de la génération des ERO délétères aux cellules sont multiples et peuvent résulter du métabolisme de la DA, d'un dysfonctionnement mitochondrial ou d'une neuroinflammation.

Dans un premier temps, les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles au stress oxydatif en raison de la présence d'enzymes génératrices d'ERO, telles que la TH et la monoamine-oxydase (MAO) (Maiti *et al.*, 2017). De plus, ces neurones contiennent du fer pouvant générer des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène, contribuant ainsi au stress oxydatif (Halliwell, 1992). La DA oxydée serait aussi un facteur aggravant du stress oxydatif et de la dégénérescence cellulaire, comme proposé suite à l'observation de la neuromélanine, le produit final de l'oxydation de la DA, qui s'accumule dans la région nigrale des cerveaux humains (Zecca *et al.*, 2003). Normalement, la DA est stockée dans des vésicules, mais lors de la MP, celle-ci est retrouvée oxydée dans le cytosol (Burbulla *et al.*,

2017). Il a ainsi été montré, au moyen de souris exprimant un faible niveau du transporteur de la monoamine, qu'il y a une augmentation de la DA cytosolique oxydée et que celle-ci est corrélée avec la perte des neurones dopaminergiques nigraux (Caudle *et al.*, 2008). Cette oxydation de la DA produit également des modifications protéiques très significatives, dont une altération de l' $\alpha$ -synucléine qui provoque alors la formation d' $\alpha$ -synucléine protofibrillaire cytotoxique (Conway *et al.*, 2001), qui elle-même induit une perméabilisation vésiculaire causant l'aggravation de l'accumulation de DA cytosolique (Lotharius *et al.*, 2002). La DA oxydée provoque aussi l'inactivation de l'activité ubiquitine ligase de Parkin, entraîne son insolubilité (LaVoie *et al.*, 2005), en plus d'occasionner l'inactivation de son transporteur et de la TH (Meiser *et al.*, 2013). Enfin, elle peut aussi interagir avec l'enzyme mitochondriale DJ-1 et induire son inactivation, ce qui engendre un dysfonctionnement mitochondrial (Choi *et al.*, 2006).

En outre, le dysfonctionnement mitochondrial est une autre source de stress oxydatif. En condition normale, la génération de radicaux tels que le peroxyde d'hydrogène et l'ion superoxyde est court-circuitée par la mitochondrie (Maiti *et al.*, 2017). Lors de la MP, une augmentation importante d'ERO est observée due à l'inactivité mitochondriale, causant ainsi le relargage du cytochrome C et le déclenchement de l'apoptose. En effet, la mutation de PINK1 entraîne une réduction du niveau d'ADN mitochondrial, une diminution de la production d'ATP et la génération de radicaux libres (Abramov *et al.*, 2011). Il a aussi été montré que des souris KO (knock-out) pour DJ-1 accumulaient plus d'ERO dans le cerveau (Lopert *et al.*, 2014).

Enfin, il a été mis en évidence *in vitro* que la neuromélanine libérée lors de la MP cause l'activation des microglies. Ces cellules sont aussi activées en présence d'agents oxydants tels les quinones et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui sont habituellement éliminés par les astrocytes qui protègent les neurones par la production de glutathion. À noter qu'il a été rapporté que Parkin et DJ-1 régulent la translocation nucléaire de facteurs de transcription associés à l'expression d'enzymes antioxydantes dans les astrocytes, de sorte qu'un lien évident se tisse entre le stress oxydatif et la neuroinflammation (Hald *et al.*, 2005).

### 3.4.3. Neuroinflammation

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication d'un processus inflammatoire dans le développement de la MP. Par exemple, en condition normale, Parkin est impliquée dans la régulation de NF- $\kappa$ B (*necrotic factor- $\kappa$ B*) et dans la régulation négative de gènes pro-inflammatoires, incluant ceux de cytokines et de chimiokines (Newman *et al.*, 2018). La protéine DJ-1 régule également divers signaux tels que p38 MAPK, STAT1 et la production d'ERO afin de réduire l'inflammation (Waak *et al.*, 2009). Un grand nombre d'ARNs messagers encodant pour des cytokines inflammatoires sont également retrouvés dans les cerveaux de souris invalidés pour le gène de la protéine PINK1 (Kim *et al.*, 2013). Ainsi, cela suppose que les mutations de ces protéines lors de la MP ont un rôle majeur dans les processus inflammatoires.

Également, l'expression de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), une enzyme pro-inflammatoire, a été observée *post mortem* dans les cerveaux parkinsoniens humains et murins (Bartels *et al.*, 2010). En particulier, il a été démontré que COX-2 provoque l'augmentation des niveaux de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et cause ainsi une neurodégénération (Teismann, 2012). Il est maintenant établi que PGE<sub>2</sub> induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires, comme IL-6, dans de nombreux types cellulaires tels les astrocytes (Fiebich *et al.*, 1997). En particulier, des augmentations parallèles d'IL-6 et de COX-2 ont été observées (Hinson *et al.*, 1996, Rojanathammanee *et al.*, 2011). L'activation des microglies et des astrocytes dans le striatum et la région nigrale de patients parkinsoniens serait majoritairement responsable de la réponse inflammatoire dans le SNC (Joe *et al.*, 2018). Les microglies sont des cellules immunitaires du système nerveux indispensables à la régulation des processus inflammatoires dans le cerveau. Il existe deux sous-types de microglies : les M1, qui sont associées à la production de cytokines pro-inflammatoires ; et les M2, qui produisent des cytokines anti-inflammatoires. Durant la MP, une suractivation des microglies responsables de la dégénérescence dopaminergique est observée (Stephenson *et al.*, 2018). Notamment, le phénotype M1 est majoritairement activé dans les cerveaux parkinsoniens et il participe ainsi à l'augmentation de l'expression d'un groupe de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (*tumor necrotic factor  $\alpha$* ), l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'IL-6 et l'IL-12. Ce phénomène contribue à l'accélération de la perte des neurones dopaminergiques (Stephenson *et al.*, 2018). Par exemple, durant la neurodégénérescence observée suite à l'administration de MPTP, on note un accroissement du nombre de cytokines pro-inflammatoires et celui-ci est corrélé avec la perte des neurones dopaminergiques chez l'animal (Meredith *et al.*, 2011). Il est à souligner qu'au cours de la

progression de la MP, des molécules comme l' $\alpha$ -synucléine, l'ATP et la métalloprotéinase-3 (MMP-3), libérées durant la dégénérescence des neurones, peuvent renforcer la stimulation des microglies, créant un cercle vicieux favorisant la neurodégénérescence. Aussi, la réduction dans la SN de l'histone méthylase *jmjd3*, indispensable à la polarisation des microglies, provoque leurs suractivations et la mort des neurones dopaminergiques dans les modèles animaux (Tang *et al.*, 2014).

Les astrocytes sont également impliqués dans la neuroinflammation lors de la MP. Tout comme les microglies M1, elles produisent des cytokines pro-inflammatoires en réponse à des stimuli comme le LPS (Liddel *et al.*, 2017). Elles peuvent également être activées par des médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les microglies. Il a par ailleurs été observé que des astrocytes primaires en culture, traités avec de l' $\alpha$ -synucléine, voient augmenter leur expression de TNF- $\alpha$  et d'IL-6. L'astrogliogenèse est caractérisée par l'augmentation de la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP) et cette manifestation a été rapportée dans des études précliniques et cliniques de la MP (Clairembault *et al.*, 2014). Aussi, la surexpression de l' $\alpha$ -synucléine provoque l'amplification de l'astrogliogenèse et de la microgliogenèse et aggrave la neurodégénérescence dopaminergique (Bruck *et al.*, 2016). En conséquence, la gliogenèse peut induire une neurotoxicité en perturbant le réseau neuronal et en induisant une plasticité inadaptée qui entraîne ainsi des lésions tissulaires (Papa *et al.*, 2014). La gliogenèse induit également le relargage de cytokines pro-inflammatoires, d'oxyde nitrique et d'ERO (H. J. Lee *et al.*, 2010, Qian *et al.*, 2008).

Pour finir, les lymphocytes T sont aussi des partenaires du processus neuroinflammatoire. Par exemple, dans des cerveaux *post mortem* de patients parkinsoniens, on peut observer une infiltration de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Brochard *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que le sous-type D3R du récepteur de la DA, exprimé sur les CD4<sup>+</sup>, joue un rôle prépondérant dans la dégénérescence dopaminergique puisque des souris déficientes en D3R sont résistantes au MPTP (Gonzalez *et al.*, 2013). L'injection de cellules T CD4<sup>+</sup> à ces mêmes souris provoque l'apparition d'un parkinsonisme suite à un traitement au MPTP. Finalement, la stimulation du D3R entraîne l'accumulation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, dit «*helper*», de type 1 (Th1) et de type 17 (Th17), reconnus pour être pro-inflammatoires (Contreras *et al.*, 2016). Prises dans leur ensemble, ces données démontrent le rôle du récepteur D3R et des lymphocytes T dans le développement de la neuroinflammation lors de la MP (Stephenson *et al.*, 2018).

#### 3.4.4. Excitotoxicité

La DA est un neurotransmetteur qui maintient l'excitation du noyau subthalamique (NST) à son niveau basal en inhibant l'activité glutamatergique du *caudate putamen* au thalamus (**Figure 11**) (Maiti *et al.*, 2017). Cependant, durant la MP, la déficience en DA induit une surexcitation du NST et une hyperactivation du système glutamatergique (Rodriguez *et al.*, 1998) de sorte qu'il y a une accumulation de glutamate dans l'espace postsynaptique, ce qui provoque une surexpression des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et l'entrée massive de calcium dans la cellule (Perier *et al.*, 2007). Un excès en calcium intracellulaire cause un stress mitochondrial (Perier *et al.*, 2005), une activation des microglies, ainsi qu'une réaction inflammatoire prolongée (Hirsch *et al.*, 2009), soit un ensemble de conditions propices pour induire la mort cellulaire.

La vulnérabilité intrinsèque des neurones dopaminergiques, associée à un déficit mitochondrial, au stress oxydatif et à une déficience de la machinerie protéolytique, représente un terrain favorable pour l'activation de l'excitotoxicité et une progression de leur mort (Ambrosi *et al.*, 2014). En effet, l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine augmente l'activation des récepteurs glutamatergiques et la transmission synaptique, perturbant ainsi l'homéostasie calcique intracellulaire dans des cultures neuronales (Huls *et al.*, 2011). Il a aussi été montré que Parkin régule la fonction et la stabilité des synapses glutamatergiques (Helton *et al.*, 2008). En conséquence, la mutation de Parkin provoque une prolifération du nombre de ces synapses, ce qui cause la vulnérabilité des neurones et une excitotoxicité accrue (Helton *et al.*, 2008).

Le processus neuroinflammatoire, qui est en grande partie responsable de la neurodégénérescence, provoque une exacerbation de l'effet cytotoxique du glutamate. En effet, l'activation des microglies contribue au relargage de glutamate et potentialise la réponse des récepteurs NMDA (Barger *et al.*, 2007, Noda *et al.*, 2013). En parallèle, il a été montré dans les cerveaux de rat, que les microglies expriment les récepteurs glutamatergiques et que leur activation est responsable du relargage de cytokines pro-inflammatoires (M. Lee, 2013). Cela suggère la présence d'une rétroaction des processus neuroinflammatoires et cytotoxiques instaurant *de facto* un cercle vicieux et l'aggravation de la maladie.

Aussi, le dérèglement du système GABAergique provoque une augmentation de l'influx calcique qui, à son tour, cause une excitotoxicité conduisant à la mort des neurones de la SNpc (Blaszczyk, 2016). Enfin, d'autres mécanismes, comme le métabolisme du tryptophane, seraient aussi impliqués dans le processus d'excitotoxicité, comme le suggère l'hyperstimulation des

récepteurs NMDA par un métabolite du tryptophane tel que l'acide quinoléique (Lugo-Huitron *et al.*, 2013).

Pour conclure, l'ensemble de ces mécanismes engendre une vulnérabilité des neurones dopaminergiques et leur dégénérescence. De plus, comme ces mécanismes s'autorégulent, ils provoquent un diallèle et l'aggravation de la maladie.

### 3.5. Modèles expérimentaux de la MP

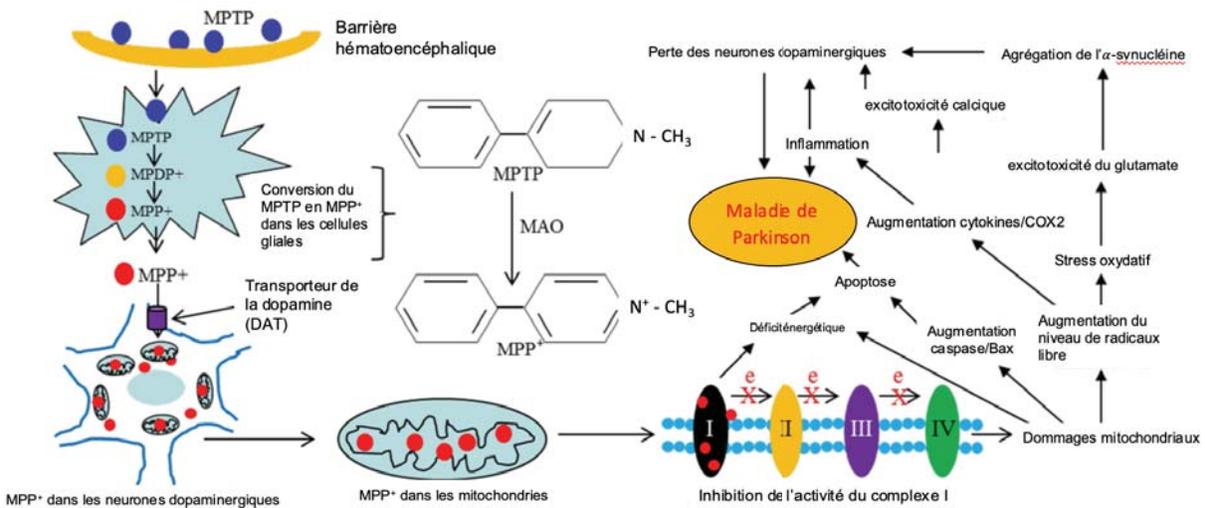
Les modèles animaux de la MP sont des outils importants pour mieux comprendre l'étiologie de la maladie et tester de nouveaux traitements. Il existe des modèles développés sur la base des mutations génétiques retrouvées dans la MP, et d'autres obtenus par exposition à des agents neurotoxiques. Les rongeurs sont particulièrement utilisés comme modèles expérimentaux de la MP. En effet, leur cerveau est très similaire à celui de l'humain au plan neuro-anatomique. De plus, la fonction et la connectivité des noyaux cérébraux les plus touchés dans la MP comme la SN, le *locus caeruleus*, le noyau du raphé, et l'aire tegmentale ventrale sont comparables. D'autres modèles animaux, tant vertébrés qu'invertébrés, sont aussi disponibles et le poisson-zèbre en est un dont l'usage est en croissance. Bien sûr, chaque modèle de la MP a ses avantages et ses inconvénients dépendamment des aspects de la maladie qui sont étudiés (neuroprotection, neurodégénérescence, dyskinésie, progression de la maladie, etc.) (Blesa *et al.*, 2014). Dans cette partie, nous parlerons principalement de l'agent neurotoxique 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) utilisé pour induire la MP, et du poisson-zèbre comme modèle expérimental de la MP. Pour plus d'informations sur les différents modèles animaux (génétiques ou induits par des neurotoxines), le lecteur est invité à lire les revues référencées (Blesa *et al.*, 2014, Creed *et al.*, 2018, Luk *et al.*, 2014).

### 3.5.1. Agent neurotoxique : le MPTP

Au cours des années, de nombreux agents neurotoxiques ont été utilisés pour reproduire des caractéristiques de la MP. Leur utilisation représente une stratégie efficace pour étudier des manifestations de la neurodégénérescence comme la perte des neurones dopaminergiques et l'apparition des corps de Lewy (Blesa *et al.*, 2014). Classiquement, la 6-OHDA et le MPTP sont les plus en usage. Néanmoins, d'autres molécules comme des pesticides ou des psychostimulants ont également été utilisés (Blesa *et al.*, 2014).

Le MPTP, dont la structure lipophile lui confère la capacité de traverser la BHE (Burns *et al.*, 1984), est un très bon outil pour mimer des paramètres pathologiques de la MP tels que la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Cet agent neurotoxique permet d'étudier divers mécanismes associés à la maladie, et il est notamment actif chez plusieurs espèces incluant l'homme, la souris, le rat, le singe et le poisson-zèbre (Makhija *et al.*, 2014, Tieu, 2011). Une fois dans le cerveau, le composé est converti en 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (MPDP) par la MAO-B libérée par les astrocytes et les neurones sérotoninergiques (Chiueh *et al.*, 1984, Markey *et al.*, 1984), puis il est rapidement oxydé pour former le métabolite toxique MPP<sup>+</sup> (Markey *et al.*, 1984). Ce dernier, *via* le transporteur de la DA (DAT), va entrer dans les neurones dopaminergiques et bloquer le complexe I de la chaîne mitochondriale. Comme illustré à la **Figure 12**, cela provoque un dysfonctionnement cellulaire et la mort des neurones suite à l'activation de la cascade apoptotique, d'un stress oxydatif, d'une excitotoxicité et d'une inflammation (comme décrit à la section 3.4) (Singer *et al.*, 1988). Notamment, des souris traitées avec 25 mg/kg/j de MPTP par voie s.c., durant 5 jours, présentent une perte de 80 % de leurs neurones dopaminergiques dans la SNpc (Alexander, 2004). Dans un même temps, l'exposition à cet agent augmente la production de glutamate et engendre une excitotoxicité par le calcium (Dong *et al.*, 2009).

La faiblesse de ce modèle réside dans l'absence de formation de corps de Lewy (Halliday *et al.*, 2009, Shimoji *et al.*, 2005), bien que des études ont montré l'expression d' $\alpha$ -synucléine (Dauer *et al.*, 2002, Purisai *et al.*, 2005, Vila *et al.*, 2000). Les effets comportementaux sont également variables en fonction de l'espèce, et en particulier chez la souris (Taylor *et al.*, 2010).



**Figure 12 : Mécanisme de dégénérescence des neurones dopaminergiques par le MPTP (Maiti et al., 2017).**

Le MPTP traverse la BHE et est converti en MPP<sup>+</sup> par les cellules gliales du cerveau. Le MPP<sup>+</sup>, via le transporteur de la DA, entre dans les neurones dopaminergiques et induit des dommages au niveau de la mitochondrie, provoquant ainsi une baisse d'énergie, un stress oxydatif, de l'excitotoxicité par le glutamate et le Ca<sup>2+</sup>, l'agrégation d'α-synucléine et la mort des neurones dopaminergiques. Cette figure a été traduite de Maiti et al., 2017 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 3.5.2. Le poisson-zèbre comme modèle expérimental de la MP

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un modèle animal en émergence qui est utilisé pour étudier les causes génétiques et évolutives de diverses maladies neurologiques (Best et al., 2008, Kalueff et al., 2014). Ce modèle, en raison de la faible pigmentation des poissons, permet une observation directe des organes et des processus physiologiques et cellulaires. Il permet l'obtention de résultats rapides de par leur petite taille (5 cm à l'âge adulte et 5 mm à 7 jours post fertilisation, j.p.f.) et leur grande fertilité. Ainsi, les manipulations peuvent être réalisées en plaque de 96 puits et permettent d'utiliser de très faibles quantités de composés à étudier.

En plus d'être un vertébré, l'organisation génomique du poisson-zèbre et les voies génétiques contrôlant la transduction des signaux et du développement sont très semblables à celles de l'homme (Williams et al., 2011). Il est maintenant établi que les poissons-zèbres présentent de nombreuses réponses neurologiques, telles que cognitives et motrices, contrôlées par un système nerveux central, ce qui en fait un candidat de choix pour l'étude de maladies neurodégénératives (Kalueff et al., 2014). L'organisation cérébrale est particulièrement similaire à celles des autres vertébrés avec des zones définies comme le diencephale, le télencéphale, le

cervelet ou encore la colonne vertébrale (Kalueff *et al.*, 2014), bien que des différences évidentes résident dans la taille des hémisphères cérébraux et la disposition du cerveau antérieur (Wullimann *et al.*, 2004). Les poissons-zèbres possèdent également des systèmes de neurotransmission tels que cholinergique, dopaminergique et noradrénergique, de même qu'une BHE structurellement et fonctionnellement semblable à celle des vertébrés après 3 j.p.f., et totalement formée à 10 j.p.f. (Fleming *et al.*, 2013). Ainsi, le poisson-zèbre apparaît comme un modèle pertinent pour étudier l'activité neuroprotectrice de médicaments potentiels tout en évaluant leur capacité à passer la BHE.

Le poisson-zèbre est maintenant utilisé pour étudier de nombreuses pathologies neurologiques telles que les addictions, la maladie d'Alzheimer, l'anxiété, l'épilepsie, la maladie d'Huntington, la maladie de Parkinson, la schizophrénie ou encore l'insomnie (Kalueff *et al.*, 2014). En effet, plusieurs techniques ont été développées autour de ce modèle animal afin d'étudier et de quantifier de nombreux paramètres associés à ces maladies tels que les déficits cognitifs (la capacité d'apprentissage, la mémoire, l'attention), le sommeil, la dépendance aux drogues ou encore l'activité locomotrice.

Aussi, ce poisson exprime plusieurs protéines jouant un rôle dans la pathogenèse de la MP. Par exemple, les protéines Parkin, DJ-1, LRRK2, PINK1, Trap1 ou encore l' $\alpha$ -synucléine sont exprimées chez le poisson-zèbre (Makhija *et al.*, 2014). Comme susmentionné, le système monoaminergique est conservé chez ce poisson. En particulier, la TH, ce marqueur important des neurones cathécholaminergiques, et deux gènes, *th1* et *th2*, encodant pour cette dernière, sont exprimés chez le poisson-zèbre (Filippi *et al.*, 2010). Cet animal exprime également le DAT et les MAOs A et B, démontrant ainsi la présence d'un système dopaminergique développé et comparable à l'homme (Vaz *et al.*, 2018). Ce vertébré est sensible à plusieurs agents neurotoxiques utilisés dans les études de la MP. Par exemple, le MPTP provoque une réduction significative du nombre de neurones dopaminergiques, une diminution des niveaux de dopamine, norépinephrine et sérotonine, ainsi qu'un déficit moteur qui se traduit par une réduction de la vitesse de nage (bradykinésie) et un schéma de nage irrégulier (dyskinésie) (Sallinen *et al.*, 2009, Sarath Babu *et al.*, 2016). Une administration de 6-OHDA directement dans le diencephale ventral réduit énormément le nombre de neurones dopaminergiques (>85 %) et provoque une bradykinésie (Vijayanathan *et al.*, 2017). Des modèles génétiques du poisson-zèbre ont également été développés. Par exemple, la surexpression de la  $\gamma$ 1-synucléine (forme de  $\alpha$ -synucléine chez le poisson-zèbre) engendre la formation d'agrégat et une neurotoxicité similaire à celle observée lors de la mutation de l' $\alpha$ -synucléine chez l'homme (Lulla

*et al.*, 2016). Il est important de noter que le modèle du poisson-zèbre, à certains égards, imite mieux que les souris les mécanismes pathologiques de la MP retrouvés chez l'homme. Par exemple, la mutation de PINK1 chez l'homme est associée à un dysfonctionnement mitochondrial (Valente *et al.*, 2004) alors qu'il a été montré chez des souris déficientes en PINK1 qu'il n'y a pas de pertes neuronales, et qu'il n'y a aucun changement au niveau des concentrations de dopamine, ni du nombre et de la morphologie des mitochondries (Kitada *et al.*, 2007). Chez le poisson-zèbre, l'abolition du gène de PINK1 induit une déficience mitochondriale qui influence l'expression de plusieurs protéines qui contribue au processus pathogénique de la MP (Flinn *et al.*, 2013, Vaz *et al.*, 2018). Des résultats similaires ont aussi été observés pour Parkin (Vaz *et al.*, 2018). Le poisson-zèbre représente donc un excellent modèle animal pour l'étude de la MP malgré quelques limitations inhérentes à l'émergence récente de ce modèle (Vaz *et al.*, 2018).

### 3.6. Thérapies et limitations

À ce jour, aucun traitement curatif de la MP n'a encore été développé malgré les nombreux travaux de recherche visant à ralentir et/ou stopper la progression de cette maladie. Cette section fait néanmoins le bilan des différentes stratégies qui ont été développées pour traiter la MP et leurs limitations. Ainsi, plusieurs médicaments sont disponibles pour atténuer les symptômes liés à la MP. Actuellement, ces médicaments se divisent en deux catégories, soit les traitements dopaminergiques et les non dopaminergiques. Par ailleurs, d'autres traitements tels que des interventions chirurgicales, la transplantation de cellules souches ou encore la thérapie génique sont également étudiés. Malheureusement, bien que plusieurs de ces traitements améliorent la qualité de vie des patients, aucun ne parvient à freiner la progression de la maladie.

#### 3.1.1 Les médicaments dopaminergiques

Le développement de médicament mimant la DA ou limitant sa dégradation permet de réduire les symptômes moteurs de la MP. Notamment, la découverte de précurseurs de la DA tels que la L-DOPA, permet de maintenir les niveaux de DA dans le cerveau (Barbeau, 1969). Ainsi, la L-DOPA est couramment utilisée pour réduire les tremblements au repos et les autres symptômes primaires. Bien que ce composé puisse facilement traverser la BHE, il est incapable de stopper la dégénérescence des neurones dopaminergiques et il cause de nombreux effets

secondaires dont de la bradykinésie (Cenci, 2014, Foster *et al.*, 2004). Chez les patients souffrant de la MP, les niveaux de l'enzyme catalytique MAO-B sont augmentés, provoquant alors une diminution du niveau de DA dans le cerveau. C'est pourquoi l'utilisation d'inhibiteurs de cette enzyme, tels que la sélégiline et la rasagiline, est une stratégie pour maintenir les niveaux de DA dans le cerveau (Krishna *et al.*, 2014, Riederer *et al.*, 2004). Aussi, lors de l'oxydation de la DA par la MAO-B, il y a formation d'acide dihydroxyphénylacétique qui, sous l'action de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), est transformé en acide homovanillique qui provoque un stress oxydatif et une exacerbation de la MP. Ainsi, des inhibiteurs de la COMT, comme l'entacapone ou la tolcapone, sont aussi en usage, en particulier pour prolonger les effets de la L-DOPA (Antonini *et al.*, 2008). Les composés décrits ci-haut sont utilisés en combinaison avec la L-DOPA afin de maintenir son action dans le temps. En revanche, à long terme, de nombreux effets secondaires apparaissent, tels notamment des mouvements anormaux involontaires et/ou une dyskinésie (Maiti *et al.*, 2017).

### 3.1.2 Les médicaments non dopaminergiques et autres types de médications

D'autres médicaments sont aussi utilisés pour le traitement des symptômes moteurs et non moteurs de la MP. Ainsi, parmi les molécules thérapeutiques non dopaminergiques, nous retrouvons des composés tels que des anticholinergiques et des agents sérotoninergiques. Les anticholinergiques sont utiles pour traiter des symptômes moteurs de la MP. Par contre, ils provoquent de nombreux effets secondaires comme de la tachycardie, de la constipation ou encore une vision floue (Lertxundi *et al.*, 2015). Aussi, lors de la MP, le système GABAergique est hyperactivé. Comme le récepteur Adénosine A<sub>2A</sub> est abondamment exprimé par les neurones GABAergiques, l'emploi d'inhibiteurs de ce récepteur, tels que l'istradefylline, peut être retenu pour le traitement des symptômes moteurs (Kondo *et al.*, 2015). Les résultats restent cependant contestables quant à leur efficacité (Fox *et al.*, 2018).

### 3.1.3 Traitements chirurgicaux

Chez certains patients, les médicaments n'ont que des activités transitoires et/ou ils causent de nombreux effets secondaires. Ainsi, des traitements chirurgicaux peuvent être privilégiés afin de stimuler les circuits neuronaux. Une stimulation cérébrale profonde par impulsions électriques a pour effet de réduire les symptômes primaires. Cette technique requiert toutefois d'implanter des batteries dans le cerveau, ce qui peut être à l'origine de complications comme des accidents vasculaires cérébraux, des hémorragies et des infections. Aussi, ce procédé n'est pas efficace sur les patients parkinsoniens « atypiques », et il ne peut être utilisé à des stades tardifs de la maladie. Enfin, elle n'est pas efficace pour traiter les déficits cognitifs, psychologiques et autres symptômes non moteurs (Negida *et al.*, 2018).

Pour les patients souffrant d'une dystonie lourde, il existe des interventions chirurgicales visant à détruire une partie du GP (Cif *et al.*, 2017). En effet, les mouvements moteurs sont contrôlés par le GP, lequel fait la connexion synaptique entre le thalamus et le striatum. La réduction de la taille du GP réduit les tremblements, la rigidité, la bradykinésie et les postures anormales. De même, la destruction d'une partie du thalamus a montré une restauration de la balance des neurotransmetteurs comme le glutamate et une réduction des symptômes comme les tremblements. Malgré les bienfaits, il ne faut cependant pas oublier que cette technique nécessite une intervention chirurgicale lourde et risquée (Cif *et al.*, 2017).

### 3.1.4 Transplantation cellulaire

Afin de pallier à la dégénérescence neuronale, la transplantation de cellules souches apparaît comme une thérapie prometteuse. Cette technique consiste à différencier des cellules souches embryonnaires humaines afin de générer des précurseurs neuronaux pouvant se différencier par la suite en neurones dopaminergiques (Grealish *et al.*, 2014). L'implantation de ces cellules dans le striatum de patient parkinsonien a montré une élévation des niveaux de la DA (Piccini *et al.*, 1999). L'implantation de cellules porcines génératrices de DA dans le cerveau d'un patient parkinsonien a également montré de légères améliorations cliniques (Fink *et al.*, 2000). Dans le même ordre d'idée, la transplantation de tissus fœtaux ventraux mésencéphaliques humains chez des patients parkinsoniens a donné lieu à d'importants effets bénéfiques (Hauser *et al.*, 1999). Aussi, il a été montré que ces cellules sont capables de faire des connexions synaptiques et d'augmenter les niveaux de DA (Maiti *et al.*, 2017). D'autre part,

certaines études visent à évaluer l'utilisation des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) comme approche thérapeutique de la MP (Morizane *et al.*, 2012), comme montré par une étude clinique utilisant ces cellules qui a été approuvée en Australie pour traiter la MP (Barker *et al.*, 2016). Bien que cette thérapie soit considérée comme prometteuse, une meilleure compréhension des événements biologiques régissant la différenciation neuronale *in vivo* est nécessaire. Par ailleurs, des études additionnelles doivent être conduites pour évaluer la sûreté, l'efficacité et la viabilité de l'implantation de cellules souches chez les patients parkinsoniens (Parmar, 2018).

### 3.1.5 Thérapie génique

La thérapie génique semble être un moyen prometteur pour soigner la MP. Notamment, l'utilisation d'un adénovirus recombiné contenant des gènes prévenant la dégénérescence neuronale a fourni des résultats intéressants (Allen *et al.*, 2014). Entre autres, l'injection d'un tel adénovirus contenant le gène de l'acide glutamique décarboxylase, une enzyme qui régule la production de GABA dans le NST, s'est avérée sans danger et bien tolérée par les patients parkinsoniens (LeWitt *et al.*, 2011). D'autres gènes, tels que ceux des enzymes requis pour la synthèse de la DA, ont aussi donné des résultats prometteurs (Jarraya *et al.*, 2009). Finalement, la découverte du système CRISPR/Cas-9 offre une avenue stimulante pour développer des thérapies géniques pour de nombreuses maladies, dont la MP. Cette technique devrait donc faire l'objet sous peu d'études approfondies dans le cadre du développement d'une nouvelle approche pour vaincre cette maladie (Basu *et al.*, 2017).

## 4. Mise en situation, hypothèses et objectifs de recherche

Ces dernières années, un décuplement des maladies neurodégénératives a été observé et on estime aujourd'hui que 55 000 Canadiens sont notamment atteints de la maladie de Parkinson (MP). Malgré de nombreux efforts investis en recherche, à ce jour, seuls des traitements palliatifs existent pour cette neuropathologie (Sarkar *et al.*, 2016). Néanmoins, une attention particulière a été déployée pour comprendre la physiopathologie de la MP afin de développer de nouvelles thérapies réduisant la dégénérescence neuronale (Kulisevsky *et al.*, 2018, Sarkar *et al.*, 2016). Ces traitements viseraient notamment à réduire l'apoptose des neurones dopaminergiques et de ce fait, à restaurer les niveaux de dopamine.

Dans ce contexte, le PACAP apparaît comme un agent thérapeutique attrayant pour le traitement des maladies neurodégénératives. En effet, il a montré des actions neuroprotectrices dans divers modèles cellulaires et animaux de maladies neurodégénératives telles que la MP et des modèles expérimentaux de lésions cérébrales telles que l'ischémie cérébrale (E. H. Lee *et al.*, 2014, Reglodi *et al.*, 2011, R. Yang *et al.*, 2015). Par l'intermédiaire de son action sur le récepteur PAC1, ce peptide est capable d'induire des effets antiapoptotiques (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). D'autre part, sa capacité à traverser efficacement la BHE en fait une cible très attractive. Toutefois, l'utilisation de ce peptide est limitée en raison de sa faible biodisponibilité et des effets secondaires qu'il pourrait causer suite à l'activation des récepteurs VPAC1 et VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2008b, Brifault *et al.*, 2016, Vandermeers *et al.*, 1992, Zhu *et al.*, 2003). Au cours des dernières années, notre équipe de recherche a réussi à développer un composé s'avérant sélectif aux récepteurs PAC1 et VPAC1 et possédant les effets neuroprotecteurs désirés, tout en ne montrant qu'une activité limitée sur le système cardiovasculaire suite à la stimulation de VPAC2 (Lamine *et al.*, 2016). Néanmoins, malgré ce succès issu de nos études de relations structure-activité, aucun ligand spécifique à PAC1 n'a pu être découvert à ce jour.

Le traitement des maladies neurodégénératives requiert une thérapie prolongée et, un danger rattaché à une administration continue d'un médicament est l'apparition d'une désensibilisation du système à court, moyen ou long terme (Rajagopal *et al.*, 2018). Ce phénomène, bien documenté pour les récepteurs de la morphine, est généralement associé à une phosphorylation du récepteur et au recrutement des  $\beta$ -arrestines (Reiter *et al.*, 2012). Il a notamment été montré que ce mécanisme provoque l'internalisation du récepteur, une signalisation intracellulaire et le recyclage de ce même récepteur à la membrane, ou sa

dégradation. Il a ainsi été mis en évidence que les RCPGs de la classe B sont plus facilement dégradés que ceux de la classe A (Thomsen *et al.*, 2016). Diverses études pharmacologiques et génétiques au niveau des RCPGs ont démontré qu'il est possible de développer des agonistes caractérisés par leur capacité à déclencher uniquement un sous-ensemble (ou sous-ensembles sélectionnés) des signaux produits en aval de la cascade (agonistes biaisés) (Rankovic *et al.*, 2016, Wootten *et al.*, 2017). On comprend alors l'importance de concevoir de tels agonistes biaisés capables de se lier au récepteur PAC1, tout en ne recrutant pas les  $\beta$ -arrestines de manière à empêcher l'internalisation du récepteur et donc d'éviter la désensibilisation du système PACAPergique.

Ainsi, en parallèle de nos études de type structure-activité, notre premier objectif a été de réévaluer la capacité de certains analogues du PACAP à activer ou non certaines voies de signalisation afin d'identifier des paramètres chimiques et/ou structuraux qui aideraient à concevoir des agonistes biaisés spécifiques pour PAC1, neuroprotecteurs et incapables d'activer les  $\beta$ -arrestines. Pour cela, une quinzaine d'analogues du PACAP (dans les deux isoformes) ont été sélectionnés en raison des modifications dans les segments N-terminal et central du peptide, impliquant des changements variables dans la structure secondaire de celui-ci. Ils ont été évalués sur la base de leur capacité à se lier aux récepteurs, à exercer un effet neuroprotecteur contre la toxicité *in vitro* du MPP<sup>+</sup> et à activer les voies de signalisation neuroprotectrices et désensibilisatrices (**Article 1**).

Dans un second temps, nous avons utilisé une nouvelle approche afin de générer des analogues peptidiques capables d'activer spécifiquement le récepteur PAC1. La transmission du signal au niveau intracellulaire est directement associée à des changements structuraux opérés au niveau des boucles intracellulaires d'un RCPG donné. Il a récemment été montré que des peptides développés à partir des boucles intracellulaires d'un RCPG, appelés pepducines, peuvent à eux seuls initier diverses cascades de signalisation par une reconnaissance spécifique du RCPG au niveau intracellulaire. Ainsi, notre second objectif a visé le développement et caractérisation de pepducines dérivées de PAC1. Nous avons émis l'hypothèse qu'une pepducine du récepteur PAC1 activerait spécifiquement ce récepteur et serait efficace pour contrer les effets toxiques du MPP<sup>+</sup> (*in vitro*) et assurer une neuroprotection marquée dans un modèle *in vivo* de la MP. Ainsi, trois pepducines, dérivées des 3 boucles intracellulaires du récepteur PAC1-*null*, ont été synthétisées et évaluées pharmacologiquement pour leur capacité à activer les récepteurs du PACAP et à contrer efficacement la neurodégénérescence cellulaire *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de la MP (**Article 2**).



# *Article 1*

## CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

### New insights about the peculiar role of the 28–38 C-terminal segment and some selected residues in PACAP for signaling and neuroprotection

Mathilde Poujol de Molliens<sup>a, b</sup>, Myriam Létourneau<sup>a, b</sup>, Dominic Devost<sup>c</sup>, Terence E. Hébert<sup>c</sup>, Alain Fournier<sup>b</sup>, David Chatenet<sup>a</sup>

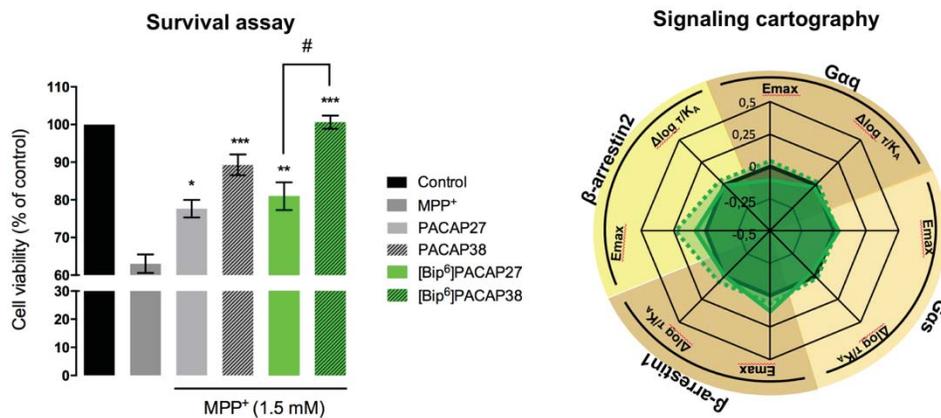
<sup>a</sup> INRS – Institut Armand-Frappier, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>b</sup> INRS – Institut Armand-Frappier, Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>c</sup> Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Cet article est publié dans **Biochemical Pharmacology**, vol. 154, p. 193-202, 2018

DOI : 10.1016/j.bcp.2018.04.024



## 1. Résumé de l'article en français :

Le *pituitary adenylyate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), une neurohormone existant sous deux isoformes de 27 et 38 acides aminés, induit une protection neuronale *in vitro* et *in vivo* suite à l'activation du récepteur PAC1, un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) de la classe B. Basé sur ses effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires, ce peptide représente une avenue prometteuse pour le développement d'une stratégie thérapeutique ralentissant efficacement la progression des certains troubles neurologiques, et même potentiellement curative. La voie canonique des RCPGs est associée à l'activation des protéines G. Cependant, ils peuvent induire une multitude de signaux intracellulaires pouvant être sélectivement activés par des ligands dits « biaisés », élargissant ainsi considérablement les possibilités de découverte de nouveaux médicaments. De manière intéressante, des études ont montré certaines caractéristiques signalétiques distinctes pour les deux isoformes du PACAP. Ainsi, à partir de ce constat, nous avons évalué l'impact de modifications chimiques et structurales introduites dans des régions spécifiques des deux isoformes du PACAP sur leurs effets neuroprotecteurs, et étudié le rôle joué par ces caractéristiques physicochimiques sur la signalisation intracellulaire relative à PAC1. Chacun des ligands a été évalué sur la base sa capacité à lier les trois récepteurs du PACAP, à promouvoir à la survie cellulaire dans un modèle parkinsonien et à stimuler les différents partenaires intracellulaires associés aux récepteurs PAC1, à savoir  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_q$  ainsi que les  $\beta$ -arrestines 1 et 2. Nos résultats démontrent que le PACAP38 et ses analogues exercent un effet neuroprotecteur plus marqué que leurs équivalents de 27 acides aminés. Également, nous avons établi que l'effet neuroprotecteur du PACAP est dépendant de l'activation de  $G\alpha_s$  et de  $G\alpha_q$ . Cette étude améliore notre compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la neuroprotection du PACAP.

## 2. Contribution de l'étudiant :

La grande majorité du travail a été réalisé par Mathilde Poujol de Moliens. La synthèse des peptides a été effectuée par d'anciens et actuels membres du laboratoire, Ngoc-Duc Doan et Myriam Létourneau. Les résultats des tests de liaison pour les analogues du PACAP27, à l'exception de [Ala<sup>22</sup>]PACAP27, avaient été précédemment publiés par Ngoc-Duc Doan (Doan *et al.*, 2012). Myriam Létourneau a participé à cet article en donnant de précieux conseils sur la nature des manipulations à réaliser. Elle a également effectué une partie des tests de survie cellulaire. Terence E. Hébert et Dominic Devost ont conçu les sondes de *bioluminescence resonance energy transfer* et ont révisé le manuscrit. David Chatenet et Alain Fournier ont conçu le projet et supervisé les travaux de recherche. Ils ont aussi participé à l'élaboration des hypothèses. Finalement, David Chatenet et Alain Fournier ont révisé le manuscrit pour la production de la version finale ici présente.

**New insights about the peculiar role of the 28-38 C-terminal segment and some selected residues in PACAP for signaling and neuroprotection**

Mathilde Poujol de Molliens<sup>1,2</sup>, Myriam Létourneau<sup>1,2</sup>, Dominic Devost<sup>3</sup>, Terence E. Hébert<sup>3</sup>, Alain Fournier<sup>2</sup>, David Chatenet<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> INRS – Institut Armand-Frappier, Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>3</sup> Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, Canada

**Corresponding author.**

\* Pr. David Chatenet, INRS – Institut Armand-Frappier, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada, H7V 1B7

Tel: +1-450-687-5010; Fax: +1-450-686-5446; E-mail address: [david.chatenet@iaf.inrs.ca](mailto:david.chatenet@iaf.inrs.ca)

**Abbreviations:**

BRET, bioluminescence resonance energy transfer; ACN, acetonitrile; BBB, blood-brain barrier; Bip, biphenylalanine ; Boc, tert-butoxycarbonyl; BOP, (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate; CHO cells, Chinese hamster ovary cells; DCM, dichloromethane; DIEA, N,N-diisopropylethylamine; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMF, dimethylformamide; FBS, foetal bovine serum; Fmoc, fluorenylmethyloxycarbonyl; GFP 10, green fluorescent protein 10; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK 293 cells, human embryonic kidney 293 cells; Hyp, hydroxyproline; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; PAC1, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor 1; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; RlucII, *Renilla* luciferase II; RP-HPLC, reverse phase-high performance liquid chromatography.

## **Abstract**

The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), which exists in two isoforms of 27 and 38 amino acids, can induce neuronal protection *in vitro* and *in vivo* following the activation of PAC1, a class B G protein-coupled receptor (GPCR). With its potent neuroprotective and anti-inflammatory effects, this peptide represents a promising avenue for the development of therapeutic strategies to potentially cure or at least slow the progression of neurodegenerative disorders. Beyond the canonical G protein signal effectors, GPCRs are also coupled to a multitude of intracellular signaling pathways that can be independently activated by biased ligands, thereby expanding vastly the potential for discovering new drugs. Interestingly, some studies have demonstrated distinct signaling features for the PACAP isoforms. With this observation in mind, we assessed the impact of chemical and structural modifications introduced into specific regions of the PACAP isoforms on their neuroprotective effects, and determined the role played by these physico-chemical and structural features on their signaling signatures. Each compound was also evaluated for its ability to bind the PACAP receptors, promote cell survival in a cellular model of Parkinson's disease and stimulate the signaling partners associated with PAC1 activation, including  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_q$ , as well as  $\beta$ -arrestin 1 and 2. Our results demonstrate that PACAP38 and its related analogs exert a more potent neuroprotective action than their 27-counterparts and that this neuroprotective effect is dependent on both  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_s$ -dependent signaling. This study will definitely improve our understanding of the molecular and cellular mechanisms associated with PACAP neuroprotection.

## **Keywords:**

PACAP, PAC1 receptor, Parkinson's disease, neuroprotection, BRET-based biosensor, biased agonism.

## 1. Introduction

The prevalence of Parkinson's disease (PD) has increase by more than 15% between 1990 and 2015, making it one of the most common neuronal disorder with about 4.6 million people affected worldwide (Feigin, 2017). This condition is characterized by a cognitive syndrome that is often accompanied with tremors, bradykinesia and muscle rigidity (Jankovic, 2008). The main cause of these symptoms is the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) leading to a reduction of dopamine release (Dauer *et al.*, 2003). Many studies have shown that neurodegenerative disorders such as PD involved an inflammatory process and an increase in oxidative stress, two phenomena linked to neuronal apoptosis (Friedlander, 2003). To date, many treatments aimed at reducing PD symptoms have been developed but no cure has yet been discovered (Maiti *et al.*, 2017). In particular, among the challenges encountered when designing a drug developed for an eventual chronic use, there is the need to efficiently cross the blood-brain barrier (BBB) and to prevent long-term desensitization associated with G protein-coupled receptor kinases (GRK) activation and  $\beta$ -arrestins recruitment (Rajagopal *et al.*, 2017).

In the past years, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has been shown to display neuroprotective effects in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's (Han *et al.*, 2014, Rat *et al.*, 2011) and Parkinson's diseases (Brown *et al.*, 2013, Lamine *et al.*, 2016, Reglodi *et al.*, 2004b, Wang *et al.*, 2008). For instance, it was demonstrated that PACAP reduced inflammatory responses induced by salsolinol or a cocktail of LPS and interferon- $\gamma$  in SH-SY5Y neuroblastoma cells (Brown *et al.*, 2013, Brown *et al.*, 2014). *In vivo*, PACAP not only prevents dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models (Maasz *et al.*, 2017) but also reduces neuronal loss and motor deficits (Shivers *et al.*, 2014). Hence, PACAP represents an attractive therapeutic framework to modify the course of neurodegenerative

disorders, including PD, especially considering its ability to cross the BBB (Mizushima *et al.*, 1999).

Isolated in 1989 from ovine hypothalamus on the basis of its capacity to stimulate adenylyl cyclase in rat pituitary cells (Miyata *et al.*, 1989), this peptide exists in two endogenous isoforms termed PACAP38 and PACAP27. The former is a 38-amino acid C-terminally  $\alpha$ -amidated molecule, whereas the latter is the C-truncated 27-residue amidated form of PACAP38 (Arimura, 1998). Pharmacological studies have demonstrated that both PACAP isoforms bind to three distinct G protein-coupled receptors, *i.e.* PAC1, VPAC1 and VPAC2, through which different actions are mediated (David Vaudry *et al.*, 2009b). On the one hand, PAC1 is widely distributed in the central nervous system and its activation by both PACAP isoforms produce antiapoptotic actions. On the other hand, triggering VPAC1 induces anti-inflammatory processes (Dejda *et al.*, 2011, Shioda *et al.*, 1998), whereas VPAC2 stimulation mostly leads to peripheral effects such as vasodilation and tachycardia that could be detrimental in the context of chronic treatment (Chang *et al.*, 2005, Warren *et al.*, 1992).

Various studies have been carried out to develop selective PAC1 ligands but to date, only PAC1/VPAC1 selective peptides have been obtained (Doan *et al.*, 2011, Lamine *et al.*, 2016). Nonetheless, these compounds revealed important properties including *in vitro* and *in vivo* neuroprotective actions without potent cardiovascular side-effects (Lamine *et al.*, 2016). PACAP structure-activity analyses carried out with various analogs revealed the importance of specific features, such as a N-terminal Asx-turn motif encompassing the first four amino acids, a N-capping molecular arrangement involving amino acids 6 to 11, and a helical structure spanning from residues 8 to 21, for the peptide structural stability, binding affinity and activity (Bourgault *et al.*, 2008b, Doan *et al.*, 2011, Inooka *et al.*, 1992, Wray *et al.*, 1993). For instance, the presence of an Asx-turn, a  $\beta$ -turn-like peptide configuration stabilized by hydrogen bonds, is supported by the production of potent agonists following incorporation of constrained amino acids at position 2 (L-proline and L-hydroxyproline) (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). The N-capping

motif, characteristic of all class B GPCR ligands, appears to be strengthened by hydrophobic interactions mimicking those between Phe<sup>6</sup> and Tyr<sup>10</sup> in PACAP (Doan *et al.*, 2011). Following structural studies, it was recently hypothesized that different N-capping motifs in PACAP could explain, at least in part, the differences in binding affinity observed between PACAP receptors (Neumann *et al.*, 2008). Also, after additional investigations, it was concluded that serine-2, phenylalanine-6, threonine-7 and tyrosine-22 represented key residues for PACAP molecular stabilization and pharmacological properties (Fournier *et al.*, 2016). Notably, Ala-substitutions at position 2, 6, 7 or 22 decreased the affinity and/or the activity toward VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Also, Ala-scan and Lys-scan carried out on PACAP27 showed the importance of Tyr<sup>22</sup> for stabilization of the  $\alpha$ -helix (Bourgault *et al.*, 2008b, Bourgault *et al.*, 2009b). Further, the addition of a CH<sub>2</sub>-NH bond between Lys<sup>21</sup> and Tyr<sup>22</sup>, a modification that impaired the helical structure, yielded inactive analogs (Bourgault *et al.*, 2008a). Finally, for class B GPCR, it has been postulated that there is a two-step process leading to receptor activation: first, the C-terminal segment of the hormone binds to the extracellular domain of the receptor, and second, the N-terminal portion of the peptide ligand is brought into the binding pocket located inside the core of the receptor transmembrane domain (Hoare, 2005). Interestingly, and as recently observed with the glucagon receptor, the first extracellular loop undergoes major conformational changes in secondary structure during peptide binding, forming key interactions with the peptide (H. Zhang *et al.*, 2017). When assessing the binding features of both PACAP isoforms, it appears that the presence of the 28-38 C-terminal segment in PACAP38 modifies the interaction of the ligand with the receptor (Sze *et al.*, 2007). Given the importance of the C-terminal portion of the ligand for class B GPCR binding, this disparity between the structures of the PACAP isoforms probably results in distinct effects on the receptor activation process and therefore distinct signaling outcomes. Such differences in intracellular signaling between both PACAP isoforms were already highlighted. For instance, Spengler *et al.* demonstrated that PACAP38 is more potent than PACAP27 in stimulating inositol triphosphate

(IP<sub>3</sub>) production while this order is reversed for cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (Spengler *et al.*, 1993). The neuroprotective action of PACAP has been linked to various pathways, including G $\alpha_s$  that leads to the cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Kienlen Campard *et al.*, 1997), and G $\alpha_q$  that yields to protein kinase C (PKC) stimulation (Wang *et al.*, 2005). Actually, PACAP-induced neuroprotection has primarily been studied in the context of G $\alpha_s$  activation (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016).

The development of functionally selective ligands, also termed biased agonists, is critical for understanding the molecular pharmacology of GPCR activation but also for the conception of safer drugs with reduced side-effects (T. P. Kenakin, 2012). Indeed, by antagonizing detrimental GPCR signaling pathways while stimulating beneficial downstream processes, biased ligands could deliver more precise therapeutic benefits with fewer side-effects than current GPCR-targeted drugs (Luttrell *et al.*, 2015). For example, as recently reported, TRV0109101, a G protein-biased agonist of the  $\mu$ -opioid receptor, is unable to promote opioid-induced mechanical allodynia following chronic administration. Such compounds may therefore represent an effective therapeutic avenue for managing chronic pain with reduced propensity for opioid-induced hyperalgesia (Koblish *et al.*, 2017). Similarly, the conception of a G protein biased PAC1 agonist might therefore represent an attractive means to slow down neurodegeneration. Currently, such derivatives do not yet exist, thereby preventing the implementation of definitive studies and their therapeutic validation. Thus, the goal of this study was to evaluate the impact of physico-chemical and structural parameters on PACAP27- and PACAP38-associated signaling signatures and neuroprotective effects. Based on previous structure-activity analyses, selected compounds were evaluated for their capacity to bind PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptors, to protect human neuroblastoma cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) toxicity and, using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensors, to promote G protein (G $\alpha_s$  and G $\alpha_q$ ) and  $\beta$ -arrestin 1/2 activation. Our results reveal the peculiar role of the 28-

38 C-terminal segment of PACAP for its neuroprotective action and suggest that PACAP-induced neuroprotection depends on multiple signaling pathways mostly driven by  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_s$  activation.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Materials.*

The fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-protected amino acids, the Fmoc-Rink-amide AM-functionalized polystyrene resin and the coupling reagent (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) were purchased from Chem-Impex (Wood Dale, IL). Trifluoroacetic acid (TFA), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), diethyl ether, N,N-dimethylformamide (DMF), piperidine, dichloromethane (DCM) and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON).  $Na^{125}I$  was purchased from Perkin-Elmer (Montreal, QC). Coelenterazine 400a was purchased from Gold Biotechnology, Inc (St. Louis, MO). G418-sulfate was purchased from bioWORLD (Dublin, OH). N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA), chloramine-T, 1,2-ethanedithiol (EDT), thioanisol,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, phenol, 1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP<sup>+</sup>) and all other chemicals were from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON). Ham's F12, MEM medium, DMEM medium, OptiMEM, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, D-glucose, penicillin and streptomycin (P/S) and all other cell culture reagents were from Wisent (St-Bruno, QC).

### *2.2. Peptide synthesis*

All peptides were synthesized using a commercially available Fmoc-Rink-amide AM resin and a Fmoc-based solid phase peptide synthesis procedure. Following a previously published protocol

(Doan *et al.*, 2011), all protected amino acids (3 equiv, based on the substitution of the resin) were coupled using an *in situ* activation step with BOP (3 equiv) and DIEA (5 equiv) in DMF for 45 min. Deprotection of the Fmoc-protecting group was achieved with 20% piperidine in DMF. Each coupling and deprotection step was monitored using a ninhydrin test. Peptide-resins were dried *in vacuo* and then cleaved with reagent K (TFA/water/phenol/thioanisole/EDT; [82.5:5:5:5:2.5]). Peptides were purified by preparative reverse phase HPLC to attain a minimum of 95% purity and the molecular weight of each compound was verified by MALDI-TOF mass spectrometry using an  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Voyager DE, Applied Biosystems, Foster City, CA). Peptides were lyophilized and kept at -20°C until use.

