

Université de Montréal

**MODULATION ALLOSTÉRIQUE DE LA FONCTION
DES RÉCEPTEURS FP ET PAF**

Par

Dario Antonio Bivona

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Science (M. Sc.)
en Pharmacologie

Juillet, 2009

© Dario Antonio Bivona, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**MODULATION ALLOSTÉRIQUE DE LA FONCTION
DES RÉCEPTEURS FP ET PAF**

présenté par :
Dario Antonio Bivona

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Hélène Girouard, président-rapporteur
Dre Audrey Claing, directrice de recherche
Dr Nicolaus Heveker, co-directeur de recherche
Dr Eric Thorin, membre du jury

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPGs) constituent la première étape d'une série de cascades signalétiques menant à la régulation d'une multitude de processus physiologiques. Dans le modèle classique connu, la liaison du ligand induit un changement de conformation du récepteur qui mène à sa forme active. Une fois activés, les RCPGs vont réguler l'activité d'une protéine membranaire cible qui peut être tant une enzyme qu'un canal ionique. L'interaction entre le récepteur et la cible nécessite l'intermédiaire d'une protéine hétérotrimérique appelée « *protéine G* », qui est activée pour favoriser l'échange du GDP (guanosine diphosphate) pour un GTP (guanosine triphosphate) et assurer la transduction du signal du récepteur à l'effecteur. Les mécanismes moléculaires menant à l'activation des effecteurs spécifiques via l'activation des RCPGs par les protéines G hétérotrimériques sont encore plutôt méconnus.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux récepteurs FP et PAF, à leurs ligands naturels, la PGF₂ α et le Carbamyl-PAF respectivement, et à des ligands à action antagoniste sur ces récepteurs. Des ligands considérés comme agonistes, sont des molécules qui interagissent avec le récepteur et induisent les mêmes effets que le ligand naturel. Les antagonistes, par contre, sont des molécules qui interagissent avec le récepteur et bloquent l'action du ligand naturel en prévenant le changement conformationnel du complexe, et ils peuvent avoir une action compétitive ou non-compétitive.

Nous avons étudié aussi des ligands orthostériques et allostériques du récepteur FP des prostaglandines et du récepteur PAF. Un ligand orthostérique peut se comporter comme agoniste ou antagoniste en se fixant au site de liaison du ligand (agoniste) naturel. Un ligand allostérique est un agoniste ou antagoniste se fixant à un site autre que celui du ligand naturel entraînant un changement de conformation ayant pour conséquence soit une augmentation (effecteur positif), soit une diminution (effecteur négatif) de l'activité du ligand naturel.

Mots-clés: Remodelage du cytosquelette d'actine, récepteur couplé aux protéines G, récepteur allostérique, récepteur FP, récepteur PAF, agoniste/antagoniste allostérique, Rac1, ARF6.

Abstract

G protein coupled receptors (GPCRs) are involved in the first step of most signalling pathways that regulate a variety of physiological events. The classical view of GPCR activation suggests that ligand binding to the inactive receptor will trigger a conformational change leading to an active conformation of the receptor. The GPCRs activated regulate the activity of a target membrane protein which can then activate other signalling proteins such as enzymes and ionic channels. The interaction between the receptor and the target requires an intermediary, in this case an heterotrimeric protein named « *G protein* », which is activated in order to facilitate the exchange of GDP (guanosine diphosphate) for a GTP (guanosine triphosphate) and allow the transduction of the signal from the receptor to the effector. The molecular mechanisms leading to the activation of signalling effectors via the activation of GPCRs by its heterotrimeric G protein have not yet been well characterized.

We focused our study on two GPCRs, the FP and PAF receptors, their natural ligands, PGF2 α and Carbamyl-PAF respectively, and their antagonist ligands. Agonists are ligands that bind to the target receptor and trigger the same effects as the natural ligand of the GPCR. In contrast with agonists, antagonist ligands are molecules that prevent the effects of the natural ligand by keeping the GPCR from changing to its active conformation and can be competitive or non-competitive.

We have also studied orthosteric and allosteric ligands of the FP and PAF receptors. An orthosteric ligand binds the same site as the natural ligand of the receptor and can act as an agonist or an antagonist. In the contrary, an allosteric ligand will rather have a different binding site than the natural ligand (agonist) and can positively or negatively modulate the effects of the natural ligand.

Keywords: Remodelling of the actin cytoskeleton, G protein coupled receptor, allosteric receptor, FP receptor, PAF receptor, allosteric agonist/antagonist, Rac1, ARF6.

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
1.1 Récepteurs couplés aux protéines G	1
1.1.1 Structure et classification des RCPGs	1
1.1.2 Rôle et signalisation des RCPGs	5
1.1.2.1. Désensibilisation des RCPGs	9
1.1.2.2. Internalisation des RCPGs	10
1.2. Prostaglandines : Synthèse, fonctions et utilisations thérapeutiques	12
1.2.1. La prostaglandine F _{2α} (PGF _{2α}) : ligand naturel du FPR	16
1.2.2. Récepteur FP des prostaglandines (FPR)	19
1.2.2.1. Structure du FPR	19
1.2.2.2. Fonctions biologiques du FPR	20
1.3. Agonistes et antagonistes : ligands allostériques	21
1.4. Le facteur activant les plaquettes (PAF)	25
1.4.1. Fonctions biologiques du PAF	28
1.4.2. Structure du PAF	29
1.4.3. Récepteur du facteur activant les plaquettes (PAFR)	30
1.5. Les protéines ARF et Rho	33
1.5.1. Les protéines de la famille des ARF	33
1.5.2. Rôle d'ARF6	36
1.5.3. Les protéines de la famille des Rho	36
1.5.4. Fonctions des protéines Rho : rôle de Rac1	38
1.6. Projet et hypothèse de recherche	44

2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	46
2.1.	Réactifs et anticorps	46
2.2.	Culture cellulaire	47
2.3.	Microscopie confocale	47
2.4.	Migration cellulaire	47
2.5.	Production des protéines de fusion GST-GGA3 et GST-PAK	48
2.6.	Essais d'activation d'ARF6 et Rac1 dans des cellules HEK293 HA-FP	49
3.	RÉSULTATS	50
3.1.	Étude de la réponse du récepteur FP suite à la stimulation par différents ligands	50
3.1.1.	Réaction du récepteur FP à son ligand naturel, la PGF2 α	50
3.1.2.	Réponse du récepteur FP suite à la stimulation par l'AL-8810, le THG113 et le THG113.824	53
3.2.	Étude de la réponse du récepteur PAF suite à la stimulation par différents ligands	57
3.2.1.	Réaction du récepteur PAF à son ligand naturel, le Carbamyl PAF	57
3.2.2.	Réponse du récepteur PAF suite à la stimulation par d'autres ligands, dont l'ABT-491	59
3.3.	Migration cellulaire des cellules stables au récepteur FP et des cellules stables au récepteur PAF	67

3.4.	Activation des protéines Rac1 et ARF6 suite à la stimulation par la PGF2 α	69
4.	DISCUSSION	71
4.1.	Le récepteur FP des prostaglandines	71
4.2.	Le récepteur PAF	75
5.	CONCLUSION	77
6.	RÉFÉRENCES	78

Liste des figures

Figure 1 : Modélisation du récepteur bovin de la rhodopsine	2
Figure 2 : Modèles en deux et en trois dimensions du récepteur bovin de la rhodopsine	3
Figure 3 : Activation des protéines G : le cycle GTPase	6
Figure 4 : Diversité des sous unités Gα des protéines G	7
Figure 5 : Dimère β/γ	8
Figure 6 : Synthèse et actions des prostaglandines	13
Figure 7 : Structure chimique de la PGF2α	17
Figure 8 : Structure du récepteur FP sur la base du model bovin	19
Figure 9 : Régulation allostériques des récepteurs	22
Figure 10 : Structure du THG113	23
Figure 11 : Structure du THG113.824	24
Figure 12 : Structure chimique du PAF	26
Figure 13 : Biosynthèse du PAF-acéther	27
Figure 14 : Schéma synthétique des voies de transduction du PAFR	31
Figure 15 : Structure cristalline d'ARF6 liée au GTP	34
Figure 16 : Les différents membres de la famille Rho chez l'homme	37
Figure 17 : Effets des protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 sur le cytosquelette d'actine dans des fibroblastes Swiss3T3	40

Figure 18 : Morphologie des cellules HEK293 stables au récepteur FP des prostaglandines et des HEK293 stables au récepteur de l'angiotensine, stimulées respectivement avec la PGF2α (0,1μM) et l'AngII (0,1μM)	52
Figure 19 : Effet des antagonistes AL-8810, THG113 et THG113.824 sur les cellules HEK293 HA-FP	54
Figure 20 : Ondulation membranaire en pourcentage suite à la stimulation par la PGF2α seule, ou avec les différents antagonistes	56
Figure 21 : Stimulation des HEK293 HA-PAF par le C-PAF	57
Figure 22 : Pourcentage de cellules qui ont répondu, qui n'ont pas répondu et qui sont mortes suite au traitement par le Carbamyl-PAF	58
Figure 23 : Stimulation des HEK293 HA-PAF par le BN52021	60
Figure 24 : Stimulation des HEK293 HA-PAF par le CV-3988	61
Figure 25 : Stimulation des HEK293 HA-PAF par l'Octylonium Bromide	62
Figure 26 : Stimulation des HEK293 HA-PAF par le FR-49175	63
Figure 27 : Stimulation des HEK293 HA-PAF par le PCA-4248	64
Figure 28 : Stimulation des HEK293 HA-PAF par l'ABT-491	65
Figure 29 : Capacité des antagonistes à bloquer le remodelage du cytosquelette d'actine	66
Figure 30 : Migration cellulaire des HEK293 HA-FP et des HEK293 HA-PAF	68
Figure 31 : Activation de Rac1 suite à la stimulation par la PGF2α	69

Figure 32 : Activation d'ARF6 suite à la stimulation par la PGF2 α

Liste des abréviations

AAGPC : alkyl acyl glycéro phosphocholine

AC : adénylate cyclase

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AngII : angiotensine II

AP-2 : protéine adaptatrice 2

ARF : facteur d'ADP-ribosylation

Arg : arginine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNO : ARF nucleotide binding site opener

Asp : acide aspartique

ATP : adénosine triphosphate

ATR : récepteur de l'angiotensine

βAR : récepteur β-adrénergique

BSA : albumine de sérum bovin

CCV : vésicule tapissée de clathrine

CD2, 3 et 4 : cluster de différenciation 2, 3 et 4

COX1 et 2 : cyclo-oxygénases 1 et 2

CRF : facteur libérant la corticotropine

DAG : diacylglicérol

DP : récepteur de la prostaglandine D

EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique

EP : récepteur de la prostaglandine E

FBS : sérum bovin foetal

FDA : Food and Drug Administration

FITC : isothiocyanate de fluorescéine
FP : récepteur de la prostaglandine F
FSH : hormone folliculo-stimulante
GABA_BR : récepteur de type B de l'acide γ -aminobutyrique
GAP : protéine activatrice de GTPase
GDP : guanosine diphosphate
GED : domaine effecteur GTPase
GEF : facteur d'échange guanylique
GGA3 : Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF-binding protein 3
GHRH : hormone libérant l'hormone de croissance
GIP :
Gly : glycine
GnRH : hormone libérant les gonadotrophines
GRKs : kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G
GST : Glutathion-S-transférase
GTP : guanosine triphosphate
hCG : gonadotrophine chorionique humaine
HEK293: Human embryonic kidney cell
His : histidine
I κ B : inhibiteur de kB
IKK : I κ B kinase
IP : récepteur de la prostacycline I
IP₃ : inositol triphosphate
LH : hormone lutéinisante
lyso-PAF : 1-O-alkyl-sn-glycérol-3-phosphorylcholine
MAPK : protéine kinase activé par des mitogènes
MEM : milieu minimal essential
MeOH : méthanol

mGluR : récepteur métabotropique du glutamate
NF- κ B : facteur nucléaire - kappa B
NSAID : médicament anti-inflammatoire non-steroidal
NCCV : vésicule non-tapissée de clathrine
NEAA : acide aminé non essentiel
PAF: platelet activating factor
PAFR: récepteur du PAF
PAK : kinase p21 activée
PGD2 : prostaglandine D2
PGDS : prostaglandine synthase D
PGF2 : prostaglandine F2
PGF2 α : prostaglandine F2 α
PGE2 : prostaglandine E2
PGES : prostaglandine synthase E
PGFS : prostaglandine synthase F
PGG2 : prostaglandine endoperoxydase G2
PGH2 : prostaglandine endoperoxydase H2
PGHS1 et 2 : prostaglandine endoperoxydase H synthases 1 et 2
PGI2 : prostacycline I2
PGIS : prostacycline synthase I
PGJ2 : prostaglandine J2
PGs : prostaglandine
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) biphosphate
PI(3,4,5)P₃ : phosphatidylinositol-(3,4,5) triphosphate
PLA₂ : phospholipase A₂ ()
PLC : phospholipase C

PLD : phospholipase D

PPAR : récepteur activé de prolifération des peroxysomes

PPI : phosphoinositides

PTH : hormone parathyroïdienne

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

Ser : sérine

TAS1 : récepteur du goût de type 1

Thr : thréonine

TNF α : facteur de nécrose tumorale α

TP : récepteur du thromboxane A2

TSH : thyrotropine

TxA2 : thromboxane A2

TxAS : thromboxane synthase

VIP : peptide vasoactif intestinal

*Je dédie cet ouvrage à mes parents,
Alberto Bivona et Maddalena Corigliano,
et à mon frère, Tiziano. Merci de m'avoir
toujours soutenu dans mes projets.*

Remerciements

Mes premiers mots de remerciement s'adressent à ma directrice de recherche, Audrey Claing, qui a toujours été disponible, généreuse et compréhensive. Merci de m'avoir si bien accueilli au laboratoire et de m'avoir permis d'approfondir mes connaissances. Je me sens privilégié d'avoir travaillé avec toi et d'avoir bénéficié de ton expertise professionnelle. Merci pour ta confiance et ton soutien, pour m'avoir dirigé dans mes recherches et dans tous mes choix de carrière.

J'aimerais également remercier toute l'équipe du laboratoire. Chacun d'entre vous m'a appris quelque chose. Merci à Zeinab de toujours savoir où trouver ce qu'on cherche et d'avoir été toujours extrêmement gentille avec moi. Merci à Matthieu et à Pierre-Luc pour m'avoir fait faire le saut à plusieurs reprises avec vos embuscades, et merci surtout d'avoir été de bon co-équipiers toujours souriants et avec la musique dans l'âme! Merci à Derek pour sa disponibilité et sa patience pour avoir toujours essayé de parler en français avec moi.

Je tiens aussi à remercier mon co-directeur, Nikolaus Heveker, qui m'a donné la chance de participer à ce projet et qui m'a reçu dans son laboratoire pour une partie de mes études. Merci de m'avoir appris à travailler dans un laboratoire de niveau III. Un grand remerciement aussi à toute son équipe, en particulier à Yamina, qui a été toujours présente pour moi.

Merci également à Stéphane Laporte, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis d'utiliser ses équipements, et à Christian Le Guill, qui a toujours été à l'écoute pour répondre à mes questions sur les cellules et les produits.

J'adresse un merci tout spécial à mes parents, mon frère et ma tante Floriana qui m'ont toujours aimé, encouragé et conseillé.

Un grand merci aussi à mes amis Elisa et Raoul qui ont toujours été proches et prêts à résoudre tous problèmes informatiques de dossiers word corrompus! La vie à Montréal n'aurait pas été la même sans votre amour, votre soutien et votre présence. Merci pour tous les beaux moments passés ensemble.

Je tiens à remercier ma meilleure amie, Lara, que je connais depuis très longtemps et qui est comme une sœur pour moi. Merci d'être toujours à mes côtés moralement, de me faire rire quand je suis triste, de me calmer quand je suis stressé, de m'aimer toujours, même quand je ne suis pas le meilleur des amis!

Merci également à Joséane et Tristan qui m'ont toujours encouragé... *go go go go go go go!!!* Je suis heureux de vous avoir croisés dans mon chemin et de vous compter parmi les amis les plus chers.

Merci aussi à Daniela avec qui j'ai partagé mes problèmes et mes joies, merci d'être une amie et une confidente précieuse.

Pour finir, j'aimerais remercier mon ami Yves Jean qui a toujours été patient avec moi, qui m'a encouragé sans relâche et qui a toujours cru en moi. Merci d'être une si belle personne sur qui je peux toujours compter.

Grazie a tutti voi di essermi stati vicini in questi anni di studio e di vita, senza la vostra presenza, il vostro sostegno e il vostro amore non sarei quello che sono!

1. Introduction

1.1. Récepteurs couplés aux protéines G

Trois à six pour cent des gènes d'un organisme codent pour des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), ce qui en fait la plus grande famille de protéines membranaires répertoriée à ce jour (1). Chez les vertébrés cette famille compte plus de 2% du génome (2), 5% chez le *C. Elegans* (3) et elle est présente dans une multitude d'organismes tels que les protozoaires, les levures (4) et les plantes (5). Les RCPGs sont capables d'assurer la reconnaissance et la transduction de messages aussi variés que ceux des acides aminés (acide glutamique, etc.), des peptides (angiotensine, neurotensine, somatostatine, etc.), des protéines (thyrotropine ou TSH, hormone folliculo-stimulante ou FSH, etc.), des amines (acétylcholine, adrénaline, sérotonine, etc.), des lipides (prostaglandines, leukotriènes, etc.) des nucléotides et des nucléosides (adénosine ou ATP). Les ions (Ca^{++}), les molécules odorantes et gustatives, les photons et les phéromones font partie également des signaux extracellulaires reconnus par les RCPGs (6).

1.1.1. Structure et classification des RCPGs

La plupart de nos connaissances concernant la structure des RCPGs viennent de la cristallisation du récepteur de la rhodopsine (Fig.1) (7). Les RCPG sont des protéines à sept domaines transmembranaires (TM1 à TM7) possédant une structure en hélice α , reliés par trois boucles externes (E1, E2 et E3) et trois boucles internes (I1, I2 et I3), avec une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire (Fig. 2) (8). Cette structure secondaire, fondée sur l'analyse d'hydrophatie, est spéculative pour la majorité des RCPGs. L'analyse en microscopie électronique de la rhodopsine, à l'état de cristal bidimensionnel, a permis de définir la morphologie de ce récepteur et de confirmer la présence des sept domaines transmembranaires (9). Ces sept segments transmembranaires constituent le « corps central » de ces récepteurs et leur longueur avec celle des trois boucles extracellulaires sont reconnues comme

étant essentiellement identiques chez une majorité de RCPGs. Les variations dans les autres régions seraient à la base de la spécificité de chacun des récepteurs (7). Le changement de conformation du « corps central », qui fait suite à la liaison du ligand, est responsable de l'activation des RCPGs (10).

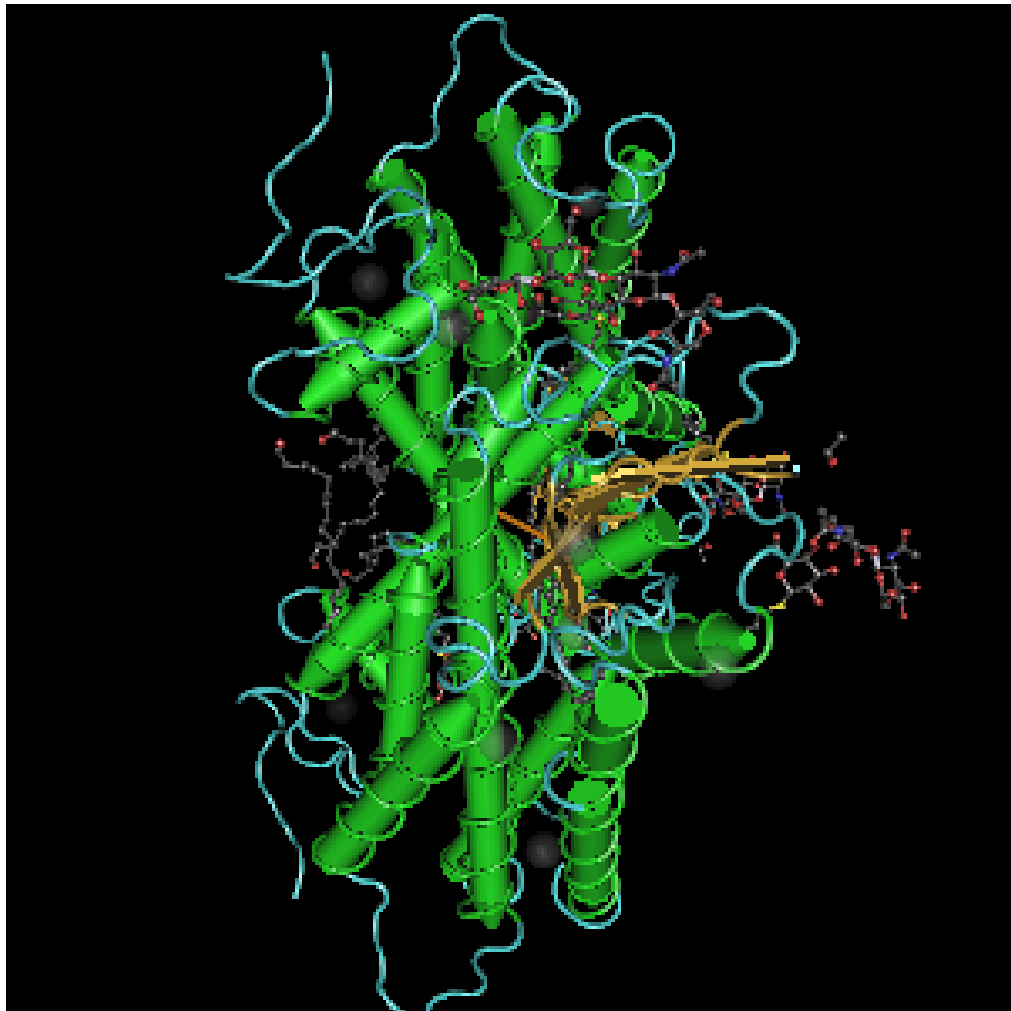
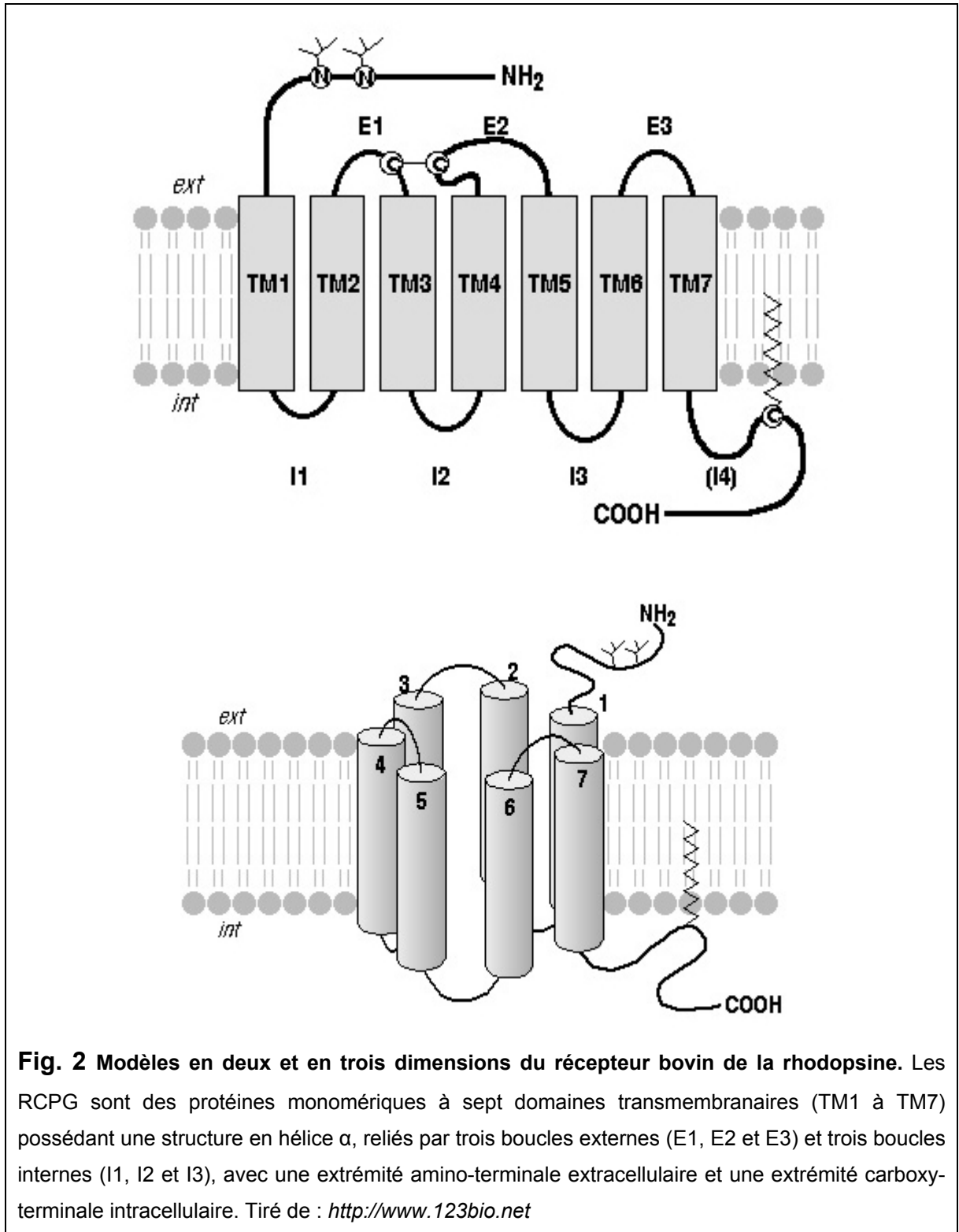


Fig. 1 Modélisation du récepteur bovin de la rhodopsine. Tiré de : *Palczewski, et al., Science, 2000.*



Même si la structure à sept segments hydrophobes transmembranaires est commune aux RCPGs, les études phylogéniques ont démontré que ces récepteurs n'ont pas évolué à partir d'une origine commune. Pour cette raison, plusieurs systèmes de classification ont été mis en place pour organiser cette superfamille de récepteurs en sous-familles selon leurs caractéristiques structurales communes et distinctives (11). Le système de classification le plus utilisé actuellement répartie les RCPGs en six classes (familles) : A, B, C, D, E et F (12, 13). La plupart des RCPGs qui se retrouvent dans les vertébrés sont classifiés dans les familles A, B et C.

Un autre système de classification des RCPGs humains est le système GRAFS, basé sur des analyses phylogéniques. Le système GRAFS contient cinq familles : Glucagon, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Smoothed et Secretin (11, 14).

La famille A ou famille des récepteurs « *Rhodopsin-like* » contient plus de 700 membres incluant les récepteurs olfactifs ainsi que plusieurs récepteurs orphelins dont les ligands ne sont pas encore aujourd'hui connus (11). Cette famille peut être sous-divisée en plusieurs sous-groupes. Le groupe 1a contient les RCPGs liant des petits ligands dont le site de liaison est situé dans une cavité formée par les domaines TM-III et TM-VI. Les RCPGs du groupe 1b ont comme ligands des peptides qui se lient aux domaines extracellulaires (tel que la queue N-terminale par exemple). Le groupe 1c est composé par les récepteurs de glycoprotéines (LH, FSH, TSH et LG) et il est caractérisé par la position de son site de liaison dans un large domaine N-terminal (rare pour les RCPGs de la famille A) (10).

La famille B des RCPGs, appelée aussi famille des récepteurs « *secretin-like* », contient environ vingt membres dont les récepteurs des hormones gastro-intestinales (sécrétine, VIP, GIP, glucagon et GHRH) et des neuropeptides (PTH, calcitonine et CRF) (11). Les RCPGs de la famille B sont caractérisés par un domaine N-terminal large d'environ une centaine d'acides aminés, contenant

plusieurs résidus Cys conservés. Les ligands de ces récepteurs sont des larges polypeptides et leurs sites de liaison sont situés dans la partie N-terminal (1, 15).

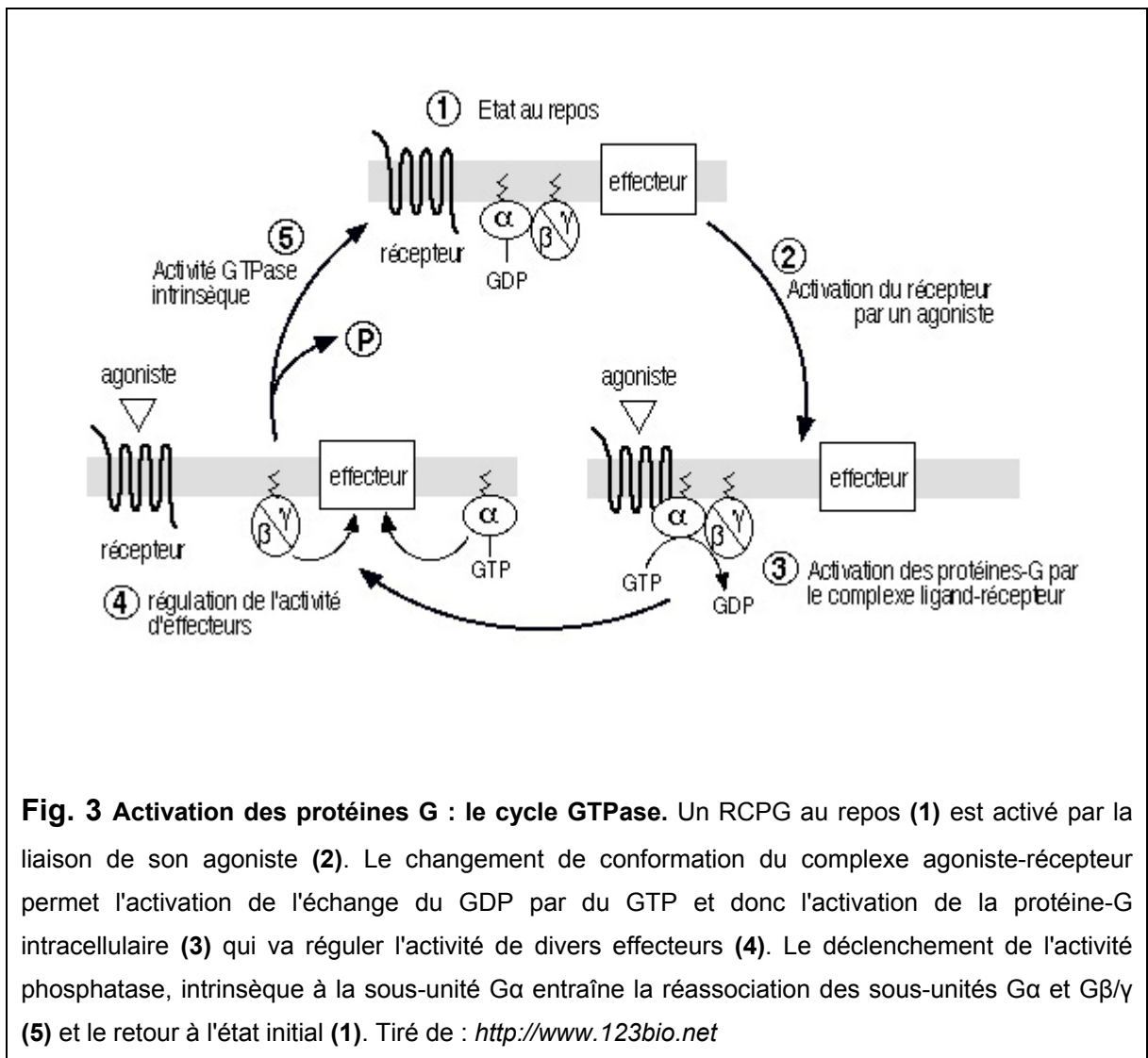
La famille C, qui dans le système GRAF correspond à la famille *Glutamate*, est composée par les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), les récepteurs de type B de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_BR), un récepteur de Ca²⁺ et les récepteurs du goût de type 1 (TAS1). Même dans cette famille nous retrouvons des résidus Cys conservés qui sont à la base de la formation d'un pont disulfure entre les boucles E-I et E-II (16). Une caractéristique de cette famille est le très large domaine extracellulaire composé par 300-600 acides aminés (1).