### 2.3. Cell culture

Chinese hamster ovary (CHO) cells stably and individually expressing human PAC1, VPAC1 or VPAC2 receptors were grown in Ham's F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 UI/mL of penicillin and streptomycin (P/S) and 400  $\mu$ g/mL of G418. The neuroblastoma cell line SH-SY5Y, endogenously expressing the human PAC1 and VPAC2 receptors but not VPAC1 (Lutz *et al.*, 2006), were grown in a 1:1 mixture of MEM medium and Ham's F-12 nutrient mixture containing 15% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 100 UI/mL of P/S. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 4.5 g/L D-glucose, 2 mM L-glutamine and 100 UI/mL of P/S. All cell lines were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and passages were performed using trypsinization when cells reached about 80% confluence.

### 2.4. Radioligand binding assays

Acetylated PACAP27 was radioiodinated using the chloramine-T oxidation technique and purified on a *Sep-Pak* C<sub>18</sub> cartridge (Waters, Milford, MA) (Hunter *et al.*, 1962). Binding assays were performed using CHO cells stably transfected with the human PAC1, VPAC1 or VPAC2

receptor isoforms. Cells were seeded at a density of 150,000 cells/well in 24-well plates. The next day, cells were washed with binding buffer (0.1% BSA, 25 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) for 10 min at room temperature. The solution was replaced with a fresh solution containing 0.05 nM of <sup>125</sup>I-Ac-PACAP27 and increasing concentrations of different competitor peptide (10<sup>-14</sup> to 10<sup>-5</sup>M). After 2 h of incubation at room temperature, cells were washed twice with the binding buffer and then lysed with sodium hydroxide (0.1 M). Cell-bound radioactivity was quantified using a  $\gamma$ -counter (1470 Wizard, Perkin Elmer, Woodbridge, ON). Results were expressed as a percentage of the specific binding of <sup>125</sup>I-Ac-PACAP27. Non-specific binding was determined in the presence of PACAP38 (10<sup>-5</sup>M).

### 2.5. Cell survival assays

SH-SY5Y cells, seeded into 96-well plates at a density of 30,000 cells/well, were incubated for 48 h to ensure cell adhesion. Cells were starved for 2 h and then incubated at 37°C for 4 h with peptides (10<sup>-7</sup>M) prior to the addition of 1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP<sup>+</sup>; 1.5 mM final concentration). Cell viability was assessed 24 h after the MPP<sup>+</sup> treatment using the cell titer Blue-cell viability assay kit (Promega, Madison, WI) and a microplate reader FlexStation<sup>®</sup>3 (Molecular Devices, San Jose, CA) to determine fluorescence intensity related to the conversion of resazurin into resoflurin. Positive control (MPP<sup>+</sup>-treated cells) and negative control (non-treated cells) were included in each experiment.

### 2.6. Bioluminescence resonance energy transfer assay

Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensors, the activation of G $\alpha_q$  and G $\alpha_s$ , as well as those of  $\beta$ -arrestin 1 and 2, was monitored following the stimulation of PAC1. This receptor (pcDNA 3.1\_PAC1) and one of the signaling pathway-related biosensors were transiently co-transfected into HEK293 cells using the TransIT-2020 transfection reagent (Mirus Bio, Madison, WI) for pLVXi2H-Polycis\_G $\alpha_q$ -RlucII-GFP<sub>10</sub>- $\beta$ 1- $\beta$ 1, pcDNA3.1\_G $\alpha_s$ -RlucII and

pcDNA3.1\_Gy1-GFP<sub>10</sub>, and Lipofectamine<sup>®</sup>2000 (Invitrogen, Burlington, ON) for pLVXi2H\_GFP10-βarr1-RlucII and pLVXi2H\_GFP10-βarr2-RlucII. A 1.5:1 ratio of TransIT-2020 or Lipofectamine<sup>®</sup>2000/DNA was used. On the day of the transfection, cells were trypsinized and suspended at a density of 150,000 cells/mL for G $\alpha_q$ , and 300,000 cells/mL for G $\alpha_s$ , β-arrestin 1 and β-arrestin 2 in DMEM supplemented with 2.5% FBS. DNA and TransIT-2020 or Lipofectamine<sup>®</sup>2000 were combined in OptiMEM, and the mixture was incubated at room temperature for 30 min before being added to the cells. Transfected cells were then seeded at a density of 15,000 cells/well for G $\alpha_q$ , and 30,000 cells/well for G $\alpha_s$ , β-arrestin 1 and β-arrestin 2 in 96-well plates. After 24 h, medium was removed and changed with DMEM supplemented with 5% FBS, 400 μg/mL of G418, 100 UI/mL of P/S and incubated for another 24 h. Cells were washed with 120 μL PBS solution supplemented with 0.1 % glucose, and then incubated with 80 μL of this solution for 2 h. Then, 10 μL of a 1/20 dilution (diluted before use) of coelenterazine 400A (stock at 1 mM in ethanol) in PBS solution supplemented with 0.1 % glucose and 10 μL of the 10X appropriate concentration of peptide were added and then incubation was resumed for 30 min at room temperature for G $\alpha_q$  experiments, and 10 min at room temperature for G $\alpha_s$  and β-arrestin 1. For β-arrestin 2, peptides were added directly after replacement of the media with 80 μL of PBS/0.1% glucose, and the cells were incubated 2 h at 37°C. Filters were set at 410 nm and 515 nm to detect the *Renilla* luciferase II (RlucII, donor) and green fluorescent protein 10 (GFP10, acceptor) light emissions, respectively. BRET signals, measured on a TECAN Infinite 2000 (Morrisville, NC), were monitored for 5 min after co-addition of coelenterazine 400A and ligands. BRET ratios were determined by calculating the ratio of the light emitted by GFP10 over the light emitted by the RlucII. BRET signals were normalized to the maximum signal measured with PACAP27 or PACAP38.

## 2.7. Data analysis

Binding experiments, cell survival assays and G protein and  $\beta$ -arrestin activation assessments were performed at least in quadruplicate. Data, expressed as mean  $\pm$  S.E.M, were analyzed with Prism software (Graphpad Software, San Diego, CA). Sigmoidal concentration-response fits with variable slope and one-site competition functions were used to determine  $EC_{50}$  and  $IC_{50}$ , respectively. A decrease in BRET signal was observed at high concentrations of PACAP resulting in bell-shaped curves. This phenomenon has been previously described in the literature and is explained by receptor internalization (Jorgensen *et al.*, 2007). Thereby,  $E_{max}$  of each ligand was normalized with the highest value obtained for PACAP27 or PACAP38.  $\text{Log } \tau/K_A$  was determined using the Black-Leff operational model (van der Westhuizen *et al.*, 2014). Statistical comparisons were analyzed by the Student's t-test, and differences were considered significant when  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  or  $***P < 0.001$ .

### 3. Results

#### 3.1. Binding affinity of PACAP and related analogs for PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptor

Both PACAP isoforms and their related analogs were tested for their capacity to bind PACAP receptors, *i.e.* PAC1, VPAC1 and VPAC2. The binding affinity of PACAP27 and its related analogs has been previously determined by our group (Doan *et al.*, 2011) and is used for comparison with binding data obtained for PACAP38 and related analogs. As shown in Table 1, replacement of the serine residue at position 2 with an L-alanine, *i.e.* [Ala<sup>2</sup>]PACAP38/27, significantly increased the binding affinity of PACAP38 for PAC1 ( $pIC_{50} = 8.76 \pm 0.08$ ,  $**P < 0.01$ ), VPAC1 ( $pIC_{50} = 9.68 \pm 0.18$ ,  $*P < 0.05$ ), and VPAC2 ( $pIC_{50} = 9.45 \pm 0.13$ ,  $**P < 0.01$ ). However, this modification did not change the binding affinity of PACAP27 for the PAC1 or VPAC1 receptors but reduced it significantly for VPAC2 ( $pIC_{50} = 7.16 \pm 0.11$ ,  $*P < 0.05$ ). On the one hand, the substitution of Ser<sup>2</sup> with D-proline, a constrained D-amino acid, reduced significantly the ability of both PACAP isoforms to bind PAC1 ([D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38;  $pIC_{50} = 6.75 \pm 0.12$ ,  $***P < 0.001$  and [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP27;  $pIC_{50} = 6.33 \pm 0.14$ ,  $**P < 0.01$ ), which was not the case when this residue was substituted with L-hydroxyproline. Additionally, both [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP isoforms showed an important binding reduction for VPAC1. On the other hand, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38 bound VPAC2 with the same affinity as did the endogenous ligand while this modification significantly decreased the binding affinity of PACAP27 ( $pIC_{50} = 5.65 \pm 0.10$ ,  $***P < 0.001$ ). Moreover, L-hydroxyproline incorporation at this position affected PACAP27 binding affinity towards both VPAC receptors (VPAC1,  $pIC_{50} = 7.40 \pm 0.11$ ,  $**P < 0.01$  and VPAC2,  $pIC_{50} = 6.89 \pm 0.07$ ,  $**P < 0.01$ ) but only slightly altered the ability of PACAP38 to bind VPAC1 ( $pIC_{50} = 7.57 \pm 0.20$ ). Replacement of the aromatic and hydrophobic phenylalanine residue at position 6 with a L-biphenylalanine (Bip) did not alter the binding affinity of either PACAP isoform for PAC1, VPAC1 or VPAC2. Additionally, as observed with [Ala<sup>2</sup>]PACAP27, introduction of an alanine moiety at position 7 of PACAP27 gave rise to an analog that exhibited a lower binding affinity to all three PACAP receptors (PAC1,  $pIC_{50} = 7.78 \pm 0.16$ ,  $*P < 0.05$ ; VPAC1,  $pIC_{50} = 7.51 \pm 0.21$ ,  $*P$

< 0.05; VPAC2,  $pIC_{50} = 5.80 \pm 0.12$ ,  $***P < 0.001$ ) compared to its PACAP38 counterpart (PAC1,  $pIC_{50} = 8.52 \pm 0.11$ ; VPAC1,  $pIC_{50} = 7.78 \pm 0.24$ ; VPAC2,  $pIC_{50} = 7.48 \pm 0.15$ ). Finally, replacement of Tyr<sup>22</sup> with L-alanine reduced the capacity of both isoforms to bind PAC1 ([Ala<sup>22</sup>]PACAP38,  $pIC_{50} = 7.54 \pm 0.16$ ,  $*P < 0.05$  and [Ala<sup>22</sup>]PACAP27,  $pIC_{50} = 6.94 \pm 0.11$ ,  $**P < 0.01$ ) but interestingly, this modification was the only one among those that we studied that lowered binding to VPAC1 and VPAC2 significantly.

### 3.2. Survival assays

Each compound was evaluated for its ability to protect the neuroblastoma SH-SY5Y cell line against the neurotoxic effects of MPP<sup>+</sup>, which produces neuronal damages very similar to those observed in Parkinson's disease (Javitch *et al.*, 1985). These neuroblastoma, which endogenously express PAC1 and VPAC2 receptors (Lutz *et al.*, 2006), exhibit dopaminergic neuron characteristics (Lopes *et al.*, 2010, Presgraves *et al.*, 2004) and have been largely used as an *in vitro* model of Parkinson's disease (Xie *et al.*, 2010). Although the SH-SY5Y cells have not been differentiated into a neuronal subtype, several studies have shown the usefulness of this cell line to investigate neuroprotective action (Brown *et al.*, 2013, Brown *et al.*, 2014, Lamine *et al.*, 2016). With the exception of [Ala<sup>2</sup>]PACAP27/38, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38, [Bip<sup>6</sup>]PACAP27/38, [Ala<sup>7</sup>]PACAP27/38, [Ala<sup>22</sup>]PACAP27/38, all the other analogs were statistically unable to protect neuronal cells, although the binding affinity of [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP27/38 for PAC1 receptors, and to some extent that of [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27, were severely altered. Interestingly, [Ala<sup>2</sup>]PACAP38, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38, [Bip<sup>6</sup>]PACAP38, [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 and [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 seemed to protect neurons against cell death more efficiently than their 27-amino acid counterparts, a feature also observed between native PACAP isoforms (Fig. 1).

### 3.3. Pharmacological characterization of PACAP38, PACAP27, and their related analogs

PACAP inhibits neuronal apoptosis *via* the stimulation of multiple signaling pathways involving elevation of cAMP and calcium levels, following the activation of distinct G proteins (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). In order to more closely examine the signaling pathways potentially involved in the neuroprotective action of PACAP and its related analogs, all peptides were evaluated, using BRET-based biosensors, for their ability to activate  $G_{\alpha_q}$ ,  $G_{\alpha_s}$ ,  $\beta$ -arrestin 1 and  $\beta$ -arrestin 2 (Table 2, Fig. 2 and 3).

### 3.3.1 $G_{\alpha_q}$ activation

As shown in Table 2, [Ala<sup>2</sup>]PACAP38 ( $pEC_{50} = 7.42 \pm 0.18$ ;  $E_{max} = 95\% \pm 6$ ) and [Bip<sup>6</sup>]PACAP38 ( $pEC_{50} = 7.41 \pm 0.30$ ;  $E_{max} = 102\% \pm 10$ ) stimulated  $G_{\alpha_q}$  with a potency and an efficacy similar to that of PACAP38 ( $pEC_{50} = 7.03 \pm 0.15$ ;  $E_{max} = 94\% \pm 7$ ), and these results are in accordance with their neuroprotective effects. In addition, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 and [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 stimulated  $G_{\alpha_q}$  with no loss of potency ( $pEC_{50} = 7.45 \pm 0.81$  and  $pEC_{50} = 6.66 \pm 0.32$ , respectively) but with a significant reduction in efficacy ( $E_{max} = 22\% \pm 6$ ,  $***P < 0.001$ , and  $E_{max} = 61\% \pm 11$ ,  $*P < 0.05$ , respectively) compared to PACAP38 ( $pEC_{50} = 7.03 \pm 0.15$ ,  $E_{max} = 94\% \pm 7$ ). These analogs could be therefore considered as partial agonists for the  $G_{\alpha_q}$  activation. Furthermore, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38 failed to activate  $G_{\alpha_q}$ , while [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 was a full agonist but showed an important loss of potency ( $pEC_{50} = 6.32 \pm 0.12$ ,  $**P < 0.01$  and  $E_{max} = 124\% \pm 11$ ). These results appear to be in agreement with the neuroprotective effects measured with each analog. We next evaluated the impact of these substitutions on PACAP27 isoforms (Table 2, Fig. 3). Except for [Ala<sup>2</sup>]PACAP27, all analogs showed a reduction in potency and/or efficacy. For instance, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP27 acted as a weak partial agonist ( $pEC_{50} = 5.82 \pm 0.45$ ,  $**P < 0.01$ ;  $E_{max} = 36\% \pm 13$ ,  $***P < 0.001$ ). [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 ( $pEC_{50} = 6.75 \pm 0.20$ ) and [Bip<sup>6</sup>]PACAP27 ( $pEC_{50} = 6.74 \pm 0.20$ ) stimulated  $G_{\alpha_q}$  with the same potency as PACAP27 ( $pEC_{50} = 6.93 \pm 0.09$ ) but with a significant loss of efficacy ( $E_{max} = 57\% \pm 7$ ,  $***P < 0.001$  and  $E_{max} = 86\% \pm 9$ ,  $*P < 0.05$ ,

respectively), while [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 and [Ala<sup>22</sup>]PACAP27-induced G $\alpha_q$  activation was significantly less potent than with PACAP27 (pEC<sub>50</sub> = 6.26 ± 0.12, \*\*P < 0.01 and pEC<sub>50</sub> = 6.38 ± 0.09, \*\*P < 0.01, respectively) but with a comparable efficacy.

### 3.3.2 G $\alpha_s$ activation

Since the neuroprotective effect of PACAP is known to involve activation of G $\alpha_s$ , peptides were also evaluated for their ability to activate this G protein. All PACAP38 related analogs retained the capacity to stimulate G $\alpha_s$ . In particular, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38, which was inactive for G $\alpha_q$  stimulation assay, stimulated G $\alpha_s$  with no significant reduction in potency or efficacy (pEC<sub>50</sub> = 6.52 ± 0.42 and E<sub>max</sub> = 59% ± 14) compared to PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 7.58 ± 0.27 and E<sub>max</sub> = 76% ± 7). Furthermore, [Ala<sup>2</sup>]PACAP38, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 and [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 acted as full agonists and appeared to be more efficacious than PACAP38 (E<sub>max</sub> = 76% ± 7) to activate G $\alpha_s$  (E<sub>max</sub> = 103% ± 10, \*P < 0.05; E<sub>max</sub> = 120% ± 12, \*\*P < 0.01; and E<sub>max</sub> = 114% ± 11, \*P < 0.05, respectively). Finally, [Bip<sup>6</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 8.09 ± 0.43) and [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 8.01 ± 0.43) stimulated G $\alpha_s$  with a higher potency than PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 7.58 ± 0.27) but with a comparable efficacy (Table 2). Similar experiments were also performed with PACAP27 and its related analogs (Table 2). The replacement of Ser<sup>2</sup> with L-alanine had no significant effect on G $\alpha_s$  activation. However, the substitution at this position with constrained amino acids such as D-proline or L-hydroxyproline revealed a significant impact. [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP27 acted as a partial agonist with a pEC<sub>50</sub> < 5 and a maximal efficacy of 44% (\*\*P < 0.01), while [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27, which exhibited only a weak reduction of its potency (pEC<sub>50</sub> = 7.50 ± 0.22), stimulated G $\alpha_s$  with a striking efficacy (E<sub>max</sub> = 175% ± 10, \*\*\*P < 0.001). A similar observation was made with [Ala<sup>7</sup>]PACAP27, for which the potency to activate the G $\alpha_s$  pathway was reduced significantly (pEC<sub>50</sub> = 7.22 ± 0.38, \*P < 0.05) but with an efficacy that was undeniably increased (E<sub>max</sub> = 139% ± 15, \*\*P < 0.01). Additionally, the increase of bulkiness, hydrophobicity and aromaticity at

position 6 through introduction of a biphenylalanine moiety, *i.e.* [Bip<sup>6</sup>]PACAP27, did not alter G $\alpha_s$  activation. Finally, [Ala<sup>22</sup>]PACAP27 exhibited a significant reduction of potency for G $\alpha_s$  activation (pEC<sub>50</sub> = 7.00 ± 0.23, \*\**P* < 0.01) (Table 2).

#### $\beta$ -arrestin 1 and 2 activation

Analogues were also tested for their capacity to stimulate  $\beta$ -arrestins. As shown in Table 2, except for [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38, all analogues activated  $\beta$ -arrestin 1. More precisely, the treatment of HEK293 cells transiently transfected with PAC1 with [Ala<sup>2</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 6.71 ± 0.16, E<sub>max</sub> = 109% ± 8) or [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 6.44 ± 0.13, E<sub>max</sub> = 139% ± 11) produced a  $\beta$ -arrestin 1 activation similar to that of PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 6.76 ± 0.12, E<sub>max</sub> = 121% ± 8). Furthermore, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 displayed the same propensity to activate the  $\beta$ -arrestin 1 pathway but with a reduced efficacy (E<sub>max</sub> = 89% ± 9, \**P* < 0.01) compared to PACAP38 (E<sub>max</sub> = 121% ± 8). Notably, [Bip<sup>6</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 7.44 ± 0.15, \*\*\**P* < 0.001) and [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 7.13 ± 0.11, \*\**P* < 0.01) exhibited a higher tendency to activate  $\beta$ -arrestin 1 relative to PACAP38. Also, [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 was able to reach 147% ± 6 of the efficacy associated with PACAP38-mediated  $\beta$ -arrestin 1 activation. As for  $\beta$ -arrestin 1 activation, only [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38 did not activate the  $\beta$ -arrestin 2 pathway. Also, on the one hand, [Ala<sup>2</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 6.92 ± 0.18) and [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 (pEC<sub>50</sub> = 7.23 ± 0.41) activated  $\beta$ -arrestin 2, as did the endogenous ligand (pEC<sub>50</sub> = 6.80 ± 0.22), while, on the other hand, [Bip<sup>6</sup>]PACAP38, [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 and [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 stimulated  $\beta$ -arrestin 2 recruitment with greater efficacies (E<sub>max</sub> = 148% ± 11, \*\**P* < 0.01; E<sub>max</sub> = 220% ± 15, \*\*\**P* < 0.001; E<sub>max</sub> = 233% ± 22, \*\*\**P* < 0.001, respectively) than PACAP38 (E<sub>max</sub> = 92% ± 10). As shown in Table 2, all PACAP27 analogues activated the  $\beta$ -arrestin 1 pathway with various potencies. In particular, [Ala<sup>22</sup>]PACAP27 exhibited rather low potency (pEC<sub>50</sub> = 6.23 ± 0.13, \**P* < 0.05) to activate  $\beta$ -arrestin 1 while exhibiting similar efficacy (E<sub>max</sub> = 133% ± 14) than that of PACAP27 (pEC<sub>50</sub> = 6.56 ± 0.07, E<sub>max</sub> = 118% ± 5). Also, as for [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38, its PACAP27 counterpart compound failed to activate  $\beta$ -arrestin 1, while

[Bip<sup>6</sup>]PACAP27 ( $E_{\max} = 152\% \pm 9$ ) activated  $\beta$ -arrestin 1 with an efficacy significantly higher than that of PACAP27 but with a similar potency.

The 27-amino acid analogs were also tested for their capacity to stimulate the  $\beta$ -arrestin 2 pathway. Surprisingly, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP27 ( $pEC_{50} = 5.67 \pm 0.30$ ) exhibited a reduced ability to promote  $\beta$ -arrestin 2 activation and was only able to achieve around 55% of PACAP27-associated recruitment, revealing itself as a partial agonist for this pathway. Also, [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 activated the  $\beta$ -arrestin 2 signaling with a  $pEC_{50} = 6.42 \pm 0.11$ , thus markedly lower than the value measured with the endogenous ligand, but with an efficacy ( $E_{\max} = 134\% \pm 8$ ) significantly higher than that of PACAP27. Finally, the other analogs were equipotent to the endogenous ligand at activating  $\beta$ -arrestin 2 (Table 2).

#### 4. Discussion

Biological responses to hormonal stimuli are encoded during the initial interactions between a ligand and its cognate receptor(s). Since downstream signaling is tightly coupled to specific ligand/receptor interactions, structurally different ligands might therefore modulate downstream signaling events differentially (Galandrin *et al.*, 2007). Over the years, evidence for functional selectivity or biased agonism following activation of PAC1 by its two endogenous ligands has accumulated (Spengler *et al.*, 1993, Walker *et al.*, 2014). While most descriptions of biased agonism have been centered on differential effects of synthetic drugs, there are several important G protein-coupled receptor (GPCR) families that bind to multiple endogenous agonists such as the somatostatin and opioid receptor families. Although this has been traditionally attributed to the redundancy of some biological systems, the existence of multiple ligands for the same receptor could represent an added layer of control to engender finely tuned physiological responses through biased agonism/functional selectivity (Thompson *et al.*, 2014). For instance, it has been shown that PACAP27 is more potent and efficacious than PACAP38 to induce cAMP

production while this order is reversed for inositol triphosphate production (Spengler *et al.*, 1993). More recently, it has been demonstrated that PACAP38, but not PACAP27, was able to trigger ERK<sub>1/2</sub> phosphorylation in glial cells, while both isoforms stimulated cellular cAMP production, albeit with different potencies (Walker *et al.*, 2014). Induced PAC1 signaling in response to PACAP38 or PACAP27 could therefore lead to distinct effects for each peptide in the pathogenesis and progression of PAC1-associated diseases (David Vaudry *et al.*, 2009b, Walker *et al.*, 2014). Hence, advances in our understanding and treatment of PAC1-associated diseases will emerge from an evolving comprehension of ligand-receptor interactions, along with their associated downstream effectors and divergent signaling pathways.

To gain some insight regarding the particular molecular pharmacology of each PACAP isoform and also, in order to probe specific structural and/or physico-chemical determinants that might explain their distinct activation profile, we examined the binding affinity as well as the ability of PACAP38, PACAP27 and some related analogs to trigger multiple signaling pathways, including different G proteins and  $\beta$ -arrestin isoforms. As described above, point substitutions were introduced within key pharmacophoric elements of the PACAP isoforms, *i.e.* the Asx-turn motif (position 2), the N-capping domain (positions 6 and 7), and the  $\alpha$ -helical region (position 22) (Lamine *et al.*, 2016). These analogs were selected based on their ability to bind preferentially PAC1 and VPAC1 ([Ala<sup>2</sup>]PACAP27, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP27, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27, [Ala<sup>7</sup>]PACAP27, and [Ala<sup>22</sup>]PACAP27/38) (Doan *et al.*, 2011, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015) or to behave as a superagonist ([Bip<sup>6</sup>]PACAP27) (Bourgault *et al.*, 2009b). In addition, because the C-terminal 28-38 region is an integral part of the physico-chemical and/or structural parameters regulating PAC1 signaling pathways, we evaluated the contribution of this region on the neuroprotective action of the peptide molecules of this study by synthesizing analogs according to both PACAP isoform scaffolds.

With respect to their binding affinity, it was noticed that most PACAP38 isoforms interacted more efficiently with PAC1 and VPAC2 than their PACAP27 counterparts.

Accordingly, it has been previously shown that the 28-38 segment forms a short helix that facilitates the binding of PACAP38 through an electrostatic interaction involving basic C-terminal residues and an acidic patch located on the N-terminal ectodomain of PAC1 (Sun *et al.*, 2007). Because both PACAP isoforms are well known for their anti-apoptotic actions, using SH-SY5Y cells, each analog was tested for its ability to prevent MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis. Out of the 12 analogs, only 9 derivatives, *i.e.* [Ala<sup>2</sup>]PACAP27/38, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 [Bip<sup>6</sup>]PACAP27/38, [Ala<sup>7</sup>]PACAP27/38 and [Ala<sup>22</sup>]PACAP27/38, protected SH-SY5Y cells against MPP<sup>+</sup> toxicity despite the fact that all analogs bound to PAC1. Interestingly, PACAP38 and its derivatives were better neuroprotective agents than their PACAP27 counterparts. For instance, while [Ala<sup>2</sup>]PACAP27 and [Ala<sup>2</sup>]PACAP38 bound with a similar affinity to PAC1, [Ala<sup>2</sup>]PACAP38 exerted a significantly stronger neuroprotective action than its parent derivative (Fig. 1, Table 1). A similar pattern was also observed with [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38, [Bip<sup>6</sup>]PACAP38, [Ala<sup>7</sup>]PACAP38, and [Ala<sup>22</sup>]PACAP38. For [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 and the last two analogs, their PACAP27 counterparts were almost devoid of any protective action (Fig. 1). Regarding the analogs unable to provide any protection, it appeared that the replacement in PACAP38 or PACAP27 of serine-2 with a D-proline, or substitution of tyrosine-22 with L-alanine, induced a substantial reduction of their binding affinities for all PACAP receptors, a condition that probably explains their lack of efficacy. However, this justification is not sufficient to explain the behavior of [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27, which is inactive despite a binding affinity similar to those of the endogenous peptides. As previously described, structurally different analogs might stabilize different receptor conformations and lead to subtle bias in signaling pathways associated with the activation of a given receptor. While we know the impact of the C-terminal domain of PACAP38, as well as that of a few modifications on binding affinity and anti-apoptotic function, we have currently no insights regarding the pharmacophore contribution to PAC1-associated signaling.

To understand the impact of each modification and to pinpoint specific signaling pathways associated with their anti-apoptotic actions, using BRET-based biosensors, we

evaluated the propensity of each analog to activate  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_s$ , as well as  $\beta$ -arrestin 1 and 2 (Table 2). At position 2, replacement of the serine residue with an alanine did not produce an activation profile different from that observed for PACAP27 (Fig. 3). However, this modification, in combination with the presence of the 28-38 segment, improved significantly  $\beta$ -arrestin 2 and  $G\alpha_s$  activation (Table 2, Fig. 2). While it is well known that the  $G\alpha_s$  pathway is involved in the neuroprotective effect of both PACAP isoforms, the participation of  $\beta$ -arrestins in neuroprotection has not yet been definitely confirmed. Nonetheless, their involvement was suspected as receptor internalization processes have been linked to its neuroprotective action (May *et al.*, 2010). To date, only one study has shown that PACAP38-sustained ERK<sub>1/2</sub> signaling was linked to  $\beta$ -arrestin 1 activation (Broca *et al.*, 2009), and that this mechanism, *i.e.* ERK<sub>1/2</sub> phosphorylation, might be involved in PACAP-associated neuroprotection (Journot *et al.*, 1998, Villalba *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2005). Interestingly, the absence of the hydroxyl group at position 2, produced by substituting the serine residue with an alanine, did not reduce the ability of the related analog to efficiently activate  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_q$ . While demonstrating an impact of the C-terminal region of the ligand on PAC1 activation profile, this data also confirms that the hydroxyl group of serine-2 is not critical for PAC1 receptor activation and its subsequent neuroprotective action. In addition, introduction of a conformational restriction at this position *via* insertion of a hydroxyproline residue, which generated the selective PAC1/PAC1 agonist [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 (Doan *et al.*, 2011), strongly promoted  $G\alpha_s$  activation and produced a  $\beta$ -arrestin 1 and 2 activation similar to that of PACAP27, but triggered only partial  $G\alpha_q$  activation (Fig. 3, Table 2). The same substitution in PACAP38 further decreased the efficiency of [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 to activate  $G\alpha_q$  activation but promoted  $G\alpha_s$  activation strongly, as did the PACAP27 counterpart, and reduced the efficacy to activate  $\beta$ -arrestin 1 while leaving  $\beta$ -arrestin 2 signaling unaffected. Surprisingly, while minor differences between the activation profile of [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 and [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 were noted, only [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 was able to significantly protect

neuroblastoma cells. Those differences were observed with respect to  $G_{\alpha_q}$  and  $\beta$ -arrestin 1 signaling with [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 being more potent than [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 to activate  $G_{\alpha_q}$  but less efficient than [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 to activate  $\beta$ -arrestin 1. Hence, these data suggest that  $\beta$ -arrestin 1 is not involved in the neuroprotective action of PACAP.

As previously noted, binding of the cationic C-terminal tail of PACAP38 with an acidic patch located in the N-terminal domain of PAC1 promotes, within the activation pocket of the receptor, a particular positioning of the N-terminal portion of the 38-amino acid ligand (Sun *et al.*, 2007). As reported for the glucagon receptor, such an initial interaction promotes major conformational modifications at the receptor level and facilitates additional contacts between the peptide and the first extracellular loop (Yin *et al.*, 2016, H. Zhang *et al.*, 2017). Therefore, the N-terminal segment of PACAP38, encompassing the Asx-turn, is probably oriented in the receptor cavity in a slightly different manner from the one that occurs with PACAP27, which does not possess the basic C-terminal stretch (Sun *et al.*, 2007). Hence, these results support the presence of specific chemical determinants/interactions within the PACAP/PAC1 complex that modulate distinct aspect of downstream cellular signaling. Thus, it can be postulated that the introduction of a modification in either PACAP27 or PACAP38 does not imply a transposition of the signaling signature and pharmacological effects on both isoforms. Analysis of the activation profile of the active [Ala<sup>2</sup>]PACAP27 analog and the inactive [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 derivative suggests that the ability of the analog to activate  $G_{\alpha_q}$  and/or  $\beta$ -arrestin 1 influences its propensity to protect SH-SY5Y cells against the MPP<sup>+</sup> toxicity (Figs. 1, 2 and 3, Table 2). Accordingly, it was demonstrated that  $G_{\alpha_q}$ -associated effectors, and more particularly Akt, are linked to the neuroprotective action of PACAP through PAC1 (May *et al.*, 2010). Similarly, when looking at the signaling signature of [Bip<sup>6</sup>]PACAP38 and [Bip<sup>6</sup>]PACAP27, a small but significant reduction of  $G_{\alpha_q}$  efficacy was observed for [Bip<sup>6</sup>]PACAP27 (Fig. 2 and 3), which also appears to be less neuroprotective than its PACAP38 counterpart (Fig.1). Also, while both [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 and

[Ala<sup>7</sup>]PACAP27 protected SH-SY5Y neuroblastoma cells, [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 exerted a trend to a better neuroprotective action than its PACAP27-related analog. An overview of their activation profiles revealed significant variations in their ability to potently and efficiently activate G $\alpha_q$ ,  $\beta$ -arrestin 2, and G $\alpha_s$ . The latter is positively linked to different cAMP-regulated protein kinases that mediate the neuroprotective effects of PACAP (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). A similar observation was also made with the pair [Ala<sup>22</sup>]PACAP27/38 since the PACAP38 derivative appears to activate G $\alpha_s$  with a higher potency than the PACAP27 counterpart, which could again explain, at least in part, their differential neuroprotective actions. Overall, most of the time, the 38-amino acid PACAP isoforms promoted a greater activation of  $\beta$ -arrestin 1,  $\beta$ -arrestin 2, or both than their PACAP27 counterparts. This observation further supports the role of the C-terminal portion of PACAP38 for the activation of  $\beta$ -arrestins, and in particular  $\beta$ -arrestin 2. Whether or not this phenomenon is only dependent on the presence of the 28-38 C-terminal segment remains to be determined. Indeed, this observation could also be linked to differential positioning of the N-terminal Asx-turn of PACAP27 and PACAP38 in the receptor environment, thereby stabilizing or disrupting specific microswitches involved in  $\beta$ -arrestin activation (Chenyi Liao *et al.*, 2017a). Altogether, it appears that neuroprotective actions cannot be linked to a single signaling pathway but more likely would be the result of multiple events that would lead to a neuroprotective effect, upon reaching a particular threshold. Also, this data supports the idea that the binding and activation determinants between PACAP27 and PACAP38 are not the same. Further, it has been proposed that PACAP binds to PAC1 *via* a two-step activation process and that the dissimilar C-terminal segments of PACAP isoforms bind to the receptor extracellular domains through distinct electrostatic, hydrophobic and hydrogen bond interactions allowing the N-terminal portion of the peptide to access the transmembrane core and induce receptor activation (Pal *et al.*, 2012). These differential interactions characterizing each PACAP isoform and the N-terminal region of PAC1 probably activate switches distinctively and induce the activation of unique sets of intracellular effectors. Notably, it has been recently demonstrated

that PAC1 transits through several conformational states, spreading from the extracellular domain to the second messenger binding sites (Chenyi Liao *et al.*, 2017a). Finally, a recent study reported the importance of the first extracellular domain of the human glucagon receptor. Especially, this study demonstrated that the  $\beta$ -hairpin formation plays a role in stabilizing the ligand-receptor interaction (H. Zhang *et al.*, 2017). Our results improve the understanding of activation of class B GPCRs and bring some insights about the pharmacological differences observed between PACAP27 and PACAP38.

In conclusion, we showed that the introduction of alike modifications in both PACAP isoforms generated analogs with distinct signaling signatures. This observation suggested a role for the C-terminal 28-38 segment in the binding and activation processes, and more acutely in the  $\beta$ -arrestins activation. Interestingly, the study revealed that introduction of a specific modifications at position 6, 7 or 22 in PACAP27 and PACAP38 consistently improved their potency and efficiency to drive  $\beta$ -arrestin activation, but left G protein stimulation almost unaffected. Among the different modifications introduced in PACAP27 and PACAP38, the presence of D-Pro at position 2 has been the only one that drastically and negatively affected  $\beta$ -arrestins recruitment. We also observed that the neuroprotective action of the PACAP27- and PACAP38-related analogs was multiparametric and necessitated the activation of both  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_s$  and their associated downstream effectors. Over the years, both isoforms have been used to study their neuroprotective potential of PACAP in various diseases. However, characteristics such as a short *in vivo* half-life, especially for PACAP38, or their lack of selectivity, PAC1 versus VPAC receptors, have prevented their use as therapeutic agents (Bourgault *et al.*, 2008a). However, the ability to cross the BBB, either passively (PACAP27) or through a transporter-mediated mechanism (PACAP38), makes these peptides highly interesting as chemical templates for peptide-based drug design (Banks *et al.*, 1993). While PACAP38 seems more suitable due to its higher *in vitro* neuroprotective effects, its use could be hampered by its ability to hyperactivate  $\beta$ -arrestins, a feature that could lead to receptor desensitization. Altogether, PACAP27, with its

higher plasma stability, its ability to diffuse passively throughout the BBB and most importantly, its relative inability to overstimulate  $\alpha$ -arrestins appears so far as a better template than PACAP38 for the development of a peptide-derived drug designed to treat neurodegenerative diseases such as PD. Although the data are still preliminary, the present study showed that the introduction of various modifications within key pharmacophores of PACAP was able to perturb signaling signatures compared to endogenous ligands. A more comprehensive library screening is therefore necessary to clearly highlight the specific physico-chemical and/or structural elements modulating PACAP27 signaling.

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

We thank the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for funding.

## Uncategorized References

1. Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol.* 1998;48(5):301-31.
2. Banks WA, Kastin AJ, Komaki G, Arimura A. Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 1993;267(2):690-6.
3. Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, et al. Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides.* 2008;29(6):919-32.
4. Bourgault S, Vaudry D, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Couvineau A, Laburthe M, et al. Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *J Med Chem.* 2009;52(10):3308-16.
5. Bourgault S, Vaudry D, Guilhaudis L, Raoult E, Couvineau A, Laburthe M, et al. Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *J Mol Neurosci.* 2008;36(1-3):260-9.
6. Broca C, Quoyer J, Costes S, Linck N, Varrault A, Deffayet PM, et al. beta-Arrestin 1 is required for PAC1 receptor-mediated potentiation of long-lasting ERK1/2 activation by glucose in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 2009;284(7):4332-42.
7. Brown D, Tamas A, Reglodi D, Tizabi Y. PACAP protects against salsolinol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 2013;50(3):600-7.
8. Brown D, Tamas A, Reglodi D, Tizabi Y. PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Neurotoxicity research.* 2014;26(3):230-9.

9. Chang Y, Lawson LJ, Hancock JC, Hoover DB. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: localization and differential influence on isolated hearts from rats and guinea pigs. *Regul Pept.* 2005;129(1-3):139-46.
10. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39(6):889-909.
11. Dejda A, Seaborn T, Bourgault S, Touzani O, Fournier A, Vaudry H, et al. PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides.* 2011;32(6):1207-16.
12. Doan ND, Bourgault S, Dejda A, Letourneau M, Detheux M, Vaudry D, et al. Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(4):552-61.
13. Feigin VL. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Neurology.* 2017;16(11):877-97.
14. Fournier A, Bourgault S, Chatenet D. The Pharmacophoric Determinants of PACAP. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 111-32.
15. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 2003;348(14):1365-75.
16. Galandrin S, Oligny-Longpre G, Bouvier M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(8):423-30.
17. Han P, Tang Z, Yin J, Maalouf M, Beach TG, Reiman EM, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against beta-amyloid toxicity. *Neurobiol Aging.* 2014;35(9):2064-71.
18. Hoare SR. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today.* 2005;10(6):417-27.

19. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*. 1962;194:495-6.
20. Inooka H, Endo S, Kitada C, Mizuta E, Fujino M. 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*. 1992;40(5):456-64.
21. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(4):368-76.
22. Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(7):2173-7.
23. Jorgensen R, Kubale V, Vrecl M, Schwartz TW, Elling CE. Oxyntomodulin differentially affects glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin recruitment and signaling through Galpha(s). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322(1):148-54.
24. Journot L, Villalba M, Bockaert J. PACAP-38 protects cerebellar granule cells from apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;865:100-10.
25. Kenakin TP. Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2012;165(6):1659-69.
26. Kienlen Campard P, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP. PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol*. 1997;16(3):323-33.
27. Koblisch M, Carr R, 3rd, Siuda ER, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Cowan CL, et al. TRV0109101, a G Protein-Biased Agonist of the micro-Opioid Receptor, Does Not Promote Opioid-Induced Mechanical Allodynia following Chronic Administration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2017;362(2):254-62.

28. Lamine A, Letourneau M, Doan ND, Maucotel J, Couvineau A, Vaudry H, et al. Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. *Neuropharmacology*. 2016;108:440-50.
29. Liao C, Zhao X, Brewer M, May V, Li J. Conformational Transitions of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor, a Human Class B GPCR. *Scientific reports*. 2017;7(1):5427-.
30. Lopes FM, Schroder R, da Frota ML, Jr., Zanotto-Filho A, Muller CB, Pires AS, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*. 2010;1337:85-94.
31. Luttrell LM, Maudsley S, Bohn LM. Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism. *Mol Pharmacol*. 2015;88(3):579-88.
32. Lutz EM, Ronaldson E, Shaw P, Johnson MS, Holland PJ, Mitchell R. Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. *Molecular and cellular neurosciences*. 2006;31(2):193-209.
33. Maasz G, Zrinyi Z, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Dis Model Mech*. 2017;10(2):127-39.
34. Maiti P, Manna J, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl Neurodegener*. 2017;6:28.
35. Manecka D-L, Boukhzar L, Falluel-Morel A, Lihrmann I, Anouar Y. PACAP Signaling in Neuroprotection. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 549-61.
36. May V, Lutz E, MacKenzie C, Schutz KC, Dozark K, Braas KM. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple

neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. *J Biol Chem*. 2010;285(13):9749-61.

37. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164(1):567-74.

38. Mizushima H, Banks WA, Dohi K, Shioda S, Matsumoto H, Matsumoto K. The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-brain and blood-spinal cord barrier to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Peptides*. 1999;20(11):1337-40.

39. Neumann JM, Couvineau A, Murail S, Lacapere JJ, Jamin N, Laburthe M. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends Biochem Sci*. 2008;33(7):314-9.

40. Pal K, Melcher K, Xu HE. Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by Class B G-protein-coupled receptors. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(3):300-11.

41. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotoxicity research*. 2004;5(8):579-98.

42. Rajagopal S, Shenoy SK. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal*. 2017.

43. Ramos-Alvarez I, Mantey SA, Nakamura T, Nuche-Berenguer B, Moreno P, Moody TW, et al. A structure-function study of PACAP using conformationally restricted analogs: Identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. *Peptides*. 2015;66:26-42.

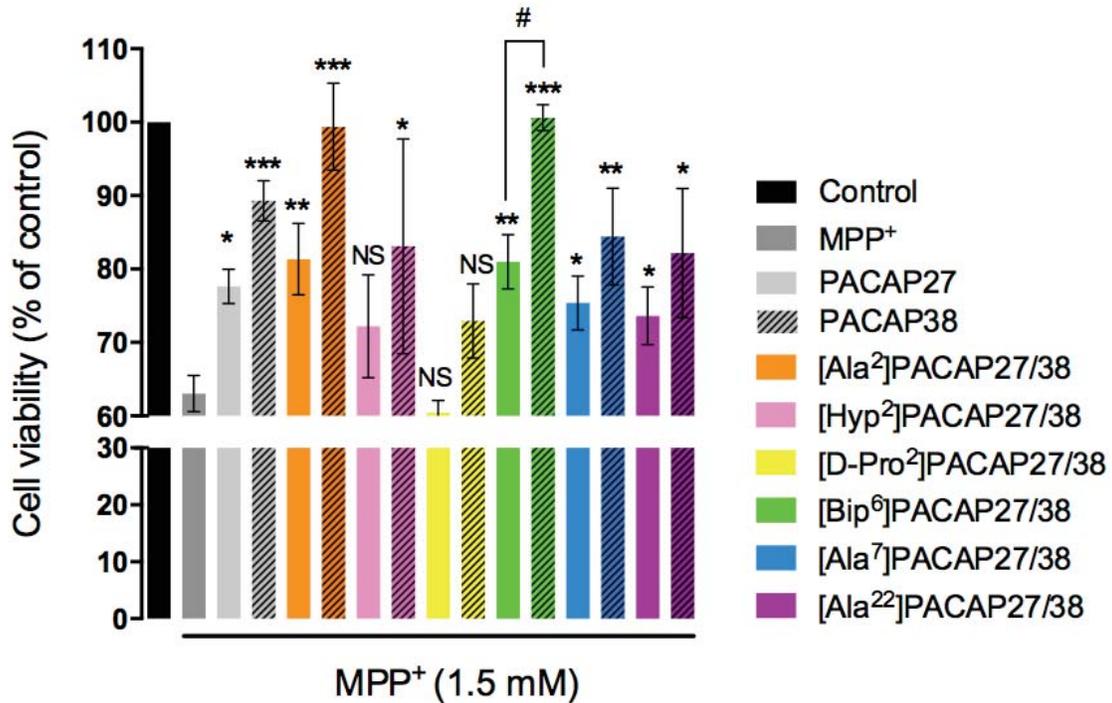
44. Rat D, Schmitt U, Tippmann F, Dewachter I, Theunis C, Wiczczak E, et al. Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *FASEB J*. 2011;25(9):3208-18.

45. Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Szalontay L, Lengvari I. Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept.* 2004;123(1-3):85-94.
46. Shioda S, Ozawa H, Dohi K, Mizushima H, Matsumoto K, Nakajo S, et al. PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;865:111-7.
47. Shivers KY, Nikolopoulou A, Machlovi SI, Vallabhajosula S, Figueiredo-Pereira ME. PACAP27 prevents Parkinson-like neuronal loss and motor deficits but not microglia activation induced by prostaglandin J2. *Biochimica et biophysica acta.* 2014;1842(9):1707-19.
48. Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, et al. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature.* 1993;365(6442):170-5.
49. Sun C, Song D, Davis-Taber RA, Barrett LW, Scott VE, Richardson PL, et al. 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.* 2007;104(19):7875-80.
50. Sze KH, Zhou H, Yang Y, He M, Jiang Y, Wong AO. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology.* 2007;148(10):5042-59.
51. Thompson GL, Canals M, Poole DP. Biological redundancy of endogenous GPCR ligands in the gut and the potential for endogenous functional selectivity. *Front Pharmacol.* 2014;5:262.
52. van der Westhuizen ET, Breton B, Christopoulos A, Bouvier M. Quantification of ligand bias for clinically relevant beta2-adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. *Mol Pharmacol.* 2014;85(3):492-509.

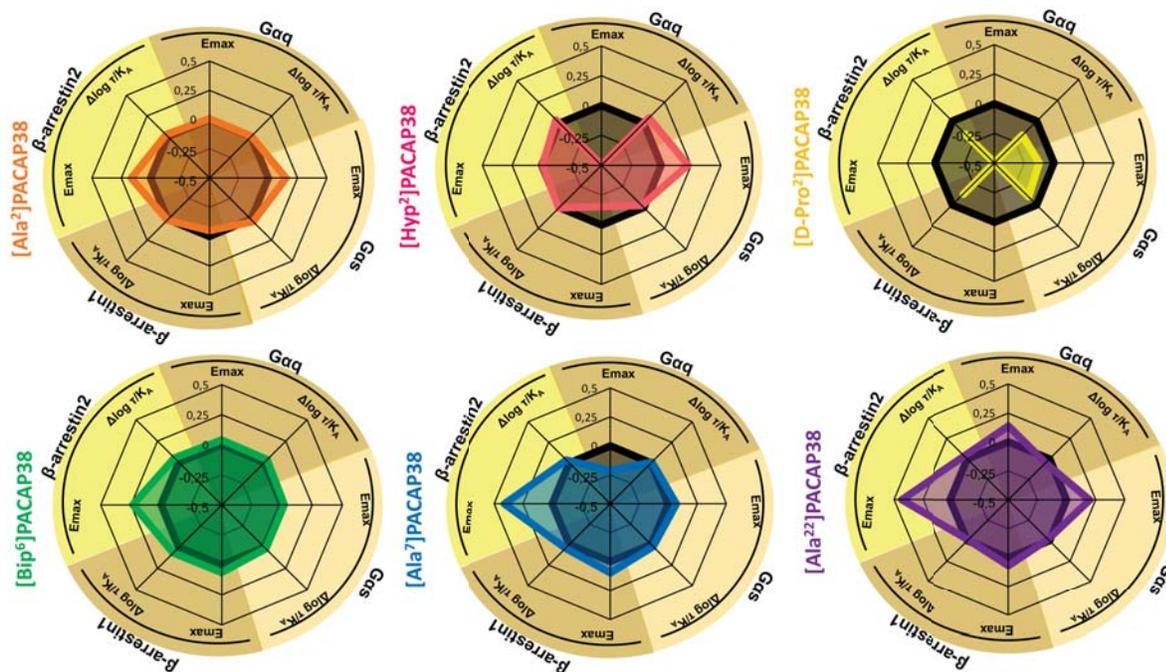
53. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, et al. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacological Reviews*. 2009;61(3):283-357.
54. Villalba M, Bockaert J, Journot L. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci*. 1997;17(1):83-90.
55. Walker CS, Sundrum T, Hay DL. PACAP receptor pharmacology and agonist bias: analysis in primary neurons and glia from the trigeminal ganglia and transfected cells. *Br J Pharmacol*. 2014;171(6):1521-33.
56. Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett*. 2005;579(18):4005-11.
57. Wang G, Pan J, Tan YY, Sun XK, Zhang YF, Zhou HY, et al. Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP) subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides*. 2008;42(3):267-76.
58. Warren JB, Cockcroft JR, Larkin SW, Kajekar R, Macrae A, Ghatei MA, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator in humans. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20(1):83-7.
59. Wray V, Kakoschke C, Nokihara K, Naruse S. Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*. 1993;32(22):5832-41.
60. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal*. 2010;123(8):1086-92.
61. Yin Y, Zhou XE, Hou L, Zhao LH, Liu B, Wang G, et al. An intrinsic agonist mechanism for activation of glucagon-like peptide-1 receptor by its extracellular domain. *Cell Discov*. 2016;2:16042.

62. Zhang H, Qiao A, Yang D, Yang L, Dai A, de Graaf C, et al. Structure of the full-length glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2017;546(7657):259-64.

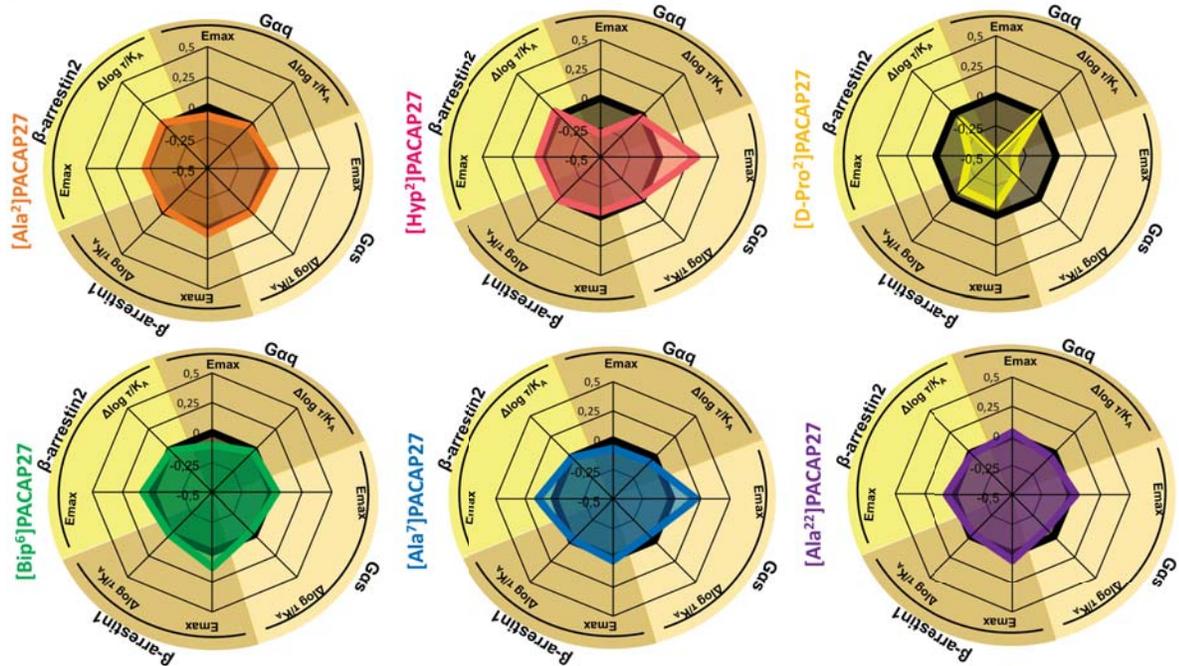
## FIGURE LEGENDS



**Fig. 1.** Effects of MPP<sup>+</sup> (1.5 mM) on SH-SY5Y cell viability after a 4 h pretreatment with PACAP or its related analogs (peptide concentration 10<sup>-7</sup>M). Results associated with PACAP27 analogs are represented by solid bars while those of PACAP38 and its derivatives are represented by striped bars. Values represent the mean ± S.E.M of 3 to 6 independent experiments performed in sextuplets. Statistical analyses were performed using the Student's t-test versus the percentage of cell viability measured in presence of MPP<sup>+</sup> alone (NS, non-significant; \**P* ≤ 0.05; \*\**P* ≤ 0.01 and \*\*\**P* ≤ 0.001). Statistical analyses between the PACAP27 and PACAP38 isoforms were performed using the Student's t-test (#*P* ≤ 0.05; ##*P* ≤ 0.01 and ###*P* ≤ 0.001).



**Fig. 2.** Kiviati chart of PACAP38 and its related analogs obtained with the responses of the various signaling pathways associated with PAC1 receptor activation. Each Kiviati chart summarizes the maximal effect ( $E_{max}$ ) and the  $\log \tau/K_A$  of the different ligand-activated signaling pathway. In order to compare activity of each ligand to PACAP38, each  $E_{max}$  and  $\log \tau/K_A$  values were normalized with respect to the value of  $E_{max}$  or  $\log \tau/K_A$  of PACAP38. Data for PACAP38 are represented with the black line.



**Fig. 3.** Kiviat chart of PACAP27 and its related analogs obtained with the responses of the various signaling pathways associated with PAC1 receptor activation. Each Kiviat chart summarizes the maximal effect ( $E_{\max}$ ) and the  $\log \tau/K_A$  of the different ligand-activated signaling pathway. In order to compare activity of each ligand to PACAP27, each  $E_{\max}$  and  $\log \tau/K_A$  values were normalized with respect to the value of  $E_{\max}$  or  $\log \tau/K_A$  of PACAP27. Data for PACAP27 are represented with the black line.

**Table 1.** Binding affinity of the PACAP isoforms and their related analogs on human PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptors.