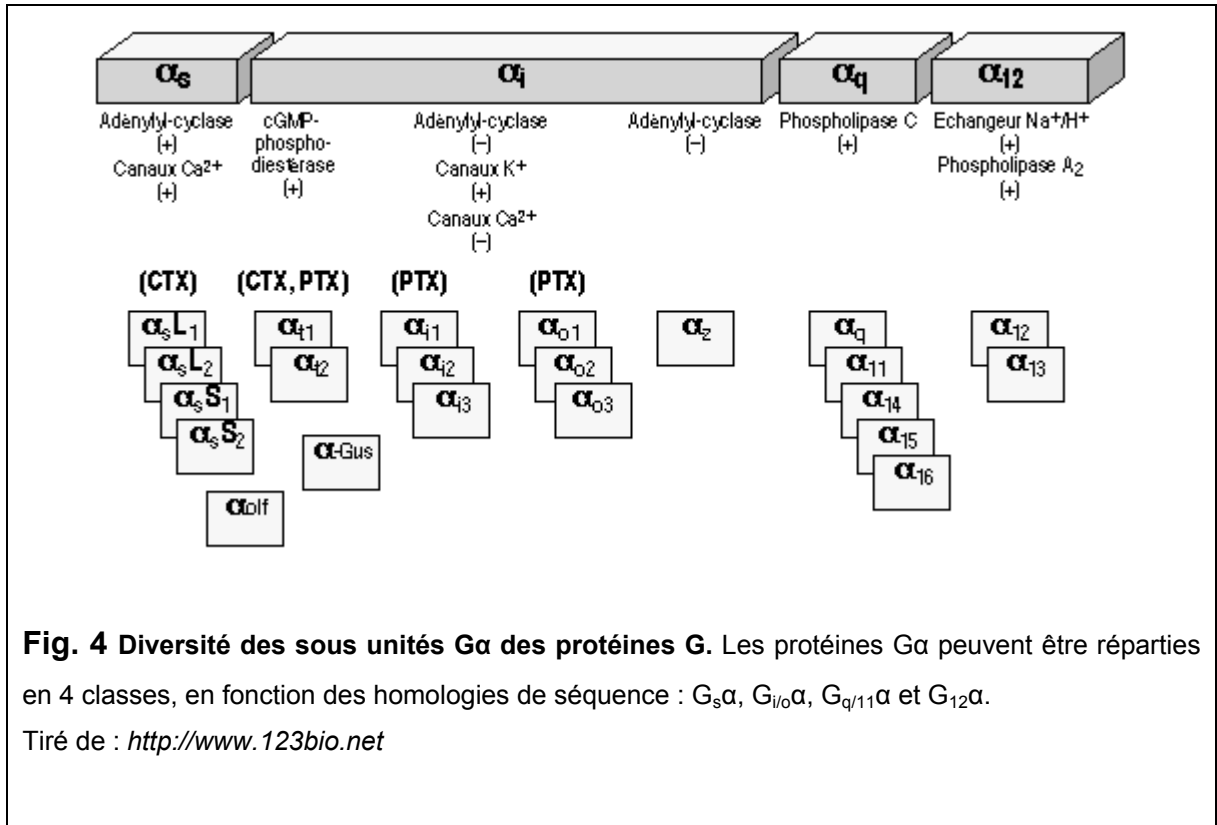
Les classes D, E et F sont des familles plus rares dont les membres se retrouvent seulement chez quelques espèces, comme les organismes unicellulaires ou les levures.

1.1.2. Rôle et signalisation des RCPGs

Les RCPGs constituent la première étape d'une série de cascades signalétiques menant à la régulation d'une multitude de processus physiologiques. Dans le modèle classique connu, la liaison du ligand induit un changement de conformation du récepteur qui mène à sa forme active. Une fois activés, les RCPGs vont réguler l'activité d'une protéine membranaire cible qui peut être tant une enzyme qu'un canal ionique. L'interaction entre le récepteur et la cible nécessite l'intermédiaire d'une protéine hétérotrimérique appelée « *protéine G* », qui est activée pour favoriser l'échange du GDP (guanosine diphosphate) pour un GTP (guanosine triphosphate) et assurer la transduction du signal du récepteur à l'effecteur (Fig.3). Les protéines G hétérotrimériques sont formées de 3 sous unités : α , β et γ . Les sous unités β et γ forment un complexe indissociable, sauf en conditions dénaturantes, et agissent toujours dépendamment l'une de l'autre. De son côté, la sous unité α est capable d'hydrolyser le GTP (17). Seize gènes différents codent pour plus de 20 protéines G α , cinq pour les sous unités G β et

douze pour les sous unités $G\gamma$ (17). Les protéines G peuvent être subdivisées en quatre classes différentes selon la similarité de séquence des sous unités α ainsi que leur spécificité pour les effecteurs en aval (Fig. 4) (18). On a la classe des $G_{\alpha s}$ (α_s , α_{sX} et α_{OLF}) qui active l'adénylate cyclase (AC) et provoque une augmentation d'AMP cyclique (AMPc).





La classe des G_{q/11}, au contraire, inhibe l'adénylate cyclase (AC) et au même temps inhibe aussi la production d'AMPc et les canaux calciques (Ca⁺) et active les canaux potassiques (K⁺). Entre autre, la classe des G_{q/11}, dans laquelle on retrouve G_q, G_{α11}, G_{α14}, G_{α15} et G_{α16}, est liée à l'activation de la phospholipase C_β (PLC_β) menant à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglicérol (DAG) (17). La classe G_{α12/13} est responsable de l'activation de la phospholipase D (PLD) et du facteur d'échange guanylique (GEF) de la GTPase monomérique Rho (11, 18). Les sous-unités βγ peuvent également activer ou inhiber certains effecteurs comme il est résumé dans la figure 5 ci-dessous.

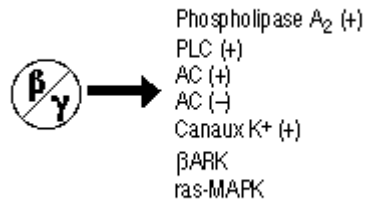


Fig. 5 Dimère β/γ . Le dimère β/γ peut activer ou inhiber l'activité de certains effecteurs comme certaines adénylates cyclases, des canaux ioniques, ou encore la voie ras-MAP kinases. Tiré de : <http://www.123bio.net>

Les mécanismes moléculaires menant à l'activation des effecteurs spécifiques via l'activation des RCPGs par les protéines G hétérotrimériques sont encore plutôt méconnus. La liaison du ligand au récepteur permet la stabilisation de la conformation active du RCPG. La successive liaison de la protéine G, comme on a dit plus tôt, au récepteur simplifie l'échange du GDP pour un GTP, ce qui active la protéine G (18). À ce moment la protéine G se divise en la sous-unité $G\alpha$ et le complexe $G\beta\gamma$, capables de moduler plusieurs réponses (18). L'adénylate cyclase est un des principaux effecteurs modulés par l'activation des protéines G. On connaît 9 isoformes de l'adénylate cyclase, qui est une protéine membranaire catalysant la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc, un important second messenger dans les cellules. Il stimule l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc, la protéine kinase A (PKA). Ensuite, la PKA phosphoryle d'autres substrats jouant un rôle important par exemple dans le métabolisme du glucose. L'état d'activation de la PLC et de la phospholipase A_2 (PLA_2) est aussi modulé par les protéines G. La PLC hydrolyse le phospholipide PIP_2 en IP_3 et DAG, des seconds messagers qui vont mobiliser le calcium intracellulaire et promouvoir l'activation des protéines sensibles au calcium tel que la calmoduline.

De plus, les protéines G sont aussi impliquées dans la modulation de la fonction de plusieurs GEF et GAP des GTPases monomériques (19).

Lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, le signal transmis par les protéines G est interrompu, permettant ainsi la reconstitution de l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$.

1.1.2.1. Désensibilisation des RCPGs

Les RCPGs ont la particularité d'autoréguler leur activité par le phénomène de désensibilisation qui est une perte rapide de la capacité de répondre aux stimuli extérieurs, afin de protéger l'organisme contre une surstimulation chronique du récepteur (20). Le processus de désensibilisation est réglé par trois familles de protéines :

- a) Les kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G (GRKs). Sept gènes des GRKs ont été identifiés chez les mammifères (GRK1-GRK7). GRK1 et GRK7 sont exprimés seulement dans la rétine, par contre les autres GRKs sont exprimées dans plusieurs tissus (17, 21). Ces sont des sérines/thréonine-kinases d'environ 60 à 80 kDa contenant trois domaines : un domaine N-terminal d'environ 185 acides aminés, un domaine catalytique central et un domaine C-terminal contenant des structures d'ancrage à la membrane (22).
- b) Les kinases dépendantes des seconds messagers (PKA et PKC). Ces kinases phosphorylent les résidus Ser et Thr dans la boucle C-III et la queue C-terminale des RCPGs menant au mécanisme de désensibilisation.
- c) Les arrestines. Cette famille comprend quatre membres. L'arrestine visuelle (ou arrestine 1) et l'arrestine du cône (C-arrestine / arrestine 4) sont exprimées seulement dans la rétine. Les arrestines non-visuelles, arrestine 2 (β -arrestine 1) et arrestine 3 (β -arrestine 2) sont exprimées de façon plus ubiquitaire dans les autres tissus et servent à réguler la fonction des autres RCPGs (23).

1.1.2.2. Internalisation des RCPGs

L'internalisation ou endocytose est le mécanisme à travers le quel la cellule séquestre des protéines intermembranaires ou extracellulaire à l'intérieurs de vésicules pour les transporter vers des compartiments intracellulaires où elles seront utilisées pour activer des voies de signalisation, ou seront modifiées. L'internalisation des RCPGs joue plusieurs rôles importants pour l'homéostasie de la cellule : a) la resensibilisation du récepteur, b) la dégradation du récepteur en cas de stimulus soutenu (« *down-regulation* »), c) l'activation des voies de signalisation et d) l'atténuation de la réponse biologique (mais ce dernier est principalement du à la désensibilisation du récepteur et en part mineure à l'internalisation). L'internalisation des RCPGs est régulée par des mécanismes hautement contrôlés impliquant plusieurs protéines. Il existe trois différentes voies d'endocytose pour les RCPGs :

- a) la voie des vésicules tapissées de clathrine (CCV). Une bonne partie de RCPGs est internalisée via cette voie. Les premières études à ce sujet ont été menées sur d'autres types de récepteurs tels que le récepteur au LDL (23). Par la suite, d'autres études ont démontré que des RCPGs tels que les récepteurs β ARs, les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine et les récepteurs de l'adénosine utilisaient cette voie d'internalisation (24, 25). Ces vésicules sont formées par deux composants majeurs, la clathrine et la protéine adaptatrice AP-2, qui s'associent pour former des cages. D'autres protéines impliquées dans cette voie sont la dynamine, qui est un GTPase située au cou de la vésicule, et, dans le cas des RCPGs, la β arrestine. La dynamine est la protéine responsable du processus de détachement de la vésicule de la membrane (26).
- b) La voie des caveolae. Les caveolae constituent des invaginations en forme de vase à surface lisse d'environ 55-65 nm. Ces structures sont

riches en cholestérol, en sphingolipides et en cavéoline, la principale protéine constitutive (27). La cavéoline est retrouvée sous trois isoformes : la cavéoline-1 (prédominante et exprimée de façon ubiquitaire), la cavéoline-2 (en complexes hétéro-oligomériques avec la cavéoline-1 et la cavéoline-3) et la cavéoline-3 (dans les muscles striés) (28). Les caveolae sont abondantes dans certains types cellulaires tels que les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires, et elles sont complètement absentes dans les lymphocytes et dans plusieurs types de cellules neuronales (29). Plusieurs RCPGs se retrouvent localisés dans les caveolae, tel que le β_2 AR, le récepteur M2 muscarinique, le récepteur B2 de la bradykinine et le récepteur de type A de l'endothéline (28, 30). Les mécanismes d'endocytose via cette voie est très peu connu. Les études menés sur cette voie ont démontré que la caveoline-1 est capable de lier directement le cholestérol et les acides gras (31, 32). Parmi les inhibiteurs de cette voie, nous retrouvons tous les composés qui lient le cholestérol, tel que le methyl- β -cyclodextrine (28) ainsi que le dominant négatif de la dynamine (dynamine K⁴⁴A) (33).

- c) La voie des vésicules non-tapissées de clathrine (NCCV) (Fig. 6, E). La voie des NCCV est une voie d'internalisation encore dont les protéines constitutives et les mécanismes moléculaires sont encore méconnus. Actuellement, seul le récepteur M2 muscarinique est reconnu utiliser cette voie d'endocytose (34).

Les RCPG qui nous ont intéressés et dont nous avons étudiés différents aspects, sont le récepteur de prostaglandines (FPR) et le récepteur du facteur activant les plaquettes (PAFR), respectivement.

1.2. Prostaglandines : synthèse, fonctions et utilisations thérapeutiques

La découverte des prostaglandines (PG) et la détermination de leur structure ont commencé en 1930, quand Raphael Kurzrok et Charles Lieb, deux gynécologues de New York, observèrent que le fluide séminal humain stimule la contraction du muscle utérin isolé. Quelques ans après en Suède, Ulf von Euler a confirmé ce rapport et a également noté que le fluide séminal humain produit une contraction dans le muscle lisse intestinal et abaisse la tension artérielle une fois injecté dans le sang. C'était Von Euler qui a conçu le nom de prostaglandine pour cette substance mystérieuse. Le nom prostaglandine lui semblait approprié car il croyait qu'elle provenait de la prostate. Aujourd'hui, nous savons que la production de prostaglandines n'est pas limitée à la prostate, en fait, elles sont pratiquement produites par la plupart des tissus.

Les prostaglandines sont de petites molécules dérivées d'acides gras poly-insaturés et appartiennent à la superfamille des eicosanoïdes. Le précurseur des prostanoïdes, l'acide arachidonique, est produit par l'hydrolyse des glycérophospholipides membranaires par la PLA2 et, à un moindre degré, par la phospholipase C. L'acide arachidonique subit une oxydation puis une réduction par les enzymes COX1 et COX2 (cyclo-oxygénases 1 et 2 également dénommées PGHS1 et PGHS2, pour prostaglandin endoperoxydase H synthases 1 et 2), pour être transformé en PGG2 (prostaglandin endoperoxydase G2) puis en PGH2 (prostaglandin endoperoxydase H2). La PGH2 est ensuite convertie par des prostaglandines synthases (PGDS, PGES, PGFS ou PGIS, ou TxAS) en prostaglandines, PGD2, PGE2, PGF2 α , ou prostacycline (PGI2) ou thromboxane A2 (TxA2) respectivement (Fig. 6). Ces molécules activent des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Fig. 6). Il en existe neuf membres, DP1 et DP2 (ou CRTH2) pour la PGD2, EP1-4 pour la PGE2, FP pour la PGF2 α , IP pour la PGI2 et TP pour le TxA2, qui traduisent des signaux différents via la production des seconds messagers AMPc ou IP3/diacylglycérol/Ca⁺⁺ (35, 36) (Fig. 6).