Compound	PAC1		VPAC1		VPAC2	
	n	pIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	n	pIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	n	pIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
PACAP38	4	8.19 ± 0.12	3	8.51 ± 0.28	4	7.93 ± 0.21
[Ala <sup>2</sup> ]PACAP38	3	8.76 ± 0.08**	3	9.68 ± 0.18*	3	9.45 ± 0.13**
[D-Pro <sup>2</sup> ]PACAP38	3	6.75 ± 0.12***	3	6.72 ± 0.24**	3	7.98 ± 0.29
[Hyp <sup>2</sup> ]PACAP38	3	8.21 ± 0.15	3	7.57 ± 0.20	3	8.20 ± 0.15
[Bip <sup>6</sup> ]PACAP38	3	8.00 ± 0.16	3	8.06 ± 0.21	3	8.17 ± 0.21
[Ala <sup>7</sup> ]PACAP38	3	8.52 ± 0.11	3	7.78 ± 0.24	3	7.48 ± 0.15
[Ala <sup>22</sup> ]PACAP38	3	7.54 ± 0.16*	3	6.99 ± 0.25*	3	5.60 ± 0.30**
PACAP27 <sup>b</sup>	3	8.34 ± 0.07	3	8.23 ± 0.01	3	7.99 ± 0.16
[Ala <sup>2</sup> ]PACAP27 <sup>b</sup>	3	8.33 ± 0.12	3	8.15 ± 0.07	3	7.16 ± 0.11*
[D-Pro <sup>2</sup> ]PACAP27 <sup>b</sup>	3	6.33 ± 0.14**	3	6.04 ± 0.13***	3	5.65 ± 0.10***
[Hyp <sup>2</sup> ]PACAP27 <sup>b</sup>	3	8.07 ± 0.18	3	7.40 ± 0.11**	3	6.89 ± 0.07**
[Bip <sup>6</sup> ]PACAP27 <sup>b</sup>	3	8.36 ± 0.17	3	7.85 ± 0.15	3	7.64 ± 0.11
[Ala <sup>7</sup> ]PACAP27 <sup>b</sup>	3	7.78 ± 0.16*	3	7.51 ± 0.21*	3	5.80 ± 0.12***
[Ala <sup>22</sup> ]PACAP27	3	6.94 ± 0.11**	4	7.42 ± 0.13**	3	<5***

<sup>a</sup>Negative log concentration producing 50% inhibition of specific binding of <sup>125</sup>I-Ac-PACAP27.

<sup>b</sup>Binding values for these analogs were reported elsewhere (Doan *et al.*, 2011). Statistical analysis was performed using a Student's t-test versus the value obtained with native PACAP isoforms (\**P* ≤ 0.05; \*\**P* ≤ 0.01; \*\*\**P* ≤ 0.001). Each replicate (n) was conducted on different cell passages.

**Table 2.** Agonist activity of PACAP isoforms and their related analogs.

Compound	G $\alpha_q$			G $\alpha_s$			$\beta$ -arrestin 1			β-arrestin2		
	n	pEC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>	n	pEC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>	n	pEC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>	n	pEC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>
PACAP38	4	7.03 ± 0.15	94 ± 7	10	7.58 ± 0.27	76 ± 7	6	6.60 ± 0.12	121 ± 8	8	6.80 ± 0.22	92 ± 10
[Ala <sup>2</sup> ]PACAP38	4	7.42 ± 0.18	95 ± 6	5	8.13 ± 0.31	103 ± 10*	3	6.71 ± 0.16	109 ± 8	3	6.92 ± 0.18	129 ± 11
[D-Pro <sup>2</sup> ]PACAP38	4	inactive	inactive	4	6.52 ± 0.42	59 ± 14	5	inactive	inactive	3	inactive	inactive
[Hyp <sup>2</sup> ]PACAP38	4	7.45 ± 0.81	22 ± 6***	4	7.02 ± 0.34	120 ± 12**	3	6.76 ± 0.21	89 ± 9*	4	7.23 ± 0.41	91 ± 12
[Bip <sup>6</sup> ]PACAP38	4	7.41 ± 0.30	102 ± 10	5	8.09 ± 0.43	79 ± 10	5	7.44 ± 0.15***	137 ± 7	4	7.10 ± 0.21	148 ± 11**
[Ala <sup>7</sup> ]PACAP38	4	6.66 ± 0.32	61 ± 11*	4	8.01 ± 0.43	87 ± 9	5	7.13 ± 0.11**	147 ± 6*	3	6.67 ± 0.16	220 ± 15***
[Ala <sup>22</sup> ]PACAP38	4	6.32 ± 0.12**	124 ± 11	4	7.40 ± 0.27	114 ± 11*	3	6.44 ± 0.13	139 ± 11	4	6.58 ± 0.20	233 ± 22***
PACAP27	8	6.93 ± 0.09	106 ± 4	9	8.27 ± 0.20	91 ± 5	1	6.56 ± 0.07	118 ± 5	7	6.92 ± 0.10	101 ± 5
[Ala <sup>2</sup> ]PACAP27	4	6.93 ± 0.11	92 ± 5	4	8.49 ± 0.36	101 ± 9	7	6.48 ± 0.13	128 ± 10	3	7.28 ± 0.29	104 ± 11
[D-Pro <sup>2</sup> ]PACAP27	3	5.82 ± 0.45**	36 ± 13***	4	<5	44 ± 14**	3	inactive	inactive	3	5.67 ± 0.30***	57 ± 16**
[Hyp <sup>2</sup> ]PACAP27	3	6.75 ± 0.20	57 ± 7***	3	7.50 ± 0.22	175 ± 10***	7	6.64 ± 0.15	109 ± 9	4	7.43 ± 0.26	107 ± 8
[Bip <sup>6</sup> ]PACAP27	3	6.74 ± 0.20	86 ± 9*	3	7.53 ± 0.41	98 ± 11	4	6.49 ± 0.10	152 ± 9**	4	6.61 ± 0.14	118 ± 8
[Ala <sup>7</sup> ]PACAP27	3	6.26 ± 0.12**	92 ± 8	3	7.22 ± 0.38*	139 ± 15**	3	6.57 ± 0.16	124 ± 12	3	6.42 ± 0.11*	134 ± 8**
[Ala <sup>22</sup> ]PACAP27	3	6.38 ± 0.09**	113 ± 7	4	7.00 ± 0.23**	98 ± 10	7	6.23 ± 0.13*	133 ± 14	3	6.52 ± 0.16	114 ± 10

<sup>a</sup>Negative logarithm of the concentration producing 50% of maximal effect. <sup>b</sup>Maximum efficacy is expressed as a percentage of activation induced by the related endogenous PACAP. A decrease in BRET signal was observed at high concentrations of PACAP resulting in bell-shaped curves. This phenomenon has been previously described in the literature and is explained by receptor internalization (ref 23). Thereby, E<sub>max</sub> of each ligand was normalized with the highest value obtained for PACAP27 or PACAP38. Statistical analysis was performed using a Student's t-test versus the value obtained with native PACAP38 (\**P* ≤ 0.05 ; \*\**P* ≤ 0.01 ; \*\*\**P* ≤ 0.001). Each replicate (n) was conducted on different cell passage.

# *Article 2*

## CHAPITRE 3 : ARTICLE 2

### **Design of membrane-tethering peptides derived from the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor 1 and characterization of their neuroprotective properties in neurodegenerative disease models**

Mathilde Poujol de Molliens<sup>\*†</sup>, Priyanka Jamadagni<sup>‡</sup>, Myriam Létourneau<sup>\*†</sup>, Dominic Devost<sup>§</sup>, Terence E. Hébert<sup>§</sup>, Shunmoogum A. Patten<sup>‡</sup>, Alain Fournier<sup>†</sup>, David Chatenet<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>†</sup>Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>‡</sup>Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>§</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, QC, Canada

Cet article est soumis dans Neurotherapeutics, 2018.

## 1. Résumé de l'article en français :

Le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* est capable d'induire une neuroprotection dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, suite à l'activation de PAC1, un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). Ce dernier représente donc une cible prometteuse pour le traitement des maladies neurodégénératives. Cependant, ce peptide peut se lier à deux autres RCPGs, VPAC1 et VPAC2, ce qui provoque des effets indésirables, notamment sur le système cardiovasculaire. La transmission du signal au niveau intracellulaire est directement associée à des changements structuraux opérés au niveau des boucles intracellulaires d'un RCPG donné. Ainsi, nous supposons que des peptides dérivés des boucles intracellulaires de PAC1 pourraient initier, en tant que modulateurs allostériques présumés, diverses cascades de signalisation par une reconnaissance spécifique de PAC1 et une modulation conformationnelle de celui-ci. Trois molécules, dérivées de chacune des trois boucles intracellulaires de PAC1, ont été synthétisées puis évaluées pour leur capacité à 1) promouvoir la survie cellulaire, 2) stimuler les diverses voies de signalisation associées à l'activation de PAC1, 3) activer sélectivement PAC1, VPAC1 ou VPAC2, et 4) réduire les effets délétères dans un modèle parkinsonien de poisson-zèbre. Nos résultats montrent que ces trois molécules, du nom générique de pepducines, sont capables d'assurer la survie cellulaire d'une lignée de neuroblastome humain exprimant le récepteur PAC1-*null* humain, et ce, en absence du ligand endogène. Par ailleurs, elles sont toutes capables d'activer les protéines  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_q$ . Enfin, nos résultats obtenus avec les poissons-zèbres confirment un effet neuroprotecteur *in vivo* des pepducines dérivées de PAC1, sur la base de leur capacité à préserver la mobilité du poisson-zèbre et à prévenir la diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase au niveau du cerveau. La découverte de telles molécules représente une avancée importante dans la conception de nouveaux traitements pour certaines maladies neurodégénératives.

## 2. Contribution de l'étudiant :

La synthèse des pepducines et les mesures *in vitro*, tels que les tests de survie et les tests de *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET) ont été réalisées en totalité par Mathilde Poujol de Molliens. Les résultats *in vivo* ont également été obtenus par l'étudiante sous la supervision des professeurs David Chatenet et Alain Fournier, en collaboration avec le professeur Shunmoogum A. Patten. Les images des coupes de cerveau de poisson-zèbre ont été produites avec l'aide de Priyanka Jamadagni. Myriam Létourneau a collaboré à cet article en donnant de précieux conseils sur la nature des manipulations à réaliser et en participant à la révision du manuscrit. Terence E. Hébert et Dominic Devost ont conçu les sondes de BRET et ont révisé le manuscrit. Comme mentionné ci-haut, la partie *in vivo* a été effectuée en collaboration avec le Pr Shunmoogum A. Patten. Ce dernier a également contribué à la discussion des résultats et à la révision du manuscrit. David Chatenet et Alain Fournier ont conçu le projet, supervisé les travaux de recherche et aidé à l'élaboration des hypothèses. Finalement, ils ont révisé le manuscrit pour la production de la version finale.

## **Design of membrane-tethering peptides derived from the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor 1 and characterization of their neuroprotective properties in neurodegenerative disease models**

Mathilde Poujol de Molliens<sup>\*,†</sup>, Priyanka Jamadagni<sup>‡</sup>, Myriam Létourneau<sup>\*,†</sup>, Dominic Devost<sup>§</sup>, Terence E. Hébert<sup>§</sup>, Shunmoogum A. Patten<sup>‡</sup>, Alain Fournier<sup>†</sup>, David Chatenet<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>†</sup>Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>‡</sup>Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada

<sup>§</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, QC, Canada

### **Correspondence**

Pr. David Chatenet, INRS – Institut Armand-Frappier, Groupe de Recherche en Ingénierie des Peptides et en Pharmacothérapie (GRIPP), Université du Québec, Ville de Laval, QC, Canada, H7V 1B7

E-mail address: [david.chatenet@iaf.inrs.ca](mailto:david.chatenet@iaf.inrs.ca); Tel: +1-450-687-5010; Fax: +1-450-686-5446

Original research

### **Abstract**

Over the years, the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1), a class B G protein-coupled receptor (GPCR), has emerged as a promising target for treating neurodegenerative diseases. Unfortunately, despite decades of research, no PAC1-specific agonist has been discovered, as activity on two other GPCRs, VPAC1 and VPAC2, associated with several adverse effects, is retained with current PACAP analogs. Cell signaling is directly related to structural modifications in the intracellular loops (ICLs) of GPCRs. Thus, we posited that peptide derived from the ICLs (called pepducins) of PAC1 might initiate, as allosteric ligands, various signaling cascades by specific recognition of the parent receptor and modulation of its conformational landscape. Three pepducins, derived from the PAC1 ICLs, were synthesized and evaluated for their ability to 1) promote cell survival; 2) stimulate various signaling pathways associated with PAC1 activation; 3) modulate selectively PAC1, VPAC1 or VPAC2; and 4) sustain mobility and prevent death of dopaminergic neurons in a zebrafish model of Parkinson's disease (PD). Our results demonstrate that these molecules promote SH-SY5Y cell survival, a human neuroblastoma cell line endogenously expressing PAC1, and activate downstream signaling via  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_q$ . Interestingly, both pepducins derived from ICLs 1 and 2 appeared to activate selectively PAC1, VPAC1 and VPAC2. Also, *in vivo* experiments, using a zebrafish PD model, showed a neuroprotective action for each PAC1-pepducin, revealing their ability to preserve mobility and tyrosine hydroxylase expression in the brain. Thus, such an approach represents an attractive strategy for developing innovative therapies for neurodegenerative diseases.

**Keywords:**

Pepducin, PACAP, PAC1 receptor, Parkinson's disease, neuroprotection, BRET-based biosensor.

**Abbreviations:**

ACN, acetonitrile; BBB, blood-brain barrier; Boc, tert-butoxycarbonyl; BOP, (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; DCM, dichloromethane; DIEA, N,N-diisopropylethylamine; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMF, dimethylformamide; d.p.f., days post-fertilization; FBS, fetal bovine serum; Fmoc, fluorenylmethyloxycarbonyl; GFP 10, green fluorescent protein 10; GPCR, G protein-coupled receptor; h.p.f., hours post-fertilization; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; PAC1, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; RlucII, *Renilla* luciferase II; RP-HPLC, reverse phase-high performance liquid chromatography.

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by tremor, bradykinesia and muscle rigidity, as well as verbal disturbance and deficits in attention (Maiti *et al.*, 2017). These symptoms are mainly associated with a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc), thereby leading to a decrease of dopamine release. Many studies have shown that this disease is associated with multiple etiological factors such as exposure to environmental toxins or genetic mutations, which lead to mitochondrial damage, oxidative stress, inflammation and excitotoxicity (Freire *et al.*, 2012, Jankovic, 2008, Joe *et al.*, 2018, Klein *et al.*, 2012, Maiti *et al.*, 2017). With the growing aging population, the prevalence of PD is becoming a major public health issue. At present, symptomatic treatments like dopamine substitution, anticholinergic medications, immunotherapies and surgical procedures are available, but none of them are disease-modifying (Maiti *et al.*, 2017). Therefore, there is an urgent need to develop new ways to slow down or even stop neuronal loss associated with PD.

The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) was discovered based on its capacity to stimulate potently the activity of adenylyl cyclase from rat anterior pituitary cells (Miyata *et al.*, 1989). This peptide, which exists in two endogenous isoforms termed PACAP38 and PACAP27, mediates its effects *via* the activation of three G protein-coupled receptors (GPCRs), *i.e.* PAC1, VPAC1 and VPAC2 (Harmar *et al.*, 1998). PACAP isoforms belong to the secretin/glucagon/vasoactive intestinal peptide (VIP) family of GPCRs and share up to 68% sequence homology with VIP. While VIP exhibits about 1000 times less affinity for PAC1 than both PACAP isoforms, these peptides bind VPAC1 and VPAC2 with similar potency (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Biochemical and pharmacological studies have shown that PACAP and its receptors are widely distributed in the central nervous system (CNS) and in peripheral tissues (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Among its numerous biological activities, PACAP is notably involved in the development and the regulation of the central nervous (Shen *et al.*, 2013, Watanabe *et al.*, 2016), cardiac (Tompkins *et al.*, 2016), inflammatory (Wainwright *et al.*, 2008), skeletal (T.

Juhász *et al.*, 2015) and reproductive systems (Canipari *et al.*, 2016). In addition, it has been demonstrated that this peptide shows striking beneficial effects in various neurodegenerative pathologies such as Parkinson's, Alzheimer's, and Huntington's diseases, as well as ischemia, traumatic brain injury, diabetes, myeloma, kidney injury, headaches, cardiac injury, and retinopathy (Arimura *et al.*, 2006, E. H. Lee *et al.*, 2014, Sanlioglu *et al.*, 2012, Subramaniam *et al.*, 2017, Vollesen *et al.*, 2018, Werling *et al.*, 2017). In the CNS, the neuroprotective actions of PACAP are mediated by the activation of PAC1, which reduces neuronal apoptosis, and to a lesser extent VPAC1, which induces anti-inflammatory processes (Harmar *et al.*, 2012). Conversely, VPAC2 stimulation produces detrimental peripheral cardiovascular effects such as vasodilation and tachycardia (Brifault *et al.*, 2016). Over the years, numerous studies have demonstrated that PAC1 represents an attractive and promising target for the treatment of neurodegenerative disorders. Unfortunately, despite studies conducted to understand the specific determinants involved in the recognition and activation of PAC1 by PACAP, no specific PAC1 ligand has been discovered to date, although some selective compounds have been described (Bourgault *et al.*, 2008a, Bourgault *et al.*, 2009a, Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Lamine *et al.*, 2016, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Hence, from a therapeutic perspective, the development of highly selective PAC1 agonists still represents a promising strategy for elaborating new treatments focusing on stopping or at least slowing down the progression of neurodegenerative processes related to CNS disease or traumatic brain injuries.

GPCRs comprise an extracellular N-terminal segment, seven transmembrane domains, three extra- and intra-cellular loops, respectively (ECLs and ICLs) and a cytoplasmic C-terminal tail. It is well established that GPCRs can adopt multiple conformations and that those are further shaped by their interactions with ligands, partner receptors or regulatory proteins (Gurevich *et al.*, 2017). Still, ligand interactions with GPCRs, by altering receptor conformation at the level of the ICLs, modulate the type and the extent of contribution of different effectors involved in signaling pathways (Gurevich *et al.*, 2017). Interestingly, the demonstration that ago-allosteric

modulators derived from the ICLs of a target receptor can promote receptor activation and subsequent signaling cascades has opened up new vistas in drug discovery. Accordingly, these derivatives, called pepducins, have been developed for several GPCRs such as the protein-activated receptor-1 (PAR1) and PAR2, the  $\beta_2$ -adrenergic receptor, the C-X-C chemokine receptor 4, the sphingosine-1-phosphate receptor, and the P2Y<sub>2</sub>R (Carr *et al.*, 2016b, Gabl *et al.*, 2016, Licht *et al.*, 2003, Shearer *et al.*, 2016, Tchernychev *et al.*, 2010, P. Zhang *et al.*, 2012). Their effects are quite striking and it is worth mentioning that some are currently going through clinical studies. This is the case with PZ-128, a pepducin derived from the third ICL of the PAR1 receptor, which is used as an antiplatelet agent (Gurbel *et al.*, 2016). Hence, the development of pepducins derived from the ICLs of PAC1 could be an innovative strategy to target PAC1-associated neuroprotective actions, while avoiding significant activation of the VPAC receptors.

Thus, the goal of this study was to investigate the propensity of pepducins derived from PAC1 intracellular loops to exert neuroprotective action in cellular and zebrafish Parkinson's models. In comparison with PACAP38, PAC1-derived pepducins were evaluated for their capacity to protect human neuroblastoma cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) toxicity and, using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensors, for their ability to promote G protein ( $G\alpha_s$  and  $G\alpha_q$ ) activation. In an *in vivo* MPTP-induced zebrafish model of PD, we assessed the propensity of PAC1-derived pepducins to preserve the motility and tyrosine hydroxylase (TH) expression in the CNS of the animal. Altogether, our results reveal the capacity of PAC1-derived pepducins to protect neuroblastoma cells against MPP<sup>+</sup> toxicity and activate signaling pathways associated with PAC1 neuroprotection. Additionally, we showed *in vivo* that these peptides, in particular the PAC1-selective PAC1-Pep1, maintained partially zebrafish mobility and protected significantly dopaminergic neurons against MPTP toxicity. These tools represent innovative PAC1-targeted agonists with unique pharmacological profiles.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials.

The fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-protected amino acids, the Fmoc-Rink-amide AM-functionalized polystyrene resin and the coupling reagent (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) were purchased from Chem-Impex (Wood Dale, IL). Trifluoroacetic acid (TFA), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), diethyl ether, N,N-dimethylformamide (DMF), piperidine, dichloromethane (DCM) and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, ON). Prolume Purple (methoxy-e-coelenterazine) was purchased from NanoLight™ Technology (Pinetop, AZ). N,N-diisopropylethylamine (DIPEA), dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,2-ethanedithiol (EDT), thioanisole,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, phenol, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 1-phenyl-2-thiourea (PTU) and all other chemicals were from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON). Ham's F12, MEM medium, OptiMEM, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, D-glucose, penicillin and streptomycin (P/S) and all other cell culture reagents were from Wisent (St-Bruno, QC).

### 2.2. Peptide synthesis

Pepducin sequences were derived from the sequence of the human PAC1-null (Figure 1 and Table 1). All peptides were synthesized using a commercially available Fmoc-Rink-amide MBHA resin and following Fmoc-based solid phase peptide synthesis procedures. All protected amino acids (3 equiv based on the resin substitution) were coupled using an *in situ* activation step with BOP (3 equiv) and DIEA (5 equiv) in DMF for 45 min. At the end of the synthesis, using palmitic anhydride (3 equiv), a palmitoyl moiety was added to the N-terminus of each pepducin. Deprotection of the Fmoc-protecting group was achieved in 15 min with 20% piperidine in DMF. Each coupling and deprotection step was monitored using a ninhydrin test. Peptide-resins were

dried *in vacuo* and then cleaved with reagent K (TFA/water/phenol/thioanisole/EDT; 82.5:5:5:5:2.5). Peptides were purified by preparative reverse phase HPLC to attain a minimum of 95% purity and the molecular weight of each compound was verified by MALDI-TOF mass spectrometry using the  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. Peptides were lyophilized and kept at -20°C until use.

### 2.3. Cell culture

The neuroblastoma cell line SH-SY5Y, endogenously expressing human PAC1 and VPAC2 receptors but not VPAC1 (Licht *et al.*, 2003), was grown in a 1:1 mixture of MEM medium and Ham's F-12 nutrient mixture containing 15% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 100 UI/mL of P/S. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 4.5 g/L D-glucose, 2 mM L-glutamine and 100 UI/mL of P/S. All cell lines were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and passages were performed using trypsinization when cells reached about 80% confluence.

### 2.4. Pepducin preparation

Stock solutions of PAC1-derived pepducins were prepared by solubilizing peptides in a DMSO/H<sub>2</sub>O mixture (5%/95%) at a concentration of 1 mg/mL. At 10<sup>-7</sup> M, which is the highest concentration used in the majority of our assays (except when assessing cytotoxicity of the pepducins themselves), our solution contains only 0.05% of DMSO. This DMSO concentration was therefore used in our assays as a control.

### 2.5. Cytotoxicity assays

SH-SY5Y cells were seeded into 96-well plates at a density of 50,000 cells/well. After 24 h, cells were starved for 2 h and then incubated at 37°C for 24 h with different concentrations of PAC1-derived pepducins (10<sup>-8</sup> -10<sup>-5</sup>M). Cell toxicity was assessed using a LDH cytotoxicity assay kit

(BioChain®, Newark, CA) and a microplate reader FlexStation®3 (Molecular Devices, San Jose, CA) to determine formazan formation related to lactate dehydrogenase (LDH) activity. Positive (lysis solution) and negative (non-treated cells) controls were included in each experiment. Percentage of cytotoxicity for each compound was obtained using the formula:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Compound treatment LDH activity} - \text{negative control LDH activity}}{\text{Positive control LDH activity} - \text{negative control LDH activity}} \times 100$$

#### 2.4. Cell survival assays

SH-SY5Y cells, seeded into 96-well plates at a density of 30,000 cells/well, were incubated for 48 h. Cells were starved for 2 h and then incubated at 37°C for 4 h with PACAP or pepducins (10<sup>-7</sup>M) prior to the addition of MPP<sup>+</sup> (1.5 mM final concentration) as previously described (Poujol de Molliens *et al.*, 2018). Cell viability was assessed 24 h after the MPP<sup>+</sup> treatment using the cell titer Blue-cell viability assay kit (Promega, Madison, WI) and a microplate reader FlexStation®3 (Molecular Devices, San Jose, CA) to determine fluorescence intensity related to the conversion of resazurin into resoflurin. Positive control (MPP<sup>+</sup>-treated cells) and negative control (non-treated cells) were included in each experiment.

#### 2.5 Pepducin specificity

Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensors, activation of G $\alpha_s$  was monitored in HEK 293 cells transiently expressing PAC1, VPAC1 or VPAC2 or an empty plasmid. These receptors (pcDNA 3.1\_PAC1, pcDNA 3.1\_VPAC1 or pcDNA 3.1\_VPAC2) or the empty plasmid and the biosensor for G $\alpha_s$  (pcDNA3.1\_G $\alpha_s$ -RlucII and pcDNA3.1\_G $\gamma$ 1-GFP<sub>10</sub>) were transiently co-transfected into HEK 293 cells using the TransIT-2020 transfection reagent. A 1.5:1 ratio of TransIT-2020 was used. On the day of transfection, cells were trypsinized and suspended at a density of 300,000 cells/mL in media supplemented with 2.5% FBS. DNA and TransIT-2020 were combined in OptiMEM, and the mixture was incubated at room temperature

(RT) for 30 min before being added to the cells. Transfected cells were then seeded in 96-well plates at a density of 30,000 cells/well for the  $G\alpha_s$  activation assays. After 24 h, medium was removed and changed with media supplemented with 5% FBS and 100 UI/mL of P/S before being incubated for another 24 h. Cells were washed with 120  $\mu$ L PBS solution supplemented with 0.1% glucose, followed by an incubation with 80  $\mu$ L of this solution for 2 h. Then, 10  $\mu$ L of a 50  $\mu$ M solution (prepared before use) of Prolume Purple (stock at 1 mg/mL in methanol) in PBS containing 0.1% glucose, and 10  $\mu$ L of the 10X concentration of peptide ( $5 \times 10^{-6}$  M), were added before resuming the incubation for 30 min at RT. Filters were set at 410 nm and 515 nm to detect *Renilla* luciferase II (RlucII, donor) and green fluorescent protein 10 (GFP10, acceptor) light emission, respectively. BRET signals, measured on a TECAN Infinite 2000, were monitored for 45 min, every 5 min, after co-addition of the coelenterazine derivative and the peptide ligand. BRET ratios were determined by calculating the ratio of light emitted by GFP10 over the light emitted by RlucII.  $\Delta$ BRET were obtained by subtracting background measured for each receptor.

## 2.6. Bioluminescence resonance energy transfer assays

Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensors, the activation of  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_s$  was monitored in SH-SY5Y cells. The pLVXi2H-Polycis\_ $G\alpha_q$ -RlucII-GFP<sub>10</sub>- $\gamma$ 1- $\beta$ 1 or pcDNA3.1\_ $G\alpha_s$ -RlucII and pcDNA3.1\_ $G\gamma$ 1-GFP<sub>10</sub> plasmids were transiently transfected into SH-SY5Y cells using the conditions described above. Then, 10  $\mu$ L of the 10X concentration of peptide were added before resuming the incubation for 30 min at RT. After 25 min, 10  $\mu$ L of a 50  $\mu$ M solution (prepared before use) of Prolume Purple (stock at 1 mg/mL in methanol) in PBS containing 0.1% glucose was added to wells and BRET signals were monitored for 5 min after co-addition of the coelenterazine derivative and the peptide ligand. BRET was assessed as described above. Finally, BRET signals were normalized to the maximum signal measured with PACAP38.

### *2.7 Zebrafish maintenance*

All experimental procedures were performed in accordance with the regulations and ethical guidelines from the Canadian Council on Animal Care. We also received the approval from the institutional committee for animal care of the Institut National de la Recherche Scientifique. Embryonic development was followed in hours post-fertilization (h.p.f.) or days post-fertilization (d.p.f.), as described previously (Kimmel *et al.*, 1995). Embryos and larvae were maintained at 28°C. For tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining, embryos were maintained in water containing 0.003% of 1-phenyl-2-thiourea (PTU).

### *2.8 Treatment protocols with peptides and neurotoxic agent*

Embryos were distributed in 6-well plates (20-25 embryos/well) containing fish water (5 mL) with or without the studied compound. In a first set of experiments, on day 1 post-fertilization, embryos were manually dechorionated and then treated with a solution containing either  $10^{-4}$ M of MPTP,  $10^{-7}$  M PACAP38 or  $10^{-7}$  M pepducins to assess the toxicity of each substance on zebrafish embryos. In a second set of experiments, on day 1 post-fertilization, co-exposure of fish embryos to MPTP and peptides was performed until day 5 to assess the neuroprotective action of PAC1-derived pepducins. Fresh solution containing MPTP and peptides were prepared each day. Different groups were evaluated, as described in Table 2, and compared to a control group (no exposure to any substances) or to MPTP treated group.

### *2.9 Behavioral experiments*

Zebrafish motor activity was analyzed at 5 d.p.f. using a Basler GenIcam camera and a DanioVision recording chamber (Noldus, Wageningen, NL). Larvae were placed individually in a 96-well plate (1 embryo/well) and activity were recorded during 2 h. Data analysis was performed using the Ethovision XT 12 software from Noldus to quantify the distance swam.

### 2.10 Immunocytochemistry, microscopy and image analysis

At day 5 post-fertilization, zebrafish larvae were fixed in Dent's fixative (80% MeOH/20% DMSO) overnight (O/N) at 4°C. Specimens were progressively rehydrated into PBS and then washed 3 times (for 30 min each time) with PBS containing 1% Triton X-100 (PBS-T), before being treated with 10% normal goat serum (NGS), 1% DMSO and 2% BSA in PBS-T (the blocking solution) for 1 h at RT. Thereafter, a primary monoclonal mouse anti-TH antibody (Millipore, MAB318), diluted at 1:200 in the blocking solution, was added and the incubation was resumed O/N at 4°C. Specimens were washed in PBS-T at RT (4 times; 30 min each), blocked for 1 h with this solution and then incubated O/N at 4°C in PBS-T containing a goat anti-mouse Alexa-488 conjugated secondary antibody (Invitrogen, Burlington, ON). Final washing steps were performed at RT with PBS-T (4 times; 30 min each), before collecting the specimens. Fish heads were dissected and mounted in 80% glycerol/PBS on microscope slides with glass spacers. Imaging was achieved with a Zeiss LSM780 system attached to a Zeiss Axio Observer Z1 device. An EC Plan-Neofluar 10x 0.3NA objective was used for the observations and a Plan-Apochromat 20x 0.8NA was utilized for quantification of the TH-positive neurons. Global count of TH-positive neurons was assessed in hindbrain region excluding TH-positive neurons of the medulla oblongata, which correspond to noradrenergic neurons (McKinley *et al.*, 2005).

### 2.11 Data analysis

Cell survival assays and G protein activation assessments were performed at least in quadruplicate. Data, expressed as mean  $\pm$  S.E.M, were analyzed with Prism software (Graphpad Software, San Diego, CA). Sigmoidal concentration-response curves with variable slope and one-site competition function were fitted to determine EC<sub>50</sub>. A decrease in BRET signal was observed at high concentrations of PACAP resulting in bell-shaped curves. This phenomenon has been previously described in the literature and is explained by receptor

desensitization (Jorgensen *et al.*, 2007). Thereafter,  $E_{\max}$  of each ligand was normalized with the highest value obtained for PACAP38. Statistical comparisons between PACAP38 and pepducins were analyzed by Student's t-tests, and differences were considered significant when  $*P < 0.05$ . Data of behavioral assays are depicted with column bar graphs and expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Data were analyzed with Prism software and statistical analyses were performed using Student's t-tests, in comparison with control or MPTP-treated groups. Student's t-tests were also performed in order to compare the data obtained for the larvae treated with MPTP alone and for those co-treated with MPTP and a peptide. Differences were considered significant when  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  or  $***P < 0.001$ . TH-positive neurons were counted using the Zen lite blue edition software (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON) and data analysis was achieved with the Prism software. Statistical comparisons were analyzed with Student's t-tests, and differences were considered significant when  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  or  $***P < 0.001$ .

### **3. Results**

#### *3.1. In vitro characterization*

##### *3.1.1 Cytotoxic activity*

Due to their propensity to cross the plasma membrane (Tsuji *et al.*, 2013), we first evaluated the potential cytotoxicity of the three PAC1-derived pepducins using SH-SY5Y cells. More precisely, we evaluated the ability of these pepducins to induce LDH release, generally associated with damaged cells. As shown in Fig. 2, at  $10^{-5}$  M, PAC1-Pep2 and PAC1-Pep3 induced 35% and 45% LDH release, respectively. At  $10^{-6}$  M, PAC1-Pep2 and PAC1-Pep3 were still weakly toxic. Interestingly, PAC1-Pep1, derived from the first ICL of PAC1, was unable to trigger LDH release at any of the tested concentrations. Thereby, for further experiments, a concentration of  $10^{-7}$  M was chosen to avoid toxic effects.

### 3.1.2 Survival assays

Pepducins were initially evaluated for their ability to protect neuroblastoma SH-SY5Y cells against the neurotoxic effects of MPP<sup>+</sup>, an active metabolite of MPTP that produces neuronal damages very similar to those observed in PD (Maiti *et al.*, 2017). These cells, which endogenously express PAC1 and VPAC2 receptors (Lutz *et al.*, 2006), exhibit dopaminergic neuron characteristics (Lopes *et al.*, 2010) and have been largely used as an *in vitro* model of PD (Lamine *et al.*, 2016). As observed in Fig. 3, all pepducins were able to significantly protect SH-SY5Y cells against MPP<sup>+</sup> toxicity, whereas VIP failed to exert a similar effect. Interestingly, the neuroprotection level measured with PAC1-Pep1, PAC1-Pep2 and PAC1-Pep3 was comparable to that of PACAP38 used at the same concentration.

### 3.1.3 Pepducin selectivity

Pepducin selectivity was evaluated using HEK 293 cells transiently transfected with or without PAC1, VPAC1 or VPAC2 receptors. As shown in Fig. 4a, after 45 min, neither PACAP38 nor pepducins were able to induce G $\alpha_s$  activation in absence of the receptor, revealing a receptor-dependent action for PACAP38 and the PAC1-derived pepducins. However, in HEK 293 cells transiently expressing PAC1, VPAC1, or VPAC2, PACAP38 induced a sustained G $\alpha_s$  activation right after cell treatment (Fig. 4b, 4c, and 4d). Then, following an analysis of the kinetics of activation with HEK 293 cells expressing PAC1, it has been shown that PAC1-Pep1, PAC1-Pep2 and PAC1-Pep3 induced after 45 min a steeper G $\alpha_s$  activation that reached 26%, 65% and 43% of PACAP-mediated G $\alpha_s$  activation (Fig. 4b). Interestingly, also after 45 min, none of the pepducins stimulated G $\alpha_s$  in HEK 293 cells transiently transfected with VPAC1, while only PAC1-Pep3 induced a weak VPAC2-dependent G $\alpha_s$  activation that reached 16% of the PACAP-associated VPAC2 stimulation (Fig. 4d). Altogether, these results suggest that PAC1-Pep1 and PAC1-Pep2 activity is probably mediated through the activation of PAC1 receptors.

### 3.1.4 Pharmacological characterization of PAC1-derived pepducins

It has been demonstrated that PACAP-mediated PAC1 activation stimulates multiple signaling pathways including those involving  $G_{\alpha_q}$  and  $G_{\alpha_s}$ , and that their activation is associated with inhibition of neuronal apoptosis (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). Using BRET-based biosensors, we investigated, in SH-SY5Y cells, the propensity of PAC1-derived pepducins to activate  $G_{\alpha_q}$  and  $G_{\alpha_s}$ . As shown in Table 3, PAC1-Pep1 ( $pEC_{50} = 9.54 \pm 0.83$ ) and PAC1-Pep2 ( $pEC_{50} = 9.15 \pm 0.76$ ), derived from the first and second ICL of the receptor, stimulated  $G_{\alpha_q}$  with an apparent higher potency (not significant) than PACAP38, whereas PAC1-Pep1 exhibited a lower efficacy than PACAP38 ( $E_{max} = 59 \pm 11\%$  versus  $E_{max} = 79 \pm 11\%$ ). Interestingly, PAC1-Pep3, in contrast to PACAP38, was not able to stimulate  $G_{\alpha_q}$ .

However, it was almost as potent and efficient at stimulating  $G_{\alpha_s}$  as PACAP38 ( $pEC_{50} = 6.92 \pm 0.40$  versus  $pEC_{50} = 6.88 \pm 0.56$ ;  $E_{max} = 72 \pm 16\%$  and  $94 \pm 17\%$ , respectively). PAC1-Pep1 ( $pEC_{50} = 5.92 \pm 0.32$ ) and PAC1-Pep2 ( $pEC_{50} = 5.87 \pm 0.30$ ), although less potent than PACAP38 ( $pEC_{50} = 6.92 \pm 0.40$ ), appeared to be more effective ( $E_{max} = 212 \pm 47\%$  and  $234 \pm 52\%$ , respectively) than PACAP38 ( $94 \pm 17\%$ ) (Table 3).

### 3.2 *In vivo* characterization

In order to confirm that PAC1-derived pepducins can, as PACAP38, promote neuroprotective actions *in vivo*, their ability to preserve mobility and prevent the death of dopaminergic neurons was evaluated following treatment of zebrafish larvae with the neurotoxic agent MPTP (Lam *et al.*, 2005).

#### 3.2.1 Locomotor activity

Total swimming distance was assessed during a 2 h period with untreated and MPTP-treated zebrafish larvae. As shown in Fig. 5, treatments with PACAP38, PAC1-Pep1 or PAC1-Pep2 ( $10^{-7}$ M) did not affect the swimming capacity of untreated zebrafish larvae. Interestingly, with PAC1-Pep3, the total distance covered by larvae appeared greater than that of the control although statistical analysis indicated that the variation was not significant. Previous studies have demonstrated that MPTP, at  $10^{-4}$ M, is sufficient to produce a consistent locomotor deficit in 5 d.p.f. zebrafish (Sallinen *et al.*, 2009). Accordingly, using the same concentration of MPTP, we noticed a 90% decrease of the total swimming distance in 5 d.p.f. zebrafish compared to untreated larvae (Fig. 5). Co-treatments with MPTP and PACAP38, PAC1-Pep1 or PAC1-Pep3 retained partial (approximately 25%) swimming abilities in zebrafish larvae. Surprisingly, despite its potency to stimulate the  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_s$  signaling, PAC1-Pep2 failed to maintain some mobility in the MPTP-treated fish group.

### 3.2.2 Neuroprotective action on dopaminergic neurons

TH expression, which is a marker of dopamine (DA) production, was appraised in MPTP-treated or untreated zebrafish brains following treatment with the pepducins. At 5 d.p.f., TH-positive neurons in ventral diencephalon (vDC), telencephalon (Tel) and medulla oblongata (MO) (Fig. 6a) were observed. Considering that the TH-positive neuronal cells localized in the MO are noradrenergic neurons (McKinley *et al.*, 2005), they were excluded from global counting. Embryos treated with MPTP ( $10^{-4}$ M) showed a loss of TH-positive neurons in vDC and reduced dopaminergic neuron levels in Tel (Fig. 6b). Addition of PACAP38 or PAC1-derived pepducins during the MPTP treatment produced a protection of TH-positive neurons, particularly in Tel (Fig. 6c, 6d, 6e and 6f). Interestingly, the pepducins displayed a better neuroprotection in vDC than PACAP38 (Fig. 6c, 6d, 6e and 6f). A global count of TH-positive neurons in Tel and vDC demonstrated that embryos treated with MPTP exhibited a highly significant loss of total dopaminergic neurons while, PACAP38, PAC1-Pep1 and PAC1-Pep3 substantially protected

zebrafish embryos against MPTP toxicity (Fig. 7), promoting around 75% of neuronal survival. Finally, PAC1-Pep2 also protected zebrafish DA neurons against the neurotoxicity of MPTP (up to 54%), but to a lower extent than the other peptides.

#### 4. Discussion

Intracellular loops of GPCRs take part actively in G protein interactions and effector stimulation. In fact, many studies have demonstrated that upon ligand binding, large conformational changes occur in these receptor domains, and that ICLs play key functions in modulating global receptor conformation and in regulating second messenger activation (Rasmussen *et al.*, 2011). Over the last decade, several reports showed the ability of pepducins, *i.e.* N-terminally lipidated peptides derived from the ICL1, ICL2, ICL3 or C-terminal tail of a GPCR, to activate selectively signaling pathways associated with a target receptor (Carr *et al.*, 2014, Covic *et al.*, 2002a, Gabl *et al.*, 2016, Shearer *et al.*, 2016, Tchernychev *et al.*, 2010). Hence, these compounds might function as allosteric agonists or positive/negative allosteric modulators, making them highly useful for the investigation of GPCR signaling (Ortiz Zacarias *et al.*, 2018), as demonstrated with studies of the protease-activated receptors, chemokine receptors, and  $\beta$ -adrenergic receptors (Dimond *et al.*, 2011). As well, their properties make them attractive for the elaboration of treatments of various disorders including inflammatory diseases, cardiovascular pathologies, and cancer (Tressel *et al.*, 2011). To the best of our knowledge, no pepducin has ever been developed for a class B receptor and more particularly for PAC1. Hence, based on the ICL sequences of the human PAC1-null receptor, we have synthesized and characterized the first set of pepducins related to this class B GPCR.

Over the past 30 years, the PACAPergic system has been of particular interest because of its remarkable neuroprotective effects in various cellular and animal models (Deguil *et al.*, 2007, Lamine *et al.*, 2016, Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016, Onoue *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2005). As part of this study, we have investigated the propensity of PAC1-derived pepducins to exert, *in*

*vitro* and *in vivo*, PAC1-dependent neuroprotective actions, in comparison to that of PACAP38, the most abundant isoform of this peptide in the brain (Arimura *et al.*, 1991). We observed that pepducins derived respectively from the first, second and third ICL of PAC1 protected SH-SY5Y neuroblastoma cells against MPP<sup>+</sup> toxicity. *In vivo*, only PAC1-Pep1 and PAC1-Pep3 were able to sustain a significant mobility and promote TH-positive cell survival in a zebrafish model of PD. It is worth mentioning that the concentration of PAC1-derived pepducins reaching the intracellular space is expected to be lower than the extracellular concentration of PACAP38. While local pepducin concentration in the inner leaflet of the cell membrane might be high, the similar action of PAC1-derived pepducins compared to PACAP38 suggest that these derivatives might be more potent than the endogenous ligand. Similarly to PACAP38, which exerts its neuroprotective action through the activation of two different G proteins, *i.e.* G $\alpha_q$  and G $\alpha_s$ , (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016), PAC1-Pep1 and PAC-Pep2 were able to trigger G $\alpha_q$  and G $\alpha_s$  activation, albeit to different extents (Table 3). However, PAC1-Pep3, which exhibited neuroprotective action *in vitro* and *in vivo*, was unable to trigger G $\alpha_q$  activation, thereby suggesting that this pathway is not involved in its neuroprotective effect.

To appraise the therapeutic potential of PAC1-derived pepducins, we have used zebrafish as an *in vivo* PD model, since it is a proven alternative to mammalian paradigms (Vaz *et al.*, 2018). Numerous studies have already demonstrated the efficacy of MPTP to induce a PD pattern in zebrafish larvae (Lam *et al.*, 2005, Sallinen *et al.*, 2009, Sarath Babu *et al.*, 2016, Wen *et al.*, 2008). Moreover, Fradinger *et al.* have shown that the first and second ICLs of PAC1 are highly conserved between species and that only one amino acid, *i.e.* Ile<sup>362</sup> in the zebrafish PAC1 isoform and Met<sup>362</sup> in the human one, differs in ICL3, suggesting that the *in vivo* results would not be influenced by sequence differences between human and zebrafish PAC1 receptors (Fradinger *et al.*, 2005). Although PACAP itself crosses efficiently the blood-brain barrier (BBB) (Banks *et al.*, 1993), this ability has not yet been shown with PAC1-derived pepducins. However,

it is important to highlight that co-treatment experiments were carried out by adding the neurotoxic agent and the pepducins directly into the environment of the animals. Moreover, at 3 d.p.f., it is known that the BBB is partially formed and that molecular exclusion is size-dependent. For example, at this step of development, sulfo-NHS-biotin (562 Da) can cross the BBB but, according to the literature, molecules over 4 kDa cannot (Fleming *et al.*, 2013). PAC1-derived pepducins, which have molecular weights between 1200 Da and 2500 Da, are therefore expected to reach the fish CNS but this assertion will need to be confirmed. Also, at this stage of development, dopaminergic neurons are expressed in vDC and Tel, while noradrenergic neurons are found in the MO (McKinley *et al.*, 2005). As previously reported for zebrafish, MPTP induces functional damages in dopamine transporter-positive neurons of the vDC and, more acutely, of the Tel (McKinley *et al.*, 2005). These alterations precede TH-positive dopaminergic neuronal death (Kurosaki *et al.*, 2003). In agreement with these observations, our results confirmed that MPTP resulted in a complete loss of TH-positive neurons in Tel and reduced significantly dopaminergic neuron expression in vDC (Fig. 6). The basis of this difference remains unknown at present and represents an area for further study. A global count of dopaminergic neurons in the hindbrain demonstrated a very significant neuroprotective action of PACAP38, PAC1-Pep1 and PAC1-Pep3, with 72 %, 83% and 74% TH-positive neurons, respectively (Fig. 7). Surprisingly, PAC1-Pep3 had a similar effect than PACAP38 but PAC1-Pep1 was more potent, an observation that could be correlated with its ability to trigger efficiently  $G\alpha_s$  activation. We also observed the capacity of PACAP38, PAC1-Pep1 and PAC1-Pep3 to preserve a significant level of mobility of zebrafish larvae treated with the neurotoxic agent MPTP. Also, in contrast with the *in vitro* results showing neuroprotection, PAC1-Pep2 failed to affect zebrafish movement reduced by MPTP. Indeed, PAC1-Pep2, despite promoting the activation of both G proteins, was unable to exert a neuroprotective action *in vivo*, although it promoted SH-SY5Y survival *in vitro*. Such discrepancies could be explained, at least in part, by the different nature of the assays, *i.e.* cell *versus* whole organism. Moreover, while PAC1-Pep2

protected significantly TH-positive neurons, it is possible that this pepducin failed to protect or restore neuronal connectivity and motor circuit, thus explaining the absence of locomotor activity when larvae are treated with this molecule. However, other considerations such as its inability to cross efficiently complex biological membranes such as the BBB, or its propensity to exacerbate  $G\alpha_q$  response compared to endogenous PACAP could be also considered. Further investigation will be needed to assess such differences. Altogether, our results confirmed the capacity of PAC1-related pepducins, especially PAC1-Pep1 and PAC1-Pep3, to protect neurons against MPTP toxicity for at least 5 days.

PACAP isoforms belong to the secretin/glucagon/VIP peptide family. In particular, VIP exhibits 68% homology with PACAP27. Nonetheless, the former is a selective ligand of VPAC1/VPAC2 receptors (D. Vaudry *et al.*, 2009a), with a very poor affinity for PAC1, the receptor related to PACAP neuroprotection. Each pepducin was derived from the sequence of the ICLs of PAC1-null, an abundant PAC1 isoform in the brain (Lutz *et al.*, 2006) and, as PACAP38, they all protected neuronal cells against  $MPP^+$  toxicity, a property not shared with VIP. This results strongly suggests that the pepducin-induced neuroprotective action is dependent on PAC1 receptor activation (Fig. 3). Over the years, several PACAP analogs have been developed but their lack of specificity toward PAC1 remains a major obstacle in a therapeutic perspective due to related side effects, including VIPoma-like symptoms mediated by the activation of VPAC receptors (Belei *et al.*, 2017). Sequence analysis reveals that PAC1-ICL1 is strictly conserved between PAC1, VPAC1 and VPAC2, whereas PAC1-ICL2 exhibits 80% and 0% homology with VPAC1 and VPAC2, respectively, and PAC1-ICL3 shows 71% and 69% identity with VPAC1 and VPAC2, respectively (Table 4). At first, this suggests that PAC1-Pep1 will not be specific for PAC1. Surprisingly, we have demonstrated, in HEK 293 cells transiently transfected with one or the other of the PACAP receptors, that PAC1-Pep1 was unable to promote  $G\alpha_s$  activation following VPAC1 or VPAC2 stimulation, therefore demonstrating the specificity of this pepducin for PAC1. Further investigations of the pepducin-receptor recognition process, and more

particularly of PAC1-Pep1, must be conducted. However, these data suggest that peptide sequence is not the only parameter driving receptor recognition and/or activation.

To conclude, we have developed a PAC1-derived pepducin, *i.e.* PAC1-Pep1, that exerts neuroprotective actions similar to that of PACAP both *in vitro* and *in vivo*. Above all, PAC1-Pep1 appears to be selective for PAC1, a key parameter never met with known PACAP-derived ligands to date. Taken together, our results demonstrate that PAC1-Pep1, derived from the ICL1 of PAC1, acts as a biased allosteric agonist, thereby engaging different signaling pathways following a selective activation of PAC1. This new derivative represents an innovative tool to study PAC1 activation in the context of neurodegenerative diseases, but also opens up new vistas for the development of molecules with disease-modifying features ideal for the treatment of PAC1-associated disorders including not only PD but also the Alzheimer's and Huntington's diseases. In the continuity of this work, a special focus will have to be applied on the precise mechanism of action by which PAC1-Pep1 promotes  $G\alpha_q/G\alpha_s$  activation and neuroprotection.

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

We thank the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for funding.

## References

1. Maiti P, Manna J, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Translational neurodegeneration*. 2017;6:28.
2. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2008;79(4):368-76.
3. Freire C, Koifman S. Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*. 2012;33(5):947-71.
4. Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(1):a008888.
5. Joe EH, Choi DJ, An J, et al. Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Experimental neurobiology*. 2018;27(2):77-87.
6. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;164(1):567-74.
7. Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, et al. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological reviews*. 1998;50(2):265-70.
8. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews*. 2009;61(3):283-357.
9. Shen S, Gehlert DR, Collier DA. PACAP and PAC1 receptor in brain development and behavior. *Neuropeptides*. 2013;47(6):421-30.
10. Watanabe J, Seki T, Shioda S. PACAP and Neural Development. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 65-82.
11. Tompkins JD, Clason TA, Hardwick JC, et al. Activation of MEK/ERK signaling contributes to the PACAP-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *American journal of physiology Cell physiology*. 2016;311(4):C643-C51.
12. Wainwright DA, Xin J, Sanders VM, Jones KJ. Differential actions of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and interferon gamma on Th2- and Th1-associated chemokine expression in cultured murine microglia. *Journal of neurodegeneration & regeneration*. 2008;1(1):31-4.
13. Juhasz T, Helgadottir SL, Tamas A, Reglodi D, Zakany R. PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*. 2015;66:51-7.
14. Canipari R, Di Paolo V, Barberi M, Cecconi S. PACAP in the Reproductive System. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 405-20.

15. Arimura A, Li M, Batuman V. Treatment of renal failure associated with multiple myeloma and other diseases by PACAP-38. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1070:1-4.
16. Lee EH, Seo SR. Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB reports*. 2014;47(7):369-75.
17. Sanlioglu AD, Karacay B, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *Journal of molecular endocrinology*. 2012;49(3):R157-67.
18. Subramaniam V, Chuang G, Xia H, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects against mitoxantrone-induced cardiac injury in mice. *Peptides*. 2017;95:25-32.
19. Vollesen ALH, Amin FM, Ashina M. Targeted Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide Therapies for Migraine. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2018.
20. Werling D, Banks WA, Salameh TS, et al. Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(3).
21. Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *British journal of pharmacology*. 2012;166(1):4-17.
22. Brifault C, Vaudry D, Wurtz O. The Neuropeptide PACAP, a Potent Disease Modifier Candidate for Brain Stroke Treatment. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 583-606.
23. Bourgault S, Vaudry D, Botia B, et al. Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides*. 2008;29(6):919-32.
24. Bourgault S, Vaudry D, Dejda A, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Curr Med Chem*. 2009;16(33):4462-80.
25. Bourgault S, Vaudry D, Segalas-Milazzo I, et al. Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *J Med Chem*. 2009;52(10):3308-16.
26. Doan ND, Bourgault S, Dejda A, et al. Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(4):552-61.
27. Lamine A, Letourneau M, Doan ND, et al. Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. *Neuropharmacology*. 2016;108:440-50.
28. Ramos-Alvarez I, Mantey SA, Nakamura T, et al. A structure-function study of PACAP using conformationally restricted analogs: Identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. *Peptides*. 2015;66:26-42.

29. Gurevich VV, Gurevich EV. Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12).
30. Carr R, 3rd, Schilling J, Song J, et al. beta-arrestin-biased signaling through the beta2-adrenergic receptor promotes cardiomyocyte contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(28):E4107-16.
31. Gabl M, Holdfeldt A, Winther M, et al. A pepducin designed to modulate P2Y2R function interacts with FPR2 in human neutrophils and transfers ATP to an NADPH-oxidase-activating ligand through a receptor cross-talk mechanism. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(6 Pt A):1228-37.
32. Licht T, Tsurulnikov L, Reuveni H, Yarnitzky T, Ben-Sasson SA. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3). *Blood*. 2003;102(6):2099-107.
33. Shearer AM, Rana R, Austin K, et al. Targeting Liver Fibrosis with a Cell-penetrating Protease-activated Receptor-2 (PAR2) Pepducin. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(44):23188-98.
34. Tchernychev B, Ren Y, Sachdev P, et al. Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(51):22255-9.
35. Zhang P, Gruber A, Kasuda S, et al. Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin. *Circulation*. 2012;126(1):83-91.
36. Gurbel PA, Bliden KP, Turner SE, et al. Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2016;36(1):189-97.
37. Poujol de Molliens M, Letourneau M, Devost D, et al. New insights about the peculiar role of the 28-38 C-terminal segment and some selected residues in PACAP for signaling and neuroprotection. *Biochem Pharmacol*. 2018;154:193-202.
38. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1995;203(3):253-310.
39. McKinley ET, Baranowski TC, Blavo DO, et al. Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain research Molecular brain research*. 2005;141(2):128-37.
40. Jorgensen R, Kubale V, Vrecl M, Schwartz TW, Elling CE. Oxyntomodulin differentially affects glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin recruitment and signaling through Galpha(s). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322(1):148-54.
41. Tsuji M, Ueda S, Hirayama T, et al. FRET-based imaging of transbilayer movement of pepducin in living cells by novel intracellular bioreductively activatable fluorescent probes. *Organic & biomolecular chemistry*. 2013;11(18):3030-7.
42. Lutz EM, Ronaldson E, Shaw P, et al. Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. *Molecular and cellular neurosciences*. 2006;31(2):193-209.

43. Lopes FM, Schroder R, da Frota ML, Jr., et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*. 2010;1337:85-94.
44. Manecka D-L, Boukhzar L, Falluel-Morel A, Lihrmann I, Anouar Y. PACAP Signaling in Neuroprotection. In: Reglodi D, Tamas A, editors. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 549-61.
45. Lam CS, Korzh V, Strahle U. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *The European journal of neuroscience*. 2005;21(6):1758-62.
46. Sallinen V, Torkko V, Sundvik M, et al. MPTP and MPP+ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *Journal of neurochemistry*. 2009;108(3):719-31.
47. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature*. 2011;469(7329):175-80.
48. Covic L, Gresser AL, Talavera J, Swift S, Kuliopulos A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(2):643-8.
49. Carr R, 3rd, Du Y, Quoyer J, et al. Development and characterization of pepducins as Gs-biased allosteric agonists. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(52):35668-84.
50. Ortiz Zacarias NV, Lenselink EB, AP IJ, Handel TM, Heitman LH. Intracellular Receptor Modulation: Novel Approach to Target GPCRs. *Trends in pharmacological sciences*. 2018;39(6):547-59.
51. Dimond P, Carlson K, Bouvier M, et al. G protein-coupled receptor modulation with pepducins: moving closer to the clinic. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1226:34-49.
52. Tressel SL, Koukos G, Tchernychev B, et al. Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models. *Methods Mol Biol*. 2011;683:259-75.
53. Deguil J, Jailloux D, Page G, et al. Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP+-induced alteration of translational control in Neuro-2a neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research*. 2007;85(9):2017-25.
54. Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T, Kashimoto K. The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides*. 2002;23(8):1471-8.
55. Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD. PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS letters*. 2005;579(18):4005-11.
56. Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, et al. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*. 1991;129(5):2787-9.
57. Vaz RL, Outeiro TF, Ferreira JJ. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. *Frontiers in neurology*. 2018;9:347.
58. Sarath Babu N, Murthy Ch L, Kakara S, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *Proteomics*. 2016;16(9):1407-20.

59. Wen L, Wei W, Gu W, et al. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Developmental biology*. 2008;314(1):84-92.
60. Fradinger EA, Tello JA, Rivier JE, Sherwood NM. Characterization of four receptor cDNAs: PAC1, VPAC1, a novel PAC1 and a partial GHRH in zebrafish. *Molecular and cellular endocrinology*. 2005;231(1-2):49-63.
61. Banks WA, Kastin AJ, Komaki G, Arimura A. Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1993;267(2):690-6.
62. Fleming A, Diekmann H, Goldsmith P. Functional characterisation of the maturation of the blood-brain barrier in larval zebrafish. *PloS one*. 2013;8(10):e77548.
63. Kurosaki R, Muramatsu Y, Watanabe H, et al. Role of dopamine transporter against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. *Metabolic brain disease*. 2003;18(2):139-46.
64. Belei OA, Heredea ER, Boeriu E, et al. Verner-Morrison syndrome. Literature review. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2017;58(2):371-6.

**Table 1.** PAC1 pepducin sequences

Compounds	Sequence	MW (Da)	
		(Observed)	(Calculated)
PAC1-Pep1	Pal-FRKLHCTRN-amide	1411.6	1410.5
PAC1-Pep2	Pal-ETFFPERR-amide	1317.9	1317.5
PAC1-Pep3	Pal-QKLQSPDMGGNESSIYLR-amide	2261.4	2259.7

Pal, Palmitoyl moiety ; MW, molecular weight.

**Table 2.** Zebrafish groups according to their respective treatment.

Number	Group	Treatment
1	Control	No treatment
2	PACAP38	$10^{-7}$ M PACAP38
3	PAC1-Pep1	$10^{-7}$ M PAC1-Pep1
4	PAC1-Pep2	$10^{-7}$ M PAC1-Pep2
5	PAC1-Pep3	$10^{-7}$ M PAC1-Pep3
6	MPTP	$10^{-4}$ M MPTP
7	MPTP + PACAP38	$10^{-4}$ M MPTP + $10^{-7}$ M PACAP38
8	MPTP + PAC1-Pep1	$10^{-4}$ M MPTP + $10^{-7}$ M PAC1-Pep1
9	MPTP + PAC1-Pep2	$10^{-4}$ M MPTP + $10^{-7}$ M PAC1-Pep2
10	MPTP + PAC1-Pep3	$10^{-4}$ M MPTP + $10^{-7}$ M PAC1-Pep3

**Table 3.** Agonist activity of PACAP38 and PAC1-derived peptidins.

Compound	G $\alpha_q$			G $\alpha_s$		
	n	pEC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>	n	pEC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>
PACAP38	4	7.64 ± 0.57	79 ± 11	4	6.92 ± 0.40	94 ± 17
PAC1-Pep1	4	9.54 ± 0.83	59 ± 11	4	5.92 ± 0.32	234 ± 52*
PAC1-Pep2	4	9.15 ± 0.76	91 ± 16	5	5.87 ± 0.30	212 ± 47
PAC1-Pep3	4	inactive		5	6.88 ± 0.56	72 ± 16

<sup>a</sup>Negative logarithm of the concentration producing 50% of the maximal effect. <sup>b</sup>Maximum efficacy is expressed as a percentage of the activation induced by the related endogenous ligand PACAP. Our analysis takes into account the bell-shape effect observed at high concentrations of ligands. Statistical analysis was performed using a Student's t-test versus the value obtained with native PACAP38 (\**P* ≤ 0.05). Each replicate (n) was conducted on different cell passages.

**Table 4.** Intracellular loop sequences of PAC1, VPAC1 and VPAC2 receptors.

Receptor	ICL1	ICL2	ICL3
<b>PAC1</b>	178-RKLNHCTR-185	257-ETFFPERR-264	333-QKLQSPDMGGNESSIYLR-350
<b>VPAC1</b>	168-RKLNHCTR-174 <b>100 %</b>	241-YTLLAVSFFSERKY-254 <b>58%</b>	317-RILLQKLRPPDIRKSDSSPYSRLAR-341 <b>71%</b>
<b>VPAC2</b>	152-RKLNHCTR-158 <b>100 %</b>	228-HTLLVAMLPPRR-240 <b>0%</b>	304-RILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAK-328 <b>69%</b>

Predicted intracellular loop sequences of PAC1, VPAC1 and VPAC2 obtained using the NCBI website. Sequence alignment was done using NCBI standard protein BLAST tool. Percentage of identity of VPAC ICLs versus those of PAC1, are shown in red.

## FIGURE LEGENDS

*N-Terminal*

1 MAGVVHVSLAALLLLPMAPAMHSDCIFKKEQAMCLEKIQRANELMGFNDSSPGCPGMWDN

61 ITCWKPAHVGEMLVLSCEPELFRIFNPDQVWETETIGESDFGDSNSLDLSDMGVVSRCNTE

TM1

121 DQWSEPFPHYFDACGFDEYESETGDQDYYL SVKALYTVGYSTSLVTLTTAMVILCRFRK

IL1                      TM2                      EL1                      TM3

181 LHCTRNFIHMNLFVSFMLRAISVFIKDWILYAEQDSNHCFISTVECKAVMVFPHYCVVSN

IL2                      TM4                      EL2

241 YFWLFIEGLYLFLLVETFFPERRYFYWYTIIGWGTPTVCVTVWATLRLYFDDTGCWDMN

TM5                      IL3                      TM6

301 DSTALWWVIKGPVVGSI MVN FVLFIGIIVILVQKLQSPDMGGNESIYLRLARSTLLLIP

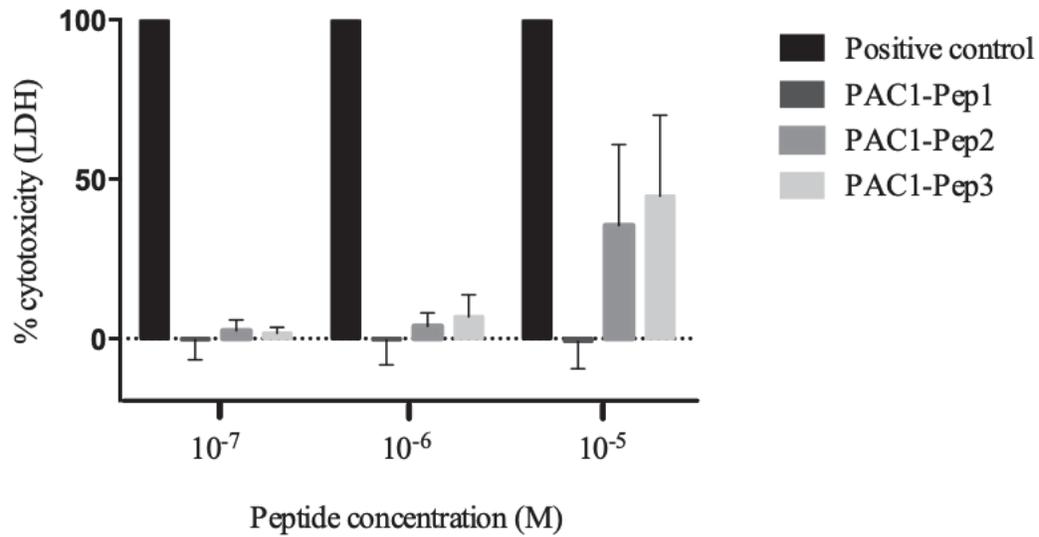
EL3                      TM7

361 LFGIHYTVFAFSPENVSKRERLVFELGLGSFQGFVVAVLYCFLNGEVQAEIKRKWRSWKV

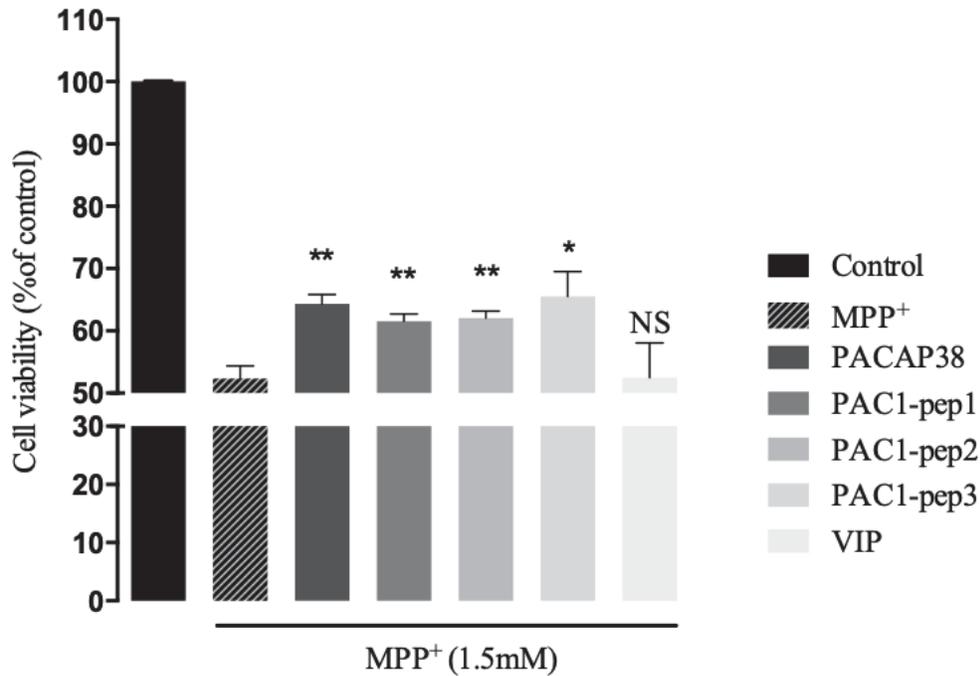
*C-Terminal*

421 NRYFAVDFKHRHPSLASSGVNGGTQLSILSKSSQIRMSGLPADNLAT

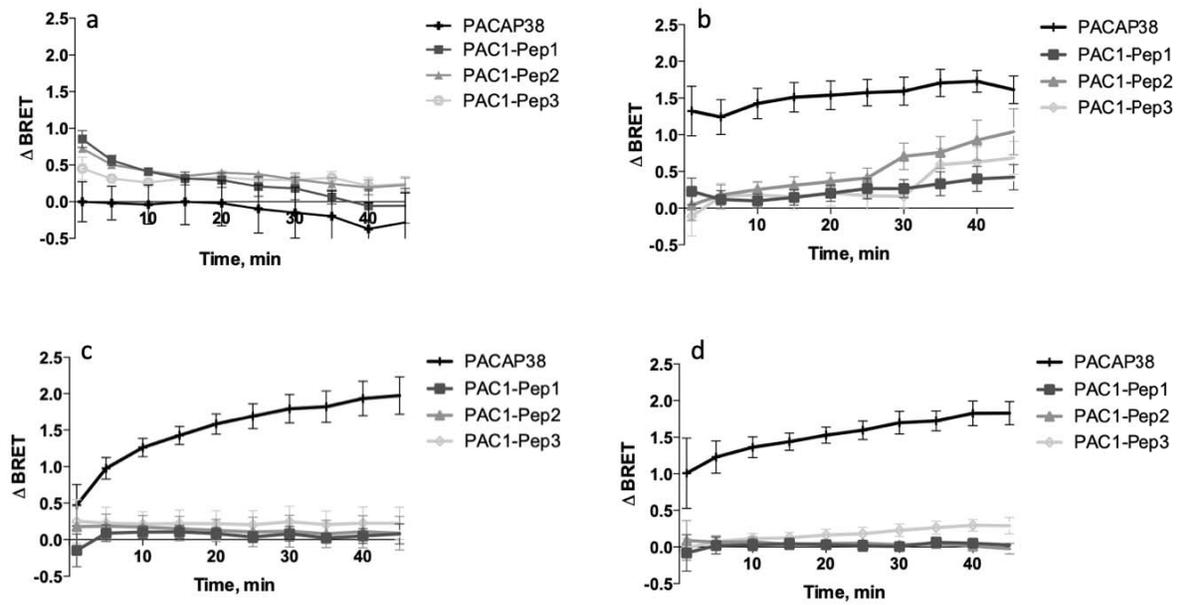
**Fig. 1** Predicted PAC1-null transmembrane domain using TMPred. Each predicted transmembrane (TM) helix is shown with blue shading. Each predicted intracellular loop (IL) is shown in red.



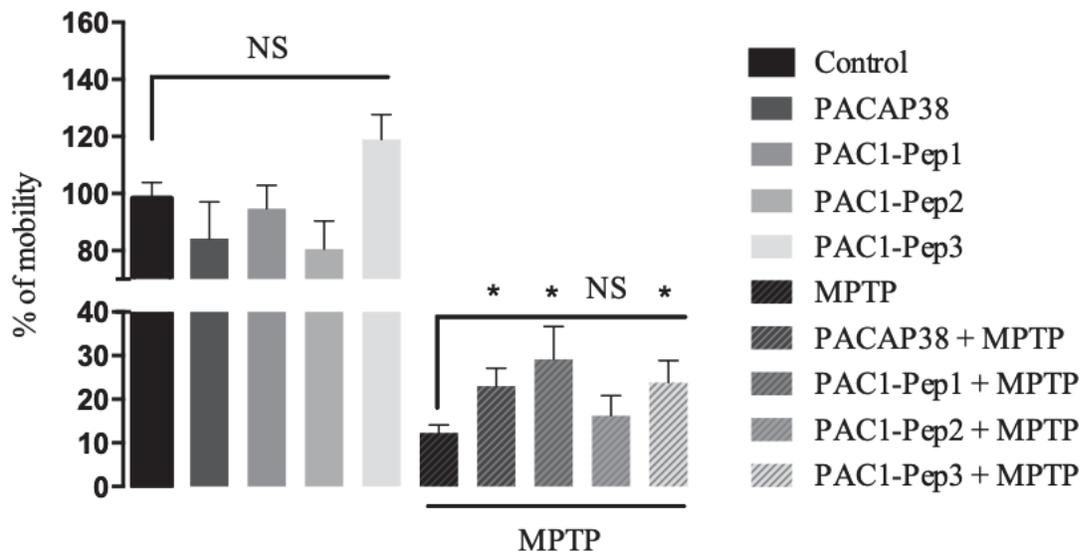
**Fig. 2** LDH release by SH-SY5Y cells after a 24 h treatment with pepducins at different concentrations. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 3-6 independent experiments performed in sextuplet.



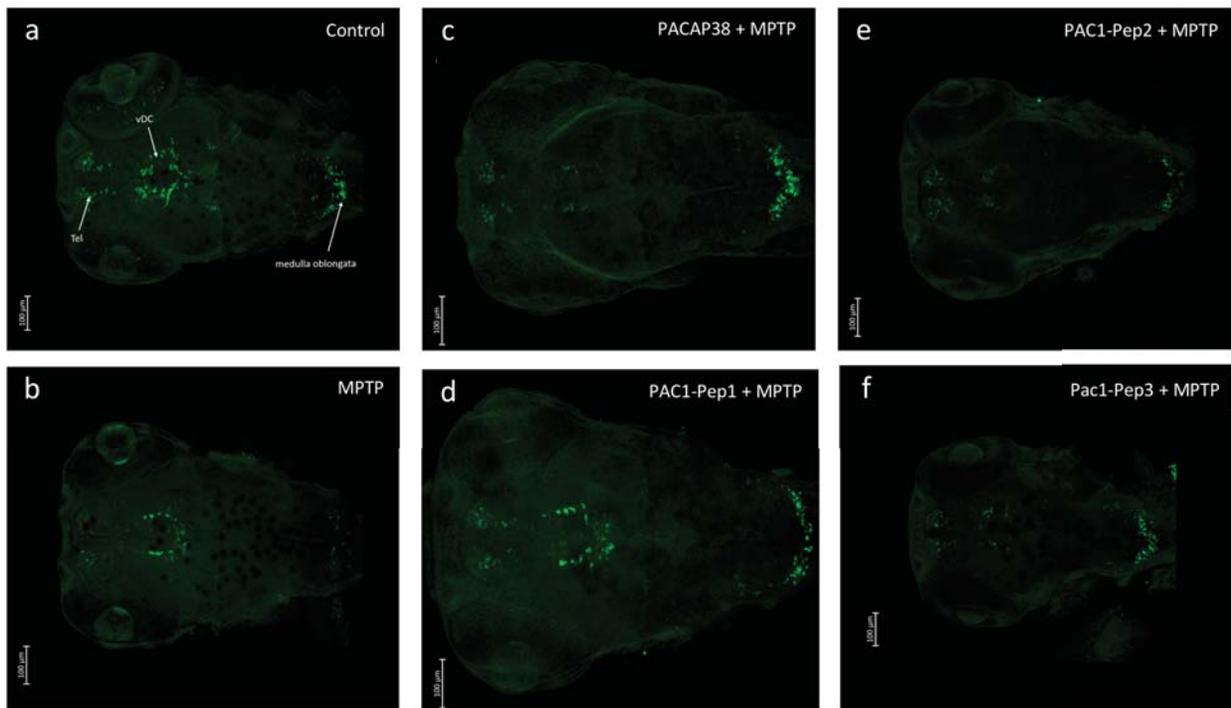
**Fig. 3** Pepducins and PACAP38 protect SH-SY5Y neuroblastoma cells against MPP<sup>+</sup> toxicity. Effects of MPP<sup>+</sup> (1.5 mM) on cell viability following a 4 h pretreatment with PACAP38 or pepducins (10<sup>-7</sup>M). Values represent the mean ± S.E.M. of 3 to 6 independent experiments performed in sextuplet. Statistical analyses were performed using the Student's t-test versus the percentage of cell viability measured in presence of MPP<sup>+</sup> alone (NS, non-significant; \**P* ≤ 0.05; \*\**P* ≤ 0.01 and \*\*\**P* ≤ 0.001).



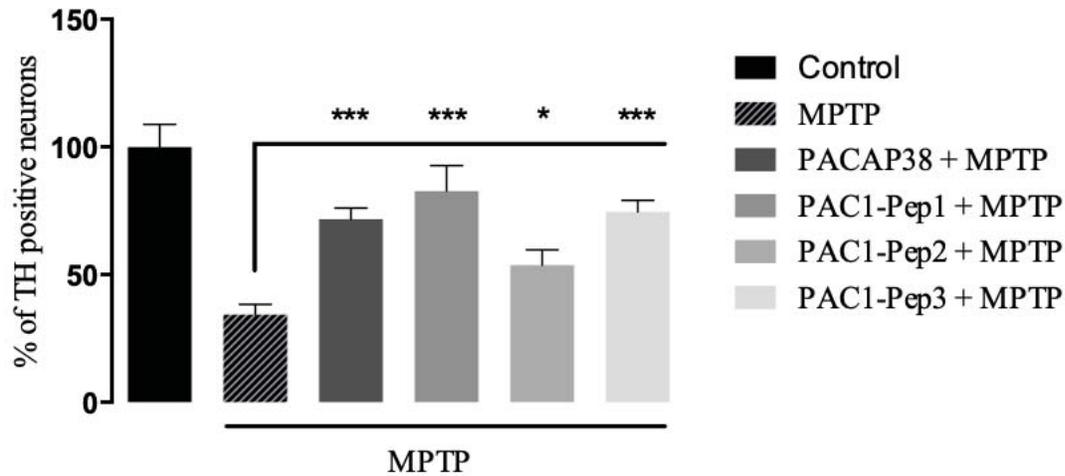
**Fig. 4** PAC1-Pep1 and PAC1-Pep2 selectively trigger PAC1-mediated  $G\alpha_s$  activation. HEK 293 cells co-transfected with empty vector, pcDNA 3.1\_PAC1, pcDNA 3.1\_VPAC1 or pcDNA 3.1\_VPAC2 and biosensor pcDNA3.1\_  $G\alpha_s$ -RlucII and pcDNA3.1\_G $\gamma$ 1-GFP<sub>10</sub> were pre-incubated with proluome purple for 2 min and stimulated with  $5 \times 10^{-7}$ M of pepducins or  $5 \times 10^{-7}$ M of PACAP38. Changes in BRET were monitored every 5 min during a 45 min recording period. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 3 to 6 independent experiments performed in duplicate. a. PACAP38 and pepducin responses in HEK 293 cells in the absence of PAC1; b. PACAP38 and pepducin responses in HEK 293 transiently transfected with PAC1; c. PACAP38 and pepducin responses in HEK 293 cells transiently transfected with VPAC1; d. PACAP38 and pepducin responses in HEK 293 cells transiently transfected with VPAC2.



**Fig. 5** PAC1-Pep1 and PAC1-Pep3 sustain partially zebrafish mobility in a PD model. Effect of MPTP (100  $\mu$ M) on zebrafish mobility after a daily 2 h co-treatment with PACAP38 or pepducins (10<sup>-7</sup>M), performed at 5 d.p.f. Results with peptides alone are displayed as solid bars while co-treatments are represented by striped bars. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 3 to 8 independent experiments performed with 16 to 32 individual zebrafish. Statistical analyses were performed using the Student's t-test versus the percentage of mobility in zebrafish control (NS, non-significant) or versus the percentage of mobility in zebrafish measured in presence of MPTP alone (NS, non-significant; \* $P \leq 0.05$ ).



**Fig. 6** Representative images at 5 d.p.f. of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons after co-treatment with MPTP (100 μM) and peptides (10<sup>-7</sup>M). a, Control; b, MPTP; c, PACAP38 and MPTP; d, Pep1 and MPTP; e, Pep2 and MPTP; f, Pep3 and MPTP.



**Fig. 7** Pepducins protect tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons against MPTP toxicity. Effect at 5 d.p.f. of MPTP (100  $\mu$ M) on TH expression in zebrafish midbrain after co-treatments with PACAP38 or pepducins ( $10^{-7}$ M). Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 to 8 independent experiments. Statistical analyses were performed using the Student's t-test versus the percentage of TH-positive neurons in zebrafish, measured in presence of MPTP alone ( $***P \leq 0.001$ ).



# *Discussion*

## Chapitre 4 : DISCUSSION

La maladie de Parkinson est le deuxième trouble neurologique le plus commun après la maladie d'Alzheimer. À ce jour, on estime que 55 000 Canadiens sont atteints de cette maladie neurodégénérative et les médicaments disponibles sur le marché visent principalement à en réduire les symptômes (Bhupendra, 2017, Maiti *et al.*, 2017). Compte tenu de la prévalence accrue de cette maladie chez les plus de 65 ans et du vieillissement de la population, des efforts sont déployés afin de trouver de nouvelles stratégies pour ralentir sa progression. Notamment, un des défis majeurs pour le traitement des maladies neurodégénératives est d'identifier des composés pouvant traverser efficacement la BHE. En effet, l'entrée des molécules au niveau du système nerveux central est grandement limitée par la perméabilité sélective de celle-ci (Pandey *et al.*, 2016). Également, dans le cadre des maladies où la dégénérescence neuronale est l'élément distinctif, la découverte de composés pouvant efficacement protéger les neurones serait une avenue enthousiasmante.

À cet égard, le PACAP présente de nombreux avantages. En effet, celui-ci peut aisément traverser la BHE de manière passive ou active (Banks *et al.*, 1993). De plus, son action neuroprotectrice a été largement étudiée dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* de conditions neurodégénératives, telles que l'ischémie cérébrale, la MP, la MA, la maladie d'Huntington et les traumatismes cérébraux (E. H. Lee *et al.*, 2014). Le PACAP est ainsi capable de contrer les effets de plusieurs agents neurotoxiques causant des caractéristiques physiopathologiques associées à la maladie de Parkinson, tels que la roténone, la 6-OHDA et le MPTP (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016, Reglodi *et al.*, 2018, D. Vaudry *et al.*, 2009a). Par exemple, dans un modèle murin de la MP, le PACAP réduit de 50 % l'effet toxique induit par la 6-OHDA sur le niveau de dopamine (Maasz *et al.*, 2017). Ce peptide, *via* son action sur son récepteur PAC1, inhibe l'induction de l'apoptose par la stimulation de protéines antiapoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, ERK ou encore la protéine 14-3-3, et par l'inhibition de facteurs proapoptotiques tels que JNK, Bad, Bax et p38 MAPK *via* l'activation de PKA (Aubert *et al.*, 2006, Fan *et al.*, 2010, Hur, 2005, Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016, Reglodi *et al.*, 2018).

Nonobstant ses effets bénéfiques, le PACAP induit aussi de multiples activités biologiques pouvant s'avérer délétères pour la santé d'un patient qui serait traité avec ce peptide. Par exemple, par l'intermédiaire de l'activation de VPAC2, le PACAP engendre un effet hypotenseur et une bradycardie accompagnée d'une fibrillation auriculaire (Hirose *et al.*, 1997, Seebeck *et al.*, 1996), ce qui limiterait son utilisation clinique, même s'il a été montré qu'il induit

des effets bénéfiques lors d'une ischémie cérébrale suite à une déficience vasculaire (Brifault *et al.*, 2016). Notamment, l'injection i.v. de PACAP chez des volontaires sains augmente significativement le rythme cardiaque après seulement 20 min (Birk *et al.*, 2007). Aussi, ce peptide peut produire des rougeurs au niveau de la poitrine et du visage ou encore, des maux de tête chez des volontaires sains ou sujets aux migraines, *via* l'activation des récepteurs VPACs (Schytz *et al.*, 2009, Schytz *et al.*, 2010). Il a été également démontré que l'activation sélective du récepteur VPAC2 aggrave les lésions cérébrales et provoque des hémorragies chez le rat Goto-Kakizaki porteur de diabète de type II et ayant subi un accident vasculaire cérébrale (Darsalia *et al.*, 2013). Afin de limiter ces effets secondaires, il est donc important de développer des analogues ciblant le récepteur PAC1. Ces dernières décennies, plusieurs laboratoires se sont penchés sur la conception de tels composés et la compréhension des déterminants structuraux nécessaires à l'activation du récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2008a, Bourgault *et al.*, 2009a, Bourgault *et al.*, 2008b, Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Fournier *et al.*, 2016, Lamine *et al.*, 2016, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Cependant, à ce jour, aucun analogue spécifique à PAC1 n'a encore été découvert.

Suite à l'activation de PAC1, il est bien établi que deux protéines G,  $G_{\alpha_q}$  et  $G_{\alpha_s}$ , sont stimulées et que leurs actions sont à l'origine des effets antiapoptotiques du PACAP (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). Il a également été démontré que le récepteur PAC1 peut interagir avec d'autres protéines telles que les  $\beta$ -arrestines (Broca *et al.*, 2009, Shintani *et al.*, 2018). Ces dernières sont souvent décrites comme les responsables de l'internalisation des RCPGs, ce qui peut entraîner l'activation d'autres seconds messagers ou une désensibilisation du système (Peterson *et al.*, 2017, Rajagopal *et al.*, 2018). Au cours des dernières années, de nombreux laboratoires ont conçu des ligands, dits « biaisés », pouvant activer de manière sélective une ou plusieurs voies de signalisation. La découverte de tels composés a ouvert de nouvelles perspectives pour le développement de médicaments (T. Kenakin *et al.*, 2013) puisqu'ainsi certains composés peuvent sélectivement activer les voies de signalisation désirées tout en évitant l'activation des signaux causant des effets secondaires (Rankovic *et al.*, 2016). Par exemple, il a été suggéré que les effets secondaires de la morphine (désensibilisation, nausée, constipation) seraient associés au recrutement des  $\beta$ -arrestines (C. H. Yang *et al.*, 2011). Des ligands biaisés en faveur des protéines G ont donc été développés (Rankovic *et al.*, 2016) et l'un d'entre eux, le TRV-130, un agoniste biaisé du récepteur aux opiacés  $\mu$  capable d'activer préférentiellement les protéines G, est aussi efficace que la morphine, mais ne cause que peu de nausées (Soergel *et al.*, 2014).

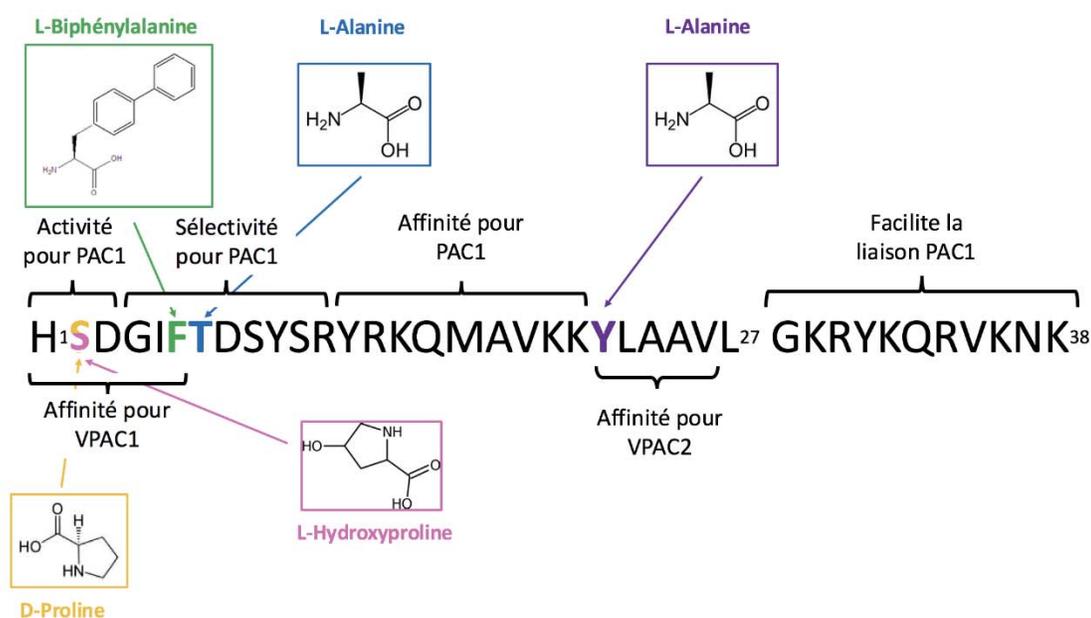
Dans la continuité des études de type structure-activité (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Fournier *et al.*, 2016, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015), et dans le contexte actuel en lien avec la pluridimensionalité des RCPGs, il nous est apparu essentiel de mieux connaître l'ensemble des signaux intracellulaires régis par l'activation du récepteur PAC1, et en tout premier lieu, de définir des paramètres chimiques et/ou structuraux des deux isoformes du PACAP impliqués dans l'activation du récepteur PAC1. Ainsi le premier volet de cette thèse a eu pour objectif d'évaluer pharmacologiquement des analogues synthétiques du PACAP sous ces deux isoformes : il s'agissait de jauger l'influence du domaine 28-38 et de certains résidus sur la sélectivité envers les récepteurs du PACAP ainsi que sur les voies de signalisation associées à son effet neuroprotecteur. Cette étude a permis une meilleure compréhension du système PACAPergique et ouvre de nouvelles pistes pour l'élaboration de composés sélectifs à PAC1.

À ce jour, les approches traditionnelles pour cibler spécifiquement le récepteur PAC1 n'ont pas conduit à la découverte d'une molécule idéale pour le traitement de la MP. En conséquence, sur la base des travaux de Covic *et al.*, nous avons utilisé une nouvelle stratégie pour l'activation de ce récepteur (Covic *et al.*, 2002a). Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous avons montré qu'il est possible de concevoir des modulateurs allostériques du récepteur PAC1 à partir des séquences des boucles intracellulaires de ce récepteur. Nous avons notamment mesuré la capacité de ces différentes molécules, définies de façon générale comme des pepducines, à activer des voies de signalisation associées à PAC1 au moyen de tests d'activation utilisant des biosenseurs de type BRET, et caractérisé *in vitro* et *in vivo* leurs propriétés neuroprotectrices dans des modèles parkinsoniens. Bien que notre étude ne soit qu'un point départ, les résultats montrent que ces composés sont prometteurs pour le développement d'agents neuroprotecteurs. Nous discuterons donc ici des avantages et inconvénients à développer ce type de composé et en particulier, nous ferons le parallèle avec le développement d'analogues du PACAP au regard de la spécificité/sélectivité, de la pharmacologie *in vitro* (effet antiapoptotique/désensibilisation) et des effets *in vivo*.

# 1. Les analogues du PACAP

## 1.1. Spécificité PAC1 versus VPAC1 et VPAC2.

Un des défis majeurs dans la conception de ligand ciblant le récepteur PAC1 est la suppression de la capacité de liaison du PACAP pour les récepteurs VPAC1 et VPAC2. Plusieurs études de relation structure-activité (RSA) ont permis d'identifier des éléments clés pour la reconnaissance de l'un ou l'autre des trois récepteurs, mais la conception d'un dérivé spécifique demeure une tâche complexe (Bourgault *et al.*, 2009a, Fournier *et al.*, 2016, D. Vaudry *et al.*, 2009a). Toutefois, il est établi que des modifications apportées aux positions 2, 6, 7 ou 22 entraînent des changements d'affinité de liaison, en particulier envers les récepteurs VPACs (**Figure 12**) (Doan *et al.*, 2011, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015, D. Vaudry *et al.*, 2009a).



**Figure 13 : Structure primaire du PACAP avec identification des domaines responsables de la reconnaissance, de l'activation et de la sélectivité envers les récepteurs, et modifications apportées dans la séquence des isoformes de 27 et 38 acides aminés.**

Il est important de rappeler que certains travaux ont mis en évidence l'impact différent joué par une même modification introduite dans la séquence de l'une ou l'autre des isoformes. Par exemple, Ramos-Alvarez *et al.* ont montré une plus grande sélectivité de [D-Ser<sup>2</sup>]PACAP<sub>38</sub> envers le récepteur PAC1, versus le récepteur VPAC1, mais cette propriété n'a pas été retrouvée avec [D-Ser<sup>2</sup>]PACAP<sub>27</sub>. Il en est de même pour [D-Pro<sup>3</sup>]PACAP<sub>27</sub> et [D-

Pro<sup>3</sup>]PACAP38 (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015), ou encore pour les analogues tronqués générés à partir de la séquence du PACAP38 qui sont plus affins que ceux du PACAP27 (Bourgault *et al.*, 2009a). Dans notre étude, les analogues dérivés du PACAP38 ont souvent démontré une plus haute affinité de liaison pour le récepteur VPAC2 que leurs équivalents de 27 acides aminés. Initialement, il a été mis en évidence que la substitution de la sérine en position 2 par une L-alanine n'affecte pas la liaison aux récepteurs PAC1 et VPAC1, mais réduit l'affinité et l'activité du PACAP pour le récepteur VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Hou *et al.*, 1994, Robberecht *et al.*, 1992a). Des résultats similaires ont été observés pour [Ala<sup>2</sup>]PACAP27, mais pas pour [Ala<sup>2</sup>]PACAP38 dont les affinités de liaison étaient significativement augmentées, en particulier pour VPAC1 et VPAC2. En corrélation avec ces résultats, les affinités de liaison de [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 pour les trois récepteurs restaient inchangées tandis que celles de [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 envers VPAC1 et VPAC2 étaient réduites. De plus, il avait été montré que la substitution de la phénylalanine par une L-biphénylalanine (Bip) n'affectait pas la capacité de liaison du ligand pour le récepteur PAC1 (Bourgault *et al.*, 2009b). Contrairement à ce qui avait été observé, l'affinité de liaison de [Bip<sup>6</sup>]PACAP38 envers les récepteurs PAC1 et VPAC1 est légèrement réduite lorsque comparée à celle du PACAP38, tandis que l'affinité de liaison pour le récepteur VPAC2 est augmentée. En parallèle [Bip<sup>6</sup>]PACAP27 présente des affinités de liaison comparables à celles du PACAP27 et une légère réduction de l'affinité de liaison pour le récepteur VPAC2.

Au niveau du segment central, il a été suggéré que la position 22 jouerait un rôle important dans la liaison aux récepteurs en particulier pour les récepteurs VPAC1 et VPAC2 (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). En effet, dans la séquence du PACAP, le résidu Tyr<sup>22</sup> est à l'interface d'une zone flexible reliant les segments central et C-terminal du peptide. De plus, le PACAP27 et le VIP, deux membres d'une même famille partageant 68 % d'homologie de séquence, possèdent tous deux une tyrosine à cette position (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Pour le VIP, cet acide aminé est extrêmement important pour la liaison au récepteur VPAC2 (Gourlet *et al.*, 1997, Igarashi *et al.*, 2005). Par contre, il a été montré que [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 a une bonne affinité de liaison pour le récepteur PAC1, et que celle-ci est augmentée de 5 fois pour le récepteur VPAC1 et est réduite de plus de 800 fois pour le récepteur VPAC2 (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). La modification de Tyr<sup>22</sup> apparaît donc comme une excellente stratégie pour découvrir des analogues sélectifs à PAC1. Dans notre premier article, et en accord avec la littérature (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015), nous avons confirmé que [Ala<sup>22</sup>]PACAP38, bien qu'il affiche une perte de liaison pour les trois récepteurs, est plus affiné pour le récepteur PAC1 que pour les deux autres récepteurs. Cependant, et de manière surprenante, [Ala<sup>22</sup>]PACAP27 est quant à lui

plus sélectif pour le récepteur VPAC1. Nos données confirment donc l'implication de la portion 28-38 dans la sélectivité envers les trois récepteurs du PACAP. En particulier, ce résultat apporte un éclairage nouveau sur les études RSA et suggère que les données obtenues avec les analogues du PACAP38 ne peuvent être transposées intégralement pour les analogues du PACAP27, et réciproquement.

La liaison du PACAP à ses récepteurs a été décrite comme étant un modèle « en deux étapes » (Bourgault *et al.*, 2009a, Hoare, 2005, Laburthe *et al.*, 2007, Neumann *et al.*, 2008). Ainsi, les isoformes du peptide, différant seulement par leur segment C-terminal, se fixeraient au domaine N-terminal extracellulaire du récepteur par des liaisons électrostatiques et hydrophobes, de même que par des ponts hydrogène, selon un profil d'interactions distinct. Après la formation du complexe ligand-récepteur, le peptide est dirigé vers la pochette d'activation afin de stimuler le récepteur. Supportant ce postulat, il a été rapporté pour le récepteur du glucagon que l'interaction initiale du peptide avec son récepteur favorise des changements conformationnels qui facilitent les contacts entre le peptide et la première boucle extracellulaire (H. Zhang *et al.*, 2017). D'ailleurs, une étude *in silico* récente portant sur le récepteur PAC1 supporte cette hypothèse (C. Liao *et al.*, 2018). Il est important de noter que la liaison du PACAP38 serait modulée par la présence de sa queue C-terminale cationique qui interagirait électrostatiquement avec une région acide du domaine N-terminal de PAC1, suggérant ainsi, comme indiqué précédemment, que les interactions initiales du récepteur ne sont pas les mêmes pour les deux isoformes du PACAP et que ces dernières sont donc fonctionnellement sélectives (Sun *et al.*, 2007). Par conséquent, les différentes régions du peptide, comprenant les motifs *Asx-turn* et *N-capping*, seraient orientées vers la cavité du récepteur de façon différente et ceci influencerait de manière distincte l'activation de certaines voies de signalisation.

## 1.2. Pharmacologie

Ces quelques études ont ainsi confirmé l'importance du segment C-terminal du PACAP dans la liaison des récepteurs, mais aucune n'a exploré l'impact des modifications apportées dans ces deux isoformes sur l'activation de certaines voies de signalisation du récepteur PAC1. Les analogues du PACAP générés dans les deux isoformes comprennent des modifications chimiques au niveau d'acides aminés clés pour la structure secondaire (motif *Asx-turn*, *N-capping* et structure en hélice  $\alpha$ ) du PACAP (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Ramos-

Alvarez *et al.*, 2015). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à des modifications aux positions 2, 6, 7 et 22 qui ont été décrites comme étant des éléments clés responsables de la stabilisation structurelle du PACAP et qui affectent particulièrement la liaison et l'activation au niveau du récepteur VPAC2. Nous avons ainsi évalué le profil pharmacologique de ces analogues afin d'examiner les événements physico-chimiques potentiellement responsables des profils d'activation du PACAP pour le récepteur PAC1. Il a été établi que le récepteur PAC1 adopte plusieurs états conformationnels pouvant être responsables du recrutement des seconds messagers (C. Liao *et al.*, 2018). De plus, il est maintenant connu que des analogues structurellement distincts stabilisent différentes conformations d'un même récepteur modulant ainsi son profil signalétique (Rankovic *et al.*, 2016).

Il a été démontré que le récepteur PAC1 est couplé à deux protéines G,  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_s$  qui sont impliquées dans les cascades de signalisation antiapoptotique du PACAP. Notamment, l'activation de  $G\alpha_s$  entraîne la stimulation de la voie AMPc/PKA alors que la stimulation de  $G\alpha_q$  active la cascade de la PLC et la mobilisation du  $Ca^{2+}$  (Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). Il a aussi été observé que le récepteur PAC1 peut interagir avec les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 (Broca *et al.*, 2009, Shintani *et al.*, 2018). Les  $\beta$ -arrestines ont été décrites dans un premier temps comme étant responsables de la désensibilisation des RCPGs. Toutefois, d'autres études ont montré que celles-ci seraient aussi impliquées dans l'activation de certaines voies de signalisation (Ranjan *et al.*, 2017). L'implication des  $\beta$ -arrestines dans l'effet neuroprotecteur du PACAP n'a pas été clairement démontrée. Cependant, le PACAP38 est capable de stimuler ERK1/2, laquelle est impliquée dans son effet neuroprotecteur, *via* la  $\beta$ -arrestine 1 (Broca *et al.*, 2009). May *et al.*, ont également prouvé que ERK1/2 est activée par deux mécanismes, selon qu'il y ait l'activation de la PKC ou l'internalisation du récepteur (May *et al.*, 2014). Aussi, très récemment, il a été rapporté que la  $\beta$ -arrestine 2 est impliquée dans le processus de désensibilisation du récepteur PAC1 et la phosphorylation de ERK1/2 (Shintani *et al.*, 2018). En conséquence, nous avons évalué la capacité de chacun des analogues contenant des modifications dans les motifs *Asx-turn* ou *N-capping*, ou bien dans la région centrale du peptide, à activer préférentiellement l'une ou l'autre de ces voies de signalisation.

### 1.2.1. Position 2 : Motif Asx-turn

Comme proposé précédemment, la conformation bioactive en *Asx-turn*, impliquant les résidus 1 à 4, serait indispensable à l'activité biologique du PACAP (Doan *et al.*, 2011). En effet, le segment N-terminal a fait l'objet de plusieurs études RSA et des modifications (Ala, inversion de la chiralité L/D, acides aminés contraints) en position 2 ont été explorées (Bourgault *et al.*, 2009a, Doan *et al.*, 2011). Ces études ont montré que des modifications dans cette région du PACAP affectent particulièrement sa liaison et sa capacité à activer le récepteur VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2011, Doan *et al.*, 2011, Hou *et al.*, 1994, Robberecht *et al.*, 1992a). En revanche, l'incorporation d'une L-alanine à la position 2 n'affecte pas les propriétés neuroprotectrices du PACAP, ni son profil d'activation des seconds messagers, suggérant ainsi que le groupement hydroxyle de la Ser<sup>2</sup> n'est pas indispensable à l'activation des seconds messagers étudiés, et donc à l'effet neuroprotecteur du PACAP médié par le récepteur PAC1.

Il a également été décrit que la substitution séquentielle de His<sup>1</sup>, Ser<sup>2</sup> et Asp<sup>3</sup> par leur énantiomère de configuration absolue D n'a pas d'impact sur l'affinité du PACAP envers PAC1 et VPAC1, mais réduit son affinité pour VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Ainsi, dans le but de renforcer le coude que forme cette structure postulée en *Asx-turn*, l'incorporation en position 2 d'acides aminés contraints tels qu'une L-proline (Pro) ou une L-hydroxyproline (Hyp) a été explorée. Ces peptides se sont avérés aussi puissants et efficaces pour la mobilisation calcique que le ligand endogène suite à l'activation du récepteur PAC1, mais avec une réduction de l'activité biologique pour le récepteur VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). Contrairement à ce qui avait été observé, l'incorporation d'acides aminés contraints à cette position affecte les propriétés neuroprotectrices du PACAP. Ces variations pourraient notamment s'expliquer par des changements importants dans l'activation des seconds messagers. En effet, l'efficacité d'activation de [Hyp<sup>2</sup>]PACAP pour les protéines G est affectée significativement pour les deux isoformes du PACAP. De manière étonnante, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 exerce des activités neuroprotectrices alors que [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27 échoue à protéger les SH-SY5Y contre la toxicité du MPP<sup>+</sup>. Alors que les deux isoformes [Hyp<sup>2</sup>]PACAP présentent une réduction de l'efficacité d'activation pour G $\alpha_q$ , [Hyp<sup>2</sup>]PACAP38 est plus puissant pour l'activation de cette dernière que [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27, ce qui pourrait en partie expliquer la différence de comportement neuroprotecteur de ces deux analogues. L'introduction d'une D-proline à la position 2, afin de stabiliser un coude à cette position et par conséquent de renforcer le motif *Asx-turn*, a généré

des antagonistes du PACAP (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). Cependant, malgré les premières observations indiquant une incapacité à initier une mobilisation calcique, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP27 est en mesure d'activer les protéines G et les  $\beta$ -arrestines, mais avec des puissances et des efficacités d'activation significativement réduites, en comparaison à celles du PACAP27. De manière surprenante, [D-Pro<sup>2</sup>]PACAP38 est biaisé pour la voie de  $G\alpha_s$ , confirmant ainsi que le segment C-terminal est impliqué dans le recrutement des seconds messagers.

Ainsi ces données suggèrent que l'organisation du motif *Asx-turn* et son rôle joué pour faciliter l'interaction du ligand dans la cavité du récepteur PAC1 sont cruciaux pour l'activité biologique du PACAP. De plus, les interactions entre le peptide et le récepteur, et par conséquent la signalisation intracellulaire qui en résulte, sont influencées par la présence du segment 28-38.

### 1.2.2. Motif N-capping

Le PACAP est également caractérisé par la présence d'un motif N-capping auquel participent les résidus 6 et 10 (Doan *et al.*, 2011). La phénylalanine en position 6 est conservée chez tous les ligands des RCPGs de la classe B, suggérant ainsi que cet acide aminé est un élément clé de la liaison et/ou de l'activation des récepteurs (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Il a été montré par Fournier et ses collaborateurs que l'hydrophobicité de ce résidu est indispensable à l'activité biologique du PACAP et que cette position est très sensible à des changements structuraux (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011, Fournier *et al.*, 2016). Par exemple, l'incorporation d'une L-alanine ou d'acides aminés aromatiques/hydrophobes contraints est très délétère pour l'activité biologique du peptide (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). D'un autre côté, la substitution de la Phe<sup>6</sup> par des résidus volumineux tels que la L-naphthylalanine (Nal) ou la L-biphénylalanine (Bip) génère des dérivés aussi puissants et efficaces que le PACAP endogène pour mobiliser le calcium intracellulaire après activation de PAC1. Cependant, ces derniers présentent des réductions d'affinité et d'activité importantes pour les récepteurs VPACs (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). Ainsi, l'incorporation d'une Bip à la position 6 apparaît comme une bonne stratégie pour la découverte de ligands sélectifs pour PAC1. Cet acide aminé renforce l'hydrophobicité de la position 6 et stabilise ainsi la structure en N-capping du PACAP. De plus, l'incorporation de cet acide aminé n'affecte pas l'activation des protéines G, bien que [Bip<sup>6</sup>]PACAP27 soit significativement moins efficace que le ligand

endogène à activer  $G\alpha_q$ , ce qui pourrait justifier la différence d'effet neuroprotecteur observée entre [Bip<sup>6</sup>]PACAP27 et [Bip<sup>6</sup>]PACAP38. Notons également que des changements manifestes ont été observés dans l'activation des  $\beta$ -arrestines, avec une majoration de la puissance et/ou de l'efficacité d'activation des  $\beta$ -arrestines 1 et 2.

Suite aux diverses études, il a été suggéré que la Thr<sup>7</sup> serait aussi impliquée dans la stabilisation du motif N-capping de type IA qui serait favorable à la liaison et à l'activation du récepteur VPAC2 (Doan *et al.*, 2011). En effet, l'incorporation d'une L-alanine à cette position réduit considérablement l'affinité et abolit l'activité du PACAP pour le récepteur VPAC2 (Doan *et al.*, 2011). De plus, l'inversion de la configuration de la thréonine en position 7 produit des analogues du PACAP27 montrant de faibles affinités envers les trois récepteurs (Doan *et al.*, 2011). Ainsi, cet acide aminé semble faire partie du processus de reconnaissance et d'activation des récepteurs PACAPergiques. Ce résidu serait aussi impliqué dans l'activation du récepteur PAC1. En effet, bien qu'ayant des efficacités d'activation similaires, [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 et [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 présentent des puissances d'activation du calcium significativement différentes, l'isoforme de 38 acides aminés étant plus puissante que son homologue de 27 résidus (Bourgault *et al.*, 2009b). En corrélation avec ces résultats, nous avons observé que [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 est significativement moins puissant à activer  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_s$  que PACAP27. De manière surprenante, l'isoforme de 27 acides aminés est plus efficace que [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 pour l'activation de  $G\alpha_q$ , ce qui avait également été rapporté par notre équipe en 2009 (Bourgault *et al.*, 2009b). En revanche cet ordre est inversé pour  $G\alpha_s$ . D'autre part, cette modification a une incidence sur l'efficacité d'activation des  $\beta$ -arrestines qui est significativement augmenté pour les deux isoformes, et en particulier pour celle de 38 acides aminés.

En résumé, ces données confirment, une nouvelle fois, l'impact du segment 28-38 sur la signalisation du récepteur PAC1 et démontrent que des modifications au sein de ce motif structural affecte la signalisation du PACAP en faveur des  $\beta$ -arrestines. Cependant, nos données ne sont pas suffisamment complètes pour en tirer des conclusions et des études RSA et structurales supplémentaires devront être conduites afin de confirmer ces hypothèses.

### 1.2.3. Position 22

Le PACAP est connu pour adopter une conformation hélicoïdale qui serait indispensable à son activité (Bourgault *et al.*, 2009b, Gonzalez-Muniz *et al.*, 2001, Inooka *et al.*, 1992, Wray *et al.*, 1993). Des études RSA de type Ala-scan ou Lys-scan ont révélé que les résidus 10, 14, 19, 20, 22 et 23 pourraient jouer un rôle central dans la stabilisation de la conformation bioactive du PACAP (Kumar *et al.*, 2011, Yung *et al.*, 2003). La Tyr<sup>22</sup> est notamment retrouvée chez le PACAP et le VIP. Il a été montré que la substitution de la Tyr<sup>22</sup>, retrouvée dans la séquence primaire du PACAP et du VIP, par une L-alanine dans le VIP génère un analogue puissant VPAC1 sélectif (Gourlet *et al.*, 1998). Récemment, le groupe de Jensen a rapporté que l'analogue [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 montre une réduction de l'affinité et de l'activité (pour l'AMPC) envers les récepteurs VPACs en particulier VPAC2 (Ramos-Alvarez *et al.*, 2015). Ces données suggèrent donc que la modification de ce résidu pourrait s'avérer une bonne stratégie pour générer des analogues puissants PAC1 sélectifs. En complément de la caractérisation initiale effectuée par Ramos-Alvarez *et al.*, nous avons observé que cette modification n'affecte pas la puissance d'activation du PACAP38 pour la protéine G $\alpha_s$ . Cependant, [Ala<sup>22</sup>]PACAP27, bien qu'efficace, est nettement moins puissant que le PACAP27. Dans nos essais, les deux isoformes de [Ala<sup>22</sup>]PACAP sont moins puissantes que les ligands endogènes à activer G $\alpha_q$ . Par ailleurs, [Ala<sup>22</sup>]PACAP38 est plus efficace que le PACAP38 pour stimuler la  $\beta$ -arrestine 2, ce que l'on ne retrouve pas avec l'isoforme 27. Ainsi, ce résidu serait impliqué dans l'activation des seconds messagers, en particulier des protéines G, et la queue C-terminale 28-38 viendrait stabiliser le récepteur PAC1 afin de produire l'activation de G $\alpha_s$  et de la  $\beta$ -arrestine 2.

### 1.2.4. Effecteur responsable de l'effet neuroprotecteur du PACAP

Au vu des résultats sur l'activation des effecteurs, cela suggère que le PACAP27 et le PACAP38 n'ont pas les mêmes déterminants d'interaction avec le récepteur PAC1, bien qu'il ait été démontré que le PACAP27 et le PACAP38 puissent induire des effets neuroprotecteurs comparables. Des études *in vitro* ont démontré que le PACAP38 avait un effet neuroprotecteur plus marqué que le PACAP27 (Doan *et al.*, 2011, Lamine *et al.*, 2016). Nous avons retrouvé cet effet pour tous les analogues que nous avons générés confirmant ainsi le rôle du segment C-terminal 28-38 dans l'effet antiapoptotique du PACAP. Tel qu'observé au cours de notre étude, cet effet neuroprotecteur du PACAP n'est pas lié à l'activation d'une seule et unique voie de

signalisation, mais serait plutôt multifactoriel. En effet, comme observé, la perte de puissance et/ou d'efficacité de l'une ou l'autre des protéines étudiées semble avoir des effets drastiques sur l'effet neuroprotecteur du ligand étudié. Par exemple, [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 est très efficace, mais beaucoup moins puissant que [Ala<sup>7</sup>]PACAP38 pour l'activation des protéines G, ce qui se traduit par un effet neuroprotecteur moins marqué. Plus particulièrement, l'effet neuroprotecteur semble nécessiter une puissante activation simultanée de G $\alpha_q$  et G $\alpha_s$  ainsi que de leurs effecteurs.

En conclusion, bien que nous n'ayons pas identifié d'analogues biaisés pour la voie des protéines G, nous avons mis en évidence que les analogues dérivés du PACAP38 activent beaucoup plus les  $\beta$ -arrestines que leurs homologues de 27 résidus, avec de surcroît un effet neuroprotecteur plus marqué. Par exemple, [Bip<sup>6</sup>]PACAP38 est plus puissant et efficace pour l'activation des  $\beta$ -arrestines 1 et 2 que le ligand endogène. À ce jour, le rôle des  $\beta$ -arrestines dans l'effet neuroprotecteur du PACAP, suite à l'activation du récepteur PAC1, n'est pas connu et nécessite donc des travaux additionnels.

Au cours de cette étude, la première en son genre sur le PACAP, nous avons pu démontrer que les déterminants physico-chimiques régissant la formation et la stabilisation du complexe PACAP/PAC1 modulent également l'activation des signaux en aval. Les deux isoformes du PACAP étant fonctionnellement sélectives, des modifications apportées dans l'une ou l'autre des séquences du PACAP n'impliquent donc pas une transposition signalétique pour les deux isoformes. Comme démontré, le récepteur PAC1 passe par de nombreux états conformationnels, permettant la transmission des signaux du domaine extracellulaire au site de liaison des seconds messagers (C. Liao *et al.*, 2018). Ainsi, les PACAP 27 et 38 entraîneraient et stabiliseraient des mouvements spécifiques donnant lieu à l'activation des seconds messagers (C. Liao *et al.*, 2017b).