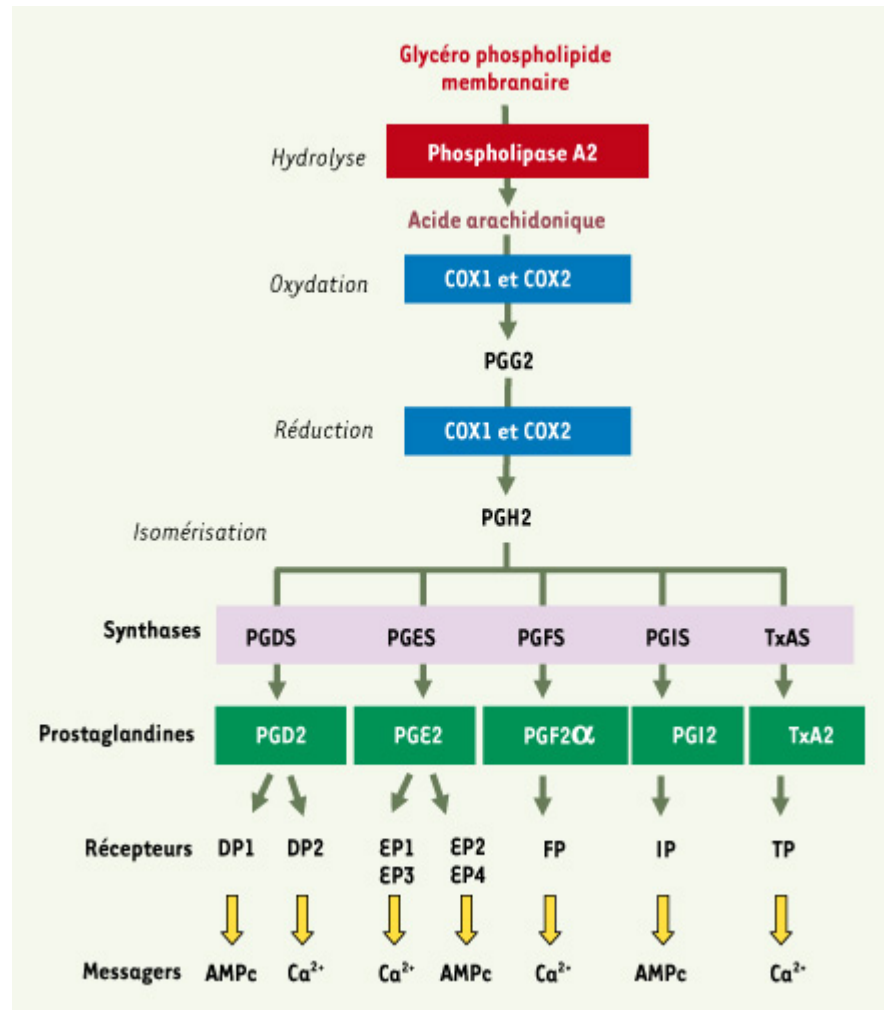


Fig. 6 Synthèse et actions des prostaglandines. L'acide arachidonique est métabolisé par les enzymes COX1 et COX2 en PGG2 puis en PGH2 au cours d'une réaction en deux étapes (oxydation et réduction). La prostaglandine PGH2, relativement instable, est convertie enzymatiquement par des synthases spécifiques : thromboxane (TxAS), PGE, PGF, PGD et PGI synthases, en l'un des cinq prostanoides : TxA2, PGE2, PGF2α, PGD2 et PGI2, respectivement. Chaque prostanoides interagit avec des membres distincts de la famille des RCPGs. Ces récepteurs (IP, DP1, DP2, EP 1-4, FP, IP et TP) activent ensuite différentes réponses et voies de signalisation. Tiré de : *Hata et al, Pharmacol Ther, 2004.*

Les prostaglandines sont impliquées dans de nombreux systèmes physiologiques, le système nerveux central, cardiovasculaire, gastro-intestinal, génito-urinaire, endocrine, respiratoire et immunitaire (36). Ces molécules agissent localement de façon autocrine et/ou paracrine, et sont considérées comme des médiateurs pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires selon la nature de la molécule et du récepteur activé, et le contexte cellulaire. Cette action est très complexe car les prostaglandines peuvent avoir des effets synergiques ou antagonistes pour un même processus physiologique, étant donnée la grande similitude de structure de ces molécules et aussi de leurs récepteurs.

D'un point de vue pharmacologique, elles constituent d'excellentes cibles thérapeutiques, puisque la synthèse des prostaglandines est impliquée dans de nombreuses maladies dont certains cancers, l'inflammation, des maladies cardiovasculaires et l'hypertension. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les NSAID (non steroidal anti-inflammatory drugs), qui inhibent l'action des enzymes COX1 et COX2 bloquant ainsi la synthèse des prostaglandines, sont déjà utilisés pour leurs activités anti-pyrétique, analgésique et anti-inflammatoire. Toutefois des effets secondaires de ces traitements ont été associés à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, puisque par exemple la PGE2 produite via COX1 ou COX2 a un rôle protecteur de l'intégrité de la muqueuse gastrique et des fonctions normales du rein, respectivement (36).

On pense que les prostaglandines jouent un rôle de médiateur dans l'activité des cellules et au cours de nombreux processus comme la contraction de l'utérus, les sécrétions gastriques, la circulation sanguine cérébrale ou la mobilité du tube digestif. Leurs principales actions sont :

- a) Au niveau de la douleur et de l'inflammation. Les PGs sont impliquées dans la sensation de la douleur liée à l'inflammation et la vasoconstriction et/ou la dilatation, et le développement de la fièvre. Une fois injectées directement dans l'hypothalamus, elles induisent la

fièvre. L'utilisation de la $\text{PGF2}\alpha$ induit également une élévation de la température corporelle possiblement par son action sur l'hypothalamus (37).

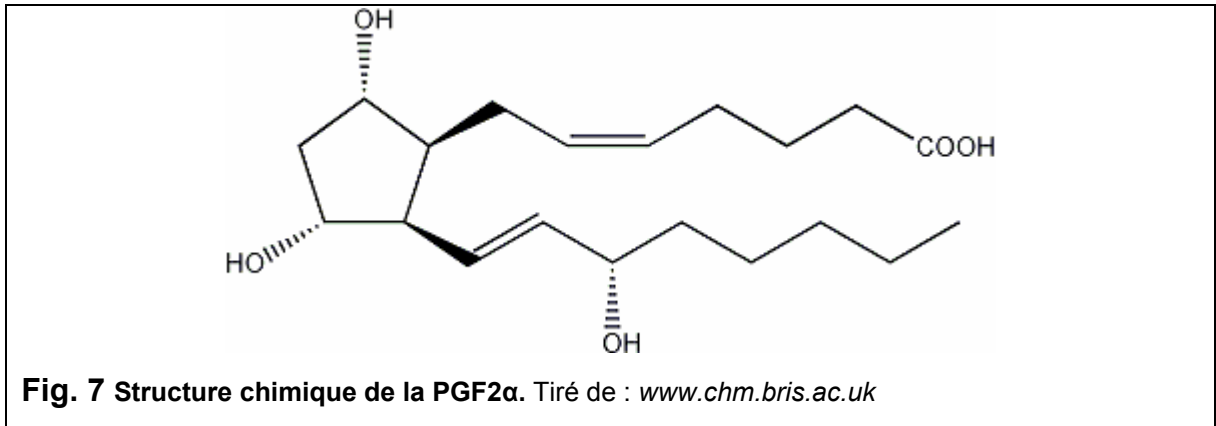
- b) Au niveau des systèmes reproducteurs. Les PGs peuvent jouer un rôle dans l'ovulation et la fonction du corpus luteum, dans les ovaires et dans la contraction de l'utérus. La production excessive de PGs peut être impliquée dans le travail prématuré, l'endométriose, la dysménorrhée (crampes menstruelles), et d'autres désordres gynécologiques. Elles sont souvent administrées pour induire le travail (38).
- c) Au niveau de l'appareil gastro-intestinal. L'estomac et l'intestin produisent PGs. Les PGs sont censés empêcher des sécrétions gastriques et influencer la motilité gastrique aussi bien que l'absorption liquide (39). Les drogues, tel que l'aspirine, qui empêchent la production de prostaglandines peuvent mener à une surproduction de sécrétion gastrique. Ceci prédispose la personne aux ulcères gastriques (40).
- d) Au niveau du système respiratoire. Certaines PGs sont des vasoconstricteurs, d'autres sont des vasodilatateurs. L'effet global est déterminé par une grande présence de PGs (41).
- e) Au niveau de la coagulation sanguine. Les thromboxanes, des autres produits de la cyclo-oxygénase, sont synthétisés par les plaquettes sanguines. Ces eicosanoïdes favorisent l'agrégation des plaquettes et la vasoconstriction. La prostacycline, produite par les cellules endothéliales vasculaires, empêche l'agrégation de plaquette et cause la vasodilatation (42).
- f) Au niveau de l'adipogenèse. $\text{PGF2}\alpha$ empêche directement l'adipogenèse (43). Par contre une autre prostaglandine sert à induire

l'adipogenèse, la PGJ2. Les dérivés PGJ2 fonctionnent comme ligands de déclenchement pour le PPAR (récepteur activé de prolifération des peroxyosomes), un récepteur nucléaire hormonal qui est essentiel à la prolifération de l'adipocyte (44). La PGF2 α bloque l'adipogenèse par l'activation de la protéine kinase mitogène active (la même kinase impliquée dans l'action de l'insuline), ayant pour résultat la phosphorylation inhibitrice de PPAR. Les deux, l'activation de la protéine kinase mitogène active et la phosphorylation de PPAR, sont requis pour les effets anti-adipogénique de la PGF2 α (43).

Les prostaglandines ont différentes utilisations thérapeutiques. En gastro-entérologie, leurs propriétés protectrices vis-à-vis de la muqueuse de l'estomac les font utiliser dans le traitement de l'ulcère gastroduodéal : à forte dose, elles diminuent la fabrication et la sécrétion d'acide chlorhydrique (40). En gynécologie et en obstétrique, elles permettent de provoquer l'interruption de grossesse (en cas d'avortement) mais également accentuent l'évacuation du contenu de l'utérus en cas d'avortement incomplet. Elles sont aussi utilisées pour la préparation à l'accouchement, en raison de leur action sur le col de l'utérus : le gel de prostaglandine que l'on dépose sur le col de l'utérus et sa préparation injectable favoriseraient le déclenchement de l'accouchement (45). Les prostaglandines sont aussi utilisées en cas d'insuffisance rénale (46).

1.2.1. La prostaglandine F2 α (PGF2 α) : ligand naturel du FPR

La prostaglandine F2 α (PGF2 α) (Fig. 7) est une hormone produite par plusieurs tissus de l'organisme. L'utérus en produit une grande quantité à la fin du cycle œstral. Son effet est la dégradation du ou des corps jaunes et le déclenchement des chaleurs. La PGF2 α est efficace pour induire la lutéolyse à condition que la femelle ait des cycles œstraux normaux et que le corps jaune soit suffisamment mature (47).



La PGF2 α n'est pas actuellement approuvée par le FDA (Food and Drug Administration) pour l'utilisation chez les humains. Les produits contenant la PGF2 α sont considérés dangereux pour les femmes et doivent être manipulés avec soin. La PGF2 α est rapidement absorbée par la peau et peut avoir comme extrême conséquence soit des défauts de naissance soit l'avortement instantané. Les prostaglandines utilisées en clinique appartiennent à la classe "E" et elles sont administrées aux femmes pour induire l'avortement ou pour débiter le travail. Des prostaglandines sont également employées pour l'impuissance chez les hommes; c'est le cas de la PGE1 qui est injectée directement dans le pénis (47).

La PGF2 α a été testée dans un éventail d'animaux à partir des singes jusqu'aux chevaux. Dans la plupart des cas les effets secondaires sont : augmentation de la température corporelle, vomissement, diarrhée, constriction bronchique, confusion, perte de coordination, tachycardie, hypotension, etc. Par contre, la PGF2 α n'est pas toxique et elle a une demi-vie dans l'ordre des minutes. La PGF2 α est actuellement utilisée dans la production animale pour contrôler l'élevage des vaches. Elle est généralement employée sous forme de sel de tromethamine dans une solution stérile pour l'injection sous-cutanée et intramusculaire. Le but est de synchroniser l'ovulation dans les bétails par l'injection séquentielle de plusieurs hormones avec la PGF2 α . Une hormone

choisie dans le groupe des hormones libérant les gonadotrophines (GnRH), l'hormone lutéinisante (LH) ou la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) sont administrées à une vache pendant un cycle oestral afin de stimuler le développement du follicule. La $\text{PGF}_2\alpha$ est alors administrée pour lancer la régression du corpus luteum environ cinq à huit jours après administration du GnRH, du LH ou du hCG. Une deuxième dose de GnRH, de LH ou de hCG est alors administrée simultanément avec l'injection de $\text{PGF}_2\alpha$ ou environ trois jours après l'injection de $\text{PGF}_2\alpha$. Cette deuxième dose d'hormone fonctionne pour stimuler l'ovulation d'un follicule dominant (47).

La $\text{PGF}_2\alpha$ est impliquée aussi dans la croissance musculaire. La stimulation mécanique du muscle (ex. étirement intermittent) a comme conséquence la production et l'efflux de deux prostaglandines, la PGE_2 et la $\text{PGF}_2\alpha$. La PGE_2 augmente la dégradation de protéines, par contre la $\text{PGF}_2\alpha$ de son côté augmente la synthèse de protéines. Une hypertrophie musculaire est habituellement la conséquence d'une augmentation de la synthèse aussi bien qu'une augmentation proportionnellement, mais inférieure, de dégradation de protéines. Le relâchement simultané de PGE_2 et de $\text{PGF}_2\alpha$ crée cette condition. Il est bien connu qu'un étirement mécanique, sans aucune activité électrique, est suffisant pour induire l'hypertrophie musculaire (48). Des études récentes ont montré que le mécanisme par lequel l'étirement mécanique mène à la production de prostaglandine et finalement à la croissance de muscle, implique des protéines de G. Ces dernières augmentent la quantité de cyclo-oxygénase, l'enzyme responsable de la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Le cyclo-oxygénase du muscle squelettique produit de la PGE_2 et $\text{PGF}_2\alpha$ à un rapport approximativement égal à un. Le mécanisme exact par lequel la $\text{PGF}_2\alpha$ augmente la synthèse de protéines n'est pas encore totalement élucidé (49).