Par conséquent, nul doute que l'élaboration d'un composé se liant spécifiquement au récepteur PAC1 exige des études RSA supplémentaires pour les deux isoformes du PACAP, et en particulier pour déterminer le rôle spécifique du segment 28-38. En effet, ce segment est aussi impliqué dans la pharmacologie du récepteur PAC1, ainsi que dans la stabilité du peptide et de son transport au cerveau.

## 2. Les pepducines du récepteur PAC1

### 2.1. Spécificité PAC1 versus VPAC1 et VPAC2

Pour contourner les difficultés rattachées au développement de ligands spécifiques de PAC1, agissant au niveau du site orthostérique du récepteur, une stratégie habile serait l'utilisation de la modulation allostérique. Il a ainsi été observé à de nombreuses reprises que des peptides dérivés des boucles intracellulaires des RCPGs, appelés pepducines, sont souvent spécifiques à leurs récepteurs parents (Covic *et al.*, 2002a, Kaneider *et al.*, 2005, Kaneider *et al.*, 2007). Ce type de molécule, qui nécessite généralement la présence du récepteur apparenté, peut agir comme agoniste ou antagoniste *via* une modulation allostérique. Par exemple, la pepducine P1Pal-12 dérivée du récepteur PAR1 bloque totalement l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine. Elle agit alors comme un NAM (Wielders *et al.*, 2007). De plus, cette pepducine ne montre aucun effet dans des cellules HEK293 transfectées et traitées avec des ligands des récepteurs PAR2, PAR4, CXCR1 et CXCR2 (Kaneider *et al.*, 2007). Dans le système PACAPergique, le récepteur PAC1-*null* possède respectivement 48 % et 49 % d'identité de séquence avec les récepteurs VPAC1 et VPAC2. L'identité de séquence entre les boucles intracellulaires de ces trois récepteurs est présentée dans le **Tableau 6**. Au cours de notre étude, nous avons démontré que les pepducines dérivées des trois boucles intracellulaires de PAC1-*null* étaient inactives en l'absence de ce dernier dans les HEK293, confirmant ainsi leurs actions récepteur-dépendantes. Il est important de noter que nous avons observé un effet neuroprotecteur dans les SH-SY5Y comparable à celui produit par le PACAP38, alors que le VIP en a été incapable (Deguil *et al.*, 2007, Lamine *et al.*, 2016). Ce peptide de la famille sécrétine/glucagon/VIP se lie sélectivement aux récepteurs VPAC1 et VPAC2 et possède une affinité 1000 fois moindre pour le récepteur PAC1 comparativement au PACAP (D. Vaudry *et al.*, 2009a). Les SH-SY5Y exprimant de manière endogène uniquement les récepteurs PAC1 et VPAC2 (Lutz *et al.*, 2006), nos résultats suggèrent que l'effet neuroprotecteur des pepducines provient de l'activation du récepteur PAC1. De plus, nous avons démontré, dans des HEK293 transitoirement transfectées avec les récepteurs VPAC1 et VPAC2, que PAC1-Pep1 et PAC1-Pep2 étaient incapables d'induire l'activation de  $G\alpha_s$ . PAC1-Pep3, quant à elle, induit une stimulation dépendante du temps de  $G\alpha_s$  *via* le récepteur VPAC2. Ces résultats s'avèrent surprenants considérant les pourcentages d'identité de séquence, en particulier pour la pepducine dérivée de la première boucle intracellulaire du récepteur PAC1 dont l'identité de

séquence est de 100 % avec les ICL1 des récepteurs VPACs. Nos données suggèrent donc que ces trois pepducines interagissent différemment avec PAC1, VPAC1 et VPAC2 et/ou induisent des mécanismes d'activation distincts avec ces récepteurs. Il est aussi possible que les pepducines PAC1-Pep1 et PAC1-Pep2, bien qu'étant inactives pour  $G\alpha_s$ , soient tout de même capables de provoquer l'activation d'autres voies de signalisation associées aux récepteurs VPACs. En effet, bien que les récepteurs VPAC1 et VPAC2 activent principalement la voie de l'AMPc/PKA, il a été montré que le VIP active également la voie de la PLC et la production de  $Ca^{2+}$ , suggérant ainsi que ces récepteurs se couplent également à la protéine  $G\alpha_q$ . Enfin, il est maintenant connu que les récepteurs VPACs forment des hétéromères avec des RAMPs (*receptor activity-modifying proteins*), ce qui influence la signalisation intracellulaire de ces récepteurs (Hay *et al.*, 2016). Par exemple, lorsque le récepteur VPAC2 est coexprimé avec RAMP2 dans des HEK293, le couplage basal à  $G\alpha_i$  est augmenté (Wootten *et al.*, 2013). Pour finir, la caractérisation de la spécificité des pepducines a été réalisée dans les cellules HEK293 transitoirement transfectées avec l'un ou l'autre des récepteurs. Il est ainsi important de considérer que ces cellules expriment un niveau basal de VPAC1 et de RAMP1 (Atwood *et al.*, 2011), pouvant influencer les résultats obtenus, bien qu'aucune des pepducines n'aient démontré une action sur ce récepteur pour la voie de  $G\alpha_s$ . Il faut aussi noter qu'une surexpression de l'un ou l'autre des récepteurs peut influencer la disponibilité des récepteurs sous forme mono- ou dimérique, et pourrait expliquer l'inactivité des pepducines. En effet, il est supposé que l'interaction des pepducines avec les récepteurs mimerait la formation d'un dimère (P. Zhang *et al.*, 2015). En résumé, des expériences complémentaires seront nécessaires pour mieux apprécier le caractère spécifique de nos pepducines.

Malgré tout, ces peptides apparaissent comme d'excellents candidats pour l'élaboration d'un ligand spécifique au récepteur PAC1. Cependant, dans nos études futures, il sera important de prendre en considération le contexte cellulaire utilisé pour étudier la spécificité des pepducines et d'évaluer d'autres voies de signalisation associées à l'activation des récepteurs VPACs.

**Tableau 6 : Séquence des boucles intracellulaires des récepteurs PAC1-null, VPAC1 et VPAC2.**

Numéro Swiss-Prot	Récepteur	ICL1	ICL2	ICL3
P41586	PAC1	179-RKLNHCTRN-186	254-LLVETFFPERRYFYW-268	333-QKLQSPDMGGNESSIYLR-350
P32241	VPAC1	168-RKLNHCTR-174	241-YTLVAVFFSERKY-254	317-RILLQKLRPDIRKSDSSPYRLAR-341
		100%	58%	71%
P41587	VPAC2	152-RKLNHCTR-158	228-HTLLVAMLPPRR-240	304-RILLQKLTSPPVGGNDQSQYKRLAK-328
		100 %	0 %	69 %

Le pourcentage d'homologie de séquence de chaque boucle, en comparaison avec celle de PAC1, apparaît en rouge.

## 2.2. Pharmacologie

### 2.2.1. *In vitro*

Nous avons démontré que les pepducines dérivées de la séquence des boucles intracellulaires du récepteur PAC1-*null* étaient capables d'induire des effets neuroprotecteurs comparables à ceux produits par le PACAP38 dans des modèles cellulaires et animaux parkinsoniens. En effet, celles-ci ont été évaluées dans un premier temps au moyen d'un modèle de dégénérescence cellulaire parkinsonien : des neuroblastomes humains SH-SY5Y traités avec le MPP<sup>+</sup> qui, en bloquant le complexe I de la chaîne mitochondriale, reproduit les dommages neuronaux retrouvés dans la MP (Maiti *et al.*, 2017). Le MPP<sup>+</sup> correspond au métabolite actif du MPTP, une neurotoxine largement utilisée pour induire le parkinsonisme dans plusieurs modèles animaux (Langston, 2017). De plus, les neuroblastomes SH-SY5Y expriment la TH et le DAT, deux caractéristiques des neurones dopaminergiques (Lopes *et al.*, 2010, Presgraves *et al.*, 2004, Xie *et al.*, 2010). Également, ces neuroblastomes expriment plusieurs isoformes du récepteur PAC1 pouvant préférentiellement activer diverses voies de signalisation (Lutz *et al.*, 2006). Ces isoformes comportent des insertions ou délétions de cassettes d'acides aminés dans le segment N-terminal, la troisième boucle intracellulaire ou dans les domaines transmembranaires, permettant ainsi une représentation plus réaliste de la réponse biologique (Lutz *et al.*, 2006). Les SH-SY5Y apparaissent comme un modèle *in vitro* parkinsonien approprié et efficace pour la caractérisation pharmacologique des pepducines du

récepteur PAC1. Nous avons ainsi montré qu'un prétraitement de 4 h avec  $10^{-7}$  M de PACAP38, de PAC1-Pep1, de PAC1-Pep2 ou de PAC1-Pep3 est suffisant pour induire une neuroprotection marquée.

Pour caractériser la réponse de ces peptides, la nature du modèle cellulaire est évidemment importante. Ainsi, nous avons également entrepris de caractériser la réponse cellulaire des pepducines dans des SH-SY5Y qui expriment de façon endogène le récepteur PAC1, mais aussi le sous-type VPAC2. PAC1-Pep3 ayant démontré sa capacité à activer VPAC2 dans les HEK293, la réponse observée dans les SH-SY5Y pourrait également être associée à ce récepteur. Les pepducines ont ainsi été caractérisées sur la base de leur capacité à stimuler efficacement les protéines  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_q$  dans les SH-SY5Y. Les trois pepducines se sont avérées capables d'induire une activation des protéines G avec des puissances et efficacités distinctes. Comme montré pour le récepteur PAR1, les pepducines peuvent induire une conformation active du récepteur différente de celle produite par le ligand endogène (P. Zhang *et al.*, 2015). Ceci peut expliquer pourquoi PAC1-Pep1 et PAC1-Pep2 activent  $G\alpha_s$  avec une efficacité largement supérieure à celle du PACAP38, bien que ces pepducines soient moins puissantes que la molécule endogène. Quant à PAC1-Pep3, la puissance d'activation de  $G\alpha_s$  est comparable à celle du ligand endogène. PAC1-Pep1 et PAC1-Pep2 sont également plus puissantes que le PACAP38 à activer  $G\alpha_q$ , bien que PAC1-Pep1 se comporte plutôt comme un agoniste partiel pour cette voie de signalisation. De manière surprenante, PAC1-Pep3 est incapable d'activer la protéine  $G\alpha_q$ . Notons toutefois que l'effet neuroprotecteur de cette pepducine était le moins marqué de tous. Dans le premier volet de cette thèse, nous avons montré que l'effet neuroprotecteur du PACAP est dépendant de l'activation de ces deux voies de signalisation, alors qu'ici, bien que PAC1-Pep3 soit incapable d'activer  $G\alpha_q$ , celle-ci peut tout de même induire un effet neuroprotecteur significatif *in vitro*. Cela amène donc un nouveau questionnement quant aux mécanismes de neuroprotection induits par l'activation du récepteur PAC1 et potentiellement au rôle que pourrait jouer les  $\beta$ -arrestines dans ce phénomène. En interagissant au niveau d'un site allostérique qui reste à identifier, nos pepducines vont probablement engendrer des changements conformationnels distincts de ceux observés avec le ligand endogène. Sur un autre système peptidergique, il a ainsi été montré par BRET que la pepducine ICL3-9 dérivée du récepteur  $\beta$ 2-AR induit un rapprochement entre le segment N-terminal de  $G\alpha_s$  et le domaine C-terminal du récepteur alors que l'inverse est observé avec l'isoprotérénol, démontrant ainsi que les interactions entre les protéines G et le récepteur diffèrent entre le ligand endogène et le MoA (Carr *et al.*, 2014). Afin de

mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans leurs effets neuroprotecteurs, nos pepducines devront être évaluées pour leur capacité à stimuler différents effecteurs associés à l'effet antiapoptotique du PAC1 et incluant l'activation caspasiqque et les seconds messagers tels AMPc, PI3K, PKC, IP<sub>3</sub>, ERK et les β-arrestines.

À ce jour, le mode d'interaction et d'action des pepducines n'est pas encore clairement défini. Il est cependant postulé que ces dernières, correspondant au site de liaison des protéines G, viendraient reconnaître leur récepteur parent par homologie de séquence et le stabiliseraient dans une conformation unique permettant l'activation ou l'inhibition des seconds messagers (Carr *et al.*, 2016a). Il a été décrit que les pepducines adopteraient une structure secondaire très proche de celle observée pour la boucle intracellulaire apparentée (P. Zhang *et al.*, 2015). Rappelons que certaines pepducines sont capables d'activer les protéines G de manière indépendante de leur récepteur (Carr *et al.*, 2014). Or, dans notre étude, les trois pepducines n'ont démontré aucune activité dans les HEK293 en l'absence du récepteur PAC1. Lors de la caractérisation de la réponse des pepducines dans des cellules HEK293 transitoirement transfectées avec PAC1, nous avons observé que l'activation de ce récepteur apparaît beaucoup plus tardivement (t : 45 min) que celle provoquée avec le ligand endogène, qui active G<sub>α<sub>s</sub></sub> directement après le traitement des cellules, et qu'elle est également plus faible ( $\Delta$ BRET =  $1,61 \pm 0,24$  pour PACAP38 et  $\Delta$ BRET =  $1,04 \pm 0,49$  pour PAC1-Pep2, après 45 min). Dans ce contexte, où nous surexprimons le récepteur PAC1, la réponse n'est bien sûr pas totalement fidèle à ce qui est retrouvé dans les cellules de type sauvage. Entre autres, dans ce modèle cellulaire, la capacité des pepducines à interagir efficacement avec le récepteur PAC1 pourrait être affectée par un nombre limité de récepteurs monomériques et/ou dimériques disponibles. En effet, une des hypothèses expliquant le mode d'activation des récepteurs par les pepducines est que ces dernières, en s'associant à une boucle intracellulaire, miment la formation d'un dimère, comme observé lors de la dimérisation des récepteurs suite à des interactions entre les ICLs des récepteurs monomériques (Winther *et al.*, 2015). Notons qu'il a été démontré que la dimérisation de PAC1 amplifie l'effet antiapoptotique du PACAP, et que ce processus facilite l'internalisation du récepteur (Yu *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'implication de l'internalisation du récepteur PAC1 et donc du recrutement des β-arrestines dans l'effet antiapoptotique, n'a pas encore été élucidée. Ainsi, ces paramètres devront être évalués afin de mieux comprendre quel type d'interaction est impliqué entre les pepducines et le récepteur PAC1.

## 2.2.2. *In vivo*

### 2.2.2.1. Effet neuroprotecteur

Depuis quelques années, le poisson-zèbre est couramment utilisé pour étudier les maladies neurodégénératives (Best *et al.*, 2008). D'une part, l'organisation de son génome et les événements génétiques contrôlant la transduction des signaux sont hautement conservés entre cette espèce animale et l'humain (Postlethwait *et al.*, 2000). D'autre part, l'organisation cérébrale de ce poisson est comparable à celle de l'homme (Wullimann *et al.*, 2004) et il possède des systèmes de neurotransmission tels que les systèmes dopaminergiques et cholinergiques (Rico *et al.*, 2011). De plus, ils sont pourvus d'une BHE qui est partiellement formée à 3 j.p.f. et dont les caractéristiques structurelles et fonctionnelles sont comparables à celles des mammifères (Fleming *et al.*, 2013). Enfin, la facilité d'obtention des larves, ainsi que leur petite taille, permettent des études rapides et à haut débit (Best *et al.*, 2008). Afin de caractériser *in vivo* l'effet neuroprotecteur de nos pepducines sur un modèle parkinsonien, nous avons traité des larves de poissons-zèbres âgées de 1 jour avec du MPTP, et ce, durant 5 jours consécutifs. Cet agent neurotoxique est largement utilisé pour reproduire la maladie de Parkinson *in vivo* (Langston, 2017, Maiti *et al.*, 2017). En particulier, cette molécule cause des dommages cérébraux chez plusieurs espèces, dont le poisson-zèbre (Anichtchik *et al.*, 2004, Lam *et al.*, 2005, Sallinen *et al.*, 2009). L'évaluation des niveaux d'expression des neurones DA démontre que PAC1-Pep2 possède un effet neuroprotecteur bien moindre que PAC1-Pep1 et PAC1-Pep3. Cet animal exprime deux isoformes du récepteur PAC1 et ce dernier présente 63 % d'homologie de séquence avec le PAC1 humain (Fradinger *et al.*, 2005). Notons cependant que la première et la deuxième boucle intracellulaire sont extrêmement bien conservées entre ces deux espèces, ce qui amène une interrogation concernant l'efficacité moindre de PAC1-Pep2 *in vivo*. En particulier, *in vitro* nous avons utilisé des neuroblastomes humains qui expriment de multiples isoformes du récepteur PAC1 alors que chez le poisson-zèbre deux transcrits du récepteur ont été caractérisés (Alexandre *et al.*, 2011). L'homologie de séquence ainsi que les disparités entre les isoformes humaines et du poisson-zèbre de PAC1 pourraient entraîner des différences d'interactions entre les pepducines et les récepteurs, engendrant un biais interspèce.

Bien que le PACAP ait démontré de nombreux effets neuroprotecteurs *in vivo* dans plusieurs modèles animaux parkinsoniens (Maasz *et al.*, 2017, Reglodi *et al.*, 2004b, D. Vaudry

*et al.*, 2009a, Wang *et al.*, 2008), il n'avait jamais été utilisé dans un modèle parkinsonien du poisson-zèbre. Ainsi, les données confirment que ce modèle est utile comme première approche de validation de l'effet neuroprotecteur pour les dérivés étudiés. Cependant, d'autres informations telles que les niveaux d'expression des protéines mutées lors de la MP, ou encore sur le niveau d'inflammation, devront être colligées afin d'apporter plus d'éléments de réponse sur les mécanismes de neuroprotection des pepducines et du PACAP chez cette espèce. D'autre part, il faut garder à l'esprit que nos travaux visent à développer un composé neuroprotecteur se liant au récepteur PAC1, et que celui-ci devra être dépourvu d'effets secondaires pouvant être délétères pour un patient. Pour le PACAP, de nombreux effets biologiques ont été démontrés chez l'homme, le porc, le chien, le cobaye, le rat ou la souris (Chang *et al.*, 2005, Darsalia *et al.*, 2013, Hirose *et al.*, 1997, Ishizuka *et al.*, 1992, Lamine *et al.*, 2016, Seebeck *et al.*, 1996). De plus, les profils d'expression des récepteurs du PACAP, en particulier des récepteurs VPAC1 et VPAC2, dans les différents tissus du poisson n'ont pas encore été totalement élucidés. Néanmoins, certains indices suggèrent une participation du système VIP/PACAP dans les échanges fonctionnels entre les systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire chez les poissons (Gorgoglione *et al.*, 2015). Donc, pour le moment, l'utilisation du poisson-zèbre doit demeurer limitée à la validation de composés neuroprotecteurs. Il sera alors nécessaire d'évaluer les futurs composés sur un modèle animal permettant de mesurer des activités biologiques multiples, et tout particulièrement, au niveau cardiovasculaire, comme réalisé précédemment lors de la caractérisation de l'analogue Ac-[Phe( $\rho$ )<sup>6</sup>, Nle<sup>17</sup>]PACAP27. Le modèle murin alors utilisé a montré que ce dérivé neuroprotecteur n'avait pas d'effets significatifs sur le rythme cardiaque et qu'en comparaison avec le ligand endogène PACAP38, son action vasodilatatrice était moins intense et de plus courte durée (Lamine *et al.*, 2016).

#### 2.2.2.2. Distribution

Le traitement des maladies neurodégénératives nécessite le développement de composés ayant la capacité de traverser la BHE. Le neuropeptide de notre étude, le PACAP, présente donc un intérêt évident puisqu'il traverse non seulement les membranes plasmiques, mais également les barrières physiologiques telles que la barrière testiculaire et la BHE (Banks, 2016). Cette dernière prévient l'entrée des molécules dans le SNC et conserve l'homéostasie pour protéger le cerveau des neurotoxines pouvant l'endommager (Pandey *et al.*, 2016). Plus particulièrement, il a été démontré que le PACAP27 traverse la BHE de manière passive, tandis que le PACAP38 franchit celle-ci au moyen du transporteur PTS-6 (Banks *et al.*, 1993). De plus,

l'influx du PACAP38 de la circulation sanguine vers le cerveau est très élevé et est même supérieur à ce qui est observé pour des molécules thérapeutiques comme la morphine (Banks, 2016). Le ligand endogène de PAC1 possède donc la propriété de se rendre facilement au cerveau après une administration périphérique.

Par contre, en ce qui concerne les pepducines produites à partir des séquences des ICLs de PAC1, nous n'avons à date aucune information suggérant qu'elles possèdent cette propriété. Des études de biodistribution réalisées avec des pepducines radiomarquées dérivées de CXCR4 ou PAR4 ont montré qu'une petite quantité de peptide peut se retrouver dans le cerveau, mais la distribution dépend bien sûr d'une part du mode d'injection et d'autre part, de la nature de la pepducine utilisée (Carlson *et al.*, 2012, Tressel *et al.*, 2011). De façon intéressante, les pepducines semblent avoir un accès favorisé aux tissus vascularisés, bien que cette observation reste à être clairement démontrée puisque peu d'entre elles ont été à ce jour évaluées *in vivo* (Tressel *et al.*, 2011). Cependant, à ce chapitre, des études portant sur la distribution de la pepducine ATI-2341, dérivée du récepteur CXCR4 et radiomarquée au carbone 14, ont été réalisées au moyen de l'autoradiographie quantitative sur animal entier. Ainsi, chez la souris, cette pepducine a été principalement retrouvée dans le foie, les reins et le système endocrinien, de même que dans les tissus adipeux, lymphatiques, pulmonaires et sécrétoires. Une faible quantité a également été observée dans les systèmes nerveux central, cutané, reproducteur, musculaire, oculaire et reproductif (Carlson *et al.*, 2012). De façon similaire, après injection intraveineuse de la pepducine P4pal-10, un Ago-PAM du récepteur PAR4, celle-ci a été principalement localisée dans le foie, les reins, les poumons et la rate, avec une part plus faible dans les autres tissus. Lorsque cette pepducine a été injectée par voie sous-cutanée, elle est alors apparue dans les reins, le foie, la rate, le sang, le cœur et les poumons, mais pas dans le cerveau, démontrant un lien avec la voie d'administration (Tressel *et al.*, 2011).

Les pepducines sont produites par l'attachement d'une chaîne lipidique ou d'un noyau stéroïdien à la fonction N-terminale du peptide. Ces structures hydrophobes permettent d'abord l'ancrage de la molécule dans les membranes plasmiques, puis son entrée dans les cellules (Tsuji *et al.*, 2013). En effet, il a été montré que les pepducines peuvent se retrouver de part et d'autre du feuillet lipidique (Tsuji *et al.*, 2013). Il a aussi été démontré qu'une palmitoylation, par exemple, est suffisante pour assurer le passage des pepducines à travers les membranes lipidiques (Tressel *et al.*, 2011). Il est établi que la BHE du poisson-zèbre est déjà partiellement formée à 3 j.p.f. et que l'exclusion des molécules est taille-dépendante. Notamment, à ce stade

développemental, la sulfo-NHS-biotine dont le poids moléculaire est de 562 Da est capable de traverser aisément la BHE, tandis que des molécules dont la masse est supérieure à 4 kDa en sont incapables (Fleming *et al.*, 2013). Nous n'avons pas mesuré précisément la capacité de nos pepducines à franchir la BHE. Néanmoins, malgré la BHE déjà active chez le modèle animal utilisé, celles-ci sont capables de protéger efficacement les neurones DA de la toxicité du MPTP, et ce, jusqu'à 5 j.p.f.

En résumé, bien que nos pepducines aient démontré une activité neuroprotectrice chez les larves de poisson-zèbre, suggérant ainsi qu'elles sont capables de traverser la BHE, leur capacité à traverser cette barrière devra être évaluée chez d'autres modèles animaux ou à l'aide d'un modèle cellulaire mimant la BHE.

# *Conclusions et Perspectives*

## CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans les pays développés, l'espérance de vie dépasse actuellement l'âge de 80 ans et en conséquence, le nombre de maladies neurodégénératives diagnostiquées augmente considérablement, notamment depuis les années 90. Parmi les maladies neurodégénératives bien connues, on identifie la maladie de Parkinson pour laquelle, à ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible. En effet, les médicaments proposés actuellement visent essentiellement à réduire les symptômes afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Comme la MP est produite par une dégénérescence accrue des neurones dopaminergiques, une approche thérapeutique à favoriser serait de prévenir ou d'arrêter cette dégénérescence neuronale afin de restaurer les niveaux de dopamine dans le cerveau. Dans ce contexte, le récepteur PAC1 du système peptidergique lié au neuropeptide PACAP apparaît comme une cible thérapeutique attrayante. En effet, son activation donne lieu à des effets antiapoptotiques, en particulier dans des conditions pathologiques dégénératives, incluant la MP (Lamine *et al.*, 2016, Maasz *et al.*, 2017, Destiny-Love Manecka *et al.*, 2016). Ainsi, dans le cadre de ce projet, nous avons identifié quelques éléments pharmacologiques clés pouvant faciliter la conception de composés sélectifs pour le récepteur PAC1 qui est à l'origine de l'effet neuroprotecteur. Nous évoquons ici les pistes qui nous apparaissent comme les plus prometteuses.

Dans un premier temps, nous avons constaté que la conception d'analogues du PACAP sur la base de la séquence de l'isoforme de 27 acides aminés est une meilleure stratégie pour le développement de composés neuroprotecteurs se liant au récepteur PAC1. En effet, selon l'ensemble actuel des observations réalisées dans notre laboratoire, nous sommes venus à la conclusion que des analogues dérivés du PACAP27 sont à privilégier puisque ceux-ci sont généralement plus sélectifs et métaboliquement plus stables. De plus, contrairement aux molécules dérivées du PACAP38, ils traversent la BHE de manière passive, ce qui assure des concentrations efficaces dans le SNC, et ils induisent moins de recrutement des  $\beta$ -arrestines qui pourrait être responsable de la désensibilisation du récepteur. Premièrement, bien que les peptides dérivés du PACAP27 montrent des effets neuroprotecteurs moindres que ceux issus du PACAP38, il apparaît que l'utilisation du PACAP27 comme modèle moléculaire favoriserait la sélectivité envers le récepteur PAC1. Ainsi, cela permettrait de s'affranchir plus facilement d'actions sur le récepteur VPAC2. Comme nous l'avons constaté, la plupart des analogues dérivés de l'isoforme de 27 acides aminés ont moins d'affinité pour ce sous-type. Notamment,

notre équipe a montré que cette avenue peut être avantageuse suite à la conception d'un analogue PAC1/VPAC1 sélectif. Bien qu'imparfait puisqu'il n'est pas dépourvu d'activité hypotensive, son action vasculaire est tout de même moindre que celle du PACAP38 et il est capable de produire un effet neuroprotecteur équivalent à celui du ligand endogène dans un modèle murin parkinsonien (Lamine *et al.*, 2016). Deuxièmement, l'utilisation du PACAP38 est limitée en raison de sa faible biodisponibilité, comparativement au PACAP27, puisqu'il est plus sensible à la dégradation enzymatique (Gourlet *et al.*, 1997, Green *et al.*, 2006). Aussi, le PACAP27 traverse la BHE de manière passive tandis que le PACAP38 franchit cette dernière à l'aide d'un transporteur (Banks *et al.*, 1993). Notons que durant la MP, l'intégrité de la BHE est altérée, ce qui peut entraîner une diminution du nombre de transporteurs disponible pour le PACAP38 (Gray *et al.*, 2015). Pour finir, bien que nous ayons constaté dans un modèle cellulaire que l'effet neuroprotecteur du PACAP38 est légèrement plus puissant que celui du PACAP27, sa prédisposition à activer les  $\beta$ -arrestines, et donc à induire une rapide désensibilisation du système, empêcherait vraisemblablement son utilisation thérapeutique de façon chronique. En effet, il est confirmé que les RCPGs de la classe B sont facilement internalisés et dégradés suite au recrutement des  $\beta$ -arrestines (Ranjan *et al.*, 2017). Considérant que les maladies neurodégénératives telles que la MP nécessitent des traitements prolongés, il est très probable que l'activation soutenue des  $\beta$ -arrestines entrainerait une perte rapide d'efficacité des traitements (Rajagopal *et al.*, 2018).

Ainsi, pour ces nombreuses raisons, le PACAP27 nous apparaît comme l'archétype moléculaire à utiliser pour développer des agonistes biaisés efficaces pour traiter de nombreuses pathologies neurodégénératives dont, bien sûr, la MP. En particulier, les travaux de notre laboratoire nous guident déjà sur la nature de modifications à introduire dans la séquence du PACAP27 afin de produire ce type de ligand. Tout d'abord, il faut considérer l'augmentation de l'hydrophobicité en position 6, une altération qui n'affecte pas l'effet neuroprotecteur du PACAP27, mais qui réduit le potentiel d'activation des récepteurs VPAC1 et VPAC2 (Bourgault *et al.*, 2009b, Doan *et al.*, 2011). Aussi, le focus est à appliquer sur la position 22, car nous avons mis en évidence que la commutation de cette tyrosine par une L-alanine promeut la sélectivité pour le récepteur PAC1. Également, nous proposons le remplacement de la sérine-2 par une L-alanine puisque cette substitution diminue significativement l'affinité de liaison du PACAP27 pour le récepteur VPAC2, tout en n'affectant pas l'effet neuroprotecteur. Similairement, nous suggérons la même modification à la position 7, car les analogues porteurs de cette transformation montrent une capacité de liaison réduite aux récepteurs VPACs. Pour finir, l'addition d'un groupement acétyle sur l'amine N-terminale, un ajout n'ayant aucune

incidence sur l'activité biologique, est une modification essentielle afin d'augmenter la stabilité plasmatique des composés (Bourgault *et al.*, 2008a). Ainsi, des études de structure-activité au moyen d'analogues du PACAP27 comportant des modifications chimiques et structurales aux sites décrits ci-haut conduiront à une connaissance accrue de l'ensemble de ces pharmacophores et faciliteront la mise au point d'une molécule dont les caractéristiques pourraient en faire un solide candidat pour d'éventuelles études cliniques.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence le potentiel neuroprotecteur de peptides dérivés des boucles intracellulaires du récepteur PAC1 dans un modèle expérimental de la MP. En effet, comparativement au PACAP, ces molécules se sont révélées être tout aussi efficaces pour contrer la toxicité du MPP<sup>+</sup> dans les cellules SH-SY5Y, et du MPTP chez le poisson-zèbre. L'usage de ces peptides, agissant comme des modulateurs allostériques, apparaît comme une stratégie additionnelle et très prometteuse pour la conception de composés ciblant le récepteur PAC1. En effet, même si le PACAP27 semble être un bon prototype pour le développement de composés sélectifs pour PAC1, les pepducines ont démontré une grande sélectivité envers ce récepteur.

Dans ce contexte, des études de relations structure-activité portant sur les pepducines sont requises afin d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques. Notamment, ces composés devront présenter une excellente spécificité envers le récepteur PAC1, un effet neuroprotecteur marqué, comparable ou même plus puissant que le PACAP endogène, une grande stabilité plasmatique, et la capacité de traverser la BHE. Dans un premier temps, des études classiques de RSA, telles que des délétions successives en C- et en N-terminal, permettront d'identifier les séquences minimales nécessaires à l'activation du récepteur PAC1. En effet, ces peptides représentent un avantage considérable, entre autres parce qu'ils sont relativement faciles à synthétiser et qu'ils peuvent généralement être produits à faibles coûts. Aussi, des bibliothèques d'analogues des pepducines pourront être constituées au moyen des méthodologies *Ala-scan* et *D-scan* et les propriétés pharmacologiques de ces composés pourront servir à identifier les déterminants responsables de l'activation du récepteur PAC1 et du recrutement des seconds messagers. Ces peptides devront ainsi être caractérisés afin d'établir leur capacité à activer diverses voies de signalisation associées aux récepteurs du PACAP, incluant les protéines G, et les effecteurs qui leurs sont associés, de même que les  $\beta$ -arrestines. Afin de mesurer la sélectivité des pepducines envers le récepteur PAC1 versus les récepteurs VPACs, quelques techniques sont à notre disposition. Par exemple, des tests de liaison avec des cellules transitoirement transfectées avec les différents récepteurs pourraient être effectués. Pour cela,

des clones des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2 pourraient être générés par la méthode FIAsh (*fluorescent arsenical haipin binders*). Cette technique consiste à introduire dans le récepteur un dérivé de fluorescéine arséniée, ou encore le monobromobimane, comme fluorophore agissant comme accepteur de BRET ou de FRET permettant ainsi d'étudier les variations distinctives dans les changements conformationnels des récepteurs PAC1, VPAC1 et VPAC2, induits par les pepducines. Ainsi, nous aurions des indices sur la sélectivité des nouvelles pepducines et sur les particularités des mouvements spécifiques d'activation observés dans les récepteurs (Bourque *et al.*, 2017). De plus, l'effet neuroprotecteur des pepducines pourrait être mesuré dans des cellules SH-SY5Y, suite à un traitement avec de l'ARN interférent visant à rendre silencieux les gènes pour les récepteurs PAC1 ou VPAC2, ou encore les  $\beta$ -arrestines. Ainsi, nous établirions si l'effet neuroprotecteur est uniquement associé au récepteur PAC1, en plus de vérifier l'influence des  $\beta$ -arrestines dans l'effet neuroprotecteur du PACAP et des pepducines.

La mise au point d'un composé biaisé en faveur des protéines G serait une avenue attrayante pour le traitement de maladies neurodégénératives telles que la MP. En effet, il est souhaité de pallier à la désensibilisation du récepteur PAC1 en créant des ligands incapables d'activer la voie des  $\beta$ -arrestines. L'action de la morphine sur ses récepteurs est un excellent exemple du phénomène de désensibilisation. En effet, en activant les  $\beta$ -arrestines, cet opiacé provoque la désensibilisation des récepteurs, ce qui entraîne une diminution de la réponse du système (Bohn *et al.*, 2000). À moyen ou long terme, ceci signifie un besoin d'accroître les doses administrées afin d'obtenir les effets antalgiques voulus (Rajagopal *et al.*, 2018). Comme mis en évidence, il est possible de développer des pepducines biaisées envers les protéines G. Par exemple, la pepducine ATI-2431 dérivée de CXCR4, un RCPG de la chimiokine CXCL12, est capable d'activer sélectivement  $G\alpha_i$ , sans causer l'activation de  $G\alpha_{12/13}$  et des  $\beta$ -arrestines (Quoyer *et al.*, 2013). Sachant que les  $\beta$ -arrestines sont recrutées suite à la phosphorylation du récepteur par les GRKs au niveau de résidus sérine/thréonine (Reiter *et al.*, 2012), nous pourrions cibler ces sites dans les pepducines du récepteur PAC1 dans le but d'identifier des pepducines biaisées en faveur des protéines G. Ces travaux amélioreront notre compréhension du rôle des  $\beta$ -arrestines dans la signalisation du récepteur PAC1. Ils devraient permettre aussi d'obtenir des indices quant à l'identité des sites de phosphorylation de PAC1 par les GRKs, car ceux-ci ne sont toujours pas connus. Plus particulièrement, l'examen de la manière dont les pepducines induisent une signalisation biaisée est un domaine innovateur, qui est certainement très propice pour la découverte de nouvelles approches thérapeutiques.

Le cerveau peut être atteint par un grand nombre d'affections telles que les encéphalites, les troubles neurologiques, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies neurodégénératives, les scléroses, et les tumeurs. Tout médicament conçu pour soigner ces diverses pathologies doit impérativement être capable de traverser la BHE. C'est pourquoi la plupart des approches thérapeutiques avortent en raison de la faible perméabilité de cette barrière physiologique pour des composés pourtant très prometteurs. En effet, plus de 90 % des petites molécules thérapeutiques échouent à la traverser efficacement (Hersh *et al.*, 2016). Ainsi, la capacité des pepducines dérivées du récepteur PAC1 à traverser la BHE doit être clairement démontrée, car ces peptides viseront à réduire la dégénérescence dopaminergique au niveau de la substance noire du cerveau. Notamment, les composés candidats pourront être évalués sur des modèles cellulaires de BHE en 3-dimensions, générés par la coculture de cellules endothéliales de cerveau, de péricytes et d'astrocytes humains (Campisi *et al.*, 2018). Plusieurs modèles commerciaux sont aussi actuellement disponibles auprès de compagnies telles que Alphabio Regen ou Neuromics. À plus long terme, les composés pourront être évalués sur un modèle parkinsonien animal de souris C57BL/6 où la séquence du récepteur PAC1 est strictement conservée (Blechman *et al.*, 2013). Les pepducines pourront être injectées par voie i.v. afin d'évaluer leur capacité à traverser la BHE et à produire une activité neuroprotectrice. De plus, des études par autoradiographie sur animal entier pourraient être réalisées sur les composés candidats afin d'évaluer leur distribution tissulaire.

Finalement, la stabilité des pepducines devra également être évaluée afin d'établir leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. À ce jour, ces paramètres ont été évalués pour quelques-unes d'entre elles, par marquage fluorescent et radioactif (Tressel *et al.*, 2011). Par exemple, chez la souris injectée avec la pepducine P4pal-10 marquée à l'Alexa-Fluor, des niveaux élevés de pepducine au niveau plaquettaire et plasmatique sont encore retrouvés après 5 h (Tressel *et al.*, 2011). Des études pharmacodynamiques chez la souris ont également démontré que cette pepducine était toujours efficace 24 h après son injection (Tressel *et al.*, 2011). Chez l'humain, la pepducine PZ-128 a une demi-vie estimée entre 1,3 et 1,8 h (Gurbel *et al.*, 2016). Également, la pepducine ATI-2341 du récepteur CXCR4, possède une stabilité plasmatique d'environ 5 h (Carlson *et al.*, 2012). Ainsi, ce type d'étude devra être conduit pour nos composés afin d'identifier une pepducine capable d'induire des effets sur de longs termes en évaluant par exemple leur stabilité plasmatique ou encore leur stabilité dans des homogénats de foie. En effet, idéalement, un composé devrait être suffisamment stable pour induire une action prolongée dans le temps, mais être également éliminé efficacement afin d'éviter l'apparition de possibles effets secondaires.

En résumé, l'élucidation précise du mode d'activation de PAC1 par des pepducines pourra conduire à la découverte d'un nouveau type de ligands pour ce récepteur. Les études supplémentaires proposées pourront contribuer à améliorer la compréhension des mécanismes d'activation du récepteur PAC1, et favoriser la découverte de composés ayant un solide potentiel thérapeutique. Toutefois, pour atteindre l'objectif ultime qui consiste en la conception d'un ligand neuroprotecteur utile pour traiter les maladies caractérisées par une dégénérescence neuronale, diverses phases d'évaluation devront encore se succéder avant l'identification d'une molécule répondant aux exigences de l'industrie pharmaceutique.



# *Bibliographie*

- Abdel-Latif A & Smyth SS (2012) Preventing platelet thrombosis with a PAR1 pepducin. *Circulation* 126(1):13-15.
- Abramov AY, Gegg M, Grunewald A, Wood NW, Klein C & Schapira AH (2011) Bioenergetic consequences of PINK1 mutations in Parkinson disease. *PLoS one* 6(10):e25622.
- Adamik A & Telegdy G (2005) Effects of pituitary adenylate cyclase polypeptide (PACAP) on extinction of active avoidance learning in rats: involvement of neurotransmitters. *Regulatory peptides* 127(1-3):55-62.
- Ago Y, Condro MC, Rajbhandari AK, Van C, Jayaram B, May V & Waschek JA (2016) PACAP Modulation of CNS and Peripheral Inflammation. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham10.1007/978-3-319-35135-3\_38. p 651-670.
- Ago Y, Yoneyama M, Ishihama T, Kataoka S, Kawada K, Tanaka T, Ogita K, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Takuma K & Matsuda T (2011) Role of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 172:554-561.
- Alexander GE (2004) Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in clinical neuroscience* 6(3):259-280.
- Alexandre D, Alonzeau J, Bill BR, Ekker SC & Waschek JA (2011) Expression analysis of PAC1-R and PACAP genes in zebrafish embryos. *Journal of molecular neuroscience : MN* 43(1):94-100.
- Allen PJ & Feigin A (2014) Gene-based therapies in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11(1):60-67.
- Ambrosi G, Cerri S & Blandini F (2014) A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 121(8):849-859.
- Amin FM, Hougaard A, Schytz HW, Asghar MS, Lundholm E, Parvaiz AI, de Koning PJ, Andersen MR, Larsson HB, Fahrenkrug J, Olesen J & Ashina M (2014) Investigation of the pathophysiological mechanisms of migraine attacks induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38. *Brain : a journal of neurology* 137(Pt 3):779-794.
- 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.
- Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M & Panula P (2004) Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Journal of neurochemistry* 88(2):443-453.
- Antonini A, Abbruzzese G, Barone P, Bonuccelli U, Lopiano L, Onofri M, Zappia M & Quattrone A (2008) COMT inhibition with tolcapone in the treatment algorithm of patients with Parkinson's disease (PD): relevance for motor and non-motor features. *Neuropsychiatric disease and treatment* 4(1):1-9.
- Archbold JK, Flanagan JU, Watkins HA, Gingell JJ & Hay DL (2011) Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends in pharmacological sciences* 32(10):591-600.
- Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T & Iguchi-Ariga SM (2013) Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:683920.
- 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, Li M & Batuman V (2006) Treatment of renal failure associated with multiple myeloma and other diseases by PACAP-38. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070:1-4.
- Arimura A & Shioda S (1995) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Frontiers in neuroendocrinology* 16(1):53-88.

- Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH & Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129(5):2787-2789.
- Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Weill C, Fiore RC, Tatsuno I, Bay V & Brenneman DE (1994) PACAP functions as a neurotrophic factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 739:228-243.
- Atwood BK, Lopez J, Wager-Miller J, Mackie K & Straiker A (2011) Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC genomics* 12:14.
- Aubert N, Falluel-Morel A, Vaudry D, Xifro X, Rodriguez-Alvarez J, Fisch C, de Jouffrey S, Lebigot JF, Fournier A, Vaudry H & Gonzalez BJ (2006) PACAP and C2-ceramide generate different AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. *Journal of neurochemistry* 99(4):1237-1250.
- Banks WA (2016) Transport of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Across the Blood–Brain Barrier: Consequences for Disease States and Therapeutic Effects. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham. 10.1007/978-3-319-35135-3\_25. p 423-432.
- Banks WA, Kastin AJ, Komaki G & Arimura A (1993) Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the blood-brain barrier. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 267(2):690-696.
- Barbeau A (1969) L-dopa therapy in Parkinson's disease: a critical review of nine years' experience. *Canadian Medical Association journal* 101(13):59-68.
- Barger SW, Goodwin ME, Porter MM & Beggs ML (2007) Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *Journal of neurochemistry* 101(5):1205-1213.
- Barker RA, Parmar M, Kirkeby A, Bjorklund A, Thompson L & Brundin P (2016) Are Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease Ready for the Clinic in 2016? *Journal of Parkinson's disease* 6(1):57-63.
- Barrie AP, Clohessy AM, Buensuceso CS, Rogers MV & Allen JM (1997) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* 272(32):19666-19671.
- Bartels AL & Leenders KL (2010) Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. *Current neuropharmacology* 8(1):62-68.
- Bartuzi D, Kaczor AA & Matosiuk D (2017a) Molecular mechanisms of allosteric probe dependence in mu opioid receptor. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 10.1080/07391102.2017.1417914:1-12.
- Bartuzi D, Kaczor AA & Matosiuk D (2017b) Signaling within Allosteric Machines: Signal Transmission Pathways Inside G Protein-Coupled Receptors. *Molecules* 22(7).
- Basille M, Gonzalez BJ, Leroux P, Jeandel L, Fournier A & Vaudry H (1993) Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. *Neuroscience* 57(2):329-338.
- 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. *The Journal of comparative neurology* 425(4):495-509.
- Bassi N & Fonarow GC (2018) Prevention of Heart Failure in Patients with Diabetes: Role of Diabetes Medications. *Current cardiology reports* 20(11):112.

- Basu S, Adams L, Guhathakurta S & Kim YS (2017) A novel tool for monitoring endogenous alpha-synuclein transcription by NanoLuciferase tag insertion at the 3' end using CRISPR-Cas9 genome editing technique. *Scientific reports* 8:45883.
- Belei OA, Heredea ER, Boeriu E, Marcovici TM, Cerbu S, Marginean O, Iacob ER, Iacob D, Motoc AGM & Boia ES (2017) Verner-Morrison syndrome. Literature review. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 58(2):371-376.
- Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG & Lefkowitz RJ (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(24):8879-8882.
- Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD & Hallett M (2001) Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 124(Pt 11):2131-2146.
- Berardelli A, Sabra AF & Hallett M (1983) Physiological mechanisms of rigidity in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 46(1):45-53.
- Best JD & Alderton WK (2008) Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatric disease and treatment* 4(3):567-576.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV & Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 3(12):1301-1306.
- Bhidayasiri R (2005) Differential diagnosis of common tremor syndromes. *Postgraduate medical journal* 81(962):756-762.
- Bhupendra S (2017) - A Review on Pharmacological Treatment of Idiopathic Parkinson's Disease. - 5(- 3):- 4.
- Binukumar BK, Shukla V, Amin ND, Grant P, Bhaskar M, Skuntz S, Steiner J & Pant HC (2015) Peptide TFP5/TP5 derived from Cdk5 activator P35 provides neuroprotection in the MPTP model of Parkinson's disease. *Molecular biology of the cell* 26(24):4478-4491.
- Birk S, Sitarz JT, Petersen KA, Oturai PS, Kruuse C, Fahrenkrug J & Olesen J (2007) The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers. *Regulatory peptides* 140(3):185-191.
- Blaszczak JW (2016) Parkinson's Disease and Neurodegeneration: GABA-Collapse Hypothesis. *Frontiers in neuroscience* 10:269.
- Blechman J & Levkowitz G (2013) Alternative Splicing of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor PAC1: Mechanisms of Fine Tuning of Brain Activity. *Frontiers in endocrinology* 4:55.
- Blesa J & Przedborski S (2014) Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy* 8:155.
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ & Caron MG (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408(6813):720-723.
- Booe JM, Walker CS, Barwell J, Kuteyi G, Simms J, Jamaluddin MA, Warner ML, Bill RM, Harris PW, Brimble MA, Poyner DR, Hay DL & Pioszak AA (2015) Structural Basis for Receptor Activity-Modifying Protein-Dependent Selective Peptide Recognition by a G Protein-Coupled Receptor. *Molecular cell* 58(6):1040-1052.
- Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P, Jr., Lerner RA & Kelly JW (2006) Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nature chemical biology* 2(5):249-253.
- Botia B, Jolivel V, Burel D, Le Joncour V, Roy V, Naassila M, Benard M, Fournier A, Vaudry H & Vaudry D (2011) Neuroprotective effects of PACAP against ethanol-induced toxicity in the developing rat cerebellum. *Neurotoxicity research* 19(3):423-434.

- 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. *Current pharmaceutical design* 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. *Current medicinal chemistry* 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. *Journal of molecular neuroscience : MN* 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. *Journal of medicinal chemistry* 52(10):3308-3316.
- Bourque K, Petrin D, Sleno R, Devost D, Zhang A & Hebert TE (2017) Distinct Conformational Dynamics of Three G Protein-Coupled Receptors Measured Using FIAsh-BRET Biosensors. *Frontiers in endocrinology* 8:61.
- Braak H & Del Tredici K (2008) Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70(20):1916-1925.
- Braas KM & May V (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides, PACAP-38 and PACAP-27, regulation of sympathetic neuron catecholamine, and neuropeptide Y expression through activation of type I PACAP/VIP receptor isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805:204-216; discussion 217-208.
- Brifault C, Vaudry D & Wurtz O (2016) The Neuropeptide PACAP, a Potent Disease Modifier Candidate for Brain Stroke Treatment. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham 10.1007/978-3-319-35135-3\_34. p 583-606.
- Broca C, Quoyer J, Costes S, Linck N, Varrault A, Deffayet PM, Bockaert J, Dalle S & Bertrand G (2009) beta-Arrestin 1 is required for PAC1 receptor-mediated potentiation of long-lasting ERK1/2 activation by glucose in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* 284(7):4332-4342.
- Brochard V, Combadiere B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC & Hunot S (2009) Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation* 119(1):182-192.
- Bronner G & Vodusek DB (2011) Management of sexual dysfunction in Parkinson's disease. *Therapeutic advances in neurological disorders* 4(6):375-383.
- Brown D, Tamas A, Reglodi D & Tizabi Y (2013) PACAP protects against salsolinol-induced toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* 50(3):600-607.
- Brown D, Tamas A, Reglodi D & Tizabi Y (2014) PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson's disease. *Neurotoxicity research* 26(3):230-239.
- Bruck D, Wenning GK, Stefanova N & Fellner L (2016) Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction. *Neurobiology of disease* 85:262-274.
- Burbulla LF, Song P, Mazzulli JR, Zampese E, Wong YC, Jeon S, Santos DP, Blanz J, Obermaier CD, Strojny C, Savas JN, Kiskinis E, Zhuang X, Kruger R, Surmeier DJ & Krainc D (2017) Dopamine oxidation

- mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science* 357(6357):1255-1261.
- Burns RS, Markey SP, Phillips JM & Chiueh CC (1984) The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 11(1 Suppl):166-168.
- Caballol N, Marti MJ & Tolosa E (2007) Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22 Suppl 17:S358-366.
- Cabezas-Llobet N, Vidal-Sancho L, Masana M, Fournier A, Alberch J, Vaudry D & Xifro X (2018) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Enhances Hippocampal Synaptic Plasticity and Improves Memory Performance in Huntington's Disease. *Molecular neurobiology* 55(11):8263-8277.
- Cagampang FR, Piggins HD, Sheward WJ, Harmar AJ & Coen CW (1998) Circadian changes in PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA in the rat suprachiasmatic and supraoptic nuclei. *Brain research* 813(1):218-222.
- Campisi M, Shin Y, Osaki T, Hajal C, Chiono V & Kamm RD (2018) 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials* 180:117-129.
- Canipari R, Di Paolo V, Barberi M & Cecconi S (2016) PACAP in the Reproductive System. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham10.1007/978-3-319-35135-3\_24. p 405-420.
- Cannon JR & Greenamyre JT (2011) The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124(2):225-250.
- Cao C, Zhang H, Yang Z & Wu B (2018) Peptide recognition, signaling and modulation of class B G protein-coupled receptors. *Current opinion in structural biology* 51:53-60.
- Cargnello M & Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75(1):50-83.
- Carlson KE, McMurry T & Hunt SW, 3rd (2012) Pepducins: lipopeptide allosteric modulators of GPCR signaling. *Drug discovery today. Technologies* 9(1):e1-e70.
- Carr R, 3rd & Benovic JL (2016a) From biased signalling to polypharmacology: unlocking unique intracellular signalling using pepducins. *Biochemical Society transactions* 44(2):555-561.
- Carr R, 3rd, Du Y, Quoyer J, Panettieri RA, Jr., Janz JM, Bouvier M, Kobilka BK & Benovic JL (2014) Development and characterization of pepducins as Gs-biased allosteric agonists. *The Journal of biological chemistry* 289(52):35668-35684.
- Carr R, 3rd, Schilling J, Song J, Carter RL, Du Y, Yoo SM, Traynham CJ, Koch WJ, Cheung JY, Tilley DG & Benovic JL (2016b) beta-arrestin-biased signaling through the beta2-adrenergic receptor promotes cardiomyocyte contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(28):E4107-4116.
- Castex MT, Arabo A, Benard M, Roy V, Le Joncour V, Prevost G, Bonnet JJ, Anouar Y & Falluel-Morel A (2016) Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice. *Molecular neurobiology* 53(9):5818-5832.
- Castorina A, Waschek JA, Marzagalli R, Cardile V & Drago F (2015) PACAP interacts with PAC1 receptors to induce tissue plasminogen activator (tPA) expression and activity in schwann cell-like cultures. *PLoS one* 10(2):e0117799.
- Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC & Miller GW (2008) Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends in neurosciences* 31(6):303-308.

- Cauvin A, Robberecht P, De Neef P, Gourlet P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC & Christophe J (1991) Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord. *Regulatory peptides* 35(2):161-173.
- Cenci MA (2014) Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Frontiers in neurology* 5:242.
- Chang Y, Lawson LJ, Hancock JC & Hoover DB (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: localization and differential influence on isolated hearts from rats and guinea pigs. *Regulatory peptides* 129(1-3):139-146.
- Chatterjee TK, Liu X, Davisson RL & Fisher RA (1997) Genomic organization of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor gene. Alternative splicing within the 5'-untranslated region. *The Journal of biological chemistry* 272(18):12122-12131.
- Chatterjee TK, Sharma RV & Fisher RA (1996) Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 271(50):32226-32232.
- Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J & Gillette MU (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(23):13468-13473.
- Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Jacobowitz DM & Kopin IJ (1984) Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacology bulletin* 20(3):548-553.
- Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS & Li L (2006) Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *The Journal of biological chemistry* 281(16):10816-10824.
- Chou PY & Fasman GD (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13(2):222-245.
- Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N & Sexton PM (2003) Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *The Journal of biological chemistry* 278(5):3293-3297.
- Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L & Isacson O (2005) Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Human molecular genetics* 14(13):1709-1725.
- Cif L & Hariz M (2017) Seventy years of pallidotomy for movement disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 32(7):972-982.
- Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, Hol EM & Derkinderen P (2014) Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 130(6):805-815.
- Cleeter MW, Cooper JM & Schapira AH (1992) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *Journal of neurochemistry* 58(2):786-789.
- Contreras F, Prado C, Gonzalez H, Franz D, Osorio-Barrios F, Osorio F, Ugalde V, Lopez E, Elgueta D, Figueroa A, Lladser A & Pacheco R (2016) Dopamine Receptor D3 Signaling on CD4+ T Cells Favors Th1- and Th17-Mediated Immunity. *J Immunol* 196(10):4143-4149.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM & Lansbury PT, Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294(5545):1346-1349.
- Covic L, Gresser AL, Talavera J, Swift S & Kuliopulos A (2002a) Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2):643-648.