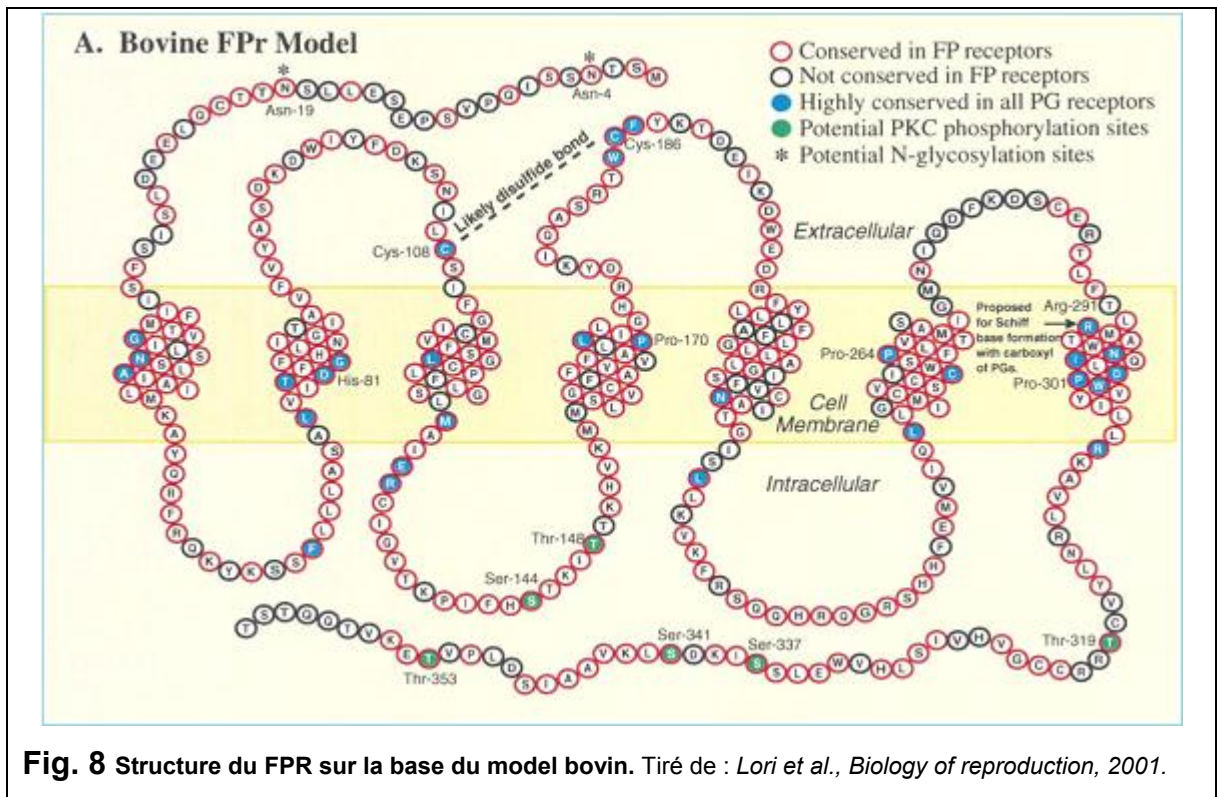
Puisque les prostaglandines sont des molécules de signalisation qui reçoivent leur message par des voies complexes de transduction du signal, elles

sont sensibles à plusieurs facteurs chimiques, hormonaux, et alimentaires. Le cortisol, par exemple, affecte la production des prostaglandines dans le tissu musculaire. D'abord, le cortisol empêche l'action de la phospholipase A2, qui est nécessaire à la synthèse de l'acide arachidonique, qui est à l'origine de la production de la $PGF_{2\alpha}$. Le cortisol empêche également la production de l'ARN messenger de la cyclo-oxygénase dans la cellule. Comme cité précédemment, la cyclo-oxygénase est l'enzyme qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandines (50). Ainsi le cortisol empêche la croissance du muscle en empêchant la production de la $PGF_{2\alpha}$ en réponse au mouvement (stimulation mécanique) et à l'alimentation (action de l'insuline).

1.2.2. Récepteur FP des prostaglandines (FPR).

1.2.2.1. Structure du récepteur FP.

Le récepteur FP appartient à la classe des RCPGs.



C'est une protéine monomérique à sept domaines transmembranaires (TM1 à TM7) possédant une structure en hélice α , reliés par 3 boucles externes (E1, E2 et E3) et 3 boucles internes (I1, I2 et I3), avec une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire (Fig. 8) (8).

1.2.2.2. Fonctions biologiques du récepteur FP

Le récepteur FP a différentes fonctions biologiques qui s'expliquent par sa liaison à son ligand naturel, la $\text{PGF}_2\alpha$:

- Rôle dans les systèmes de reproduction: stimulation de la contraction du muscle utérin (important durant certaines périodes du cycle) (51);
- Rôle dans le système sanguin: stimulation de la relaxation ou de la contraction au niveau des vaisseaux (52);
- Rôle dans le système respiratoire: $\text{PGF}_2\alpha$ est un bronchoconstricteur puissant (implication dans l'asthme) (53);
- Rôle dans l'inflammation: les prostaglandines, dont la $\text{PGF}_2\alpha$, sont responsables de l'ampleur et de la durée de la réaction inflammatoire (54).

1.3. Agonistes et antagonistes : ligands allostériques

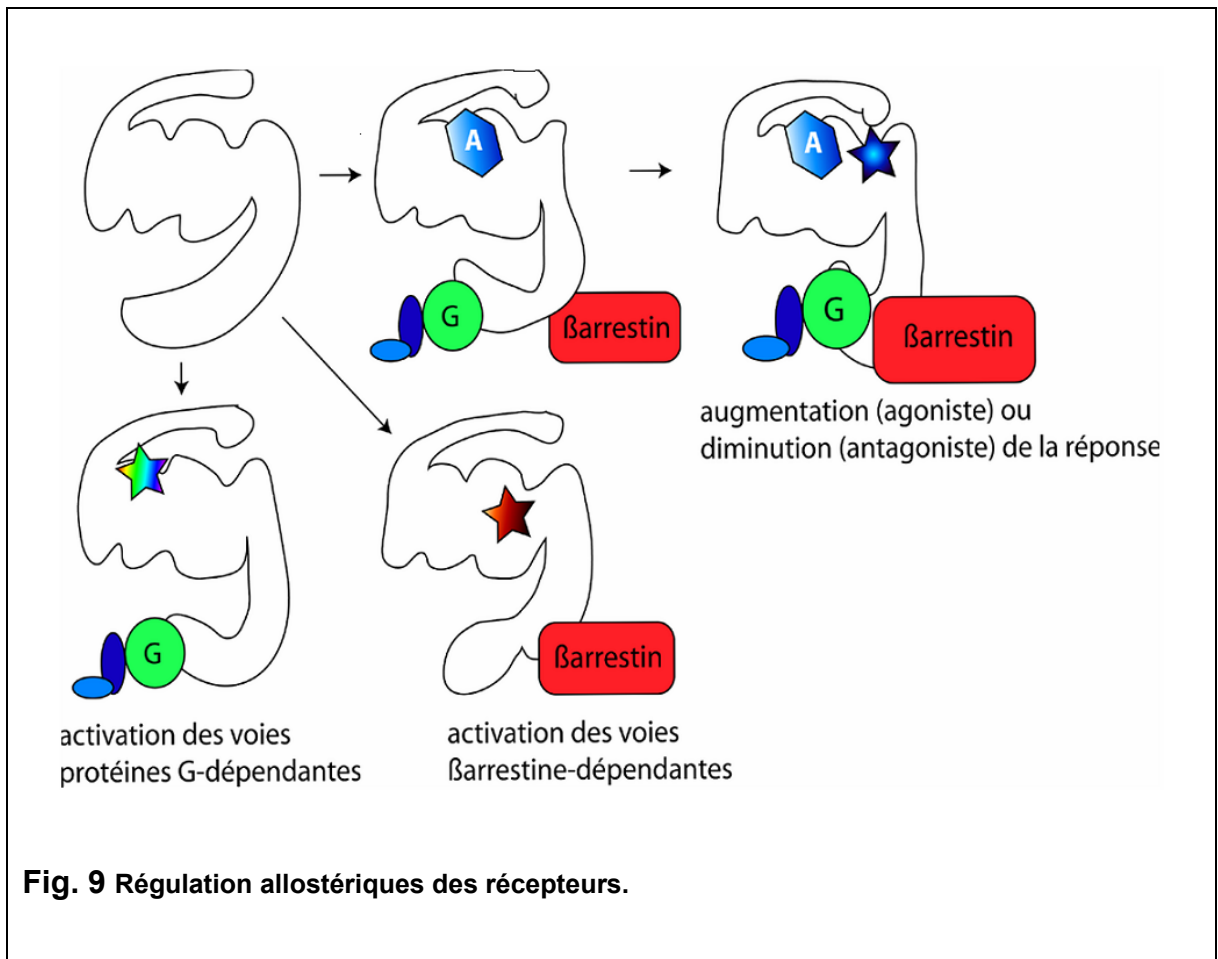
Les ligands propres d'un récepteur peuvent avoir différentes actions au niveau de l'activation ou inactivation du récepteur. Des ligands considérés comme agonistes, sont des molécules qui interagissent avec le récepteur et induisent les mêmes effets que le ligand naturel (même changement conformationnel du complexe). Ils ont une structure similaire au ligand naturel.

Les antagonistes, par contre, sont des molécules qui interagissent avec le récepteur et bloquent l'action du ligand naturel en prévenant le changement conformationnel du complexe. Nous avons deux types d'antagonistes :

- Compétitif: se lie au site actif et son action est inversée en augmentant la concentration d'agoniste.
- Non-compétitif: se lie à un site allostérique mais qui prévient l'agoniste de se fixer au récepteur.

Les agonistes partiels sont des molécules qui agissent comme agonistes et antagonistes en donnant une réponse partielle (effet < 100%). Ils possèdent une structure qui permet de se lier au site du récepteur de deux façons et ils provoquent un agencement raisonnable mais imparfait avec le site du récepteur qui ne permet pas un changement de conformation complet du complexe et ne permet qu'une transmission partielle du signal (55).

Dans notre étude, nous nous intéressons surtout aux ligands orthostériques et allostériques. Un ligand orthostérique peut se comporter comme agoniste ou antagoniste en se fixant au site de liaison du ligand (agoniste) naturel. Un ligand allostérique est un agoniste ou antagoniste se fixant à un site autre que celui du ligand naturel entraînant un changement de conformation ayant pour conséquence soit une augmentation (effecteur positif), soit une diminution (effecteur négatif) de l'activité du ligand naturel (Fig. 9) (56).



Concernant le récepteur FP, nous avons étudié l'action de son agoniste naturel, la $\text{PGF}_2\alpha$ et de différents antagonistes, l'AL-8810, le THG113 (Fig. 10) et le THG113.824 (Fig. 11). À partir des données de cristallographie et de modélisation, des régions des protéines accessoires du FP ont été identifiées. Le THG113 est un peptide homologue dérivé de la séquence primaire de la boucle extracellulaire.

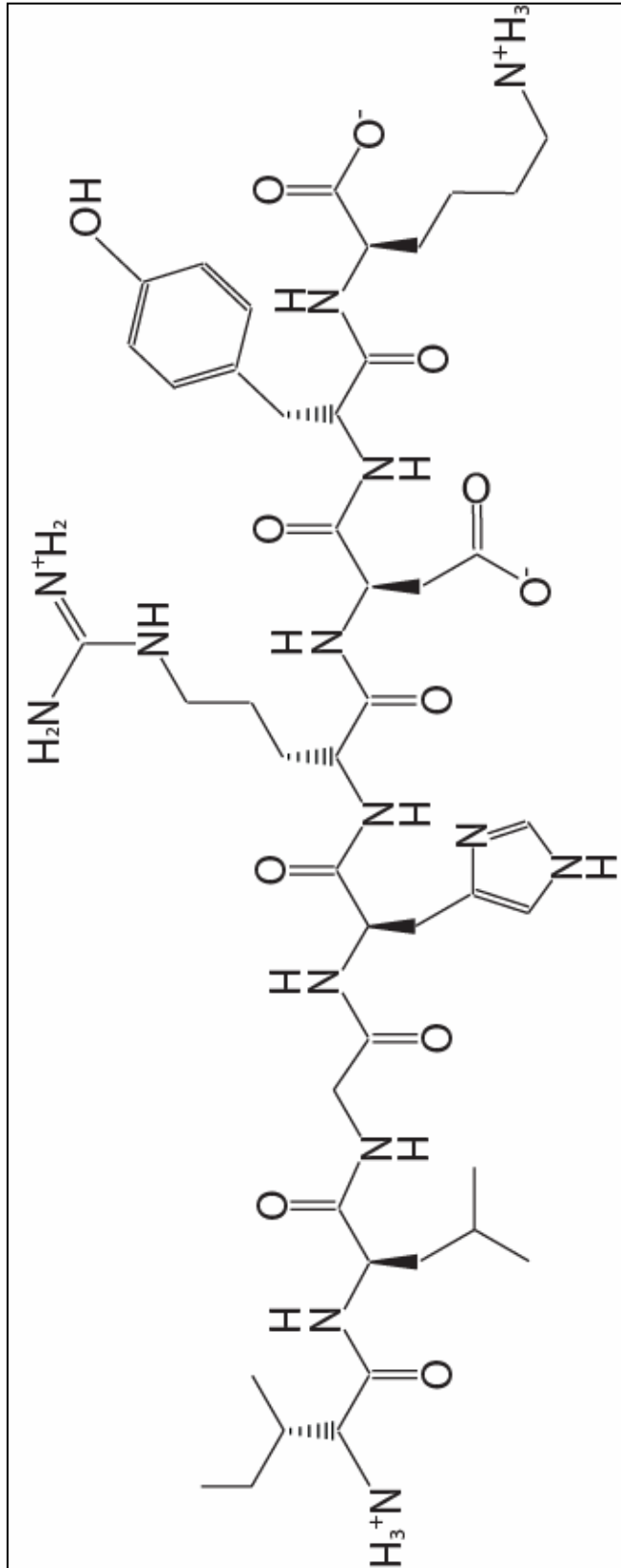


Fig. 10 Structure du THG113

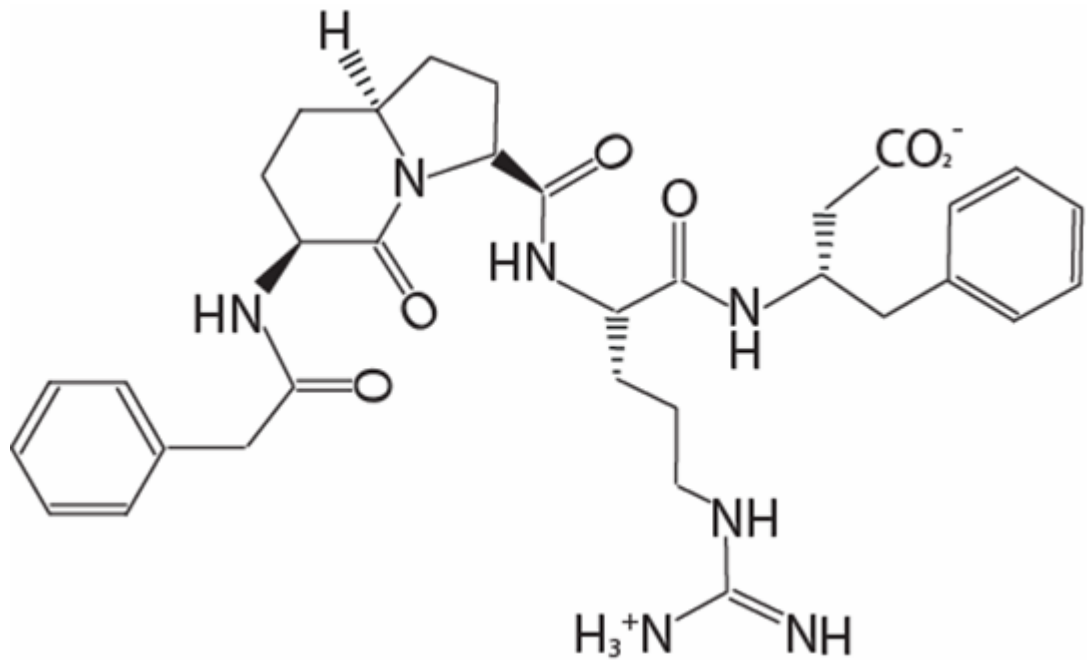


Fig. 11 Structure du THG113.824

La conversion du peptide principal, THG113, dans des composés plus efficaces est nécessaire pour parcourir la séquence peptidique pour définir les chaînes latérales appropriées et la géométrie de la structure chimique; pour appliquer l'imitateur β -turn de type II [acide aminé de L-indolizidin-2-one (L-I2aa)] pour replier la région turn présumée autour du résidu de Gly ; et pour remplacer

systématiquement des résidus d'acides aminés par des pharmacophores organiques alternatifs. L'équipe du Dr William Lubell a exploré l'importance des résidus centraux d'His, d'Arg et d'Asp et, de façon limitée, les portions terminales hydrophobes du peptide d'origine.