- Covic L, Misra M, Badar J, Singh C & Kuliopulos A (2002b) Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nature medicine* 8(10):1161-1165.
- Creed RB & Goldberg MS (2018) New Developments in Genetic rat models of Parkinson's Disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 33(5):717-729.
- Culhane KJ, Liu Y, Cai Y & Yan EC (2015) Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors. *Front Pharmacol* 6:264.
- Curtin K, Fleckenstein AE, Robison RJ, Crookston MJ, Smith KR & Hanson GR (2015) Methamphetamine/amphetamine abuse and risk of Parkinson's disease in Utah: a population-based assessment. *Drug and alcohol dependence* 146:30-38.
- Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, Gu WJ, Hirsch EC, Rooney T, Ruberg M & Brice A (2003) Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Human molecular genetics* 12(5):517-526.
- Darsalia V, Mansouri S, Wolbert P, Barde S, Sjöholm A & Patrone C (2013) The specific VPAC2 agonist Bay 55-9837 increases neuronal damage and hemorrhagic transformation after stroke in type 2 diabetic rats. *Neuropeptides* 47(2):133-137.
- Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, Staal R, Tieu K, Schmitz Y, Yuan CA, Rocha M, Jackson-Lewis V, Hersch S, Sulzer D, Przedborski S, Burke R & Hen R (2002) Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22):14524-14529.
- Dauer W & Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39(6):889-909.
- Dautzenberg FM, Mevenkamp G, Wille S & Hauger RL (1999) N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *Journal of neuroendocrinology* 11(12):941-949.
- Davidzon G, Greene P, Mancuso M, Klos KJ, Ahlskog JE, Hirano M & DiMauro S (2006) Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Annals of neurology* 59(5):859-862.
- Davie CA (2008) A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin* 86:109-127.
- Davis-Taber R, Baker S, Lehto SG, Zhong C, Surowy CS, Faltynek CR, Scott VE & Honore P (2008) Central pituitary adenylate cyclase 1 receptors modulate nociceptive behaviors in both inflammatory and neuropathic pain states. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 9(5):449-456.
- de Graaf C, Song G, Cao C, Zhao Q, Wang MW, Wu B & Stevens RC (2017) Extending the Structural View of Class B GPCRs. *Trends in biochemical sciences* 42(12):946-960.
- Deguil J, Chavant F, Lafay-Chebassier C, Perault-Pochat MC, Fauconneau B & Pain S (2010) Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP parkinsonian mice. *Neurotoxicity research* 17(2):142-155.
- Deguil J, Jailloux D, Page G, Fauconneau B, Houeto JL, Philippe M, Muller JM & Pain S (2007) Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP+-induced alteration of translational control in Neuro-2a neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research* 85(9):2017-2025.
- Dejda A, Seaborn T, Bourgault S, Touzani O, Fournier A, Vaudry H & Vaudry D (2011) PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides* 32(6):1207-1216.
- del Sol A, Tsai CJ, Ma B & Nussinov R (2009) The origin of allosteric functional modulation: multiple pre-existing pathways. *Structure* 17(8):1042-1050.
- Delgado M (2016) Immunobiology of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham.10.1007/978-3-319-35135-3\_40. p 691-708.

- Dias BG & Ressler KJ (2013) PACAP and the PAC1 receptor in post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38(1):245-246.
- DiCicco-Bloom E, Deutsch PJ, Maltzman J, Zhang J, Pintar JE, Zheng J, Friedman WF, Zhou X & Zaremba T (2000) Autocrine expression and ontogenetic functions of the PACAP ligand/receptor system during sympathetic development. *Developmental biology* 219(2):197-213.
- Dimond P, Carlson K, Bouvier M, Gerard C, Xu L, Covic L, Agarwal A, Ernst OP, Janz JM, Schwartz TW, Gardella TJ, Milligan G, Kuliopulos A, Sakmar TP & Hunt SW, 3rd (2011) G protein-coupled receptor modulation with pepducins: moving closer to the clinic. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1226:34-49.
- Dipasquale B, Marini AM & Youle RJ (1991) Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 181(3):1442-1448.
- 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. *Biochemical pharmacology* 81(4):552-561.
- Doan ND, Chatenet D, Letourneau M, Vaudry H, Vaudry D & Fournier A (2012) Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochimica et biophysica acta* 1823(4):940-949.
- Doder M, Rabiner EA, Turjanski N, Lees AJ & Brooks DJ (2003) Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction: an 11C-WAY 100635 PET study. *Neurology* 60(4):601-605.
- Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE & Banks WA (2009) Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29(2):411-422.
- Dohi K, Mizushima H, Nakajo S, Ohtaki H, Matsunaga S, Aruga T & Shioda S (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regulatory peptides* 109(1-3):83-88.
- Dong XX, Wang Y & Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica* 30(4):379-387.
- Dorner GT, Wolzt M, Eichler HG & Schmetterer L (1998) Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1-27 on ocular, cerebral and skin blood flow in humans. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 358(6):657-662.
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A & Tanner CM (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68(5):384-386.
- Edvinsson L, Tajti J, Szalardy L & Vecsei L (2018) PACAP and its role in primary headaches. *The journal of headache and pain* 19(1):21.
- Engelhardt S & Rochais F (2007) G proteins: more than transducers of receptor-generated signals? *Circulation research* 100(8):1109-1111.
- Fan J, Xu G, Nagel DJ, Hua Z, Zhang N & Yin G (2010) A model of ischemia and reperfusion increases JNK activity, inhibits the association of BAD and 14-3-3, and induces apoptosis of rabbit spinal neurocytes. *Neuroscience letters* 473(3):196-201.
- Feigin VL (2017) Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Neurology* 16(11):877-897.

- Feinstein TN, Yui N, Webber MJ, Wehbi VL, Stevenson HP, King JD, Jr., Hallows KR, Brown D, Bouley R & Vilardaga JP (2013) Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *The Journal of biological chemistry* 288(39):27849-27860.
- Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, Gardella TJ & Vilardaga JP (2009) Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nature chemical biology* 5(10):734-742.
- Fiebich BL, Hull M, Lieb K, Gyufko K, Berger M & Bauer J (1997) Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *Journal of neurochemistry* 68(2):704-709.
- Filippi A, Mahler J, Schweitzer J & Driever W (2010) Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes th1 and th2 reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *The Journal of comparative neurology* 518(4):423-438.
- Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J & Isacson O (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell transplantation* 9(2):273-278.
- Fleming A, Diekmann H & Goldsmith P (2013) Functional characterisation of the maturation of the blood-brain barrier in larval zebrafish. *PloS one* 8(10):e77548.
- Flinn LJ, Keatinge M, Bretaud S, Mortiboys H, Matsui H, De Felice E, Woodroof HI, Brown L, McTighe A, Soellner R, Allen CE, Heath PR, Milo M, Muqit MM, Reichert AS, Koster RW, Ingham PW & Bandmann O (2013) TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. *Annals of neurology* 74(6):837-847.
- Forsman H, Bylund J, Oprea TI, Karlsson A, Boulay F, Rabiet MJ & Dahlgren C (2013) The leukocyte chemotactic receptor FPR2, but not the closely related FPR1, is sensitive to cell-penetrating pepducins with amino acid sequences descending from the third intracellular receptor loop. *Biochimica et biophysica acta* 1833(8):1914-1923.
- Foster HD & Hoffer A (2004) The two faces of L-DOPA: benefits and adverse side effects in the treatment of Encephalitis lethargica, Parkinson's disease, multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Medical hypotheses* 62(2):177-181.
- 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, Cham 10.1007/978-3-319-35135-3\_8. p 111-132.
- Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Barton B, de Bie RMA, Seppi K, Coelho M & Sampaio C (2018) International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 10.1002/mds.27372.
- Fradinger EA, Tello JA, Rivier JE & Sherwood NM (2005) Characterization of four receptor cDNAs: PAC1, VPAC1, a novel PAC1 and a partial GHRH in zebrafish. *Molecular and cellular endocrinology* 231(1-2):49-63.
- Freire C & Koifman S (2012) Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology* 33(5):947-971.
- Friedlander RM (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 348(14):1365-1375.
- Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, Berg D, Mueller JC & Gasser T (2008) Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J* 22(5):1327-1334.

- Furness SGB, Liang YL, Nowell CJ, Halls ML, Wookey PJ, Dal Maso E, Inoue A, Christopoulos A, Wootten D & Sexton PM (2016) Ligand-Dependent Modulation of G Protein Conformation Alters Drug Efficacy. *Cell* 167(3):739-749 e711.
- Gabl M, Holdfeldt A, Winther M, Oprea T, Bylund J, Dahlgren C & Forsman H (2016) A peptidic designed to modulate P2Y2R function interacts with FPR2 in human neutrophils and transfers ATP to an NADPH-oxidase-activating ligand through a receptor cross-talk mechanism. *Biochimica et biophysica acta* 1863(6 Pt A):1228-1237.
- Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL & Keen JH (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *The EMBO journal* 18(4):871-881.
- Galandrin S, Oligny-Longpre G & Bouvier M (2007) The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 28(8):423-430.
- Geppetti P, Veldhuis NA, Lieu T & Bunnett NW (2015) G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch. *Neuron* 88(4):635-649.
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21(1):90-113.
- Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM & Bloom SR (1993) Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *The Journal of endocrinology* 136(1):159-166.
- Gillardon F, Hata R & Hossmann KA (1998) Delayed up-regulation of Zac1 and PACAP type I receptor after transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain research. Molecular brain research* 61(1-2):207-210.
- Gonzalez H, Contreras F, Prado C, Elgueta D, Franz D, Bernales S & Pacheco R (2013) Dopamine receptor D3 expressed on CD4+ T cells favors neurodegeneration of dopaminergic neurons during Parkinson's disease. *J Immunol* 190(10):5048-5056.
- 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/III' IBTM beta-turn mimetics. Synthesis, NMR structure determination, and binding affinity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 9(12):3173-3183.
- Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH & Benovic JL (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383(6599):447-450.
- Gorgogliione B, Carpio Y, Secombes CJ, Taylor NG, Lugo JM & Estrada MP (2015) Viral and bacterial septicaemic infections modulate the expression of PACAP splicing variants and VIP/PACAP receptors in brown trout immune organs. *Fish & shellfish immunology* 47(2):923-932.
- 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. *Biochemical pharmacology* 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. *International journal of peptide and protein research* 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. *Regulatory peptides* 62(2-3):125-130.
- Gourlet P, Vandermeers-Piret MC, Rathe J, De Neef P, Cnudde J, Robberecht P & Waelbroeck M (1998) Vasoactive intestinal peptide modification at position 22 allows discrimination between receptor subtypes. *European journal of pharmacology* 348(1):95-99.

- 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. *European journal of biochemistry* 195(2):535-541.
- Grant S, Lutz EM, McPhaden AR & Wadsworth RM (2006) Location and function of VPAC1, VPAC2 and NPR-C receptors in VIP-induced vasodilation of porcine basilar arteries. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26(1):58-67.
- Gray MT & Woulfe JM (2015) Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35(5):747-750.
- Grealish S, Diguët E, Kirkeby A, Mattsson B, Heuer A, Bramouille Y, Van Camp N, Perrier AL, Hantraye P, Bjorklund A & Parmar M (2014) Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell stem cell* 15(5):653-665.
- Green BD, Irwin N & Flatt PR (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP): assessment of dipeptidyl peptidase IV degradation, insulin-releasing activity and antidiabetic potential. *Peptides* 27(6):1349-1358.
- Grimaldi M & Cavallaro S (1999) Functional and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. *The European journal of neuroscience* 11(8):2767-2772.
- Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guerinéau NC, Elkahoul AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H & Anouar Y (2008) Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(6):1756-1768.
- Gryka RJ, Buckley LF & Anderson SM (2017) Vorapaxar: The Current Role and Future Directions of a Novel Protease-Activated Receptor Antagonist for Risk Reduction in Atherosclerotic Disease. *Drugs in R&D* 17(1):65-72.
- Gurbel PA, Bliden KP, Turner SE, Tantry US, Gesheff MG, Barr TP, Covic L & Kuliopulos A (2016) Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36(1):189-197.
- Gurevich VV & Gurevich EV (2017) Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *International journal of molecular sciences* 18(12).
- Guttman M, Boileau I, Warsh J, Saint-Cyr JA, Ginovart N, McCluskey T, Houle S, Wilson A, Mundo E, Rusjan P, Meyer J & Kish SJ (2007) Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease. *European journal of neurology* 14(5):523-528.
- Hald A & Lotharius J (2005) Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental neurology* 193(2):279-290.
- Halliday G, Herrero MT, Murphy K, McCann H, Ros-Bernal F, Barcia C, Mori H, Blesa FJ & Obeso JA (2009) No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 24(10):1519-1523.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry* 59(5):1609-1623.
- Hammack SE, Cheung J, Rhodes KM, Schutz KC, Falls WA, Braas KM & May V (2009) Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 34(6):833-843.

- Hammack SE & May V (2015) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in stress-related disorders: data convergence from animal and human studies. *Biological psychiatry* 78(3):167-177.
- Han P, Caselli RJ, Baxter L, Serrano G, Yin J, Beach TG, Reiman EM & Shi J (2015) Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with cognitive decline in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *JAMA neurology* 72(3):333-339.
- Han P & Lucero MT (2005) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide reduces A-type K<sup>+</sup> currents and caspase activity in cultured adult mouse olfactory neurons. *Neuroscience* 134(3):745-756.
- Han P, Tang Z, Yin J, Maalouf M, Beach TG, Reiman EM & Shi J (2014) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against beta-amyloid toxicity. *Neurobiol Aging* 35(9):2064-2071.
- Hannibal J (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology* 453(4):389-417.
- Hannibal J, Mikkelsen JD, Clausen H, Holst JJ, Wulff BS & Fahrenkrug J (1995a) Gene expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regulatory peptides* 55(2):133-148.
- Hannibal J, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J & Larsen PJ (1995b) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing factor-containing parvicellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology* 136(9):4116-4124.
- Harikumar KG, Morfis MM, Lisenbee CS, Sexton PM & Miller LJ (2006) Constitutive formation of oligomeric complexes between family B G protein-coupled vasoactive intestinal polypeptide and secretin receptors. *Molecular pharmacology* 69(1):363-373.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA & Waschek JA (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological reviews* 50(2):265-270.
- 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. *British journal of pharmacology* 166(1):4-17.
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Guggen M & Reubi JC (2004) Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 145(3):1203-1210.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y & Hirsch EC (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(6):2875-2880.
- Hashimoto H, Yamamoto K, Hagigara N, Ogawa N, Nishino A, Aino H, Nogi H, Imanishi K, Matsuda T & Baba A (1996) cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochimica et biophysica acta* 1281(2):129-133.
- Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH & Olanow CW (1999) Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Archives of neurology* 56(2):179-187.
- Hay DL & Pioszak AA (2016) Receptor Activity-Modifying Proteins (RAMPs): New Insights and Roles. *Annual review of pharmacology and toxicology* 56:469-487.
- Hayashita-Kinoh H, Yamada M, Yokota T, Mizuno Y & Mochizuki H (2006) Down-regulation of alpha-synuclein expression can rescue dopaminergic cells from cell death in the substantia nigra of

- Parkinson's disease rat model. *Biochemical and biophysical research communications* 341(4):1088-1095.
- Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW & International LC (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet. Neurology* 7(7):583-590.
- Helton TD, Otsuka T, Lee MC, Mu Y & Ehlers MD (2008) Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(49):19492-19497.
- Heroux M, Breton B, Hogue M & Bouvier M (2007) Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET. *Biochemistry* 46(23):7022-7033.
- Hersh DS, Wadajkar AS, Roberts N, Perez JG, Connolly NP, Frenkel V, Winkles JA, Woodworth GF & Kim AJ (2016) Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Current pharmaceutical design* 22(9):1177-1193.
- Hilger D, Masureel M & Kobilka BK (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature structural & molecular biology* 25(1):4-12.
- Hinson RM, Williams JA & Shacter E (1996) Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(10):4885-4890.
- Hirose M, Furukawa Y, Nagashima Y, Lakhe M & Chiba S (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-27 causes a biphasic chronotropic effect and atrial fibrillation in autonomically decentralized, anesthetized dogs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 283(2):478-487.
- Hirsch EC & Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet. Neurology* 8(4):382-397.
- Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, Agid Y, Mizuno Y, Mochizuki H, Tatton WG, Tatton N & Olanow WC (1999) Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 14(2):383-385.
- Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF & Przedborski S (2009) Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free radical biology & medicine* 47(7):1049-1056.
- Hoare SR (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug discovery today* 10(6):417-427.
- Hofmann KP, Scheerer P, Hildebrand PW, Choe HW, Park JH, Heck M & Ernst OP (2009) A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends in biochemical sciences* 34(11):540-552.
- 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.
- Houchi H, Hamano S, Masuda Y, Ishimura Y, Azuma M, Ohuchi T & Oka M (1994) Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on catecholamine synthesis in cultured bovine adrenal chromaffin cells: involvements of tyrosine hydroxylase phosphorylation caused by Ca<sup>2+</sup> influx and cAMP. *Japanese journal of pharmacology* 66(3):323-330.
- Huang Z, Chen Y, Pratt S, Chen TH, Bambino T, Nissenson RA & Shoback DM (1996) The N-terminal region of the third intracellular loop of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is critical for coupling to cAMP and inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry* 271(52):33382-33389.

- Huls S, Hogen T, Vassallo N, Danzer KM, Hengerer B, Giese A & Herms J (2011) AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced alpha-synuclein oligomers. *Journal of neurochemistry* 117(5):868-878.
- Hunn BH, Cragg SJ, Bolam JP, Spillantini MG & Wade-Martins R (2015) Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 10.1016/j.tins.2014.12.009.
- Hunter WM & Greenwood FC (1962) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496.
- Hur KC (2005) Protein Kinase a functions as a negative regulator of c-jun n-terminal kinase but not of p38 mitogen-activated protein Kinase in PC12 cells. *Integrative Biosciences* 9(3):173-179.
- Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, Sanna G, Carri MT & Barone P (2007) Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Human molecular genetics* 16(11):1319-1326.
- Igarashi H, Ito T, Mantey SA, Pradhan TK, Hou W, Coy DH & Jensen RT (2005) Development of simplified vasoactive intestinal peptide analogs with receptor selectivity and stability for human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315(1):370-381.
- Igarashi H, Ito T, Pradhan TK, Mantey SA, Hou W, Coy DH & Jensen RT (2002) Elucidation of the vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC(2) receptors in human and rat and comparison to the pharmacophore for VPAC(1) receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 303(2):445-460.
- Iida-Klein A, Guo J, Takemura M, Drake MT, Potts JT, Jr., Abou-Samra A, Bringham FR & Segre GV (1997) Mutations in the second cytoplasmic loop of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor result in selective loss of PTH-stimulated phospholipase C activity. *The Journal of biological chemistry* 272(11):6882-6889.
- 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. *International journal of peptide and protein research* 40(5):456-464.
- Ishizuka Y, Kashimoto K, Mochizuki T, Sato K, Ohshima K & Yanaihara N (1992) Cardiovascular and respiratory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *Regulatory peptides* 40(1):29-39.
- Jankovic J (2005) Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology* 64(12):2021-2028.
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79(4):368-376.
- Jaques A, Gamble J & Tsai SP (2001) Hydrocarbon exposure and Parkinson's disease. *Neurology* 57(2):371.
- Jarraya B, Boulet S, Ralph GS, Jan C, Bonvento G, Azzouz M, Miskin JE, Shin M, Delzescaux T, Drouot X, Herard AS, Day DM, Brouillet E, Kingsman SM, Hantraye P, Mitrophanous KA, Mazarakis ND & Palfi S (2009) Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Science translational medicine* 1(2):2ra4.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM & Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(7):2173-2177.
- Jenner P & Olanow CW (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47(6 Suppl 3):S161-170.
- Joe EH, Choi DJ, An J, Eun JH, Jou I & Park S (2018) Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Experimental neurobiology* 27(2):77-87.

- Jollow DJ, Bruckner JV, McMillan DC, Fisher JW, Hoel DG & Mohr LC (2009) Trichloroethylene risk assessment: a review and commentary. *Critical reviews in toxicology* 39(9):782-797.
- Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH & Cha CI (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 476(4):388-413.
- 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). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 322(1):148-154.
- Journot L, Villalba M & Bockaert J (1998) PACAP-38 protects cerebellar granule cells from apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 865:100-110.
- Journot L, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Seeburg PH, Bockaert J & Spengler D (1995) Differential signal transduction by six splice variants of the pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) receptor. *Biochemical Society transactions* 23(1):133-137.
- Juhasz T, Helgadottir SL, Tamas A, Reglodi D & Zakany R (2015) PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides* 66:51-57.
- Juhasz T, Tamas A, Zakany R & Reglodi D (2016) Role of PACAP and VIP Signalling in Regulation of Chondrogenesis and Osteogenesis. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham10.1007/978-3-319-35135-3\_20. p 337-353.
- Kalf JG, Borm GF, de Swart BJ, Bloem BR, Zwarts MJ & Munneke M (2011) Reproducibility and validity of patient-rated assessment of speech, swallowing, and saliva control in Parkinson's disease. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 92(7):1152-1158.
- Kalueff AV, Stewart AM & Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in pharmacological sciences* 35(2):63-75.
- Kamada H, Nito C, Endo H & Chan PH (2007) Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27(3):521-533.
- Kaneider NC, Agarwal A, Leger AJ & Kuliopulos A (2005) Reversing systemic inflammatory response syndrome with chemokine receptor peptidicins. *Nature medicine* 11(6):661-665.
- Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A, Nguyen N, Perides G, Derian C, Covic L & Kuliopulos A (2007) 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nature immunology* 8(12):1303-1312.
- Kano O, Ikeda K, Cridebring D, Takazawa T, Yoshii Y & Iwasaki Y (2011) Neurobiology of depression and anxiety in Parkinson's disease. *Parkinson's disease* 2011:143547.
- Kenakin T (2005) New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nature reviews. Drug discovery* 4(11):919-927.
- Kenakin T & Christopoulos A (2013) Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nature reviews. Drug discovery* 12(3):205-216.
- Kenakin TP (2012) Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *British journal of pharmacology* 165(6):1659-1669.
- Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbe JC, Miller GJ & Hebert TE (2013) The expanding roles of Gbetagamma subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacological reviews* 65(2):545-577.
- Kienlen Campard P, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B & Loeffler JP (1997) PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol* 16(3):323-333.

- Kim J, Byun JW, Choi I, Kim B, Jeong HK, Jou I & Joe E (2013) PINK1 Deficiency Enhances Inflammatory Cytokine Release from Acutely Prepared Brain Slices. *Experimental neurobiology* 22(1):38-44.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B & Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 203(3):253-310.
- King SB, Toufexis DJ & Hammack SE (2017) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), stress, and sex hormones. *Stress* 20(5):465-475.
- Kiss P, Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Jozsa R, Somogyvari-Vigh A, Szilvassy Z & Nemeth J (2007) Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *General and comparative endocrinology* 152(2-3):225-230.
- Kitada T, Pisani A, Porter DR, Yamaguchi H, Tschertner A, Martella G, Bonsi P, Zhang C, Pothos EN & Shen J (2007) Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27):11441-11446.
- Kivipelto L, Absood A, Arimura A, Sundler F, Hakanson R & Panula P (1992) The distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity is distinct from helodermin- and helospectin-like immunoreactivities in the rat brain. *Journal of chemical neuroanatomy* 5(1):85-94.
- Klein C & Westenberger A (2012) Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(1):a008888.
- Koblish M, Carr R, 3rd, Siuda ER, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Cowan CL, Crombie AL, Violin JD & Lark MW (2017) TRV0109101, a G Protein-Biased Agonist of the micro-Opioid Receptor, Does Not Promote Opioid-Induced Mechanical Allodynia following Chronic Administration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 362(2):254-262.
- Kojro E, Postina R, Buro C, Meiringer C, Gehrig-Burger K & Fahrenholz F (2006) The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(3):512-514.
- Komi N, Okawa K, Tateishi Y, Shirakawa M, Fujiwara T & Akutsu H (2007) Structural analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides bound to phospholipid membranes by magic angle spinning solid-state NMR. *Biochimica et biophysica acta* 1768(12):3001-3011.
- Kondo T & Mizuno Y (2015) A long-term study of istradefylline safety and efficacy in patients with Parkinson disease. *Clinical neuropharmacology* 38(2):41-46.
- Koves K, Arimura A, Gorcs TG & Somogyvari-Vigh A (1991) Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 54(2):159-169.
- Koves K, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Vigh S & Miller J (1990) Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 127(1):264-271.
- Krishna R, Ali M & Moustafa AA (2014) Effects of combined MAO-B inhibitors and levodopa vs. monotherapy in Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience* 6:180.
- Kulisevsky J, Oliveira L & Fox SH (2018) Update in therapeutic strategies for Parkinson's disease. *Current opinion in neurology* 31(4):439-447.
- Kumar S, Pioszak A, Zhang C, Swaminathan K & Xu HE (2011) Crystal structure of the PAC1R extracellular domain unifies a consensus fold for hormone recognition by class B G-protein coupled receptors. *PLoS one* 6(5):e19682.

- Kurosaki R, Muramatsu Y, Watanabe H, Michimata M, Matsubara M, Imai Y & Araki T (2003) Role of dopamine transporter against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. *Metabolic brain disease* 18(2):139-146.
- Laburthe M, Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C & Nicole P (1996) Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805:94-109; discussion 110-101.
- Laburthe M, Couvineau A & Tan V (2007) Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28(9):1631-1639.
- Lam CS, Korzh V & Strahle U (2005) Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *The European journal of neuroscience* 21(6):1758-1762.
- Lambeir AM, Durinx C, Proost P, Van Damme J, Scharpe S & De Meester I (2001) Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. *FEBS letters* 507(3):327-330.
- Lamine A, Letourneau M, Doan ND, Maucotel J, Couvineau A, Vaudry H, Chatenet D, Vaudry D & Fournier A (2016) Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. *Neuropharmacology* 108:440-450.
- Ladeira BS, Santana T, Araujo JAM, Tabet EI, Tannous BA, Schroeder T & Costa MR (2018) Activity-Independent Effects of CREB on Neuronal Survival and Differentiation during Mouse Cerebral Cortex Development. *Cereb Cortex* 28(2):538-548.
- Langer I (2012) Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies. *Frontiers in endocrinology* 3:129.
- Langer I, Gaspard N & Robberecht P (2006) Pharmacological properties of Chinese hamster ovary cells coexpressing two vasoactive intestinal peptide receptors (hVPAC1 and hVPAC2). *British journal of pharmacology* 148(8):1051-1059.
- Langston JW (2017) The MPTP Story. *Journal of Parkinson's disease* 7(s1):S11-S22.
- Lannfelt L, Basun H, Wahlund LO, Rowe BA & Wagner SL (1995) Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nature medicine* 1(8):829-832.
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG & Barak LS (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(7):3712-3717.
- LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Weihofen A, Schlossmacher MG & Selkoe DJ (2005) Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nature medicine* 11(11):1214-1221.
- Lazarovici P, Cohen G, Arien-Zakay H, Chen J, Zhang C, Chopp M & Jiang H (2012) Multimodal neuroprotection induced by PACAP38 in oxygen-glucose deprivation and middle cerebral artery occlusion stroke models. *Journal of molecular neuroscience : MN* 48(3):526-540.
- Lazarovici P, Jiang H & Fink D, Jr. (1998) The 38-amino-acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces neurite outgrowth in PC12 cells that is dependent on protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase but not on protein kinase A, nerve growth factor receptor tyrosine kinase, p21(ras) G protein, and pp60(c-src) cytoplasmic tyrosine kinase. *Molecular pharmacology* 54(3):547-558.
- Lee EH & Seo SR (2014) Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB reports* 47(7):369-375.

- Lee HJ, Suk JE, Patrick C, Bae EJ, Cho JH, Rho S, Hwang D, Masliah E & Lee SJ (2010) Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *The Journal of biological chemistry* 285(12):9262-9272.
- Lee M (2013) Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Current protein & peptide science* 14(1):21-32.
- Lee MH, Appleton KM, Strungs EG, Kwon JY, Morinelli TA, Peterson YK, Laporte SA & Luttrell LM (2016) The conformational signature of beta-arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature* 531(7596):665-668.
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K & Daaka Y (1998) Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Advances in pharmacology* 42:416-420.
- Lefkowitz RJ & Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308(5721):512-517.
- Leger AJ, Jacques SL, Badar J, Kaneider NC, Derian CK, Andrade-Gordon P, Covic L & Kuliopulos A (2006) Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation* 113(9):1244-1254.
- Lertxundi U, Isla A, Solinis MA, Domingo-Echaburu S, Hernandez R, Peral-Aguirregoitia J & Medrano J (2015) Anticholinergic burden in Parkinson's disease inpatients. *European journal of clinical pharmacology* 71(10):1271-1277.
- LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson JM, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, During MJ, Kaplitt MG & Feigin A (2011) AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *The Lancet. Neurology* 10(4):309-319.
- Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ & Batuman V (2007) Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. *Peptides* 28(9):1891-1895.
- Liao C, May V & Li J (2018) PAC1 Receptors: Shapeshifters in Motion. *Journal of molecular neuroscience : MN* 10.1007/s12031-018-1132-0.
- Liao C, Zhao X, Brewer M, May V & Li J (2017a) Conformational Transitions of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor, a Human Class B GPCR. *Scientific reports* 7(1):5427-5427.
- Liao C, Zhao X, Brewer M, May V & Li J (2017b) Conformational Transitions of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor, a Human Class B GPCR. *Scientific reports* 7(1):5427.
- Licht T, Tsurulnikov L, Reuveni H, Yarnitzky T & Ben-Sasson SA (2003) Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3). *Blood* 102(6):2099-2107.
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Munch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B & Barres BA (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541(7638):481-487.
- Liu AK, Chang RC, Pearce RK & Gentleman SM (2015) Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* 129(4):527-540.
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG & Lefkowitz RJ (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *The Journal of biological chemistry* 267(12):8558-8564.

- Lopert P & Patel M (2014) Brain mitochondria from DJ-1 knockout mice show increased respiration-dependent hydrogen peroxide consumption. *Redox biology* 2:667-672.
- Lopes FM, Schroder R, da Frota ML, Jr., Zanotto-Filho A, Muller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes Mda C & Klamt F (2010) Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research* 1337:85-94.
- Lotharius J & Brundin P (2002) Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 11(20):2395-2407.
- Lubbe S & Morris HR (2014) Recent advances in Parkinson's disease genetics. *Journal of neurology* 261(2):259-266.
- Lugo-Huitron R, Ugalde Muniz P, Pineda B, Pedraza-Chaverri J, Rios C & Perez-de la Cruz V (2013) Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:104024.
- Luk KC & Lee VM (2014) Modeling Lewy pathology propagation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 20 Suppl 1:S85-87.
- Lulla A, Barnhill L, Bitan G, Ivanova MI, Nguyen B, O'Donnell K, Stahl MC, Yamashiro C, Klarner FG, Schrader T, Sagasti A & Bronstein JM (2016) Neurotoxicity of the Parkinson Disease-Associated Pesticide Ziram Is Synuclein-Dependent in Zebrafish Embryos. *Environmental health perspectives* 124(11):1766-1775.
- Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H & Suomalainen A (2004) Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 364(9437):875-882.
- Luttrell LM, Maudsley S & Bohn LM (2015) Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism. *Mol Pharmacol* 88(3):579-588.
- 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. *Molecular and cellular neurosciences* 31(2):193-209.
- Maasz G, Zrinyi Z, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, Jungling A, Tamas A & Pirger Z (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Disease models & mechanisms* 10(2):127-139.
- Maiti P, Manna J & Dunbar GL (2017) Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Translational neurodegeneration* 6:28.
- Makhija DT & Jagtap AG (2014) Studies on sensitivity of zebrafish as a model organism for Parkinson's disease: Comparison with rat model. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics* 5(1):39-46.
- Manecka D-L, Boukhzar L, Falluel-Morel A, Lihrmann I & Anouar Y (2016) PACAP Signaling in Neuroprotection. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham10.1007/978-3-319-35135-3\_32. p 549-561.
- Manecka DL, Mahmood SF, Grumolato L, Lihrmann I & Anouar Y (2013) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) promotes both survival and neuritogenesis in PC12 cells through activation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) pathway: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK), calcium, and c-REL. *The Journal of biological chemistry* 288(21):14936-14948.

- Mao ZJ, Liu CC, Ji SQ, Yang QM, Ye HX, Han HY & Xue Z (2017) Clinical characteristics of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* 37(1):100-104.
- Marchant JS & Taylor CW (1997) Cooperative activation of IP3 receptors by sequential binding of IP3 and Ca<sup>2+</sup> safeguards against spontaneous activity. *Current biology : CB* 7(7):510-518.
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS & Herkenham MA (1984) Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311(5985):464-467.
- Masuo Y, Ohtaki T, Masuda Y, Nagai Y, Suno M, Tsuda M & Fujino M (1991) Autoradiographic distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) binding sites in the rat brain. *Neuroscience letters* 126(2):103-106.
- Masuo Y, Ohtaki T, Masuda Y, Tsuda M & Fujino M (1992) Binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain sections. *Brain research* 575(1):113-123.
- Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M & Fujino M (1993) Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain research* 602(1):57-63.
- Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, Galasko DR, Gingham C, Griffith A, Higgins DS, Kay DM, Kim H, Leverenz JB, Quinn JF, Roberts JW, Samii A, Snapinn KW, Tsuang DW, Yearout D, Zhang J, Payami H & Zabetian CP (2010) SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Archives of neurology* 67(11):1350-1356.
- May V, Buttolph TR, Girard BM, Clason TA & Parsons RL (2014) PACAP-induced ERK activation in HEK cells expressing PAC1 receptors involves both receptor internalization and PKC signaling. *American journal of physiology. Cell physiology* 306(11):C1068-1079.
- May V, Lutz E, MacKenzie C, Schutz KC, Dozark K & Braas KM (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PAC1HOP1 receptor activation coordinates multiple neurotrophic signaling pathways: Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase gamma and vesicle endocytosis for neuronal survival. *The Journal of biological chemistry* 285(13):9749-9761.
- McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA & Di Monte DA (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiology of disease* 10(2):119-127.
- McKinley ET, Baranowski TC, Blavo DO, Cato C, Doan TN & Rubinstein AL (2005) Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain research. Molecular brain research* 141(2):128-137.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG & Foord SM (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393(6683):333-339.
- McRory J & Sherwood NM (1997) Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology* 138(6):2380-2390.
- Mei YA, Vaudry D, Basille M, Castel H, Fournier A, Vaudry H & Gonzalez BJ (2004) PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I<sub>k</sub> in the anti-apoptotic action of PACAP. *The European journal of neuroscience* 19(6):1446-1458.
- Meiser J, Weindl D & Hiller K (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell communication and signaling : CCS* 11(1):34.
- Mentlein R (1999) Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides* 85(1):9-24.

- Mercer A, Ronnholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, Ossoinak A, Frisen J & Patrone C (2004) PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *Journal of neuroscience research* 76(2):205-215.
- Meredith GE & Rademacher DJ (2011) MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *Journal of Parkinson's disease* 1(1):19-33.
- Michael ES, Kuliopulos A, Covic L, Steer ML & Perides G (2013) Pharmacological inhibition of PAR2 with the pepducin P2pal-18S protects mice against acute experimental biliary pancreatitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 304(5):G516-526.
- Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J & McArdle C (1995) Pituitary adenylate cyclase activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *Journal of neuroendocrinology* 7(1):47-55.
- 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. *Biochemical and biophysical research communications* 164(1):567-574.
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N & Arimura A (1990) Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochemical and biophysical research communications* 170(2):643-648.
- Miyata A, Sato K, Hino J, Tamakawa H, Matsuo H & Kangawa K (1998) Rat aortic smooth-muscle cell proliferation is bidirectionally regulated in a cell cycle-dependent manner via PACAP/VIP type 2 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 865:73-81.
- Mizushima H, Banks WA, Dohi K, Shioda S, Matsumoto H & Matsumoto K (1999) The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-brain and blood-spinal cord barrier to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Peptides* 20(11):1337-1340.
- Moody TW, Ito T, Osefo N & Jensen RT (2011) VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 18(1):61-67.
- Morizane A & Takahashi J (2012) [A challenge towards the clinical application of induced pluripotent stem cell technology for the treatment of Parkinson's disease]. *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo* 64(1):29-37.
- Moser A, Scholz J & Gansle A (1999) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-27) enhances tyrosine hydroxylase activity in the nucleus accumbens of the rat. *Neuropeptides* 33(6):492-497.
- Mounien L, Do Rego JC, Bizet P, Boutelet I, Gourcerol G, Fournier A, Brabet P, Costentin J, Vaudry H & Jegou S (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34(2):424-435.
- Murase T, Kondo K, Otake K & Oiso Y (1993) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates arginine vasopressin release in conscious rats. *Neuroendocrinology* 57(6):1092-1096.
- Mustafa T (2013) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): a master regulator in central and peripheral stress responses. *Adv Pharmacol* 68:445-457.
- 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. *Cellular signalling* 22(10):1420-1426.
- Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H & Sakumi K (2007) Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research* 85(5):919-934.
- Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V, Cortes A, Hoffmann H, Ortiz J, Canela EI, Lluís C, Pardo L, Franco R & Woods AS (2010) Interactions between intracellular domains as key

- determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *The Journal of biological chemistry* 285(35):27346-27359.
- Negida A, Elminawy M, El Ashal G, Essam A, Eysa A & Abd Elalem Aziz M (2018) Subthalamic and Pallidal Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease. *Cureus* 10(2):e2232.
- Neumann JM, Couvineau A, Murail S, Lacapere JJ, Jamin N & Laburthe M (2008) Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends in biochemical sciences* 33(7):314-319.
- Newman LE & Shadel GS (2018) Pink1/Parkin link inflammation, mitochondrial stress, and neurodegeneration. *The Journal of cell biology* 10.1083/jcb.201808118.
- Nickols HH & Conn PJ (2014) Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiology of disease* 61:55-71.
- Nicole P, Lins L, Rouyer-Fessard C, Drouot C, Fulcrand P, Thomas A, Couvineau A, Martinez J, Brasseur R & Laburthe M (2000) Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *The Journal of biological chemistry* 275(31):24003-24012.
- Noda M & Beppu K (2013) Possible Contribution of Microglial Glutamate Receptors to Inflammatory Response upon Neurodegenerative Diseases. *J Neurol Disord* 10.4172/2329-6895.1000131.
- Nonaka N, Banks WA, Mizushima H, Shioda S & Morley JE (2002) Regional differences in PACAP transport across the blood-brain barrier in mice: a possible influence of strain, amyloid beta protein, and age. *Peptides* 23(12):2197-2202.
- O'Callaghan K, Kuliopulos A & Covic L (2012) Turning receptors on and off with intracellular pepducins: new insights into G-protein-coupled receptor drug development. *The Journal of biological chemistry* 287(16):12787-12796.
- Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A & Shioda S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(19):7488-7493.
- On JSW & Chow BKC (2016) Molecular Evolution of Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide Subfamily and Cognate Receptor Subfamily. *Pituitary Adenylyl Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham 10.1007/978-3-319-35135-3\_1. p 3-17.
- Onoue S, Endo K, Ohshima K, Yajima T & Kashimoto K (2002) The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* 23(8):1471-1478.
- Ortiz Zacarias NV, Lenselink EB, AP IJ, Handel TM & Heitman LH (2018) Intracellular Receptor Modulation: Novel Approach to Target GPCRs. *Trends in pharmacological sciences* 39(6):547-559.
- Ostrom RS & Insel PA (2004) The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *British journal of pharmacology* 143(2):235-245.
- Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A & Schutz G (2001) Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(15):5520-5527.
- Pal K, Melcher K & Xu HE (2012) Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by Class B G-protein-coupled receptors. *Acta Pharmacol Sin* 33(3):300-311.
- Pandey PK, Sharma AK & Gupta U (2016) Blood brain barrier: An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking. *Tissue barriers* 4(1):e1129476.

- Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Houssami S, Spengler D, Bockaert J & Journot L (1996) Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *The Journal of biological chemistry* 271(36):22146-22151.
- Papa M, De Luca C, Petta F, Alberghina L & Cirillo G (2014) Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 42:35-54.
- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M & Ghafourifar P (2008) Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(7-8):1272-1284.
- Parmar M (2018) Towards stem cell based therapies for Parkinson's disease. *Development* 145(1).
- Parthier C, Reedtz-Runge S, Rudolph R & Stubbs MT (2009) Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction? *Trends in biochemical sciences* 34(6):303-310.
- Pathak A & Senard JM (2006) Blood pressure disorders during Parkinson's disease: epidemiology, pathophysiology and management. *Expert review of neurotherapeutics* 6(8):1173-1180.
- Peker N, Donipadi V, Sharma M, McFarlane C & Kambadur R (2018) Loss of Parkin Impairs Mitochondrial Function and Leads to Muscle Atrophy. *American journal of physiology. Cell physiology* 10.1152/ajpcell.00064.2017.
- Perier C, Bove J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S & Vila M (2007) Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(19):8161-8166.
- Perier C, Tieu K, Guegan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S & Vila M (2005) Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(52):19126-19131.
- Peterson YK & Luttrell LM (2017) The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacological reviews* 69(3):256-297.
- Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H & Lindvall O (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nature neuroscience* 2(12):1137-1140.
- Poewe W (2008) Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *European journal of neurology* 15 Suppl 1:14-20.
- Pollanen MS, Dickson DW & Bergeron C (1993) Pathology and biology of the Lewy body. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 52(3):183-191.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A & Talbot WS (2000) Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome research* 10(12):1890-1902.
- Poujol de Molliens M, Letourneau M, Devost D, Hebert TE, Fournier A & Chatenet D (2018) New insights about the peculiar role of the 28-38 C-terminal segment and some selected residues in PACAP for signaling and neuroprotection. *Biochem Pharmacol* 154:193-202.
- Premont RT & Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual review of physiology* 69:511-534.
- Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S & Joyce JN (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotoxicity research* 5(8):579-598.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 271(18):10545-10550.
- Purisai MG, McCormack AL, Langston WJ, Johnston LC & Di Monte DA (2005) Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates. *Neurobiology of disease* 20(3):898-906.
- Qian L & Flood PM (2008) Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunologic research* 41(3):155-164.
- Quoyer J, Janz JM, Luo J, Ren Y, Armando S, Lukashova V, Benovic JL, Carlson KE, Hunt SW, 3rd & Bouvier M (2013) Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(52):E5088-5097.
- Raake PW, Vinge LE, Gao E, Boucher M, Rengo G, Chen X, DeGeorge BR, Jr., Matkovich S, Houser SR, Most P, Eckhart AD, Dorn GW, 2nd & Koch WJ (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circulation research* 103(4):413-422.
- Racz B, Gallyas F, Jr., Kiss P, Toth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Roth E, Tamas A, Lengvari I, Lubics A & Reglodi D (2006a) The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regulatory peptides* 137(1-2):20-26.
- Racz B, Tamas A, Kiss P, Toth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F, Jr., Roth E & Reglodi D (2006b) Involvement of ERK and CREB signaling pathways in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070:507-511.
- Rajagopal S & Shenoy SK (2017) GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal* 10.1016/j.cellsig.2017.01.024.
- Rajagopal S & Shenoy SK (2018) GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cellular signalling* 41:9-16.
- Ramikie TS & Ressler KJ (2016) Stress-related disorders, pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)ergic system, and sex differences. *Dialogues in clinical neuroscience* 18(4):403-413.
- 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.
- Ranjan R, Dwivedi H, Baidya M, Kumar M & Shukla AK (2017) Novel Structural Insights into GPCR-beta-Arrestin Interaction and Signaling. *Trends in cell biology* 27(11):851-862.
- Rankovic Z, Brust TF & Bohn LM (2016) Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26(2):241-250.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI & Kobilka BK (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469(7329):175-180.
- Rat D, Schmitt U, Tippmann F, Dewachter I, Theunis C, Wiczczak E, Postina R, van Leuven F, Fahrenholz F & Kojro E (2011) Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(9):3208-3218.
- Reglodi D, Kiss P, Lubics A & Tamas A (2011) Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Current pharmaceutical design* 17(10):962-972.

- Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Szalontay L & Lengvari I (2004a) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research* 151(1-2):303-312.
- Reglodi D, Tamas A, Jungling A, Vaczy A, Rivnyak A, Fulop BD, Szabo E, Lubics A & Atlasz T (2018) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology* 66:185-194.
- Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Szalontay L & Lengvari I (2004b) Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regulatory peptides* 123(1-3):85-94.
- Reiter E, Ahn S, Shukla AK & Lefkowitz RJ (2012) Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52:179-197.
- Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EB & May V (2011) Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature* 470(7335):492-497.
- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS & Bonan CD (2011) Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and teratology* 33(6):608-617.
- Riederer P, Lachenmayer L & Laux G (2004) Clinical applications of MAO-inhibitors. *Current medicinal chemistry* 11(15):2033-2043.
- Ries V, Silva RM, Oo TF, Cheng HC, Rzhetskaya M, Kholodilov N, Flavell RA, Kuan CY, Rakic P & Burke RE (2008) JNK2 and JNK3 combined are essential for apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra, but are not required for axon degeneration. *Journal of neurochemistry* 107(6):1578-1588.
- 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. *Molecular pharmacology* 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. *European journal of biochemistry* 207(1):239-246.
- Rodriguez MC, Obeso JA & Olanow CW (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Annals of neurology* 44(3 Suppl 1):S175-188.
- Roed SN, Orgaard A, Jorgensen R & De Meyts P (2012) Receptor oligomerization in family B1 of G-protein-coupled receptors: focus on BRET investigations and the link between GPCR oligomerization and binding cooperativity. *Frontiers in endocrinology* 3:62.
- Rojanathammanee L, Murphy EJ & Combs CK (2011) Expression of mutant alpha-synuclein modulates microglial phenotype in vitro. *Journal of neuroinflammation* 8:44.
- Saha AR, Ninkina NN, Hanger DP, Anderton BH, Davies AM & Buchman VL (2000) Induction of neuronal death by alpha-synuclein. *The European journal of neuroscience* 12(8):3073-3077.
- Said SI & Mutt V (1970) Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 225(5235):863-864.
- Salaga M, Binienda A, Draczkowski P, Kosson P, Kordek R, Jozwiak K & Fichna J (2018) Novel peptide inhibitor of dipeptidyl peptidase IV (Tyr-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub>) with anti-inflammatory activity in the mouse models of colitis. *Peptides* 108:34-45.

- Sallinen V, Torkko V, Sundvik M, Reenila I, Khrustalyov D, Kaslin J & Panula P (2009) MPTP and MPP+ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *Journal of neurochemistry* 108(3):719-731.
- Sanlioglu AD, Karacay B, Balci MK, Griffith TS & Sanlioglu S (2012) Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *Journal of molecular endocrinology* 49(3):R157-167.
- Saporito MS, Brown EM, Miller MS & Carswell S (1999) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons In vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 288(2):421-427.
- Sarath Babu N, Murthy Ch L, Kakara S, Sharma R, Brahmendra Swamy CV & Idris MM (2016) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *Proteomics* 16(9):1407-1420.
- Sarkar S, Raymick J & Imam S (2016) Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *International journal of molecular sciences* 17(6).
- Schytz HW, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J & Ashina M (2009) PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain : a journal of neurology* 132(Pt 1):16-25.
- Schytz HW, Holst H, Arendt-Nielsen L, Olesen J & Ashina M (2010) Cutaneous nociception and neurogenic inflammation evoked by PACAP38 and VIP. *The journal of headache and pain* 11(4):309-316.
- Seebeck J, Schmidt WE, Kilbinger H, Neumann J, Zimmermann N & Herzig S (1996) PACAP induces bradycardia in guinea-pig heart by stimulation of atrial cholinergic neurones. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 354(4):424-430.
- Seeman P & Seeman N (2011) Alzheimer's disease: beta-amyloid plaque formation in human brain. *Synapse* 65(12):1289-1297.
- Segre GV & Goldring SR (1993) Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 4(10):309-314.
- Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G & Schneider E (1996) Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology* 46(5):1275-1284.
- Seo JH, Rah JC, Choi SH, Shin JK, Min K, Kim HS, Park CH, Kim S, Kim EM, Lee SH, Lee S, Suh SW & Suh YH (2002) Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(13):1826-1828.
- Shearer AM, Rana R, Austin K, Baleja JD, Nguyen N, Bohm A, Covic L & Kuliopulos A (2016) Targeting Liver Fibrosis with a Cell-penetrating Protease-activated Receptor-2 (PAR2) Pepducin. *The Journal of biological chemistry* 291(44):23188-23198.
- Shen S, Gehlert DR & Collier DA (2013) PACAP and PAC1 receptor in brain development and behavior. *Neuropeptides* 47(6):421-430.
- Shenoy SK & Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *The Biochemical journal* 375(Pt 3):503-515.
- Shenoy SK & Lefkowitz RJ (2011) beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in pharmacological sciences* 32(9):521-533.
- Sherwood NM, Krueckl SL & McRory JE (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine reviews* 21(6):619-670.

- Shimoji M, Zhang L, Mandir AS, Dawson VL & Dawson TM (2005) Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain research. Molecular brain research* 134(1):103-108.
- Shintani Y, Hayata-Takano A, Moriguchi K, Nakazawa T, Ago Y, Kasai A, Seiriki K, Shintani N & Hashimoto H (2018) beta-Arrestin1 and 2 differentially regulate PACAP-induced PAC1 receptor signaling and trafficking. *PLoS one* 13(5):e0196946.
- Shioda S, Ozawa H, Dohi K, Mizushima H, Matsumoto K, Nakajo S, Takaki A, Zhou CJ, Nakai Y & Arimura A (1998) PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 865:111-117.
- Shivers KY, Nikolopoulou A, Machlovi SI, Vallabhajosula S & Figueiredo-Pereira ME (2014) PACAP27 prevents Parkinson-like neuronal loss and motor deficits but not microglia activation induced by prostaglandin J2. *Biochimica et biophysica acta* 1842(9):1707-1719.
- Simonneaux V, Ouichou A & Pevet P (1993) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. *Brain research* 603(1):148-152.
- Singer TP, Ramsay RR, McKeown K, Trevor A & Castagnoli NE, Jr. (1988) Mechanism of the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), the toxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicology* 49(1):17-23.
- Skoglosa Y, Takei N & Lindholm D (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Brain research. Molecular brain research* 65(1):1-13.
- Soergel DG, Subach RA, Sadler B, Connell J, Marion AS, Cowan CL, Violin JD & Lark MW (2014) First clinical experience with TRV130: pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Journal of clinical pharmacology* 54(3):351-357.
- Solari N, Bonito-Oliva A, Fisone G & Brambilla R (2013) Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. *Learn Mem* 20(10):592-600.
- Sorriento D, Fusco A, Ciccarelli M, Rungi A, Anastasio A, Carillo A, Dorn GW, 2nd, Trimarco B & Iaccarino G (2013) Mitochondrial G protein coupled receptor kinase 2 regulates proinflammatory responses in macrophages. *FEBS letters* 587(21):3487-3494.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH & Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365(6442):170-175.
- Staus DP, Strachan RT, Manglik A, Pani B, Kahsai AW, Kim TH, Wingler LM, Ahn S, Chatterjee A, Masoudi A, Kruse AC, Pardon E, Steyaert J, Weis WI, Prosser RS, Kobilka BK, Costa T & Lefkowitz RJ (2016) Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation. *Nature* 535(7612):448-452.
- Stephenson J, Nutma E, van der Valk P & Amor S (2018) Inflammation in CNS Neurodegenerative Diseases. *Immunology* 10.1111/imm.12922.
- Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF & Holtt V (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *Journal of neurochemistry* 103(4):1666-1681.
- Subramaniam V, Chuang G, Xia H, Burn B, Bradley J, Maderdrut JL, Coy DH & Varner KJ (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects against mitoxantrone-induced cardiac injury in mice. *Peptides* 95:25-32.
- Suda K, Smith DM, Ghatei MA, Murphy JK & Bloom SR (1991) Investigation and characterization of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in human brain by radioligand binding and chemical cross-linking. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 72(5):958-964.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(19):7875-7880.
- Sundler F, Ekblad E, Hannibal J, Moller K, Zhang YZ, Mulder H, Elsas T, Grunditz T, Danielsen N, Fahrenkrug J & Uddman R (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in sensory and autonomic ganglia: localization and regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805:410-426; discussion 427-418.
- Suzuki N, Nakamura S, Mano H & Kozasa T (2003) Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(2):733-738.
- Sze KH, Zhou H, Yang Y, He M, Jiang Y & Wong AO (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology* 148(10):5042-5059.
- Tajti J, Tuka B, Botz B, Helyes Z & Vecsei L (2015) Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in nociception and migraine. *CNS & neurological disorders drug targets* 14(4):540-553.
- Takei N, Skoglosa Y & Lindholm D (1998) Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *Journal of neuroscience research* 54(5):698-706.
- Tamada Y, Tanaka M, Ichitani Y, Okamura H, Yanaihara N & Iyata Y (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactive neuronal elements in rat hypothalamus and median eminence with special reference to morphological background of its effect on anterior pituitary--light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience letters* 180(2):105-108.
- Tams JW, Johnsen AH & Fahrenkrug J (1999) Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide1-38-binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. *The Biochemical journal* 341 ( Pt 2):271-276.
- Tan SK, Hartung H, Sharp T & Temel Y (2011) Serotonin-dependent depression in Parkinson's disease: a role for the subthalamic nucleus? *Neuropharmacology* 61(3):387-399.
- Tang Y, Li T, Li J, Yang J, Liu H, Zhang XJ & Le W (2014) Jmjd3 is essential for the epigenetic modulation of microglia phenotypes in the immune pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell death and differentiation* 21(3):369-380.
- Tatsuno I, Gottschall PE, Koves K & Arimura A (1990) Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 168(3):1027-1033.
- Taylor TN, Greene JG & Miller GW (2010) Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behavioural brain research* 211(1):1-10.
- Tchernychev B, Ren Y, Sachdev P, Janz JM, Haggis L, O'Shea A, McBride E, Looby R, Deng Q, McMurry T, Kazmi MA, Sakmar TP, Hunt S, 3rd & Carlson KE (2010) Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(51):22255-22259.
- Tchoumi Neree A, Nguyen PT, Chatenet D, Fournier A & Bourgault S (2014) Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP. *FEBS letters* 588(24):4590-4596.
- Teismann P (2012) COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *Biofactors* 38(6):395-397.