Le but principal est d'essayer d'améliorer le rapport entre la structure et l'activité biologique de ces nouveaux ligands allostériques. Pour cette raison, l'équipe du Dr Lubell a optimisé le dérivé THG113, pour ensuite arriver au THG113.824. La conformation turn de ce ligand a été sondée systématiquement utilisant une série des mimétiques turn (57), parce que cette région est importante pour la présentation des pharmacophores du ligand et peut ancrer le ligand à une interface entre la membrane lipidique et la protéine réceptrice. Le rapport entre la géométrie turn et l'activité biologique demeure non défini. En remplaçant le résidu L-I2aa avec le résidu énantiomérique D-I2aa, l'équipe du Dr Lubell a étudié l'importance pour l'activité de la conformation turn de type II en comparaison à celle β -turn de type II. Le successif remplacement du résidu d'I2aa, avec d'autres acides aminés d'azabicycloalkanone, un dipeptide (58) macrocyclique et des turn-mimétiques 5-tert-butylproline (59), a permis de caractériser la géométrie turn la plus active pour régler la biologie de récepteur.

Nous avons également étudié un autre RCPGs, le PAFR.

1.4. Le facteur activant les plaquettes (PAF)

Le PAF a été mis en évidence en 1972 (60) et sa structure chimique a été déterminée en 1979 par trois équipes (60; 61) comme étant 1-0-alkyl-*sn*-glycéro-3-phosphorylcholine (Fig. 12). Son originalité réside dans la liaison éther en position 1 du glycérol et le groupement acétate en position 2. Le lyso PAF, précurseur immédiat du PAF, diffère de celui-ci uniquement par la fonction acéther en position 2.

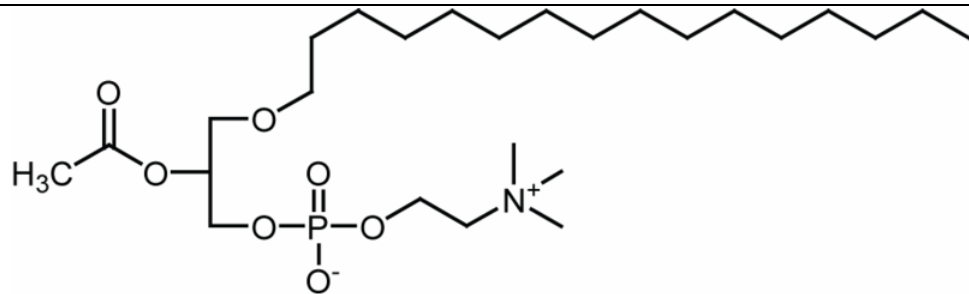


Fig. 12 Structure chimique du PAF. Tiré de : *Benveniste et al., Nature, 1977.*

La production du PAF a été décrite chez différentes espèces de mammifères (singe, lapin, rat, souris). Chez l'homme, il est produit par une grande variété de cellules : les plaquettes, les cellules endothéliales, les mastocytes, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles (62; 63).

Le PAF est produit dans beaucoup de cellules selon deux voies enzymatiques différentes (Fig.13) : l'une appelée voie de remodelage consiste en une modification structurale des lipides membranaires par la substitution d'un groupement acétyl en acyl ; l'autre appelée la voie de synthèse *de novo* utilise des acides O-alkyl-lysophosphatides.

La première voie semble être préférentiellement empruntée dans les processus physiopathologiques et la seconde serait celle de la synthèse physiologique endogène. Dans les deux voies, les alkyl acyl glycéro phosphocholines (AAGPC), et le lyso PAF sont des précurseurs du PAF et la phospholipase A2 est l'enzyme clef. L'acétyltransférase est l'enzyme de la voie de remodelage. L'acétylhydrolase est l'enzyme clef de la dégradation du PAF. Elle est hautement spécifique des phospholipides avec une courte chaîne acyl en position 2, et est retrouvée dans les compartiments intra- et extracellulaires. La régulation de la synthèse/métabolisme du PAF est complexe et dépend des acides gras polyinsaturés, du calcium, des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation enzymatiques et de l'activité d'acétylhydrolase (62; 63).

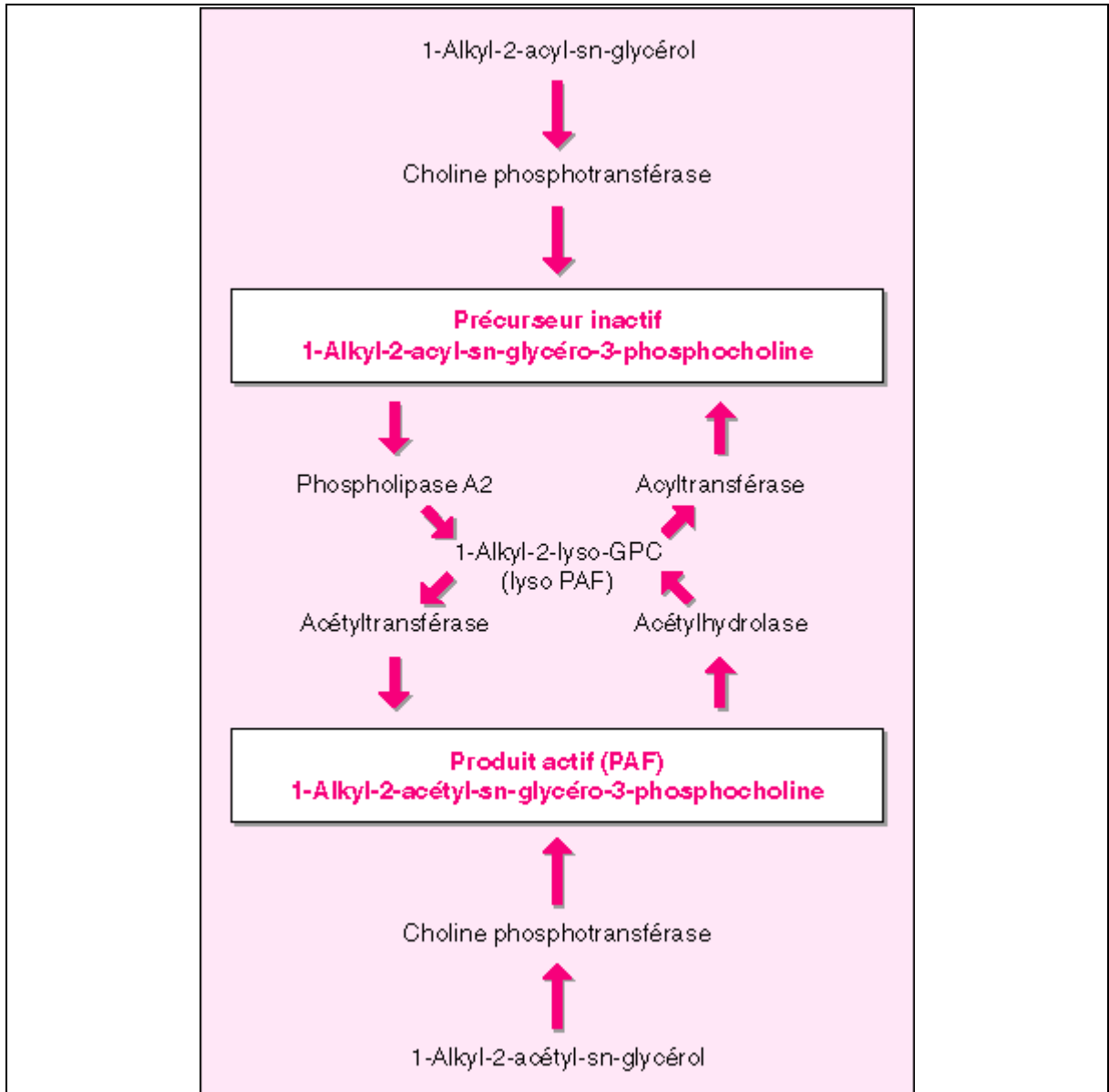


Fig. 13 Biosynthèse du PAF-acéther. Dans la voie de synthèse par remodelage, la biosynthèse du précurseur du PAF, 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycérol-3-phosphorylcholine est hydrolysée par la phospholipase A₂ (PLA₂) pour engendrer 1-O-alkyl-sn-glycérol-3-phosphorylcholine (lyso-PAF), précurseur immédiat du PAF dépourvu d'effet biologique, et un acide arachidonique. L'acétyltransférase convertit le lyso-PAF en PAF par l'addition d'un acétate provenant de l'acétyl-CoA. La voie de novo fait d'abord intervenir l'acétylation du précurseur 1-O-alkyl-sn-glycérophosphate à l'aide d'un acétyltransférase ; cette nouvelle molécule subit ensuite une déphosphorylation par une phosphohydrolase. Finalement, un groupement phosphocholine issu d'une cytidine-diphosphate est additionné à ce précurseur, par une choline phosphotransférase, pour donner le PAF. Cette voie de synthèse n'est pas utilisée par toutes les cellules. Tiré de : Snyder et al., *Am J Physiol*, 1990.

Le calcium intracellulaire est indispensable à la synthèse du PAF (62; 63). Les enzymes impliqués dans l'inactivation du PAF sont aussi régulés par le calcium. Ainsi, dans des cellules intactes, le calcium peut induire une inhibition à la fois de la désacétylation du PAF et de la transacétylation du lyso PAF. L'acétyltransférase est régulée par une kinase AMPc dépendante, une kinase calmoduline- Ca^{2+} dépendante et un système antiport Na^+/H^+ (62).

L'histamine, la thrombine, et la bradykinine sont de puissants stimulants de la synthèse du PAF (64). Les acides gras peuvent activer la synthèse du PAF (63). A l'inverse, l'EDTA, le mépacrine, les anti-inflammatoires stéroïdiens l'inhiberaient en diminuant l'activité de la PLA_2 vraisemblablement *via* la lipocortine (65; 66).

1.4.1. Fonctions biologiques du PAF

Le PAF a différents rôles dans l'organisme :

- *Appareil respiratoire.* La production de PAF par une lignée cellulaire épithéliale du poumon humain (67), la reproduction, chez l'animal, de tous les symptômes de l'asthme après injection IV ou administration de PAF par aérosol (bronchoconstriction, migration d'éosinophiles dans le poumon) sont des arguments en faveur du rôle du PAF dans la physiopathologie de l'asthme. Les antagonistes de PAF par voie IV ou par inhalation font disparaître les symptômes induits par le PAF (63; 68). Dans le cadre plus général de défaillance respiratoire lors des syndromes de choc (infectieux, hypovolémique ou ischémique), une surproduction de PAF a été mise en évidence comme étant un signe prédictif de l'atteinte respiratoire aiguë (69).
- *Système cardiaque.* Le PAF induit, chez le cobaye, une diminution de la force de contraction cardiaque et du débit coronaire avec libération de thromboxane A₂ et d'histamine pouvant aller jusqu'à l'ischémie

myocardique. Les antagonistes du PAF réduisent considérablement le phénomène de l'ischémie *in vivo* (62; 63; 68).

- *Système rénal.* Il existe une synthèse de PAF au niveau des cellules tubulaires et glomérulaires rénales. L'hypoxie rénale chez le rat, caractérisée par une oligurie et une surproduction glomérulaire de PAF n'évolue pas vers l'ischémie et l'anurie en cas de traitement par les antagonistes du PAF (62; 63; 68). Dans une étude randomisée en double aveugle, l'antagoniste de PAF, contre placebo, paraît réduire l'insuffisance rénale organique en période post-greffe rénale (70) chez l'homme.
- *Système digestif.* Des études soulignent aussi l'importance du PAF dans la régulation de la sécrétion acide gastrique en le classant parmi les sécrétagogues les plus puissants comme l'histamine ou l'acétylcholine (71 ; 72).
- *Maladies de la peau.* Il a été démontré, *in vitro*, que le PAF est libéré par les fibroblastes (73) et par des cellules de l'épithélium malpighien (74). L'infiltrat dermo-hypodermique d'éosinophiles dans l'allergie cutanée, et celui des polynucléaires dans le psoriasis seraient secondaires à l'accumulation intradermique du PAF (74; 75).
- *Système immunitaire.* Le PAF est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 et de réguler négativement l'expression des antigènes CD2 et CD3 sur les mêmes cellules (62; 63; 76).

1.4.2. Structure du PAF

Le récepteur PAF a sept domaines intermembranaires et il est couplé à une protéine G tyrosine kinase.

Le clonage du récepteur de PAF (77) a été réalisé par expression dans l'oocyte de *Xenopus laevis* à partir d'ARNm de cellules bronchiques de cobaye.

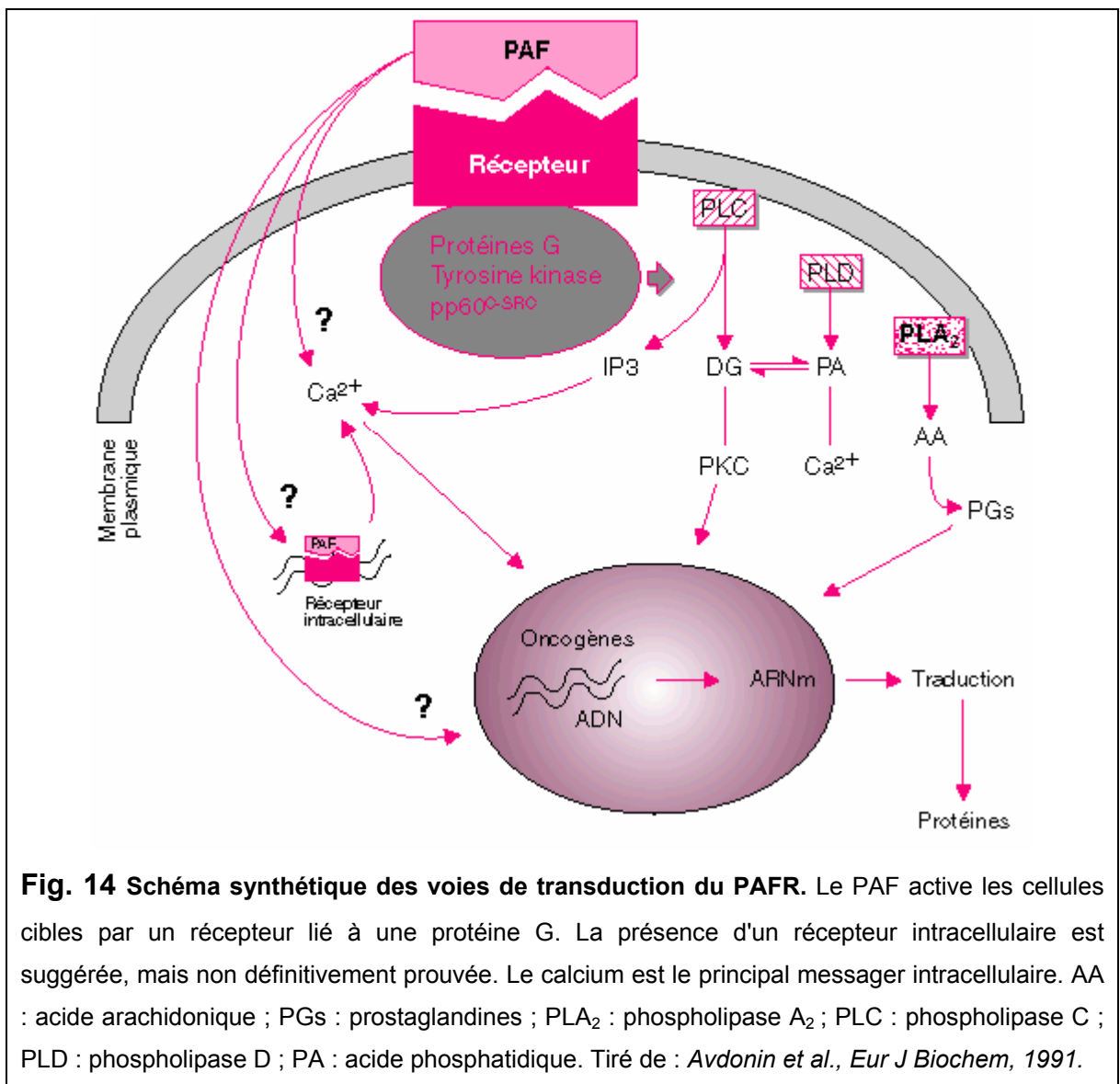
Des transcrits du récepteur ont été mis en évidence dans les leucocytes, la rate, le poumon, le rein et le myocarde humains. Il correspond à un ADNc de 3 020 nucléotides et une protéine de 342 acides aminés de 39 kD. La modélisation du récepteur du PAF basée sur l'homologie avec d'autres récepteurs à 7 domaines membranaires suggère un site de liaison chargé négativement, la molécule du PAF étant chargée positivement (78). On ne sait pas encore pourquoi le lyso PAF et le PAF sont tous deux capables de saturer le site de fixation du récepteur, mais seul le PAF active le système de transduction. Le PAF stimule l'activité GTPasique et le GTP déplace la liaison du PAF (79). Dans certains systèmes (mais pas tous), la toxine de *Bordetella pertussis* inhibe la réponse induite par le PAF suggérant l'intervention d'une protéine régulatrice de type G_i (62; 63; 80). De plus une protéine G différente de G_i et de G_s (G_q ?), serait impliquée dans le métabolisme des phosphoinositides (PPI) dans les plaquettes.

1.4.3. Récepteur du facteur activant les plaquettes (PAFR)

Plusieurs mécanismes ont été étudiés dans la signalisation membranaire induite par le PAF (Fig.14). Dans de nombreuses cellules, le PAF active la voie des PPI. Cette activation est rapide, de l'ordre de 5-10 s après fixation du PAF sur son récepteur. De nombreux antagonistes (CV-6209, SRI-63441, SRI 63-675, BN 52021) inhibent cette action du PAF. D'autres voies ont également été proposées : 1) ouverture d'un canal calcique non sélectif (car laissant passer Na^+ et Li^+) dépendant du récepteur, ce serait le cas des plaquettes ; 2) activation d'un échangeur Na^+/Ca^{2+} , ce serait le cas des cellules iléales de rat (81).

Dans plusieurs types cellulaires, le PAF est capable d'induire la synthèse d'acide arachidonique et des prostaglandines (62; 63) par l'activation de la PLA2. Ainsi, la bronchoconstriction et les troubles d'oxygénation hépatocytaire induits par le PAF, dépendraient de l'activation de cette voie. Des travaux récents ont mis l'accent sur le rôle de PLD dans la réponse induite par le PAF dans certaines

cellules, notamment les leucocytes de lapin (82). Dans beaucoup de systèmes, la réponse au PAF peut être progressivement atténuée par un mécanisme de désensibilisation. C'est le cas dans les plaquettes, de l'inhibition de l'agrégation, dans les polynucléaires neutrophiles, des réactions de dégranulation, et dans les hépatocytes, de la glycogénolyse. Les récepteurs du PAF peuvent subir une *down regulation* par internalisation.



PAF induit la phosphorylation de multiples protéines dans les cellules cibles. L'activation des protéines du processus mitogène (MAP-*mitogen activating protein-kinase*) et des MAP kinase kinases a été récemment mise en évidence (83). Cette activation est rapide et spécifique (car inhibée par les antagonistes du PAF). En effet, les MAP kinases et MAP kinase kinases sont activées lors de la division cellulaire et du processus de différenciation. Les MAP kinases semblent transmettre le signal mitogène au noyau aboutissant à l'activation des oncogènes *c-jun*, *c-fos* et *c-myc*. L'activation de ces gènes en réponse au PAF, a été démontrée dans les monocytes, les cellules neuroblastiques ou leucémiques lymphoïdes et dans le modèle cellulaire A-431 (84-87). Elle est spécifique, car le lyso PAF ne la reproduit pas et les antagonistes du PAF la suppriment. Dans certains modèles (neuroblastomes), le PAF exerce un effet synergique avec le phorbol ester sur l'activation de ces gènes (88).

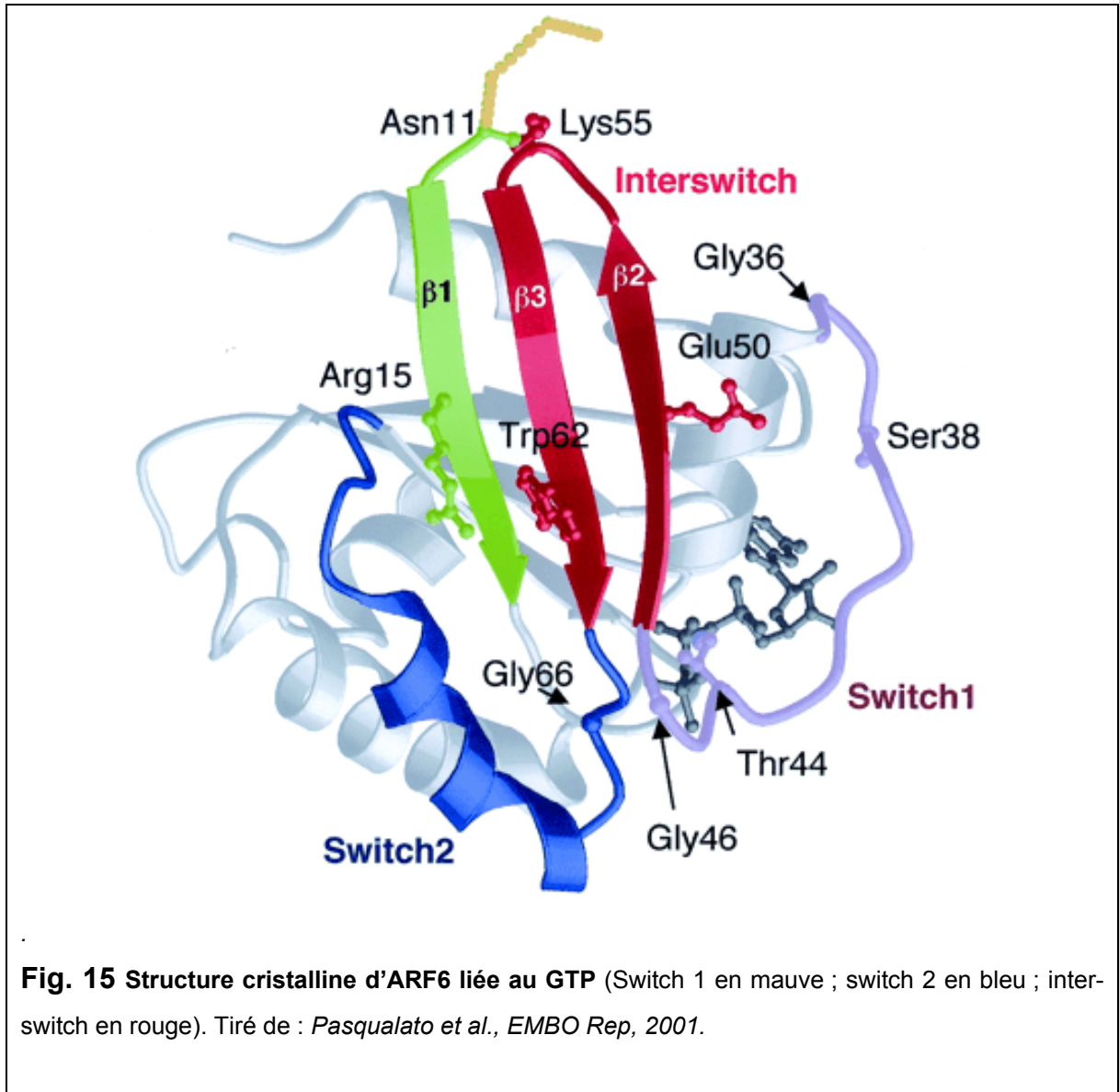
1.5. Les protéines ARF et Rho

1.5.1. Les protéines de la famille des ARF

Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARF) sont des protéines d'environ 20 kDa et constituent une famille des GTPases monomériques liées à la superfamille des protéines Ras (89). Les ARFs ont été découvertes grâce à leur implication dans la stimulation de la toxine du cholera. En fait, il avait été démontré qu'en présence de GTP, les ARFs provoquaient une ADP-ribosylation efficace et irréversible de Gas, la composante stimulatrice et régulatrice de l'adénylate cyclase (90).

Les ARFs sont très conservées et ont été retrouvées dans les organismes eucaryotes (91) et dans les mammifères. A ce jour, six isoformes ont été découvertes, de ARF1 à ARF6, ainsi qu'une famille de GTPases de type ARF-like (Arl). Chez les mammifères, les ARFs ont été divisées en trois classes en fonction de leur similarité de séquence et de leur taille relative : ARF1, 2 et 3 constituent la classe I ; ARF 4 et 5, la classe II ; ARF6 la classe III (92). Les ARFs sont distribuées de façon ubiquitaire dans les tissus humains avec une prédominance de l'expression des protéines ARF1 et 3. Par contre, au niveau cellulaire, la distribution est différente : les protéines ARF1 à ARF5 sont plutôt cytosoliques, alors qu'ARF6 est uniquement présente aux membranes (93) ou dans les endosomes (94).

Les ARFs possèdent une région centrale constituée des domaines switch 1 (résidus 40-51 d'ARF1) et switch 2 (résidus 68-81 d'ARF1) qui sont reliés par une région inter-switch (91 ; 95). Ces deux domaines sont à la base de l'interaction avec les nucléotides guanylés et ont une conformation différente selon la nature du nucléotide lié (GTP ou GDP). Les ARFs possèdent une hélice N-terminale myristoylée qui permet l'ancrage de ces protéines aux membranes (91). Ce domaine et la région inter-switch ont également des conformations différentes selon la nature du nucléotide lié (Fig. 15).



Les ARFs gravitent entre leur forme inactive liée au GDP (ARF-GDP) et leur forme active liée au GTP (ARF-GTP). Cet échange GDP/GTP est lent et la conversion du GDP au GTP est assurée par le bien des facteurs d'échange guanylique ou GEFs (ex. ARNO pour ARF6). L'activation des ARFs par les GEFs permet un changement conformationnel qui entraîne la liaison du domaine N-terminal de ces protéines aux membranes lipidiques (96). Ce processus est valide

pour toutes les ARFs, sauf ARF6 qui est déjà constitutivement attachée aux membranes, même sous la forme ARF6-GDP (97). L'échange entre GDP et GTP est à la base du changement conformationnel dans les régions switch 1 et 2, qui permet aux ARFs d'interagir avec plusieurs effecteurs (98). Après avoir accompli leur mission, l'hydrolyse du GTP en GDP, catalysée par les protéines activatrices de GTPase ou GAPs (ex. GIT pour ARF6) (91), entraîne l'inactivation des ARFs. Certaines petites protéines G des familles Ras, Rho, Rab et Ran ont une certaine activité GTPasique intrinsèque (95), par contre les ARFs n'ont pas cette capacité (99). Une fois inactivées, les ARFs, sauf ARF6, retournent au cytosol où elles sont habituellement logées dans la forme inactive.

Les ARFs sont impliquées dans la régulation transport intracellulaire et dans le remodelage du cytosquelette d'actine (100). Elles, sous forme active, interagissent avec leurs effecteurs afin de réguler des fonctions physiologiques.

ARF1 est située au niveau de l'appareil de Golgi et elle est impliquée dans la formation de vésicules car elle recrute différentes protéines de revêtement de divers types de vésicules. ARF1 joue un rôle dans le recrutement des composants des vésicules tapissées de clathrine et également dans celles non tapissées (101-103).

ARF6 est localisée à la membrane où elle a un rôle important dans l'endocytose, la phagocytose, le recyclage des récepteurs ainsi que dans les événements cellulaires menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine avec la formation de lamellipodes et aux ondulations de membrane (100).

Les ARFs activent la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5-kinase) qui est nécessaire pour produire PIP2, un phosphoinositide jouant un rôle important dans la réorganisation de l'actine et dans le trafic à la membrane plasmique *in vitro* (104). De plus, l'interaction directe d'ARF6 avec la PLD et l'activation de cette dernière aboutissent à des événements cellulaires tels que la sécrétion et les ondulations de membrane.

1.5.2. Rôle d'ARF6

ARF6 est l'unique ARF capable, toute seule, de stimuler la polymérisation de l'actine qui mène à la formations de lamellipodes au niveau des membranes cellulaires, et elle est aussi importante dans la régulation de Rac1, une GTPase de la famille Rho impliquée dans l'ondulation des membranes (105). Le rôle d'ARF6 dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans la morphologie cellulaire s'étend à des phénomènes tels que la prolifération, la migration cellulaire, la phagocytose et les ondulations membranaires induites par Rac (105-107). Toutes ces fonctions contribuent à attribuer à ARF6 une place privilégiée dans le processus de régulations des mécanismes de remodelage du cytosquelette de la cellule.

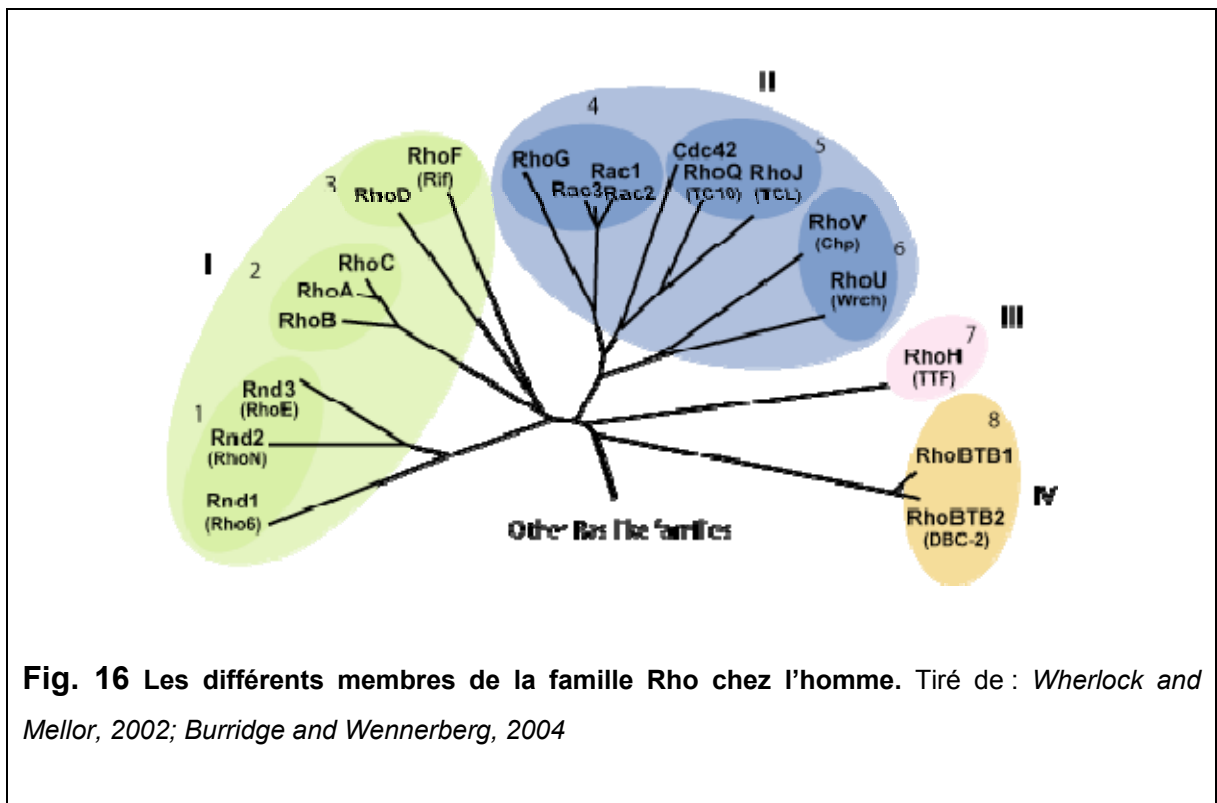
Finalement, ARF6 est aussi impliquée dans l'internalisation des récepteurs. Son rôle dans ce processus cellulaire a initialement été démontré pour le récepteur de la transferrine qui est constitutivement internalisé (108). Il semble qu'ARF6 aille un rôle essentiel dans l'internalisation de plusieurs RCPGs. Cependant, le mécanisme moléculaire contrôlé par ARF6 demeure encore peu connu.