- Thompson GL, Canals M & Poole DP (2014) Biological redundancy of endogenous GPCR ligands in the gut and the potential for endogenous functional selectivity. *Front Pharmacol* 5:262.
- Thomsen ARB, Plouffe B, Cahill TJ, 3rd, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, Kahsai AW, Strachan RT, Pani B, Mahoney JP, Huang L, Breton B, Heydenreich FM, Sunahara RK, Skiniotis G, Bouvier M & Lefkowitz RJ (2016) GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* 166(4):907-919.
- Tieu K (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1(1):a009316.
- Tolosa E & Compta Y (2006) Dystonia in Parkinson's disease. *Journal of neurology* 253 Suppl 7:VII7-13.
- Tompkins JD, Clason TA, Hardwick JC, Girard BM, Merriam LA, May V & Parsons RL (2016) Activation of MEK/ERK signaling contributes to the PACAP-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *American journal of physiology. Cell physiology* 311(4):C643-C651.
- Toth DJ, Toth JT, Gulyas G, Balla A, Balla T, Hunyady L & Varnai P (2012) Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *Journal of cell science* 125(Pt 9):2185-2197.
- Tressel SL, Koukos G, Tchernychev B, Jacques SL, Covic L & Kuliopulos A (2011) Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models. *Methods Mol Biol* 683:259-275.
- Tsuji M, Ueda S, Hirayama T, Okuda K, Sakaguchi Y, Isono A & Nagasawa H (2013) FRET-based imaging of transbilayer movement of pepducin in living cells by novel intracellular bioreductively activatable fluorescent probes. *Organic & biomolecular chemistry* 11(18):3030-3037.
- Valant C, Felder CC, Sexton PM & Christopoulos A (2012) Probe dependence in the allosteric modulation of a G protein-coupled receptor: implications for detection and validation of allosteric ligand effects. *Molecular pharmacology* 81(1):41-52.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G & Wood NW (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304(5674):1158-1160.
- van der Westhuizen ET, Breton B, Christopoulos A & Bouvier M (2014) Quantification of ligand bias for clinically relevant beta2-adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. *Mol Pharmacol* 85(3):492-509.
- Vandermeers A, Vandenborre S, Hou X, de Neef P, Robberecht P, Vandermeers-Piret MC & Christophe J (1992) Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *European journal of biochemistry* 208(3):815-819.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L & Vaudry H (2009a) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews* 61(3):283-357.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BKC, Hashimoto H, Galas L & Vaudry H (2009b) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacological Reviews* 61(3):283-357.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A & Vaudry H (1999) Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(16):9415-9420.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A & Vaudry H (2000a) The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-

- 3/CPP32. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(24):13390-13395.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A & Vaudry H (2000b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological reviews* 52(2):269-324.
- Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC & Gonzalez BJ (2002) PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *The European journal of neuroscience* 15(9):1451-1460.
- Vaz RL, Outeiro TF & Ferreira JJ (2018) Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. *Frontiers in neurology* 9:347.
- Venderova K & Park DS (2012) Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(8).
- Vertongen P, Schiffmann SN, Gourlet P & Robberecht P (1997) Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain. *Peptides* 18(10):1547-1554.
- Vijayanathan Y, Lim FT, Lim SM, Long CM, Tan MP, Majeed ABA & Ramasamy K (2017) 6-OHDA-Lesioned Adult Zebrafish as a Useful Parkinson's Disease Model for Dopaminergic Neuroregeneration. *Neurotoxicity research* 32(3):496-508.
- Vila M & Perier C (2008) Molecular pathways of programmed cell death in experimental Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 14 Suppl 2:S176-179.
- Vila M & Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience* 4(5):365-375.
- Vila M, Vukosavic S, Jackson-Lewis V, Neystat M, Jakowec M & Przedborski S (2000) Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *Journal of neurochemistry* 74(2):721-729.
- Villalba M, Bockaert J & Journot L (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(1):83-90.
- Viswanath V, Wu Y, Boonplueang R, Chen S, Stevenson FF, Yantiri F, Yang L, Beal MF & Andersen JK (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(24):9519-9528.
- Vollesen ALH, Amin FM & Ashina M (2018) Targeted Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide Therapies for Migraine. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 10.1007/s13311-017-0596-x.
- Vu JP, Benhammou JN, Goyal D, Luong L, Oh S, Germano P & Pisegna JR (2016) PACAP Regulation of Gastrointestinal Function and Obesity. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham 10.1007/978-3-319-35135-3\_16. p 261-269.
- Waak J, Weber SS, Waldenmaier A, Gorner K, Alunni-Fabbroni M, Schell H, Vogt-Weisenhorn D, Pham TT, Reumers V, Baekelandt V, Wurst W & Kahle PJ (2009) Regulation of astrocyte inflammatory responses by the Parkinson's disease-associated gene DJ-1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(8):2478-2489.
- Wainwright DA, Xin J, Sanders VM & Jones KJ (2008) Differential actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and interferon gamma on Th2- and Th1-associated chemokine expression in cultured murine microglia. *Journal of neurodegeneration & regeneration* 1(1):31-34.

- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F & Takahashi H (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 27(5):494-506.
- Walker CS, Sundrum T & Hay DL (2014) PACAP receptor pharmacology and agonist bias: analysis in primary neurons and glia from the trigeminal ganglia and transfected cells. *British journal of pharmacology* 171(6):1521-1533.
- Wang G, Pan J, Tan YY, Sun XK, Zhang YF, Zhou HY, Ren RJ, Wang XJ & Chen SD (2008) Neuroprotective effects of PACAP27 in mice model of Parkinson's disease involved in the modulation of K(ATP) subunits and D2 receptors in the striatum. *Neuropeptides* 42(3):267-276.
- Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY & Chen SD (2005) PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS letters* 579(18):4005-4011.
- Warren JB, Cockcroft JR, Larkin SW, Kajekar R, Macrae A, Ghatei MA & Bloom SR (1992) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 20(1):83-87.
- Watanabe J, Seki T & Shioda S (2016) PACAP and Neural Development. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi D & Tamas A (Édit.) Springer International Publishing, Cham10.1007/978-3-319-35135-3\_6. p 65-82.
- Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP & Lucocq JM (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *The Biochemical journal* 363(Pt 3):657-666.
- Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G & Vilardaga JP (2013) Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-Gbetagamma complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(4):1530-1535.
- Wen L, Wei W, Gu W, Huang P, Ren X, Zhang Z, Zhu Z, Lin S & Zhang B (2008) Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Developmental biology* 314(1):84-92.
- Werling D, Banks WA, Salameh TS, Kvarik T, Kovacs LA, Vaczy A, Szabo E, Mayer F, Varga R, Tamas A, Toth G, Biro Z, Atlasz T & Reglodi D (2017) Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. *International journal of molecular sciences* 18(3).
- Weston C, Lu J, Li N, Barkan K, Richards GO, Roberts DJ, Skerry TM, Poyner D, Pardamwar M, Reynolds CA, Dowell SJ, Willars GB & Ladds G (2015) Modulation of Glucagon Receptor Pharmacology by Receptor Activity-modifying Protein-2 (RAMP2). *The Journal of biological chemistry* 290(38):23009-23022.
- Whalen EJ, Rajagopal S & Lefkowitz RJ (2011) Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends in molecular medicine* 17(3):126-139.
- Wielders SJ, Bennaghmouch A, Reutelingsperger CP, Bevers EM & Lindhout T (2007) Anticoagulant and antithrombotic properties of intracellular protease-activated receptor antagonists. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5(3):571-576.
- Williams CH & Hong CC (2011) Multi-step usage of in vivo models during rational drug design and discovery. *International journal of molecular sciences* 12(4):2262-2274.
- Winther M, Dahlgren C & Forsman H (2018) Formyl Peptide Receptors in Mice and Men: Similarities and Differences in Recognition of Conventional Ligands and Modulating Lipopeptides. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 122(2):191-198.
- Winther M, Gabl M, Welin A, Dahlgren C & Forsman H (2015) A neutrophil inhibitory pepducin derived from FPR1 expected to target FPR1 signaling hijacks the closely related FPR2 instead. *FEBS letters* 589(15):1832-1839.

- Wootten D, Lindmark H, Kadmiel M, Willcockson H, Caron KM, Barwell J, Drmota T & Poyner DR (2013) Receptor activity modifying proteins (RAMPs) interact with the VPAC2 receptor and CRF1 receptors and modulate their function. *British journal of pharmacology* 168(4):822-834.
- Wootten D, Miller LJ, Koole C, Christopoulos A & Sexton PM (2017) Allosteric and Biased Agonism at Class B G Protein-Coupled Receptors. *Chemical reviews* 117(1):111-138.
- 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.
- Wullimann MF & Mueller T (2004) Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *The Journal of comparative neurology* 475(2):143-162.
- Xie HR, Hu LS & Li GY (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal* 123(8):1086-1092.
- Yamada M, Iwatsubo T, Mizuno Y & Mochizuki H (2004) Overexpression of alpha-synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of alpha-synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 91(2):451-461.
- Yang CH, Huang HW, Chen KH, Chen YS, Sheen-Chen SM & Lin CR (2011) Antinociceptive potentiation and attenuation of tolerance by intrathecal beta-arrestin 2 small interfering RNA in rats. *British journal of anaesthesia* 107(5):774-781.
- Yang R, Jiang X, Ji R, Meng L, Liu F, Chen X & Xin Y (2015) Therapeutic potential of PACAP for neurodegenerative diseases. *Cellular & molecular biology letters* 20(2):265-278.
- 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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319(2):595-603.
- Yin Y, Zhou XE, Hou L, Zhao LH, Liu B, Wang G, Jiang Y, Melcher K & Xu HE (2016) An intrinsic agonist mechanism for activation of glucagon-like peptide-1 receptor by its extracellular domain. *Cell Discov* 2:16042.
- Yu R, Cui Z, Li M, Yang Y & Zhong J (2014) Dimer-dependent intrinsic/basal activity of the class B G protein-coupled receptor PAC1 promotes cellular anti-apoptotic activity through Wnt/beta-catenin pathways that are associated with dimer endocytosis. *PloS one* 9(11):e113913.
- Yu R, Guo X, Zhong J, Li M, Zeng Z & Zhang H (2012) The N-terminal HSDCIF motif is required for cell surface trafficking and dimerization of family B G protein coupled receptor PAC1. *PloS one* 7(12):e51811.
- Yu R, Zhong J, Li M, Guo X, Zhang H & Chen J (2013) PACAP induces the dimerization of PAC1 on the nucleus associated with the cAMP increase in the nucleus. *Neuroscience letters* 549:92-96.
- Yu SP, Yeh C, Strasser U, Tian M & Choi DW (1999a) NMDA receptor-mediated K<sup>+</sup> efflux and neuronal apoptosis. *Science* 284(5412):336-339.
- Yu SP, Yeh CH, Gottron F, Wang X, Grabb MC & Choi DW (1999b) Role of the outward delayed rectifier K<sup>+</sup> current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 73(3):933-941.
- Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL & Choi DW (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278(5335):114-117.
- Yung SL, Dela Cruz F, Hamren S, Zhu J, Tsutsumi M, Bloom JW, Caudle M, Roczniak S, Todd T, Lemoine L, MacDougall M, Shanafelt AB & Pan CQ (2003) Generation of highly selective VPAC2 receptor agonists by high throughput mutagenesis of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *The Journal of biological chemistry* 278(12):10273-10281.

- Zecca L, Zucca FA, Wilms H & Sulzer D (2003) Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends in neurosciences* 26(11):578-580.
- Zeevalk GD, Razmpour R & Bernard LP (2008) Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room? *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 62(4):236-249.
- Zhang H, Qiao A, Yang D, Yang L, Dai A, de Graaf C, Reedtz-Runge S, Dharmarajan V, Zhang H, Han GW, Grant TD, Sierra RG, Weierstall U, Nelson G, Liu W, Wu Y, Ma L, Cai X, Lin G, Wu X, Geng Z, Dong Y, Song G, Griffin PR, Lau J, Cherezov V, Yang H, Hanson MA, Stevens RC, Zhao Q, Jiang H, Wang MW & Wu B (2017) Structure of the full-length glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* 546(7657):259-264.
- Zhang P, Gruber A, Kasuda S, Kimmelstiel C, O'Callaghan K, Cox DH, Bohm A, Baleja JD, Covic L & Kuliopulos A (2012) Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin. *Circulation* 126(1):83-91.
- Zhang P, Leger AJ, Baleja JD, Rana R, Corlin T, Nguyen N, Koukos G, Bohm A, Covic L & Kuliopulos A (2015) Allosteric Activation of a G Protein-coupled Receptor with Cell-penetrating Receptor Mimetics. *The Journal of biological chemistry* 290(25):15785-15798.
- 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). *The Journal of biological chemistry* 278(25):22418-22423.

*Article Annexe*

## Targeting the PAC1 Receptor for Neurological and Metabolic Disorders

Chenyi Liao<sup>1</sup>, Mathilde Pujol de Molliens<sup>2</sup>, Severin T. Schneebeli<sup>1</sup>, Matthias Brewer<sup>1</sup>, Gaojie Song<sup>3</sup>, David Chatenet<sup>2</sup>, Karen M. Braas<sup>4</sup>, Victor May<sup>4,\*</sup> and Jianing Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departments of Chemistry and <sup>4</sup> Neurological Sciences, University of Vermont, Burlington, VT 05405, USA

<sup>2</sup> INRS – Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

<sup>3</sup> Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Institute of Biomedical Sciences and School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai, 200241, China

Cette revue est acceptée dans **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2019

# Targeting the PAC1 Receptor for Neurological and Metabolic Disorders

Chenyi Liao<sup>1</sup>, Mathilde Poujol de Molliens<sup>2</sup>, Severin T. Schneebeli<sup>1</sup>, Matthias Brewer<sup>1</sup>, Gaojie Song<sup>3</sup>, David Chatenet<sup>2</sup>, Karen M. Braas<sup>4</sup>, Victor May<sup>4,\*</sup> and Jianing Li<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departments of Chemistry and <sup>4</sup> Neurological Sciences, University of Vermont, Burlington, VT 05405, USA

<sup>2</sup> INRS – Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

<sup>3</sup> Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Institute of Biomedical Sciences and School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai, 200241, China

\*Address correspondence to these authors at the Department of Chemistry, University of Vermont, 82 University Place, Burlington, VT 05405 USA; E-mail: [jianing.li@uvm.edu](mailto:jianing.li@uvm.edu) and Department of Neurological Sciences, University of Vermont, Larner College of Medicine, 149 Beaumont Avenue, Burlington, VT 05405 USA; E-mail: [victor.may@uvm.edu](mailto:victor.may@uvm.edu)

**Abstract:** The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-selective PAC1 receptor (PAC1R, *ADCYAP1R1*) is a member of the vasoactive intestinal peptide (VIP)/secretin/glucagon family of G protein-coupled receptors (GPCRs). PAC1R has been shown to play crucial roles in the central and peripheral nervous systems. The activation of PAC1R initiates diverse downstream signal transduction pathways, including adenylyl cyclase, phospholipase C, MEK/ERK and Akt pathways that regulate a number of physiological systems to maintain functional homeostasis. Accordingly, at times of tissue injury or insult, PACAP/PAC1R activation of these pathways can be trophic to blunt or delay apoptotic events and enhance cell survival. Enhancing PAC1R signaling under these conditions has the potential to mitigate cellular damages associated with cerebrovascular trauma (including stroke), neurodegeneration (such as Parkinson's and Alzheimer's disease) or peripheral organ insults. Conversely, maladaptive PACAP/PAC1R signaling has been implicated in a number of disorders, including stress-related psychopathologies (*i.e.*, depression, posttraumatic stress disorder, and related abnormalities), chronic pain and migraine, and metabolic diseases; abrogating PAC1R signaling under these pathological conditions represent opportunities for therapeutic intervention. Given the diverse PAC1R-mediated biological activities, the receptor has emerged as a relevant pharmaceutical target. In this review, we first describe the current knowledge regarding the molecular structure, dynamics, and function of PAC1R. Then, we discuss the roles of PACAP and PAC1R in the activation of a variety of signaling cascades related to the physiology and diseases of the nervous system. Lastly, we examine current drug design and development of peptides and small molecules targeting PAC1R based on a number of structure-activity relationship studies and key pharmacophore elements. At present, the rational design of PAC1R-selective peptide or small-molecule therapeutics is largely hindered by the lack of structural information regarding PAC1R activation mechanisms, the PACAP-PAC1R interface, and the core segments involved in receptor activation. Understanding the molecular basis governing the PACAP interactions with its different cognate receptors will undoubtedly provide a basis for the development and/or refinement of receptor-selective therapeutics.

**Keywords:** Class B GPCR, behavioral disorders, neurodegenerative diseases, molecular modeling, and structure-based drug discovery

## 1. INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest and one of the most important receptor families for drug discovery. The approximate 800 heptahelical receptor members can be divided into five major classes based on sequence and structural similarities: rhodopsin (class A), secretin (class B), glutamate (class C), adhesion, and frizzled/taste. Although consisting of only 15 known members, the class B GPCRs are activated by a number of critical regulatory peptides, such as corticotropin releasing hormone (CRH), calcitonin gene-related peptide (CGRP), parathyroid hormone (PTH), glucagon, vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP, *ADCYAP1*). These peptides are important with respect to neural development, calcium homeostasis, glucose metabolism, circadian rhythm, thermoregulation, inflammation, feeding behavior, pain modulation, as well as stress and related endocrine responses [1-3]. Accordingly, their corresponding receptors are potential pharmacological targets for a variety of disorders including osteoporosis, hypercalcemia, type 2 diabetes, obesity, migraine and related chronic pain disorders, as well as stress-associated psychopathologies, including depression, posttraumatic stress disorder (PTSD) and related anxiety-related abnormalities [8-10].

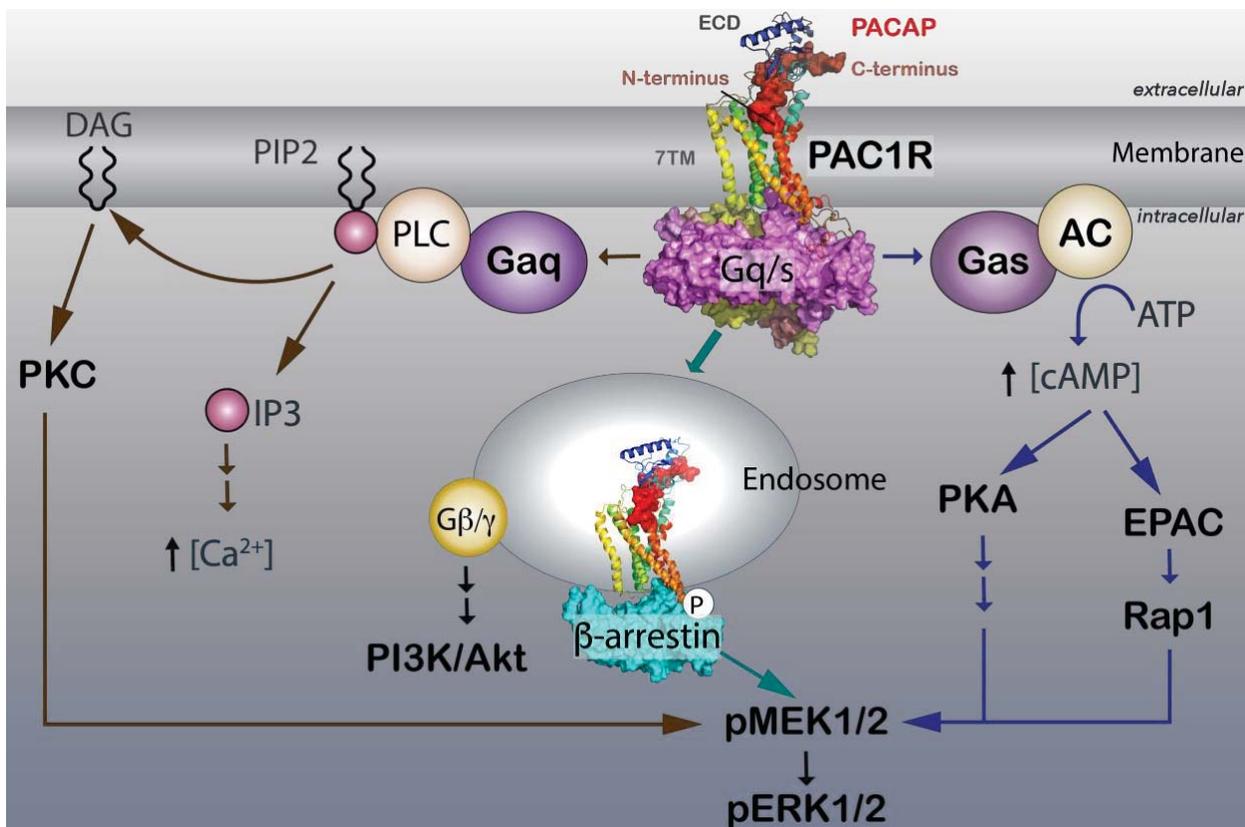


Fig. (1) A schematic diagram of PAC1R signaling cascades. Activation of the PAC1R is dually coupled to Gs to stimulate adenylyl cyclase (AC) and Gq to stimulate phospholipase C (PLC) activity. The increase in cellular cAMP can stimulate protein kinase A (PKA)/EPAC pathways that can intersect and enhance MEK/ERK signaling. PAC1R activation and recruitment of  $\beta$ -arrestin also result in receptor internalization and formation of endosomal signaling platforms for long-term MEK/ERK signaling.

In this review, we focus on one specific class B GPCR, the PACAP receptor (PAC1R, *ADCYAP1R1*, Fig. 1), which is highly expressed in the central and peripheral nervous systems. PAC1R is activated by the alternatively posttranslationally processed PACAP neuropeptides (PACAP27 or PACAP38). PAC1R is dually coupled to Gs or Gq to stimulate adenylyl cyclase (AC)/cAMP or phospholipase C (PLC)/DAG/IP3 pathways, respectively, and can engage other signaling programs in endosomal compartments following receptor internalization. We first review the current knowledge regarding the molecular structure, motion, and function of PAC1R and its peptide-binding modes. Then, we discuss the roles of PACAP/PAC1R in homeostatic and maladaptive signaling. Lastly, we examine current approaches to the design and development of peptide and small-molecule antagonists of PAC1R based on structure-activity relationship (SAR) studies and key pharmacophore elements, which could have broad impacts on many physiological systems.

## 2. PAC1R STRUCTURE, FUNCTION, AND DYNAMICS

### 2.1. Structures of Class B GPCRs and PAC1R

The common basic structure of GPCRs consists of a heptahelical-transmembrane domain (7TM) tethered by three intracellular and three extracellular loops (Fig. 2). Singularly, class B GPCRs have an N-terminal extracellular domain (ECD) composed of 120 to 160 residues which appear critical for the recognition of the C-terminal regions of peptide ligands [4]. Atomic structures of eleven of the fifteen ECDs have been determined by X-ray crystallography or nuclear magnetic resonance (NMR), either with or without their peptide ligands in complex. Notably, these structures reveal similar arrangement of a three-layered  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ / $\alpha$  fold [5] as well as a conserved peptide binding interface [6] (Figs. 2). The 7TM structures for three class B receptors, the glucagon receptor (GCGR) [7-8], the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) [9], and the corticotrophin-releasing factor receptor 1 (CRF1R) [10] have been determined. These structures provide templates to model peptide and allosteric modulator interactions within the 7TM and have enabled initial, structure-based interpretations of SARs. The recently published full-length crystal structures of peptide bound GLP-1R [11] and antibody or peptide bound GCGR [12-13] reveal how the peptides can bind to the orthosteric pockets within the 7TM to trigger downstream signaling cascades. Further, the cryo-electron microscopy (cryo-EM) structures of GLP-1R [14-15] and calcitonin receptor (CTR) [16] and CGRP receptor [17] bound to their downstream Gs trimeric complex reveal how the class B GPCR 7TMs undergo conformational changes at their intracellular regions (from TM5 to helix 8) to allow G protein binding and signaling. The binding poses of Gas with TM5-TM6 of class A and class B GPCRs are similar, but the class B GPCRs have helix 8 in the cytoplasmic tail segment, tilted ( $\sim 25^\circ$ ) to enable additional interactions with the G $\beta$  subunit. Overall, these structures have extended understandings of ligand-receptor interactions and orthosteric versus allosteric modulation mechanisms of class B GPCRs and have provided the underlying basis for structure-based drug discovery, targeting the VIP/secretin/glucagon family of GPCRs.

There are several variants of the PAC1R (Fig. 2) based on the alternative splicing of two 84-base pair exons that encode Hip and Hop 28-aa cassettes within the third intracellular loop (ICL3) [18-19]. Hence, the PAC1R may be Null (neither Hip nor Hop inserts), Hip, Hop (Hop1, or additional short Hop variant Hop2), or HipHop (an aggregate of the two cassettes). The PAC1Null

and PAC1Hop receptor variants are preferentially expressed in the central and peripheral nervous systems. In addition to the ICL3 Hip/Hop inserts, the deletion of a 21-amino acid (21-aa) loop segment within the  $\beta 3$  and  $\beta 4$  strands of the ECD has also been described [20], although this ECD deletion has not been observed in most tissues. The functional roles of these receptor variants are unclear, but have been proposed to increase receptor selectivity for different neuropeptides and/or G proteins.

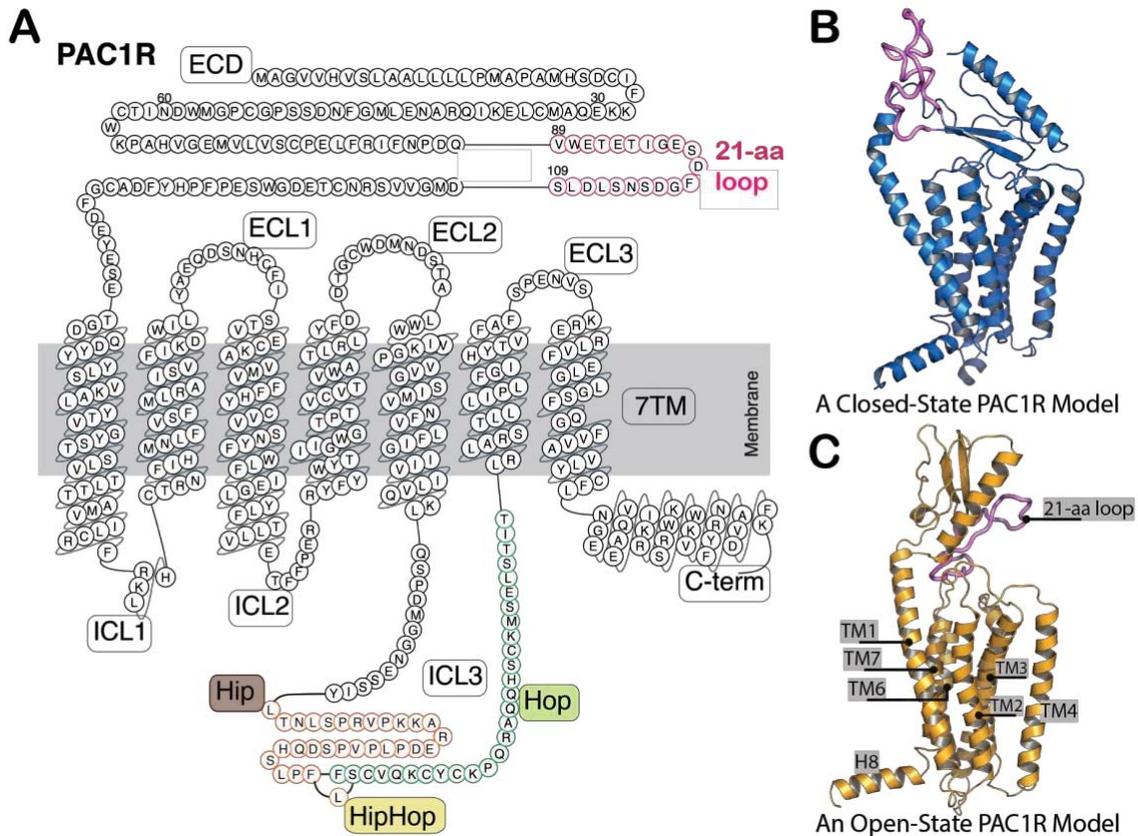


Fig. (2) (A) The PAC1R sequence and topography with potential splice variants. PAC1R can have Hip and/or Hop 28-aa cassette inserts into the ICL3 region. Accordingly, the PAC1R can be Null (neither Hip nor Hop), Hip, Hop or HipHop variants, as described in the text. Unlike most class B receptors, PAC1R also has a 21-aa loop segment in the ECD. (B) A representative conformation of PAC1R in the ECD-closed state [21]. (C) A representative conformation of PAC1R in the ECD-open state [21]. Helix 8 (H8) is located within the intracellular C-terminal tail region.

## 2.2. Structure-Dynamics-Function Relationship of PAC1R

Molecular dynamics (MD) studies of class A GPCRs have revealed valuable information about the transition between receptor active and inactive states as well as intervening conformations [22-29]. In recent years, an understanding of the structural basis and dynamic details of class B receptors has been greatly advanced. Unlike class A receptors, class B GPCRs seem to operate through large conformational shifts of the ECD and the 7TM, which are connected by a flexible linker [9, 12-13]. This shapeshifter feature [30] of PAC1R has been assessed by a recent MD simulation study on the microsecond timescale [21]. During the first few hundred



between PAC1R states involve the reshuffling of hydrogen bonds and salt bridges around the orthosteric site (N240<sup>3.43</sup>-R199<sup>2.60</sup>-Q392<sup>7.49</sup>-Y241<sup>3.44</sup>, Wootten numbering [32]) and near the intracellular face of the receptor (altered interactions between E344<sup>ICL3</sup>-R185<sup>ICL1</sup> and R185<sup>ICL1</sup>-E247<sup>3.50</sup>-Y400<sup>7.57</sup>). In addition, there is a change in the hydrophobic packing of L192<sup>2.53</sup>, L244<sup>3.47</sup>, L358<sup>6.45</sup>, and V396<sup>7.53</sup> [21]. In aggregate, the ECD dynamics, rearrangements within the 7TM, and reshuffling of interaction networks describes a sequence by which changes in communication among the domains can contribute to PAC1R function. Hence, the three-dimensional (3D) structures obtained from these simulations not only further our understandings of the mechanism governing PAC1R activation, but also allow insights for structure-based drug design targeting this receptor class.

### 2.3 Peptide-Binding Sites of Class B GPCRs and PAC1R

As described earlier, unlike the class A GPCRs most of which have a relatively small extracellular N-terminus domain, the class B receptors have evolved large ECDs to capture peptide ligands for presentation to the orthosteric receptor activation site in the 7TM. Among the 15 crystal and NMR structures of the ECDs, 11 class B GPCR ECD structures have solved in complex with their peptide ligands [33-37], including those with full-length crystal and cryo-EM structures [13-14]. In a majority of these structures, the C-terminus of the peptide ligand binds to a hydrophobic patch principally formed by the ECD  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta/\alpha$  fold ( $\alpha$ 1- $\beta$ 1- $\beta$ 2- $\alpha$ 2), while the N-terminus of the peptide ligand points in the same direction as the N-terminus  $\alpha$ 1 of the ECD (Fig. 4A). Based on the conserved three-layered  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta/\alpha$  fold [5], and the orientation of the bound peptide, a “two-site” activation model of class B receptors is supported. In this model, the  $\alpha$ -helical C-terminal region of the peptide binds to the ECD domain of the class B GPCR, which allows presentation of the peptide N-terminus to the orthosteric site within the 7TM domain eliciting receptor activation [11-13, 38] (Fig. 4B).

However, NMR studies [37] indicate that the truncated PACAP(6-38) PAC1R antagonist binds PAC1R at a distinct site and in the opposite orientation [33] as illustrated in Fig. 4C. This binding orientation was also suggested in the ligand-free PAC1R ECD crystal structure and mutation study [39]. Although clarifications may be needed, the distinct binding geometry of PACAP(6-38) to PAC1R ECD by NMR [37] raises obvious issues on how the N-terminus of the endogenous peptide can interact with the 7TM orthosteric site. Despite the apparent difference in ECD peptide orientation, the two-site activation model, which operates through a series of ECD motion transitions [21], still appears applicable for PAC1R activation. The large domain motion of the ECD leads to several distinct conformational states of PAC1R [21], which may provide structural details relevant to peptide binding and signaling. Compared to the ECD-closed conformations, the ECD-open conformations render the PACAP binding site [37] more exposed to the extracellular environment, and therefore more accessible for PACAP binding. Through the open-to-closed conformational transition process of PAC1R, the N-terminus of PACAP is likely inserted into the orthosteric ligand-binding site (Fig. 4D).

Another structural element that may regulate ligand binding is the loop between the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 strands (referred to as the 21-aa loop), which has been found to contribute to the hydrophobic interactions between the ligand and ECD in all available peptide-bound structures [13, 34-37]. Even though PACAP adopts a different binding geometry in the NMR models [37], dominant

hydrophobic interactions have been identified at the ligand-ECD interfaces. The prevalent PAC1R isoforms, containing the 21-aa ECD segment, exhibits a long loop between the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 strands (Fig. 2), which is rare in other class B receptors. The 21-aa loop can interact with ECL3 to facilitate the ECD-open conformation (Fig. 4); also, in simulations of ligand-free PAC1R, the 21-aa insert was found to transform between a random coil and a partially helical conformation at its C-terminal region, which may lead to different ligand-binding sites for PACAP [21]. Altogether, the ECD motion suggests that the receptor may adopt multiple ECD conformations to increase the probability of capturing a peptide ligand by displaying a variety of potential binding sites, and then deliver the bound ligand to the orthosteric pocket through a series of ECD motions.

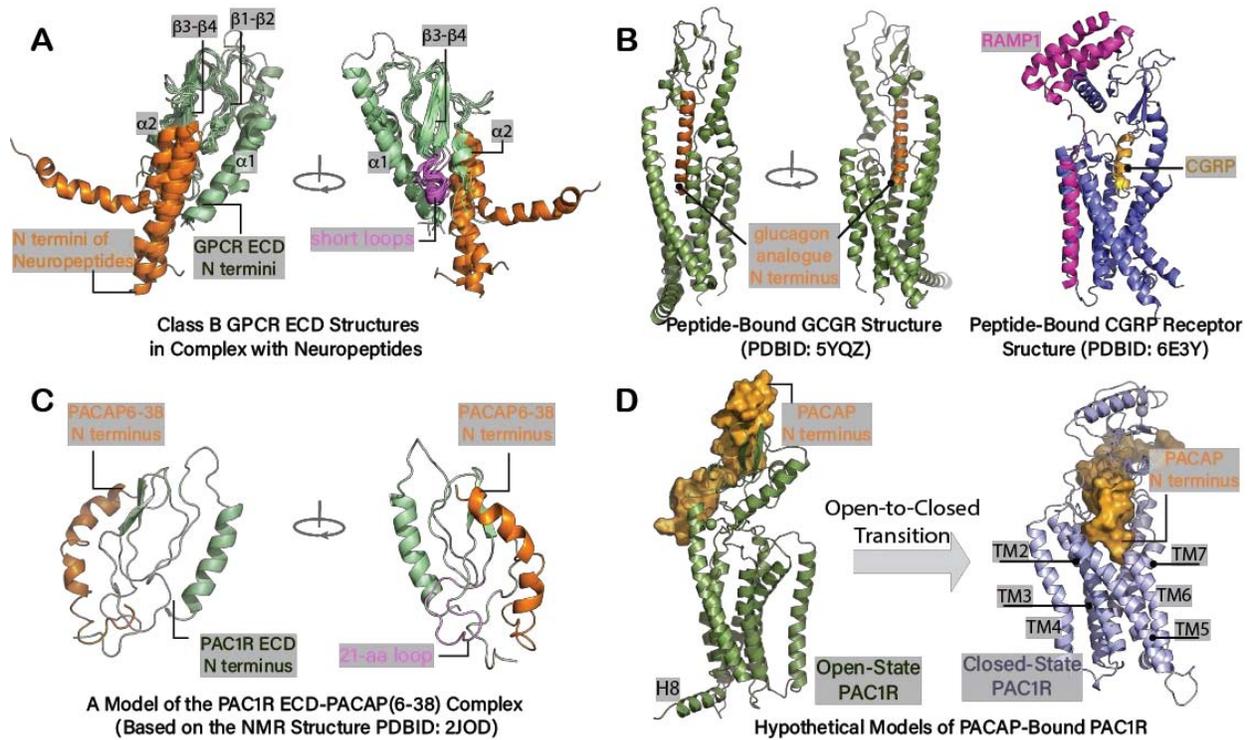


Fig. (4) (A) Overlapped ECD structures of five class B GPCRs in complex with their peptide ligands (PDBIDs: 2QKH (GIP receptor), 3IOL (GLP-1 receptor), 3C4M (PTHR), 2L27 (CRF receptor with  $\alpha$ -helical CRF), 3N96 (CRF receptor with urocortin) [34-37]. A three-layered  $\alpha$ 1-( $\beta$ 1- $\beta$ 2)-( $\beta$ 3- $\beta$ 4)/ $\alpha$ 2 fold is presented. (B) The full-length crystal structure of GCGR in complex with a glucagon analogue [13], in comparison with the full-length cryo-EM structure of the CGRP receptor. The CGRP receptor is shown in association with its receptor associated modifying protein 1 (RAMP1). (C) The PACAP-bound PAC1R ECD model. (D) Hypothetical models of full-length PAC1R bound to PACAP in open- and closed-states.

### 3. PAC1R AND SIGNALING PATHWAYS

#### 3.1. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)

PACAP is a peptide widely expressed in central and peripheral neurons and behaves as a neurotransmitter and neurotrophic regulator with critical roles in signaling, physiological homeostasis, development, survival, proliferation, differentiation and regeneration [40]. PACAP



receptor may be differentially coupled to adenylyl cyclase, phospholipase C, MAPK or Akt pathways, among others. Most of the neural and peripheral tissues examined to date contain the 21-aa splice insert in the PAC1R ECD. The 21-aa loop insert may have primary roles in stabilizing the ECD-open receptor state although early work has suggested that it may have some roles in peptide ligand specificity and function. Splice variants have not been described for the VPAC1/2R. The VPAC1R and VPAC2R appear to be preferentially coupled to adenylyl cyclase. Recent work has shown that  $\beta$ -arrestin-mediated PAC1R internalization and endosomal signaling is the primary driver of long-term cellular ERK activation [50].

## **4. PAC1R AND BEHAVIORAL DISORDERS**

### **4.1. PACAP/PAC1R Signaling Regulates Stress-related Behaviors**

Over the last several years, the PACAP/PAC1R system has been associated with stress-related anxiety-like behavior [51], including PTSD [52-53]. Chronic stress increased PACAP and PAC1R transcripts in the rat bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and hypothalamus [51], two limbic brain regions that participate in stress responses and behavior. The changes in BNST PACAP expression were dependent on chronic rather than acute stress, and did not appear secondary to corticosterone, suggesting the direct effects of stress in limbic circuit phenotypic plasticity [54]. Infusions of PACAP or maxadilan (a specific PAC1R agonist) into the BNST were anxiogenic and anorexic (analogous to stress-mediated decreases in feeding behavior) [55]. Unlike other neuroregulators, the BNST PACAP effects were long-lasting; a single injection of PACAP sustained anxiety-like responses for several days [51]. Similar long-term anxiogenic responses were elicited following PACAP infusions directly into the central amygdala (CeA) [56-57]. Accordingly, these results suggest that chronic traumatic stress, and the accompanying increases in limbic PACAP expression/signaling, could drive the maladaptive neuroplasticity leading to behavioral abnormalities. In testing this hypothesis, rats were chronically infused with the PAC1R antagonist during stressor exposures; as proof of principle, antagonism of PAC1R signaling with PACAP(6-38) during chronic stress blocked both anxiety-related responses and decreased feeding behavior [55]. The observations were in good agreement with many related studies. The PACAP and PAC1R knockout mice appeared to be less anxious [58-61], and demonstrated impaired corticosterone responses to emotional and chronic stressors [62-65].

These observations have direct translational relevancy. Notably, elevated blood PACAP levels and polymorphism in the estrogen responsive element (ERE) of the PAC1R gene have been associated with PTSD symptoms in the female population [52, 66]. The changes in PACAP levels and receptor polymorphism were correlated with higher acoustic startle indices, which have been associated previously with PTSD risk. Correspondingly, PAC1R transcripts were increased in the rat extended amygdala after classical fear conditioning and as a function of estrogen exposure. Although these PACAP/PAC1R results were associated primarily with female PTSD symptoms, epigenetic signatures for the PAC1R may be markers for PTSD-related abnormalities in both males and females [52]. These observations have been corroborated independently [53, 67-71], supporting the PACAPergic system as a novel and relevant target for therapeutics. More recent work has suggested that the maladaptive PACAP signaling may be sustained in stress-related behavioral disorders and that the benefits of PAC1R antagonists may be meaningful even during ongoing disorder progression, and may not have to stem solely from prophylactic treatments (see

below) [52]. These results are particularly notable from the vantage of potential therapeutics.

#### **4.2. PACAP Pain Pathways and Intersections with Behavior Circuits**

PACAP was initially characterized as a sensory peptide. PACAP is expressed in a population of sensory dorsal root and trigeminal ganglion neurons, and from neuroplasticity, can be induced upon injury or inflammation paradigms. Axotomy or inflammatory challenges dramatically increased PACAP expression in sensory neurons, resulting in augmented PACAP projections and signaling onto second order dorsal horn neurons. In delineating PACAP sensory circuits, it was recently shown that PACAP in the nociceptive (pain) spino-parabrachioamygdaloid pathway is important in mediating the emotional components of pain [56-57]. Briefly, PACAP in the peripheral pain circuits relayed signals that ultimately terminated in the lateral capsular division of the amygdala (CeLC), another limbic nucleus well studied for its roles in stress, anxiety and fear [72-73]. Stress and chronic pain (including migraine) are comorbid. Nearly 50% of patients with psychopathologies have chronic pain; conversely, 30 to 40% of patients with chronic pain present anxiety disorders including PTSD [74-80] Hence this particular PACAP neurocircuit may represent a means by which chronic pain can be integrated with limbic functions leading to heightened pain responses and psychopathologies. PACAP or maxadilan infusions into the amygdala increased anxiety-like responses and nociceptive thermal sensitivity; further, the PACAP responses were long-term [56]. As before, to establish the physiological relevance of this pathway, a partial sciatic nerve ligation protocol was used to induce chronic pain without impairing locomotion [57]. The paradigm produced stress- and anxiety-related behavior in parallel with increased thermal pain sensitivity. Of note, acute amygdala infusion with the PAC1R antagonist PACAP(6-38), during the progression of heightened anxiety and pain, was able to block these maladaptive responses [57]. This implicated augmented and sustained PACAP signaling in mediating these responses and that therapeutic interventions, even during ongoing disorder processes, may have beneficial effects.

Commensurate with PACAP roles in pain, several recent studies have now shown that PACAP and PAC1R signaling is associated with migraine [81-83]. Migraine is a complex and often debilitating neurological disorder characterized by intense unilateral pulsating headache, frequently accompanied with aura, photophobia, phonophobia, nausea, and related symptoms. The causes of migraine are not understood and are likely to be multifactorial. One prototypic neuroregulator in migraine is the sensory and potent vasodilatory peptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) [84]. Among many models, sensory (trigeminal) and/or autonomic (sphenopalatine) ganglion neuronal peptide signaling along central pathways or in the perivasculature may contribute to the experience of migraine pain. CGRP is localized to these pathways, exogenous CGRP administration has been shown to induce migraine-like headaches indistinguishable from spontaneous migraine attacks [85] and notably, CGRP receptor antagonists are effective in treating migraine [86]. The CGRP receptor antagonists (Olcegepant and Telcagepant), however, demonstrated adverse reactions, and consequently, antibody-based functional blockage of CGRP receptors (Aimovig; erenumab) represents the most current therapeutic means for migraine. PACAP and CGRP share a number of similarities, including parallel tissue expression and distribution patterns (colocalization in nearly 70% of sensory and central neurons), and potent vasodilatory effects through comparable signaling mechanisms. Importantly, like CGRP, PACAP infusions into humans can also induce migraine-like attacks in

normal subjects and migraineurs [87-88]. However, whereas CGRP signaling and responses in *ex vivo* pressurized vessels preparations appear short-term or transient, PACAP acts more potent with long-term sustained responses [81, 89]. These observations are novel and suggest that reagents that target PAC1R function may be more efficacious than those for CGRP in migraine and chronic pain management.

### **4.3. PACAP/PAC1R Responses are Mediated by Internalized Receptor Endosomal Signaling**

Importantly, the behavioral and chronic pain responses are dependent on cellular ERK activation. Stress and chronic pain paradigms increase phosphorylated ERK signaling in the brain; conversely, stress and chronic pain responses can be attenuated by inhibitors of the MEK/ERK signaling cascade [90]. PACAP infusions into limbic areas increase ERK activation and c-fos induction (a marker for increased neuronal activity) in parallel with behavioral and pain responses; these PACAP responses can be attenuated with MEK/ERK inhibitors [57]. Notably, current work has shown that cellular PACAP/PAC1R-ERK signaling is mediated largely following PAC1R internalization and endosomal signaling [50, 91]. In coherence, inhibitors of endocytic mechanisms can block PACAP-stimulated pain sensitivity [57].

### **4.4. PACAP Roles in Metabolism**

Some of the most consistent and robust responses of PACAP are related to feeding behavior, which can ultimately impact obesity and diabetes. PACAP and PAC1R are highly expressed in several hypothalamic nuclei important to appetite, satiety and homeostatic metabolic regulation, including the paraventricular nucleus (PVN), ventromedial hypothalamic nucleus (VMN), arcuate nucleus (ARC) and the supraoptic nucleus (SON) [92]. Both peripheral and central administration of PACAP leads to decreased feeding or anorexic responses, resulting in decreased weight gain. Intracerebroventricular injections of PACAP reduced food intake [93-94] and similarly, intraperitoneal PACAP injections suppressed appetite by decreasing ghrelin (resulting in diminished hunger) and increasing GLP-1 and leptin (resulting in increased satiety) in plasma [95-96]. The central hypothalamic mechanisms appear multifaceted as direct PACAP injections into the different sites appeared to yield slightly different attributes. Direct PACAP infusions into PVN decreased meal size, duration and total eating time, whereas PACAP activation of the VMN resulted in increased body temperature and locomotion (increased energy expenditure) [97-98]. These responses were blocked with PAC1R selective antagonist and did not appear to be mediated by VPAC receptor signaling. The PACAP/PAC1R-mediated signals in feeding are well integrated in established feeding and appetite circuits. PACAP stimulated ARC neuron POMC transcript expression in parallel with augmented  $\alpha$ MSH production, and as the PACAP-mediated hypophagic effects could be attenuated with MC4R receptor antagonists, the anorexic responses of PACAP/PAC1R signaling appeared upstream of POMC/melanocortin signaling [93]. The expression of hypothalamic orexigenic peptides neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) were not regulated by PACAP although more recent work has suggested that during fasting, PVN PACAP signaling can stimulate ARC AgRP to enhance appetite [99]. Hence, PACAP/PAC1R signaling appears to participate in anorexic and orexigenic responses depending on metabolic status.

Whether coordinate or separate, central PACAP regulation of autonomic pathways can also have significant effects on metabolic states. Intracerebroventricular (ICV) PACAP infusions for example were shown to elevate plasma glucose levels and increase hepatic glucose production that appeared dependent on sympathetic innervation of the liver [100]. However, PACAP expression and function in vagal parasympathetic inputs to the pancreas appear to function synergistically with cholinergic signaling to increase islet  $\beta$ -cell proliferation via FoxM1 (forkhead box cell cycle transcriptional factor) for potential diabetes management [101]. These observations echo the well-studied PACAP trophic (protective and prosurvival) effects against a variety of challenges in many tissue systems [40] (see below). Hence unlike for chronic pain and stress-related disorders in which PAC1R antagonism at central pathways may be beneficial, the targeted application PAC1R agonists may be novel approaches for cellular protection, proliferation and regeneration, and maintenance of energy homeostasis.

## **5. PACAP AND PAC1R NEUROTROPHIC AND NEUROPROTECTIVE ACTIVITIES**

### **5.1. PACAP/PAC1R Neurotrophic Signaling**

PACAP/PAC1R signaling can engage multiple signaling cascades including adenylyl cyclase/cAMP, phospholipase C/DAG/PKC, MEK/ERK and PI3K/Akt pathways to maintain physiological homeostasis. These signaling events intersect and likely engage a wider network of trophic signaling pathways that promote cellular survival, proliferation and differentiation in neurodevelopment, and block or attenuate pro-apoptotic processes following injury or degenerative states. Hence, the same PACAP/PAC1R signaling events that can contribute to the maladaptive neuroplasticity observed following repeated or chronic physiological insults (*i.e.*, stress-related psychopathologies and chronic pain as described above) have important beneficial attributes in development and in mitigating damages from tissue injury, disease-related degeneration and inflammation.

PACAP/PAC1R signaling has been shown to facilitate trophic signaling in a variety of central and peripheral neurons. PACAP promotes the proliferation astrocytes, sympathetic neuroblasts and neural stem cells [102-103]; PAC1R is expressed in neurogenic regions of the mouse brain and PACAP can promote the *in vitro* proliferation of cells isolated from the lateral ventricle wall of adult mice [104]. Similar observations were also made *in vivo* following the intracerebroventricular injection of PACAP [104]. Altogether, these results, which have been reproduced using the PAC1R selective agonist maxadilan [46], implicate the involvement of PAC1R in neurogenesis. Consistent with these trophic effects, PACAP can also promote the differentiation and neurite outgrowth of neuroprogenitor, neuroepithelial, neuroblastoma, cerebellar granule and pheochromocytom cells.

### **5.2 PACAP/PAC1R Signaling in Neuroprotection**

Trophic PACAP/PAC1R signaling is also neuroprotective. PACAP mitigates naturally occurring programmed cell death during cerebellar development [105-106]; PACAP can abrogate, mitigate or delay neural damages against a variety of insults including stroke, glutamate excitotoxicity, hydrogen peroxide-mediated oxidative stress, ethanol, and ceramide [107-111].

PACAP administration before or after ischemia in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of stroke, decreased infarct size, mitigated cell death and improved functional recovery [111-117]. Similarly, PACAP and the PAC1R agonist maxadilan, protected retinal neuroblastic cells from anisomycin-induced apoptosis [118]. These neuroprotective effects of PACAP have also been observed following insults in a variety of peripheral tissues, including kidney, cardiomyocytes and intestinal cell layers [119-122], suggesting that PACAP/PAC1R signaling has broad tissue protection abilities under many proapoptotic challenges.

Hence from these observations and attributes, PACAP/PAC1R signaling can be protective in neurodegenerative states. In a variety of *in vitro* culture models, cell death induced by reagents, such as rotenone, paraquat, salsolinol, MPP<sup>+</sup> or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to simulate Parkinson's disease mechanisms, can be ameliorated by PACAP treatments [108, 123-124]. In accord, PACAP protected dopaminergic cells from apoptosis in the 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease and in parallel, ameliorated the disease-associated neurological and behavioral defects [125-126]. PACAP attenuated  $\beta$ -amyloid-induced toxicity in PC12 pheochromocytoma cells [127]; further, long-term PACAP treatments of the APP[V717] transgenic mouse model of Alzheimer's disease improved cognitive functions [128]. Similarly, repeated intranasal PACAP administration to the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease improved memory and cognitive performance, and diminished mutant huntingtin aggregates [129]. From these examples, reagents that enhance PACAP/PAC1R trophic signaling may be novel in their potential to mitigate the cellular damage and functional deficits associated with a number of neurodegenerative diseases.

## 6. DEVELOPMENT OF PEPTIDES TARGETING PAC1R

With a few exceptions, class B GPCRs have proven difficult targets for the development of either peptide or small-molecule therapeutics [130]. For instance, the large PACAP-PAC1R interface, which makes critical residue interactions dispersed across the entire receptor structure, and the lack of insights related to the interactions involved in core sequence receptor activation, have so far prevented the rational design of small-molecule modulators or PAC1R-selective analogs [130]. However, some metabolically stable PACAP derivatives specifically targeting PAC1R can be poised to make a significant breakthrough in the treatment of neurodegenerative diseases [130]. Understanding the molecular basis governing PACAP interactions with its different PAC1R, VPAC1R and VPAC2R subtypes will undoubtedly provide a rational basis for the development and/or refinement of receptor-active peptidergic compounds.

From the consensus two-site model for ligand binding and signaling of class B GPCRs, an understanding the spatial positioning of specific residues and/or structural features within PACAP becomes critical in the design of pharmacological specific peptidergic reagents to the different PAC1/VPAC receptors. Similar to other members of the VIP/ secretin/glucagon family, PACAP exhibits a disorder N-terminal segment (residues 1-5), which might adopt a specific pose upon interaction with its receptor, and a C-terminal  $\alpha$ -helix for ECD binding [130-131]. Over the years, SARs have highlighted the existence and the essential role played by the Asx-turn present at the N-terminus, the N-capping motif encompassing amino acid residues 6 to 10, the C-terminal (residues 28 to 38) region, as well as the Tyr residue at position 22, for the binding and biological activity of PACAP38 [130].

## 6.1. Structure-Activity Relationships (SARs) of PACAP N-Terminal Segment

The putative Asx-turn-like structure in PACAP is characterized by two hydrogen bonds involving i) nitrogen at position 3 but not 1 of the imidazole ring and the amide proton of the Asp residue at position 3, and ii) the carbonyl of the His residue and the amide proton of the glycine at position 4 [132]. Stabilization of this secondary structure, through the replacement of the native Ser<sup>2</sup> with Ala, Pro or Hyp residues, did not alter the ability of PACAP27 to bind PAC1R and VPAC1R but significantly affected its binding affinity for VPAC2R [132-133]. Accordingly, [Pro<sup>2</sup>]PACAP27 was observed to adopt a well-defined structure, similar to a turn, that could restrict PACAP conformations for receptor activation [133]. By contrast, introduction of an Aib moiety or a D-Ser did not particularly affect the binding affinity of PACAP27 for PAC1R and VPAC2R but significantly reduced its propensity to bind VPAC1R [132]. This exploratory work led to the identification of a PACAP/VIP analog, *i.e.*, [Hyp<sup>2</sup>]PACAP27, with potent neuroprotective action *in vitro* [132]. In a recent study, the substitution of His at position 1 with 4-imidazole acetic acid ([Iaa<sup>1</sup>]PACAP38) or 4-imidazole acrylic acid ([Iac<sup>1</sup>]PACAP38) increased PACAP affinity to PAC1R and VPAC2R but reduced its binding to VPAC1R [134]. Finally, modifications introduced at position 3 of this PACAP variant, including the introduction of a proline, a piperidine-2-carboxylic acid or a N-methyl-glycine, generated several analogs with reduced affinities for all receptors, corroborating again the importance of the amide proton of the residue at position 3 [134]. While no particular physio-chemical parameters favoring PAC1R binding over VPAC receptors have been identified, these studies demonstrate that the secondary structure at the N-terminus of the peptide is an important determinant of receptor specificity.

Apart this specific turn, other determinants, also within the N-terminal domain of PACAP contribute to the selectivity of PACAP towards its different receptors. First, residues at positions 4 and 5 have been suggested to form an encrypted receptor selective dipeptide. Indeed, when the Gly<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup> dipeptide in PACAP27 replaced Ala<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup> in the VIP sequence, the new [Gly<sup>4</sup>, Ile<sup>5</sup>]VIP analog, was able to bind and activate PAC1R [135]. Similarly, the substitution of the Ala<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup> dipeptide for Gly<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup> in PACAP abolished its propensity to bind PAC1R but improved its binding to VPAC receptors [135]. The intrinsic characteristics of these amino acids and their differential impact on the secondary structure of PACAP27 and its binding characteristics might reflect the presence of specific structures ( $\beta$ -turn versus helix) involved in the discrimination by PACAP for PAC1R and VPAC receptors. Hence, the stabilization of a  $\beta$ -turn structure around residues 4 and 5 in PACAP could achieve specificity toward PAC1R while the extension of the C-terminal  $\alpha$ -helix to residue 4, may shift peptide specificity to VPAC1R [136].

## 6.2. SAR of PACAP N-Capping Motif

The N-capping motif of PACAP, VIP and other Class B GPCR ligands constitutes another potential determinant of receptor activation [137]. Accordingly, the folded backbone conformation imposed by the N-capping structure has been proposed to serve as an element for the rational design of PAC1R selective ligands. The structure, encompassing amino acid residues 6 to 10, is mostly characterized by hydrophobic interactions between aromatic residue (Phe<sup>6</sup> and Tyr<sup>10</sup>) and specific hydrogen bonding (between Thr<sup>7</sup> and Tyr<sup>10</sup> or Ser<sup>11</sup>). Over the years, the replacement of Phe<sup>6</sup> by Tyr, L-cyclohexylalanine (Cha), L-biphenylalanine (Bip) or L-naphtylalanine (Nal) has been shown not to significantly alter the binding properties of PACAP analogs but modulated their

specificity for the different receptors [130-132]. The incorporation at position 6 of bulky aromatic residues like Bip or Nal, for example, produced analogs with apparent potent activity toward PAC1R but reduced activity and affinity toward VPACs receptors [130-132]. Overall, SAR studies suggested that the bulky and hydrophobic features of PACAP Phe<sup>6</sup> are more essential than its aromaticity for proper receptor recognition. From these observations, the construction of the Ac-[Phe(pI)<sup>6</sup>,Nle<sup>17</sup>]PACAP27 analog was shown to be selective for PAC1R/VPAC1R with potent neuroprotective actions *in vitro* and *in vivo* [138]. The Thr<sup>7</sup> residue of PACAP may facilitate N-capping motif stability and accordingly, the [Ala<sup>7</sup>]PACAP27 analog can efficiently bind and activate PAC1R and VPAC1R, with almost no activation of VPAC2R. Accordingly, this residue, which is also presents in VIP, appears to represent a specific key pharmacophore for VPAC2 selectivity [132, 139]. In sum, these results implicate the N-capping motif as a structural feature in receptor recognition.

### 6.3. SAR of PACAP C-Terminal Segment

Over the years, various modifications have been introduced within the C-terminal region of PACAP with mixed results [130-131]. However, Ramos-Alvarez *et al.*, suggested recently that L-Ala substitution of PACAP Tyr<sup>22</sup> could be also a good strategy to uncover PAC1R specific ligands [134]. The Tyr<sup>22</sup> residue, found in PACAP and VIP, has been previously associated with their propensity to bind VPAC2 receptors [140]. Hence, [Ala<sup>22</sup>]PACAP27/38 has decreased affinity towards the three receptors but the decrement was more acute for VPAC receptors [134, 141].

In sum, the development of PAC1R-specific peptide agonists and antagonists remains elusive, although a few PACAP analogs have exhibited higher affinities for PAC1R and VPAC1R than VPAC2R. While single residue substitutions have failed to generate the specific ligands, multiple residue substitutions informed by PAC1R computational modeling may offer new opportunities. In addition to the design of peptide analogs specific to each of the three PACAP/VIP GPCR subtypes, there are other significant challenges with respect to drug development, including the abilities of the compounds to cross the BBB and the preferential engagement of second messengers for biased receptor signaling. GPCR activation results in canonical plasma membrane delimited activities of G proteins, but rather than desensitization following receptor endocytosis, the cellular internalization and trafficking of GPCRs are now understood to represent a reprogramming of signaling events in endosomal compartments. GPCR endosomal signaling is best understood with respect to  $\beta$ -arrestin recruitment and scaffolding of proteins for MEK/ERK activation, although sustained cellular cAMP signaling has also been attributed to endosomal receptor mechanisms. Endosomal signaling can direct second messengers to specific intracellular sites with high spatial and temporal resolution for distinct cellular responses and many of the maladaptive PACAP/PAC1R-mediated effects have been attributed to internalized receptor-endosome mechanisms. Hence a more comprehensive understanding of PACAP/PAC1R signaling messengers for the many homeostatic and maladaptive responses is needed and the design of compounds that can bias the activation or inhibition of specific second messenger pathways becomes attractive to better target therapeutic outcomes. A recent study has started to assess the impact of chemical and structural modifications introduced into specific regions of the PACAP variants on the signaling signatures of PACAP analogs [141].

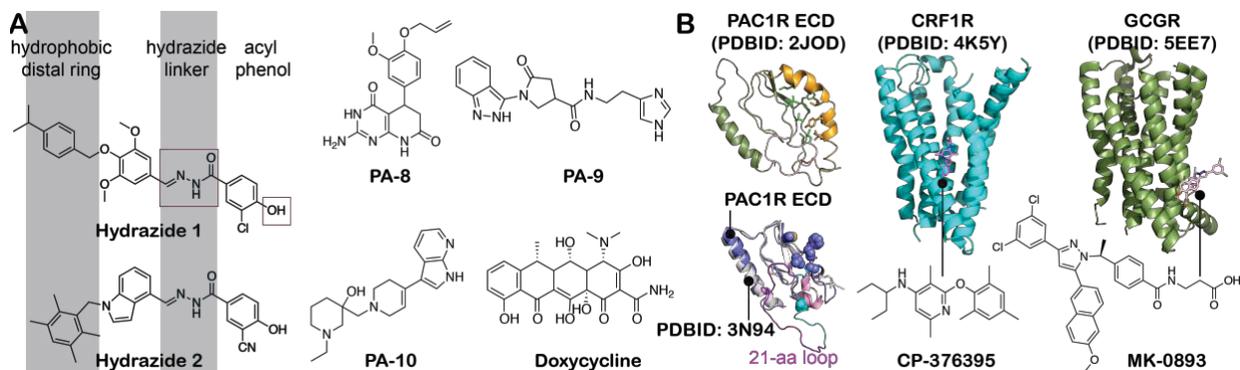


Fig. (6) (A) Small molecule compounds previously reported as PAC1R antagonists from calcium and cAMP assays [142]. (B) Potential small-molecule binding sites of PAC1R ECD. The hydrophobic residues that interact with PACAP(6-38) in the NMR structure [37], displayed by green sticks and spheres in the PAC1R model, correspond to residues M72, L74, L80, V113, F127, P128, and A133. The ECD of PAC1R (in purple blue) was built on the crystal structure (PDBID: 3N94) [39]. The  $\beta$ 3- $\beta$ 4 region is in pink, and the 21-aa loop in magenta. The deep allosteric pocket site of CRF1R, and the extra-helical site of GCGR targeted by small-molecule compounds CP-376395 and MK-0893, respectively.

## 7. DEVELOPMENT OF SMALL MOLECULES TARGETING PAC1R

Concurrent with efforts to develop receptor specific PACAP analogs, the identification and development of small-molecule ligands for class B GPCRs has also remained a challenge in drug discovery.[143-144] In recent years, a diverse array of orthosteric and allosteric nonpeptide ligands that include antagonists, agonists, and positive allosteric modulators with intrinsic efficacy has been reported for GLP-1R [145], GCGR [8], CRF1R [10], PAC1R [142, 146-147], VPAC1/2R [148]. Specific small-molecule PAC1R agonists and antagonists have utility in neurotrophic signaling and blocking the maladaptive effects of PACAP, respectively, but progress has been difficult. Below describe recent efforts to develop small-molecule ligands targeting PAC1R.

### 7.1. Small-Molecule PAC1R Antagonists

From earlier sections, PAC1R antagonism may have therapeutic potential to attenuate or abrogate the maladaptive effects of PACAP/PAC1R signaling in stress-related disorders, including chronic pain and migraine. The studies with PAC1R antagonist PACAP(6-38) have provided proof-of-principle that PAC1R antagonism, even during disorder progression, may be beneficial. As these studies have suggested that PACAP/PAC1R-initiated endosomal ERK signaling is the primary mediator of these effects, small molecules that are biased to preferentially block PAC1R endocytosis and  $\beta$ -arrestin-mediated ERK signaling may be particularly useful.

Beebe and colleagues [142] first reported potent small-molecule hydrazone compounds as antagonists for the PAC1R. SAR studies around two lead hydrazides (Fig. 6) were carried out by competitive  $^{125}\text{I}$ -PACAP27 radioligand binding and calcium influx assays. SARs were undertaken on four regions: the acyl phenol portion, the hydrazone linker, the middle aromatic ring, and the distal aromatic ring (Fig. 6). The acyl phenol tolerated no changes and the hydrazone linker tolerated small changes. Both middle aromatic ring and the distal aromatic ring accepted changes

for potency. A lipophilic group attached to the distal aromatic ring was preferred, but not crucial for potency. As these lead compounds blocked PACAP/PAC1R-stimulated calcium flux but had little effect on PAC1R endocytosis or ERK signaling, the acyl hydrazides may be biased to block predominantly membrane delimited G-protein signaling. Accordingly, these compounds may require additional studies for full therapeutic potential.

More recently, Takasaki and colleagues [146] used virtual screening and *in vitro/in vivo* pharmacological assays to identify new small-molecule antagonists for PAC1R. The NMR structure [37] of ECD of PAC1R in complex with its peptide antagonist PACAP(6-38) was used, and the conformational positions of residues Tyr<sup>22</sup>, Val<sup>26</sup>, and Arg<sup>30</sup> were structured to create 3D pharmacophore models. After multifilter virtual screening protocol, ten candidate compounds (PA-1 to PA-10) were selected to evaluate the pharmacological activity. PA-8, PA-9, and PA-10 (1 nM, Fig. 6) significantly attenuated PACAP (1 nM)-induced cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation; PA-8 and PA-9 showed comparable inhibitory effect of PACAP(6-38). Overall, PA-8, PA-9, and PA-10 showed specific and potent antagonistic activities toward the PAC1R but no detectable agonistic activity toward PAC1R, VPAC1R, and VPAC2R. As these compounds also demonstrated abilities to block PACAP-mediated physiological responses, these compounds may have potential for further development.

## 7.2. Small Molecules Targeting PAC1R as Positive Allosteric Modulators

Doxycycline (Fig. 6) and minocycline from the tetracycline family are mostly known as antibiotics to treat various bacterial infections [149]. The neuroprotective effects of doxycycline have been associated with its nonantibiotic properties including inhibition of matrix metalloproteinases [150]. Recently, doxycycline and minocycline were suggested to enhance PAC1R activity in mediating the neuroprotective effects [147]. Doxycycline might affect the binding of PACAP C-terminus to the ECD domain of PAC1R, based on evidence from molecular modeling and a single-site mutation (D116A) in the linker region [147]. Given the observation of doxycycline to promote cellular proliferation, these tetracycline compounds may enhance PACAP binding to PAC1R as well as the resulted PAC1R activation, which leads to a further hypothesis of their roles as positive allosteric modulators [147]. However, how these compounds impact PAC1R signaling remains to be evaluated in detail.

## 7.3. Small-Molecule Binding Sites of PAC1R

Apart from the ECD, targeting the druggable interface of PAC1R and PACAP to mimic the orthosteric receptor activation site provides additional means to design small-molecule antagonists. The hydrazides [147], PA compounds [146], and doxycycline [147] have been studied in targeting the ECD of PAC1R based on the PACAP(6-38) – PAC1R interface [37]. From many studies, other orthosteric and allosteric GPCR sites may provide opportunities as drug targets. In addition to ECD binding to the C-terminus of PACAP, the orthosteric peptide-binding/activation pocket within the PAC1R 7TM is also promising for drug interventions. Unexpectedly, the crystal structure of CRF1R [10] has revealed that the small-molecule antagonist CP-376395 binds at deep allosteric site distinct from the orthosteric peptide-binding pocket (Fig. 6B). Further, the GCGR

antagonist MK-0893 was found to bind to the receptor at an extra-helical site between TM6 and TM7 in direct contact with the lipid bilayer (Fig. 6B) [8]. As the PAC1R may contain comparable allosteric sites, these regions may represent unique targets that can define PAC1R versus VPAC receptors specificity. Given the dynamics of the ECD and 7TM of PAC1R, there may be other sites and approaches to modulate the function of the PACAP receptor.

#### **7.4. Molecular Docking to Develop Small-Molecule PAC1R Ligands**

The knowledge of small-molecule binding sites enables computational molecular docking studies to develop new PAC1R ligands. Despite the lack of an experimentally determined 7TM structure of PAC1R, the receptor models from homology modeling have been employed [21, 147, 151]. A few amino acid residues may be key for the definition of the orthosteric binding pocket, including R199<sup>2.60</sup> in TM2, N240<sup>3.43</sup> and Y241<sup>3.44</sup> in TM3, S354<sup>6.41</sup> and H365<sup>6.52</sup> in TM6, and Y400<sup>7.57</sup> in TM7. In addition, the crystal 7TM structures of CRF1R and GCGR in complex with small molecules (PDBIDs: 4K5Y and 5EE7 respectively, Fig. 6) as well as the PACAP-bound PAC1R ECD structure (PDBID: 2JOD, Fig. 6) may provide useful details of alternative sites for docking. Notably, docking small molecules to the extra-helical site of PAC1R should be performed with caution, as ligand contacts to the lipid bilayer have to be included during sampling and scoring. Furthermore, ensemble docking (use of multiple representative receptor models) [152] and various post-processing steps [153] have been suggested to improve the accuracy of GPCR docking. With a growing understanding of the SARs, molecular docking can be expected to aid future development of effective small molecules to modulate PAC1R.

### **CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS**

In this review, we have attempted to summarize the current understanding of PAC1R structure and dynamics, PACAP/PAC1R signaling mechanisms in physiological homeostasis and maladaptive states, and recent progresses in peptide and small-molecule development to target PAC1R. PAC1Rs are involved in a variety of signaling cascades, including adenylyl cyclase, phospholipase C, MEK/ERK and Akt pathways to maintain mature CNS and PNS function. These pathways may participate in neurogenesis, neuronal protection, migration, neuronal differentiation and regeneration; the same mechanisms may be the underlying basis for their neuroprotection activities after CNS insults or neurodegeneration. Conversely, after chronic or repeated insults, the same PAC1R signaling pathways may result in maladaptive responses that can precipitate stress-related and chronic pain disorders. Thus, studies of the PACAP/PAC1R system and the signaling pathways prove new avenues and medical strategies to treat pathophysiological conditions.

Given its diverse roles, PAC1R has emerged as a potential target for therapeutics. PAC1R agonism may enhance its trophic attributes to mitigate neurodegeneration disorders, and maintain energy balance functions in the metabolic regulation against obesity and diabetes. Conversely PAC1R antagonism bears potential in treating stress-related disorders, chronic pain/migraine and other behavioral abnormalities. SAR studies for a number of PACAP/VIP analogs have identified some of the molecular determinants responsible for the recognition and activation of PAC1R as well as VPAC1/2R. A few important motifs have been determined, including a putative Asx-turn at the N-terminal segment (residues 1 to 5) and a key pharmacophore element Phe<sup>6</sup> for PAC1R

recognition and activation, Gly<sup>4</sup> - Ile<sup>5</sup> for apparent PACAP selectivity for PAC1R, and the C-terminal helix essential for PAC1R binding affinity. Among issues, peptide agonists are subject to problems in PAC1R/VPAC receptor selectivity, transport across the BBB and rapid degradation. The development of small-molecule compounds provides means to overcome some of these problems, but challenges still remain. To facilitate the future development of peptide and small-molecule reagents for PAC1R, better insights into the key pharmacophores involved in the specific activation of PAC1R signaling are still needed. In this light, PAC1R 3D structures and dynamics from computational modeling can provide novel opportunities and insights to accelerate structure-based drug design for PAC1R and other class B GPCRs in the treatment of a number of disease conditions.

## LIST OF ABBREVIATIONS

aa = amino acid

AC = adenylyl cyclase

Akt = protein kinase B or PKB

ARC = arcuate nucleus

AgRP = agouti-related peptide

BNST = bed nucleus of the stria terminalis

BBB = blood brain barrier

cAMP = cyclic adenosine monophosphate

CeA = central amygdala

CeLC = capsular division of the amygdala

CGRP = calcitonin gene-related peptide

CREB = cAMP response element binding protein

CRF1R = corticotropin-releasing factor receptor 1

cryo-EM = cryo-electron microscopy

CTR = calcitonin receptor

DAG = diacylglycerol

ECD = extracellular domain

ECL = GPCR extracellular loop (1, 2 or 3)

EPAC = exchange factor activated by cAMP

ERE = estrogen responsive element

ERK = extracellular signal-regulated kinases

G $\alpha$ q = G protein, Gq alpha subunit

G $\alpha$ s = G protein, Gs alpha subunit

G $\beta$ / $\gamma$  = G proteins, beta/gamma subunits

GPCR = G protein-coupled receptor

GCGR = glucagon receptor

GIP = gastric inhibitory peptide

GLP-1R = glucagon-like peptide 1 receptor GRK = G protein-coupled receptor kinases

ICL = GPCR intercellular loop (1, 2 or 3)

ICV = intracerebroventricular

IP3 = inositol triphosphate

MAPK = mitogen-activated protein kinase  
MC4R receptor = melanocortin 4 receptor  
MEK = mitogen-activated protein kinase kinase  
 $\alpha$ MSH =  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone  
MPP<sup>+</sup> = 1-methyl-4-phenylpyridinium  
NPY = neuropeptide Y  
NMR = nuclear magnetic resonance  
PACAP = pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide  
PACAP38 = PACAP, 38 residues  
PACAP27 = PACAP, 27 residues  
PACAP(6-38) = PACAP residues 6-38  
PAC1R = pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor  
PDBID = protein data bank identifier  
PI3K = phosphatidylinositol-3-kinase  
PIP2 = phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
PKA = protein kinase A  
PKC = protein kinase C  
PLC = phospholipase C  
POMC = pro-opiomelanocortin  
PTHr = parathyroid hormone receptor  
PTSD = posttraumatic stress disorder  
PVN = paraventricular nucleus  
RAP1 = Ras-related protein 1  
SAR = structure–activity relationship  
SON = supraoptic nucleus  
7TM = heptahelical transmembrane domain  
TM = transmembrane domain, (same as 7TM)  
VIP = Vasoactive intestinal polypeptide  
VPAC1R or VIPR1 = vasoactive intestinal polypeptide receptor 1  
VPAC2R or VIPR2 = vasoactive intestinal polypeptide receptor 2  
VMN = ventromedial hypothalamic nucleus  
3D = three-dimensional

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Research reported in this publication was supported by the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) of the National Institutes of Health (NIH) under Award Number R01GM129431 to J. L., V. M., and M. B. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH.

## REFERENCES

1. Harmar, A. J.; Fahrenkrug, J.; Gozes, I.; Laburthe, M.; May, V.; Pisegna, J. R.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Waschek, J. A.; Said, S. I., Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 4–17.
2. Bortolato, A.; Dore, A. S.; Hollenstein, K.; Tehan, B. G.; Mason, J. S.; Marshall, F. H., Structure of Class B GPCRs: new horizons for drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 3132–3145.
3. Culhane, K. J.; Liu, Y.; Cai, Y.; Yan, E. C. Y., Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 264.
4. Graaf, C.; Donnelly, D.; Wootten, D.; Lau, J.; Sexton, P. M.; Miller, L. J.; Ahn, J. M.; Liao, J.; Fletcher, M. M.; Yang, D.; Brown, A. J.; Zhou, C.; Deng, J.; Wang, M. W., Glucagon-like peptide-1 and its class B G protein-coupled receptors: A long march to therapeutic successes. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 954–1013.
5. Pal, K.; Melcher, K.; Xu, H. E., Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by Class B G-protein-coupled receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 300–311.
6. de Graaf, C.; Song, G.; Cao, C.; Zhao, Q.; Wang, M. W.; Wu, B.; Stevens, R. C., Extending the structural view of class B GPCRs. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 946–960.
7. Siu, F. Y.; He, M.; de Graaf, C.; Han, G. W.; Yang, D. H.; Zhang, Z. Y.; Zhou, C. H.; Xu, Q. P.; Wacker, D.; Joseph, J. S.; Liu, W.; Lau, J.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Wang, M. W.; Stevens, R. C., Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* **2013**, *499*, 444–451.
8. Jazayeri, A.; Doré, A. S.; Lamb, D.; Krishnamurthy, H.; Southall, S. M.; Baig, A. H.; Bortolato, A.; Koglin, M.; Robertson, N. J.; Errey, J. C.; Andrews, S. P.; Teobald, I.; Brown, A. J. H.; Cooke, R. M.; Weir, M.; Marshall, F. H., Extra-helical binding site of a glucagon receptor antagonist. *Nature* **2016**, *533*, 274–277.

9. Song, G.; Yang, D.; Wang, Y.; de Graaf, C.; Zhou, Q.; Jiang, S.; Liu, K.; Cai, X.; Dai, A.; Lin, G.; Liu, D.; Wu, F.; Wu, Y.; Zhao, S.; Ye, L.; Han, G. W.; Lau, J.; Wu, B.; Hanson, M. A.; Liu, Z.-J.; Wang, M.-W.; Stevens, R. C., Human GLP-1 receptor transmembrane domain structure in complex with allosteric modulators. *Nature* **2017**, *546*, 312–315.
10. Hollenstein, K.; Kean, J.; Bortolato, A.; Cheng, R. K. Y.; Dore, A. S.; Jazayeri, A.; Cooke, R. M.; Weir, M.; Marshall, F. H., Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* **2013**, *499*, 438–445.
11. Jazayeri, A.; Rappas, M.; Brown, A. J. H.; Kean, J.; Errey, J. C.; Robertson, N. J.; Fiez-Vandal, C.; Andrews, S. P.; Congreve, M.; Bortolato, A.; Mason, J. S.; Baig, A. H.; Teobald, I.; Doré, A. S.; Weir, M.; Cooke, R. M.; Marshall, F. H., Crystal structure of the GLP-1 receptor bound to a peptide agonist. *Nature* **2017**, *546*, 254–258.
12. Zhang, H.; Qiao, A.; Yang, D.; Yang, L.; Dai, A.; de Graaf, C.; Reedtz-Runge, S.; Dharmarajan, V.; Zhang, H.; Han, G. W.; Grant, T. D.; Sierra, R. G.; Weierstall, U.; Nelson, G.; Liu, W.; Wu, Y.; Ma, L.; Cai, X.; Lin, G.; Wu, X.; Geng, Z.; Dong, Y.; Song, G.; Griffin, P. R.; Lau, J.; Cherezov, V.; Yang, H.; Hanson, M. A.; Stevens, R. C.; Zhao, Q.; Jiang, H.; Wang, M. W.; Wu, B., Structure of the full-length glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* **2017**, *546*, 259–264.
13. Zhang, H.; Qiao, A.; Yang, L.; Van Eps, N.; Frederiksen, K. S.; Yang, D.; Dai, A.; Cai, X.; Zhang, H.; Yi, C.; Cao, C.; He, L.; Yang, H.; Lau, J.; Ernst, O. P.; Hanson, M. A.; Stevens, R. C.; Wang, M. W.; Reedtz-Runge, S.; Jiang, H.; Zhao, Q.; Wu, B., Structure of the glucagon receptor in complex with a glucagon analogue. *Nature* **2018**, *553*, 106–110.
14. Zhang, Y.; Sun, B.; Feng, D.; Hu, H.; Chu, M.; Qu, Q.; Tarrasch, J. T.; Li, S.; Sun Kobilka, T.; Kobilka, B. K.; Skiniotis, G., Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature* **2017**, *546*, 248–253.
15. Liang, Y. L.; Khoshouei, M.; Glukhova, A.; Furness, S. G. B.; Zhao, P.; Clydesdale, L.; Koole, C.; Truong, T. T.; Thal, D. M.; Lei, S.; Radjainia, M.; Danev, R.; Baumeister, W.; Wang, M. W.; Miller, L. J.; Christopoulos, A.; Sexton, P. M.; Wootten, D., Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex. *Nature* **2018**, *555*, 121–125.
16. Liang, Y. L.; Khoshouei, M.; Radjainia, M.; Zhang, Y.; Glukhova, A.; Tarrasch, J.; Thal, D. M.; Furness, S. G. B.; Christopoulos, G.; Coudrat, T.; Danev, R.; Baumeister, W.; Miller, L. J.; Christopoulos, A.; Kobilka, B. K.; Wootten, D.; Skiniotis, G.; Sexton, P. M., Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex. *Nature* **2017**, *546*, 118–123.
17. Liang, Y.-L.; Khoshouei, M.; Deganutti, G.; Glukhova, A.; Koole, C.; Peat, T. S.; Radjainia, M.; Plitzko, J. M.; Baumeister, W.; Miller, L. J.; Hay, D. L.; Christopoulos, A.; Reynolds, C. A.; Wootten, D.; Sexton, P. M., Cryo-EM structure of the active, Gs-protein complexed, human CGRP receptor. *Nature* **2018**, *561*, 492–497.
18. Spengler, D.; Waeber, C.; Pantaloni, C.; Holsboer, F.; Bockaert, J.; Seeburg, P. H.; Journot, L., Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **1993**, *365*, 170–175.

19. Braas, K. M.; May, V., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides directly stimulate sympathetic neuron neuropeptide Y release through PAC1 receptor isoform activation of specific intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27702–27710.
20. Blechman, J.; Levkowitz, G., Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: Mechanisms of fine tuning of brain activity. *Frontiers in Endocrinology* **2013**, *4*, 55.
21. Liao, C.; Zhao, X.; Brewer, M.; May, V.; Li, J., Conformational transitions of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor, a human class B GPCR. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5427.
22. Millar, R. P.; Newton, C. L., The year in G protein-coupled receptor research. *Mol. Endocrinol.* **2010**, *24*, 261–274.
23. Lebon, G.; Warne, T.; Edwards, P. C.; Bennett, K.; Langmead, C. J.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G., Agonist-bound adenosine A(2A) receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **2011**, *474*, 521–525.
24. Li, J.; Jonsson, A. L.; Beuming, T.; Shelley, J. C.; Voth, G. A., Ligand-dependent activation and deactivation of the human adenosine A(2A) receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8749–8759.
25. Liao, C.; Zhao, X.; Liu, J.; Schneebeli, S. T.; Shelley, J. C.; Li, J., Capturing the multiscale dynamics of membrane protein complexes with all-atom, mixed-resolution, and coarse-grained models. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 9181–9188.
26. Dror, R. O.; Arlow, D. H.; Maragakis, P.; Mildorf, T. J.; Pan, A. C.; Xu, H. F.; Borhani, D. W.; Shaw, D. E., Activation mechanism of the beta(2)-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 18684–18689.
27. Yuan, S. G.; Hu, Z. Q.; Filipek, S.; Vogel, H., W246(6.48) opens a gate for a continuous intrinsic water pathway during activation of the adenosine A(2A) receptor. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2015**, *54*, 556–559.
28. Latorraca, N. R.; Venkatakrishnan, A. J.; Dror, R. O., GPCR dynamics: Structures in motion. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 139–155.
29. Kohlhoff, K. J.; Shukla, D.; Lawrenz, M.; Bowman, G. R.; Konerding, D. E.; Belov, D.; Altman, R. B.; Pande, V. S., Cloud-based simulations on Google Exacycle reveal ligand modulation of GPCR activation pathways. *Nat. Chem.* **2013**, *6*, 15–21.
30. Liao, C.; May, V.; Li, J., PAC1 Receptors: Shapeshifters in Motion. *J. Mol. Neurosci.* **2018**, 1–9.
31. Beauchamp, K. A.; Bowman, G. R.; Lane, T. J.; Maibaum, L.; Haque, I. S.; Pande, V. S., MSMBuilder2: Modeling conformational dynamics on the picosecond to millisecond scale. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3412–3419.
32. Wootten, D.; Simms, J.; Miller, L. J.; Christopoulos, A.; Sexton, P. M., Polar transmembrane interactions drive formation of ligand-specific and signal pathway-biased family B G protein-coupled receptor conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5211–5216.

33. Hollenstein, K.; de Graaf, C.; Bortolato, A.; Wang, M. W.; Marshall, F. H.; Stevens, R. C., Insights into the structure of class B GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 12–22.
34. Grace, C. R. R.; Perrin, M. H.; Gulyas, J.; Rivier, J. E.; Vale, W. W.; Riek, R., 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.* **2010**, *285*, 38580–38589.
35. Parthier, C.; Kleinschmidt, M.; Neumann, P.; Rudolph, R.; Manhart, S.; Schlenzig, D.; Fanghänel, J.; Rahfeld, J.-U.; Demuth, H.-U.; Stubbs, M. T., Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13942-13947.
36. Pioszak, A. A.; Xu, H. E., Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5034-5039.
37. Sun, C. H.; Song, D. Y.; Davis-Taber, R. A.; Barrett, L. W.; Scott, V. E.; Richardson, P. L.; Pereda-Lopez, A.; Uchic, M. E.; Solomon, L. R.; Lake, M. R.; Walter, K. A.; Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T., Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-Rs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7875–7880.
38. Yang, L.; Yang, D.; de Graaf, C.; Moeller, A.; West, G. M.; Dharmarajan, V.; Wang, C.; Siu, F. Y.; Song, G.; Reedtz-Runge, S.; Pascal, B. D.; Wu, B.; Potter, C. S.; Zhou, H.; Griffin, P. R.; Carragher, B.; Yang, H.; Wang, M. W.; Stevens, R. C.; Jiang, H., Conformational states of the full-length glucagon receptor. *Nat. Comm.* **2015**, *6*, 7859.
39. Kumar, S.; Pioszak, A.; Zhang, C.; Swaminathan, K.; Xu, H. E., Crystal structure of the PAC1R extracellular domain unifies a consensus fold for hormone recognition by class B G-protein coupled receptors. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19682.
40. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B. K. C.; Hashimoto, H.; Galas, L.; Vaudry, H., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and Its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* **2009**, *61*, 283–357.
41. Miyata, A.; Jiang, L.; Dahl, R. D.; Kitada, C.; Kubo, K.; Fujino, M.; Minamino, N.; Arimura, A., Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*, 643–648.
42. Miyata, A.; Arimura, A.; Dahl, R. R.; Minamino, N.; Uehara, A.; Jiang, L.; Culler, M. D.; Coy, D. H., Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 567–574.
43. Arimura, A.; Somogyvari-Vigh, A.; Miyata, A.; Mizuno, K.; Coy, D. H.; Kitada, C., Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* **1991**, *129*, 2787–2789.
44. Sherwood, N. M.; Krueckl, S. L.; McRory, J. E., The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 619–670.

45. Robberecht, P.; Gourlet, P.; De Neef, P.; Woussen-Colle, M. C.; Vandermeers-Piret, M. C.; Vandermeers, A.; Christophe, J., 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.* **1992**, *207*, 239–246.
46. Lerner, E. A.; Iuga, A. O.; Reddy, V. B., Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides* **2007**, *28*, 1651–1654.
47. Soares, M. B.; Titus, R. G.; Shoemaker, C. B.; David, J. R.; Bozza, M., The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 1811–1816.
48. Tatsuno, I.; Uchida, D.; Tanaka, T.; Saeki, N.; Hirai, A.; Saito, Y.; Moro, O.; Tajima, M., Maxadilan specifically interacts with PAC1 receptor, which is a dominant form of PACAP/VIP family receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* **2001**, *889*, 138-148.
49. Uchida, D.; Tatsuno, I.; Tanaka, T.; Hirai, A.; Saito, Y.; Moro, O.; Tajima, M., Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type 1 receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *865*, 253–258.
50. May, V.; Parsons, R. L., G protein-coupled receptor endosomal signaling and regulation of neuronal excitability and stress responses: Signaling options and lessons from the PAC1 receptor. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 698–706.
51. Hammack, S. E.; Cheung, J.; Rhodes, K. M.; Schutz, K. C.; Falls, W. A.; Braas, K. M.; May, V., Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): Roles for PACAP in anxiety-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 833–843.
52. Ressler, K. J.; Mercer, K. B.; Bradley, B.; Jovanovic, T.; Mahan, A.; Kerley, K.; Norrholm, S. D.; Kilaru, V.; Smith, A. K.; Myers, A. J.; Ramirez, M.; Engel, A.; Hammack, S. E.; Toufexis, D.; Braas, K. M.; Binder, E. B.; May, V., Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature* **2011**, *470*, 492–497.
53. Hammack, S. E.; May, V., Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in stress-related disorders: Data convergence from animal and human studies. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 167–177.
54. Lezak, K. R.; Roman, C. W.; Braas, K. M.; Schutz, K. C.; Falls, W. A.; Schulkin, J.; May, V.; Hammack, S. E., Regulation of bed nucleus of the stria terminalis PACAP expression by stress and corticosterone. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *54*, 477–484.
55. Roman, C. W.; Lezak, K. R.; Hartsock, M. J.; Falls, W. A.; Braas, K. M.; Howard, A. B.; Hammack, S. E.; May, V., PAC1 receptor antagonism in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) attenuates the endocrine and behavioral consequences of chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* **2014**, *47*, 151–165.
56. Missig, G.; Roman, C. W.; Vizzard, M. A.; Braas, K. M.; Hammack, S. E.; May, V., Parabrachial nucleus (PBN) pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signaling in the

- amygdala: Implication for the sensory and behavioral effects of pain. *Neuropharmacology* **2014**, *86*, 38–48.
57. Missig, G.; Mei, L.; Vizzard, M. A.; Braas, K. M.; Waschek, J. A.; Ressler, K. J.; Hammack, S. E.; May, V., Parabrachial pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activation of amygdala endosomal extracellular signal-regulated kinase signaling regulates the emotional component of pain. *Biol. Psychiatry* **2017**, *81*, 671–682.
  58. Hashimoto, H.; Shintani, N.; Tanaka, K.; Mori, W.; Hirose, M.; Matsuda, T.; Sakaue, M.; Miyazaki, J.; Niwa, H.; Tashiro, F.; Yamamoto, K.; Koga, K.; Tomimoto, S.; Kunugi, A.; Suetake, S.; Baba, A., Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13355–13360.
  59. Girard, B. A.; Lelievre, V.; Braas, K. M.; Razinia, T.; Vizzard, M. A.; Ioffe, Y.; El Meskini, R.; Ronnett, G. V.; Waschek, J. A.; May, V., Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. *J. Neurochem.* **2006**, *99*, 499–513.
  60. Hattori, S.; Takao, K.; Tanda, K.; Toyama, K.; Shintani, N.; Baba, A.; Hashimoto, H.; Miyakawa, T., Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front. Behav. Neurosci.* **2012**, *6*, 58.
  61. Otto, C.; Kovalchuk, Y.; Wolfer, D. P.; Gass, P.; Martin, M.; Zuschratter, W.; Grone, H. J.; Kellendonk, C.; Tronche, F.; Maldonado, R.; Lipp, H. P.; Konnerth, A.; Schutz, G., Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 5520–5527.
  62. Stroth, N.; Eiden, L. E., Stress hormone synthesis in mouse hypothalamus and adrenal gland triggered by restraint is dependent on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling. *Neuroscience* **2010**, *165*, 1025–1030.
  63. Hatanaka, M.; Tanida, M.; Shintani, N.; Isojima, Y.; Kawaguchi, C.; Hashimoto, H.; Kakuda, M.; Haba, R.; Nagai, K.; Baba, A., Lack of light-induced elevation of renal sympathetic nerve activity and plasma corticosterone levels in PACAP-deficient mice. *Neurosci. Lett.* **2008**, *444*, 153–156.
  64. Tsukiyama, N.; Saida, Y.; Kakuda, M.; Shintani, N.; Hayata, A.; Morita, Y.; Tanida, M.; Tajiri, M.; Hazama, K.; Ogata, K.; Hashimoto, H.; Baba, A., PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress* **2011**, *14*, 368–375.
  65. Otto, C.; Martin, M.; Wolfer, D. P.; Lipp, H. P.; Maldonado, R.; Schutz, G., Altered emotional behavior in PACAP-type-I-receptor-deficient mice. *Mol. Brain Res.* **2001**, *92*, 78–84.
  66. Dias, B. G.; Ressler, K. J., PACAP and the PAC1 receptor in post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 245–246.
  67. Almlil, L. M.; Mercer, K. B.; Kerley, K.; Feng, H.; Bradley, B.; Conneely, K. N.; Ressler, K. J., ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. *Am. J. Med. Genet. B* **2013**, *162b*, B262–B272.

68. Jovanovic, T.; Norrholm, S. D.; Davis, J.; Mercer, K. B.; Almlil, L.; Nelson, A.; Cross, D.; Smith, A.; Ressler, K. J.; Bradley, B., PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype is associated with dark-enhanced startle in children. *Mol. Psychiatry*. **2013**, *18*, 742–743.
69. Uddin, M.; Chang, S. C.; Zhang, C.; Ressler, K.; Mercer, K. B.; Galea, S.; Keyes, K. M.; McLaughlin, K. A.; Wildman, D. E.; Aiello, A. E.; Koenen, K. C., Adcyap1r1 genotype, posttraumatic stress disorder, and depression among women exposed to childhood maltreatment. *Depress. Anxiety* **2013**, *30*, 251–258.
70. Wang, L.; Cao, C. Q.; Wang, R. C.; Qing, Y. L.; Zhang, J. X.; Zhang, X. Y., PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype is associated with PTSD's emotional numbing symptoms in Chinese earthquake survivors. *J. Affect. Disord.* **2013**, *150*, 156–159.
71. Pohlack, S. T.; Nees, F.; Ruttorf, M.; Cacciaglia, R.; Winkelmann, T.; Schad, L. R.; Witt, S. H.; Rietschel, M.; Flor, H., Neural mechanism of a sex-specific risk variant for posttraumatic stress disorder in the type I receptor of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 840–847.
72. Rouwette, T.; Vanelderen, P.; Roubos, E. W.; Kozicz, T.; Vissers, K., The amygdala, a relay station for switching on and off pain. *Eur. J. Pain* **2012**, *16*, 782–792.
73. Gauriau, C.; Bernard, J.-F., Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* **2002**, *87*, 251–258.
74. Otis, J. D.; Keane, T. M.; Kerns, R. D., An examination of the relationship between chronic pain and post-traumatic stress disorder. *J. Rehabil. Res. Dev.* **2003**, *40*, 397–405.
75. McFarlane, A. C.; Atchison, M.; Rafalowicz, E.; Papay, P., Physical symptoms in post-traumatic stress disorder. *J. Psychosom. Res.* **1994**, *38*, 715–726.
76. McWilliams, L. A.; Cox, B. J.; Enns, M. W., Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain* **2003**, *106*, 127–133.
77. Asmundson, G. J.; Katz, J., Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. *Depress. Anxiety* **2009**, *26*, 888–901.
78. Moeller-Bertram, T.; Keltner, J.; Strigo, I. A., Pain and post traumatic stress disorder: Review of clinical and experimental evidence. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 586–597.
79. Norman, S. B.; Stein, M. B.; Dimsdale, J. E.; Hoyt, D. B., Pain in the aftermath of trauma is a risk factor for post-traumatic stress disorder. *Psychol. Med.* **2008**, *38*, 533–542.
80. Scioli-Salter, E. R.; Forman, D. E.; Otis, J. D.; Gregor, K.; Valovski, I.; Rasmusson, A. M., The shared neuroanatomy and neurobiology of comorbid chronic pain and PTSD: Therapeutic implications. *Clin. J. Pain* **2015**, *31*, 363–374.
81. Syed, A. U.; Koide, M.; Braas, K. M.; May, V.; Wellman, G. C., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potently dilates middle meningeal arteries: implications for migraine. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 574–583.

82. Edvinsson, L.; Tajti, J.; Szalardy, L.; Vecsei, L., PACAP and its role in primary headaches. *J. Headache Pain* **2018**, *19*, 21.
83. Akerman, S.; Goadsby, P. J., Neuronal PAC1 receptors mediate delayed activation and sensitization of trigeminocervical neurons: Relevance to migraine. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 308ra157.
84. Brain, S. D.; Williams, T. J.; Tippins, J. R.; Morris, H. R.; MacIntyre, I., Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* **1985**, *313*, 54–56.
85. Lassen, L. H.; Haderslev, P. A.; Jacobsen, V. B.; Iversen, H. K.; Sperling, B.; Olesen, J., CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* **2002**, *22*, 54–61.
86. Tepper, S. J., History and review of anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP) therapies: From translational research to treatment. *Headache* **2018**, *58*, 238–275.
87. Schytz, H. W.; Birk, S.; Wienecke, T.; Kruuse, C.; Olesen, J.; Ashina, M., PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain* **2009**, *132*, 16–25.
88. Amin, F. M.; Asghar, M. S.; Guo, S.; Hougaard, A.; Hansen, A. E.; Schytz, H. W.; van der Geest, R. J.; de Koning, P. J.; Larsson, H. B.; Olesen, J.; Ashina, M., Headache and prolonged dilatation of the middle meningeal artery by PACAP38 in healthy volunteers. *Cephalalgia* **2012**, *32*, 140–149.
89. Syed, A. U.; Koide, M.; May, V.; Wellman, G. C., PACAP regulation of vascular tone: differential mechanism among vascular beds. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi, D.; Tamas, A., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 617–630.
90. Carrasquillo, Y.; Gereau, R. W. t., Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 1543–1551.
91. May, V.; Buttolph, T. R.; Girard, B. M.; Clason, T. A.; Parsons, R. L., PACAP-induced ERK activation in HEK cells expressing PAC1 receptors involves both receptor internalization and PKC signaling. *Am. J. Physiol.* **2014**, *306*, C1068–C1079.
92. Hannibal, J., Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* **2002**, *453*, 389–417.
93. Mounien, L.; Do Rego, J. C.; Bizet, P.; Boutelet, I.; Gourcerol, G.; Fournier, A.; Brabet, P.; Costentin, J.; Vaudry, H.; Jegou, S., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* **2009**, *34*, 424–435.
94. Mizuno, Y.; Kondo, K.; Terashima, Y.; Arima, H.; Murase, T.; Oiso, Y., Anorectic Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rats: Lack of evidence for involvement of hypothalamic neuropeptide gene expression. *J. Neuroendocrinol.* **1998**, *10*, 611–616.

95. Vu, J. P.; Larauche, M.; Flores, M.; Luong, L.; Norris, J.; Oh, S.; Liang, L. J.; Waschek, J.; Pisegna, J. R.; Germano, P. M., Regulation of appetite, body composition, and metabolic hormones by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *J. Mol. Neurosci.* **2015**, *56*, 377–387.
96. Vu, J. P.; Goyal, D.; Luong, L.; Oh, S.; Sandhu, R.; Norris, J.; Parsons, W.; Pisegna, J. R.; Germano, P. M., PACAP intraperitoneal treatment suppresses appetite and food intake via PAC1 receptor in mice by inhibiting ghrelin and increasing GLP-1 and leptin. *Am. J. Physiol.* **2015**, *309*, G816–G825.
97. Resch, J. M.; Boisvert, J. P.; Hourigan, A. E.; Mueller, C. R.; Yi, S. S.; Choi, S., Stimulation of the hypothalamic ventromedial nuclei by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hypophagia and thermogenesis. *Am. J. Physiol.* **2011**, *301*, R1625–R1634.
98. Resch, J. M.; Maunze, B.; Gerhardt, A. K.; Magnuson, S. K.; Phillips, K. A.; Choi, S., Intrahypothalamic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates energy balance via site-specific actions on feeding and metabolism. *Am. J. Physiol.* **2013**, *305*, E1452–E1463.
99. Krashes, M. J.; Shah, B. P.; Madara, J. C.; Olson, D. P.; Strohlic, D. E.; Garfield, A. S.; Vong, L.; Pei, H.; Watabe-Uchida, M.; Uchida, N.; Liberles, S. D.; Lowell, B. B., An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature* **2014**, *507*, 238–242.
100. Yi, C.-X.; Sun, N.; Ackermans, M. T.; Alkemade, A.; Foppen, E.; Shi, J.; Serlie, M. J.; Buijs, R. M.; Fliers, E.; Kalsbeek, A., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glucose production via the hepatic sympathetic innervation in rats. *Diabetes* **2010**, *59*, 1591–1600.
101. Yamamoto, J.; Imai, J.; Izumi, T.; Takahashi, H.; Kawana, Y.; Takahashi, K.; Kodama, S.; Kaneko, K.; Gao, J.; Uno, K.; Sawada, S.; Asano, T.; Kalinichenko, V. V.; Susaki, E. A.; Kanzaki, M.; Ueda, H. R.; Ishigaki, Y.; Yamada, T.; Katagiri, H., Neuronal signals regulate obesity induced beta-cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism. *Nat. Comm.* **2017**, *8*, 1930.
102. Tatsuno, I.; Morio, H.; Tanaka, T.; Uchida, D.; Hirai, A.; Tamura, Y.; Saito, Y., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a regulator of astrocytes: PACAP stimulates proliferation and production of interleukin 6 (il-6), but not nerve growth factor (NGF), in cultured rat astrocyte. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *805*, 482–488.
103. Lu, N.; Zhou, R.; DiCicco-Bloom, E., Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms. *J. Neurosci. Res.* **1998**, *53*, 651–662.
104. Mercer, A.; Ronnholm, H.; Holmberg, J.; Lundh, H.; Heidrich, J.; Zachrisson, O.; Ossoinak, A.; Frisen, J.; Patrone, C., PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *76*, 205–215.
105. Vaudry, D.; Gonzalez, B. J.; Basille, M.; Fournier, A.; Vaudry, H., Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9415–9420.
106. Allais, A.; Burel, D.; Isaac, E. R.; Gray, S. L.; Basille, M.; Ravni, A.; Sherwood, N. M.; Vaudry, H.; Gonzalez, B. J., Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *25*, 2604–2618.

107. Manecka, D.-L.; Boukhzar, L.; Falluel-Morel, A.; Lihrmann, I.; Anouar, Y., PACAP Signaling in Neuroprotection. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, Reglodi, D.; Tamas, A., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 549–561.
108. Reglodi, D.; Tamas, A.; Jungling, A.; Vaczy, A.; Rivnyak, A.; Fulop, B. D.; Szabo, E.; Lubics, A.; Atlasz, T., Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide against neurotoxic agents. *Neurotoxicology* **2018**, *66*, 185–194.
109. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Basille, M.; Pamantung, T. F.; Fontaine, M.; Fournier, A.; Vaudry, H.; Gonzalez, B. J., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *72*, 303–316.
110. Falluel-Morel, A.; Aubert, N.; Vaudry, D.; Basille, M.; Fontaine, M.; Fournier, A.; Vaudry, H.; Gonzalez, B. J., Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **2004**, *91*, 1231–1243.
111. Reglodi, D.; Vaczy, A.; Rubio-Beltran, E.; MaassenVanDenBrink, A., Protective effects of PACAP in ischemia. *J. Headache Pain* **2018**, *19*, 19.
112. Ohtaki, H.; Nakamachi, T.; Dohi, K.; Aizawa, Y.; Takaki, A.; Hodoyama, K.; Yofu, S.; Hashimoto, H.; Shintani, N.; Baba, A.; Kopf, M.; Iwakura, Y.; Matsuda, K.; Arimura, A.; Shioda, S., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7488–7493.
113. Zhang, Y.; Malmberg, A. B.; Yaksh, T. L.; Sjölund, B.; Sundler, F.; Håkanson, R., Capsaicin-evoked release of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) from rat spinal cord in vivo. *Regul. Pept.* **1997**, *69*, 83–87.
114. Nakamachi, T.; Ohtaki, H.; Yofu, S.; Dohi, K.; Watanabe, J.; Hayashi, D.; Matsuno, R.; Nonaka, N.; Itabashi, K.; Shioda, S., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) co-localizes with activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brains. *Regul. Pept.* **2008**, *145*, 88–95.
115. Gillardon, F.; Hata, R.; Hossmann, K.-A., Delayed up-regulation of Zac1 and PACAP type I receptor after transient focal cerebral ischemia in mice. *Mol. Brain Res.* **1998**, *61*, 207–210.
116. Brifault, C.; Gras, M.; Liot, D.; May, V.; Vaudry, D.; Wurtz, O., Delayed pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide delivery after brain stroke improves functional recovery by inducing M2 microglia/macrophage polarization. *Stroke* **2015**, *46*, 520–528.
117. Dejda, A.; Sokolowska, P.; Z Nowak, J., *Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI*. 1999; Vol. 57, p 307–320.
118. Silveira, M. S.; Costa, M. R.; Bozza, M.; Linden, R., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16075–16080.
119. Róth, E.; Wéber, G.; Kiss, P.; Horváth, G.; Tóth, G.; Gasz, B.; Ferencz, A.; Gallyas, F.; Reglodi, D.; Rácz, B., Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1163*, 512–516.

120. Laszlo, E.; Juhasz, T.; Varga, A.; Czibere, B.; Kovacs, K.; Degrell, P.; Horvath, G.; Jancso, G.; Szakaly, P.; Tamas, A.; Reglodi, D., Protective effect of PACAP on ischemia/reperfusion-induced kidney injury of male and female rats: Gender differences. *J. Mol. Neurosci.* **2018**, 1–12.
121. Ferencz, A.; Kiss, P.; Weber, G.; Helyes, Z.; Shintani, N.; Baba, A.; Reglodi, D., Comparison of Intestinal warm ischemic injury in PACAP knockout and wild-type mice. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *42*, 435–442.
122. Ferencz, A.; Weber, G.; Helyes, Z.; Hashimoto, H.; Baba, A.; Reglodi, D., Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *42*, 428–434.
123. Wang, G.; Qi, C.; Fan, G.-H.; Zhou, H.-Y.; Chen, S.-D., PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 4005–4011.
124. Deguil, J.; Jailloux, D.; Page, G.; Fauconneau, B.; Houeto, J.-L.; Philippe, M.; Muller, J.-M.; Pain, S., Neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in MPP<sup>+</sup>-induced alteration of translational control in Neuro-2a neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85*, 2017–2025.
125. Reglódi, D.; Lubics, A.; Tamás, A.; Szalontay, L.; Lengvári, I., Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* **2004**, *151*, 303–312.
126. Reglódi, D.; Tamás, A.; Lubics, A.; Szalontay, L.; Lengvári, I., Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul. Pept.* **2004**, *123*, 85–94.
127. Onoue, S.; Endo, K.; Ohshima, K.; Yajima, T.; Kashimoto, K., The neuropeptide PACAP attenuates  $\beta$ -amyloid (1–42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* **2002**, *23*, 1471–1478.
128. Rat, D.; Schmitt, U.; Tippmann, F.; Dewachter, I.; Theunis, C.; Wiczczak, E.; Postina, R.; Leuven, F. v.; Fahrenholz, F.; Kojro, E., Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *FASEB J.* **2011**, *25*, 3208–3218.
129. Cabezas-Llobet, N.; Vidal-Sancho, L.; Masana, M.; Fournier, A.; Alberch, J.; Vaudry, D.; Xifro, X., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) enhances hippocampal synaptic plasticity and improves memory performance in Huntington's disease. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 8263–8277.
130. Bourgault, S.; Chatenet, D.; Wurtz, O.; Doan, N. D.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Fournier, A.; Vaudry, D., Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 1002–1024.
131. Bourgault, S.; Vaudry, D.; Dejda, A.; Doan, N. D.; Vaudry, H.; Fournier, A., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective peptide. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4462–4480.

132. Doan, N. D.; Bourgault, S.; Dejda, A.; Letourneau, M.; Detheux, M.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Chatenet, D.; Fournier, A., Design and in vitro characterization of PAC1/VPAC1-selective agonists with potent neuroprotective effects. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 552–561.
133. Bourgault, S.; Vaudry, D.; Segalas-Milazzo, I.; Guilhaudis, L.; Couvineau, A.; Laburthe, M.; Vaudry, H.; Fournier, A., Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3308–3316.
134. Ramos-Alvarez, I.; Mantey, S. A.; Nakamura, T.; Nuche-Berenguer, B.; Moreno, P.; Moody, T. W.; Maderdrut, J. L.; Coy, D. H.; Jensen, R. T., A structure-function study of PACAP using conformationally restricted analogs: Identification of PAC1 receptor-selective PACAP agonists. *Peptides* **2015**, *66*, 26–42.
135. Onoue, S.; Waki, Y.; Nagano, Y.; Satoh, S.; Kashimoto, K., The neuromodulatory effects of VIP/PACAP on PC-12 cells are associated with their N-terminal structures. *Peptides* **2001**, *22*, 867–872.
136. Inooka, H.; Ohtaki, T.; Kitahara, O.; Ikegami, T.; Endo, S.; Kitada, C.; Ogi, K.; Onda, H.; Fujino, M.; Shirakawa, M., Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 161–165.
137. Neumann, J. M.; Couvineau, A.; Murail, S.; Lacapere, J. J.; Jamin, N.; Laburthe, M., Class B GPCR activation: Is ligand helix-capping the key? *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 314–319.
138. Lamine, A.; Letourneau, M.; Doan, N. D.; Maucotel, J.; Couvineau, A.; Vaudry, H.; Chatenet, D.; Vaudry, D.; Fournier, A., Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. *Neuropharmacology* **2016**, *108*, 440–450.
139. Igarashi, H.; Ito, T.; Pradhan, T. K.; Mantey, S. A.; Hou, W.; Coy, D. H.; Jensen, R. T., Elucidation of the vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC(2) receptors in human and rat and comparison to the pharmacophore for VPAC(1) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 445–460.
140. Gourlet, P.; Vandermeers-Piret, M. C.; Rathe, J.; De Neef, P.; Cnudde, J.; Robberecht, P.; Waelbroeck, M., Vasoactive intestinal peptide modification at position 22 allows discrimination between receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *348*, 95–99.
141. Poujol de Molliens, M.; Letourneau, M.; Devost, D.; Hebert, T. E.; Fournier, A.; Chatenet, D., New insights about the peculiar role of the 28-38 C-terminal segment and some selected residues in PACAP for signaling and neuroprotection. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *154*, 193–202.
142. Beebe, X.; Darczak, D.; Davis-Taber, R. A.; Uchic, M. E.; Scott, V. E.; Jarvis, M. F.; Stewart, A. O., Discovery and SAR of hydrazide antagonists of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor type 1 (PAC(1)-R). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2162–2166.
143. Wacker, D.; Stevens, R. C.; Roth, B. L., How ligands illuminate GPCR molecular pharmacology. *Cell* **2017**, *170*, 414–427.

144. Kufareva, I.; Katritch, V.; Stevens, Raymond C.; Abagyan, R., Advances in GPCR modeling dvaluated by the GPCR Dock 2013 assessment: Meeting new challenges. *Structure* **2014**, *22*, 1120–1139.
145. Willard, F. S.; Bueno, A. B.; Sloop, K. W., Small molecule drug discovery at the glucagon-like peptide-1 receptor. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, *2012*, 709893.
146. Takasaki, I.; Watanabe, A.; Yokai, M.; Watanabe, Y.; Hayakawa, D.; Nagashima, R.; Fukuchi, M.; Okada, T.; Toyooka, N.; Miyata, A.; Gouda, H.; Kurihara, T., In silico screening identified novel small-molecule antagonists of PAC1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *365*, 1–8.
147. Yu, R.; Zheng, L.; Cui, Y.; Zhang, H.; Ye, H., Doxycycline exerted neuroprotective activity by enhancing the activation of neuropeptide GPCR PAC1. *Neuropharmacology* **2015**, *103*, 1–15.
148. Chu, A.; Caldwell, J. S.; Chen, Y. A., Identification and characterization of a small molecule antagonist of human VPAC(2) receptor. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 95–101.
149. Chopra, I.; Roberts, M., Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 232–260.
150. Bortolanza, M.; Nascimento, G. C.; Socias, S. B.; Ploper, D.; Chehín, R. N.; Raisman-Vozari, R.; Del-Bel, E., Tetracycline repurposing in neurodegeneration: focus on Parkinson’s disease. *J. Neural. Transm.* **2018**, *125*, 1403–1415.
151. Yu, R.; Zheng, L.; Cui, Y.; Zhang, H.; Ye, H., Doxycycline exerted neuroprotective activity by enhancing the activation of neuropeptide GPCR PAC1. *Neuropharmacology* **2016**, *103*, 1–15.
152. Amaro, R. E.; Baudry, J.; Chodera, J.; Demir, Ö.; McCammon, J. A.; Miao, Y.; Smith, J. C., Ensemble docking in drug discovery. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 2271–2278.
153. Beuming, T.; Lenselink, B.; Pala, D.; McRobb, F.; Repasky, M.; Sherman, W., Docking and virtual screening strategies for GPCR drug discovery. In *G Protein-Coupled Receptors in Drug Discovery: Methods and Protocols*, Filizola, M., Ed. Springer New York: New York, NY, 2015; pp 251–276.