1.5.3. Les protéines de la famille des Rho

Les protéines Rho appartiennent à la superfamille des petites (~20-35 kDa) protéines G qui compte plus de 80 membres chez les mammifères et peut être divisée en plusieurs classes comprenant entre autres les familles Ras, Rab, Arf/Sar1, Ran et Rho. Leurs rôles sont extrêmement nombreux et diversifiés. Elles sont impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine, la polarité cellulaire, la motilité cellulaire, la transcription des gènes, le métabolisme des lipides, le trafic vésiculaire, le transport noyau/cytoplasme, la prolifération, la différenciation, l'apoptose, etc. (109). Leur activité est régulée par des signaux provenant de différentes classes de récepteurs de surface tels que les récepteurs

couplés aux protéines G, les récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs aux cytokines et les récepteurs intervenant dans l'adhésion.

Les protéines Rho sont présentes chez tous les eucaryotes. Chez l'homme, vingt membres ont été identifiés à l'heure actuelle et peuvent être regroupés en plusieurs sous-familles (Fig. 16): Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rnd (Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/Rho8/RhoE), RhoD, RhoH/TTF, Rac (Rac1, Rac2, Rac3; RhoG), Cdc42 (Cdc42Hs/G25K, TC10, TCL; Wrch et Chp), Rif, RhoBTB (1 et 2) (110-112). Bien que ce regroupement en sous-familles ait été fait sur base de leurs séquences et de différences fonctionnelles, il est à noter que chaque protéine peut aussi avoir un rôle spécifique (113). Ainsi, bien que RhoA, RhoB et RhoC semblent partager des fonctions communes dans la régulation des fibres de stress (114), elles diffèrent par leur localisation subcellulaire (115), la régulation de leur expression (116; 117) et leur modification lipidique post-traductionnelle (118).



Les protéines Rho sont liées de façon réversible à un nucléotide guanilique. Elles existent dans la cellule sous deux formes: une forme liée au GDP, qui est inactive et une forme liée au GTP, correspondant à l'état actif, sous laquelle elles peuvent interagir avec leurs effecteurs et assurer la transduction du signal extracellulaire. Il existe néanmoins quelques exceptions : TTF, Rnd1, Rnd2 et Rnd3 qui, suite au changement d'acides aminés clés dans l'hydrolyse du GTP, existent sous une forme prédominante liée au GTP (119).

Sous la forme liée au GTP, les protéines Rho sont capables d'interagir avec différentes protéines effectrices, telles que des Ser/Thr kinases (Rho-kinase, PKN), des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (phosphoinositides kinases, phospholipase D) ou des protéines adaptatrices impliquées dans la transduction de différents signaux (Rhotéine, Rhophiline, p140Dia) (119).

La compréhension de ces mécanismes à la base de la fonction des protéines G a permis de mener au développement de mutants constitutivement actifs (déficients au niveau GTPase) et dominants négatifs (déficients au niveau de l'échange des nucléotides) qui bloquent la protéine dans sa forme liée au GTP ou GDP respectivement. La majeure partie de la connaissance des fonctions des protéines Rho dérive d'études réalisées sur RhoA, Rac1 et Cdc42 (113). Leurs rôles dans le cytosquelette et dans diverses cascades de signalisation ont été élucidés grâce à l'expression de dominants négatifs ou de mutants constitutivement actifs mais aussi par l'utilisation de toxines bactériennes.

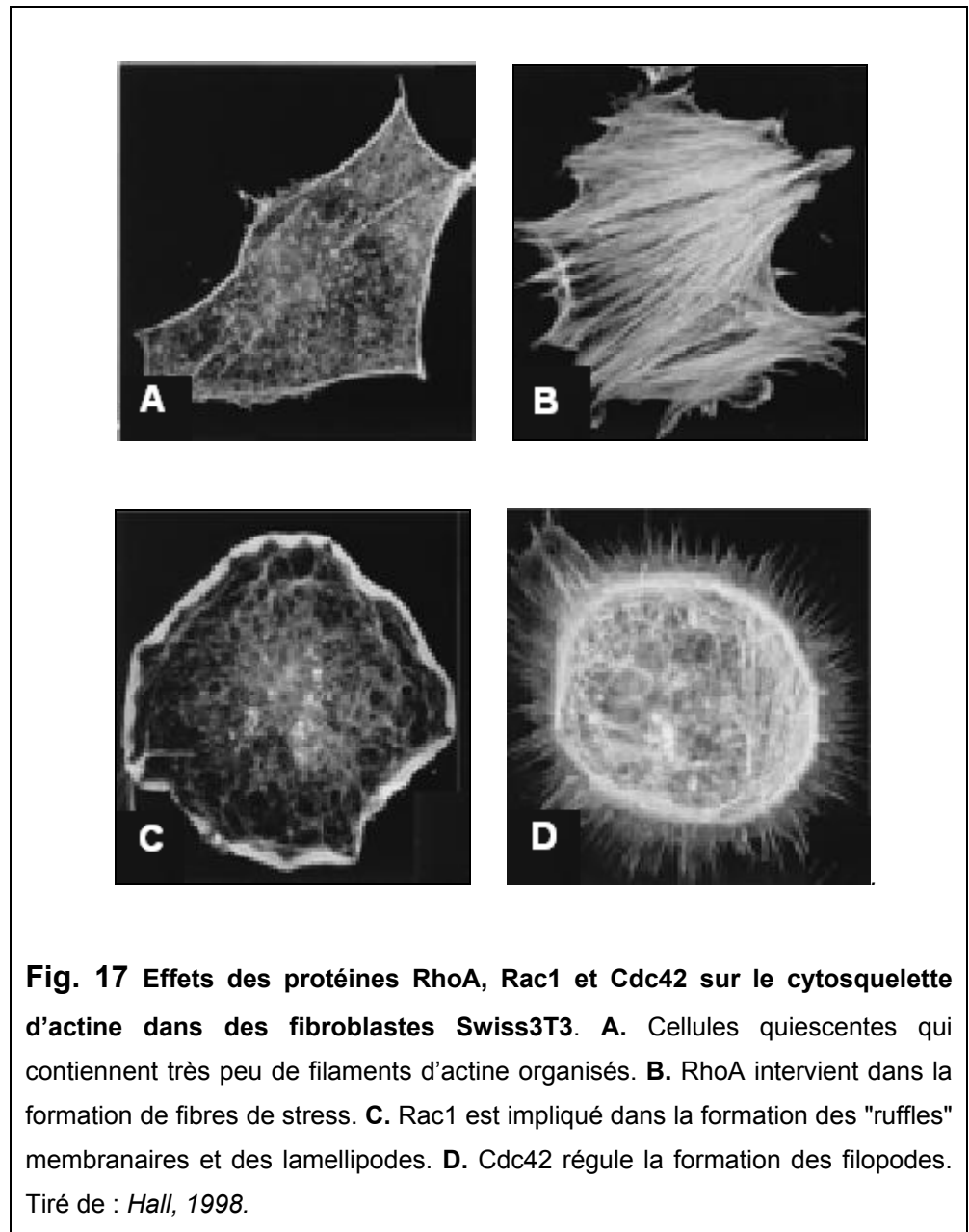
1.5.4. Fonctions des protéines Rho : rôle de Rac1

Les protéines Rho sont impliquées dans la régulation d'une large variété de processus cellulaires. La fonction majeure de ces protéines est de réguler l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine (120). Les protéines Rho sont aussi à l'origine de cascades de signalisation qui induisent l'activation d'une variété de facteurs de transcription. Les changements dans l'organisation de

l'actine ou dans l'expression génique induits par ces protéines peuvent aussi réguler de nombreux processus cellulaires associés à la fonction des Rhos. Ceux-ci incluraient la régulation de la morphologie cellulaire, l'attachement des cellules, la motilité et l'invasion cellulaires, les interactions cellule-cellule, la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

1. *Relation de l'organisation du cytosquelette d'actine.* Les effets des protéines Rho, Rac et Cdc42 ont été initialement décrits dans des fibroblastes Swiss3T3 qui, à l'état quiescent, contiennent peu de fibres d'actine (120). Des études de microinjection de mutants constitutivement actifs ou dominants négatifs des Rhos ont montré que, dans cette lignée, Cdc42 régule la formation de filopodes, fines excroissances à la surface de la cellule, probablement impliqués dans la reconnaissance de l'environnement extracellulaire (121). Rac1 est impliqué dans la formation de "ruffles" membranaires, replis de la surface cellulaire, et de lamellipodes, petits appendices en forme de feuillets minces impliqués dans la reptation de la cellule (122). Quant à RhoA, il intervient dans la formation de fibres de stress composées de longs faisceaux de filaments d'actine, associés à la myosine II, qui traversent la cellule et permettent son attachement à la matrice extracellulaire via les adhésions focales (114) (Fig. 17). Ces protéines peuvent agir de concert dans des cascades qui lient leurs activités. Ainsi, dans les Swiss3T3, l'activation de Cdc42 active Rac qui à son tour active RhoA. Bien que cette cascade soit aussi observée dans d'autres types cellulaires (123), une séparation de leurs voies ainsi que des boucles de rétrocontrôle existent également. Par exemple, l'inactivation de Rho induit l'activation de Rac et Cdc42 dans des cellules de neuroblastomes (124). De même, leurs effets sur le

cytosquelette peuvent varier en fonction du type cellulaire. Ainsi, si on reprend l'exemple des cellules de neuroblastomes, Rho induit la rétraction des neurites, alors que Rac induit leur extension.



Notons que d'autres membres de la famille (RhoD, RhoG, Rnd1, Rnd3) participent à l'organisation du cytosquelette d'actine et que les protéines Rho sont également associées à ce processus dans d'autres organismes (113). Deux voies principales par lesquelles Rho induit l'assemblage des filaments d'actine ont été bien caractérisées et peuvent agir en synergie (125). La première induit l'activation de la myosine II, une protéine motrice pour les filaments d'actine et responsable de leurs propriétés contractiles. La seconde voie induisant la formation des fibres de stress par Rho fait intervenir les effecteurs de Rho appartenant à la famille Dia et qui comprend Dia1 et Dia2 (126). Les membres de cette famille conduisent à la réorganisation de l'actine par liaison à la profiline, une protéine qui induit l'assemblage d'actine G monomérique en filaments (127).

2. *Régulation de l'expression des gènes.* La famille Rho est aussi impliquée dans la régulation de l'expression de NF- κ B (128; 129), qui reconnaît des éléments d'ADN présents dans une variété de promoteurs de gènes impliqués principalement dans les réponses immunes et inflammatoires. A l'état inactif, NF- κ B est localisé dans le cytoplasme où il est retenu par l'inhibiteur I κ B. Son activation par des stimuli externes induit la phosphorylation et la dégradation protéolytique d'I κ B, libérant NF- κ B qui peut migrer dans le noyau et lier l'ADN (130). Il a été montré que Rac1, RhoA et Cdc42 induisent l'activité transcriptionnelle de NF- κ B via la phosphorylation d'I κ B α et la translocation de NF- κ B dans le noyau (128). RhoA et Cdc42 sont également impliqués dans l'activation de NF- κ B par certains stimuli tels que le TNF α (128). Rac1 peut aussi stimuler l'activité de l'I κ B kinase (IKK) qui phosphoryle I κ B, alors que Cdc42 et Rho activent NF- κ B

indépendamment de IKK (131). Dans des fibroblastes, PAK peut stimuler la translocation nucléaire de NF- κ B via un mécanisme indépendant d'IKK (132). Dans les cellules HeLa, l'activation de NF- κ B par Rac est corrélée à sa capacité à induire la production de superoxyde (133).

3. *Régulation de la prolifération.* Le fait que des protéines dont la fonction principale est la régulation du cytosquelette soient couplées à la prolifération peut à première vue paraître surprenant. Mais, depuis de nombreuses années, il est bien connu que les cellules non transformées en culture requièrent à la fois des facteurs chimiques (ex: facteurs de croissance) et des facteurs physiques (ex: adhésion, sous-confluence) pour proliférer. In vivo, ces besoins permettent probablement aux cellules de s'assurer que celles-ci prolifèrent uniquement lorsqu'elles sont dans l'environnement physique correct et que les facteurs de croissance appropriés sont présents. Or, l'activité des protéines Rho est régulée par des facteurs physiques divers tels que l'engagement des intégrines, la confluence et la formation de jonctions adhérentes, de telle sorte que ces protéines sont de bons candidats pour transmettre les informations entre l'environnement physique et la machinerie du cycle cellulaire (134). La première évidence soutenant un lien direct entre les protéines Rho et la régulation du cycle cellulaire a été apportée par le fait que la microinjection de mutants constitutivement actifs de RhoA, Rac1 et Cdc42 dans des Swiss3T3 quiescents induit la progression en G1 et stimule la synthèse d'ADN, tandis que les mutants dominants négatifs correspondants bloquent la synthèse d'ADN stimulée par le sérum (135; 136). Depuis, différents groupes ont montré que les protéines

Rho sont liées à la régulation de composants spécifiques du cycle cellulaire.

4. *Autres fonctions.* Dans les cellules épithéliales, les Rhos régulent la formation et la maintenance des jonctions cellulaires (jonctions adhérentes et "tight"), requises pour la fonction de barrière des couches épithéliales et l'établissement de la polarité apicale-basolatérale, ainsi que leur désassemblage pendant la motilité cellulaire (137-139). Au niveau de la motilité des cellules, il est généralement admis que Cdc42 régule la polarité de la migration cellulaire, Rac intervient dans la formation de protrusions membranaires à l'avant de la cellule en migration, tandis que RhoA est nécessaire pour la génération de la force contractile permettant à l'arrière et au reste du corps cellulaire de suivre l'avant (140). La phagocytose, l'endocytose et l'exocytose sont encore d'autres processus contrôlés par les protéines de la famille Rho (141 ; 142).

1.6. Projet et hypothèse de recherche

Les médiateurs comme le $\text{PGF2}\alpha$ et le PAF sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques variant de l'inflammation à l'accouchement prématurée (45, 54, 63, 72). Ces récepteurs sont des cibles pharmacologiques validées pour différentes conditions pathologiques. Cependant, peu d'antagonistes ou de modulateurs de fonctions efficaces de ces récepteurs ont été développés par l'industrie pharmaceutique.

Toutes les voies de signalisations intracellulaires menant aux réponses biologiques activées suite à la liaison de la $\text{PGF2}\alpha$ et du PAF à leurs récepteurs demeurent encore inconnues. Ainsi, notre étude vise d'une part à identifier les voies de signalisation activées par les récepteurs FP du $\text{PGF2}\alpha$ et les récepteurs du PAF en se concentrant sur les signaux menant au remodelage du cytosquelette d'actine et donc aux changements de morphologie cellulaire. Cette réponse physiologique étant importante pour la contraction cellulaire associée au $\text{PGF2}\alpha$ et la capacité migratoire (chimiotactisme) associée au PAF. Classiquement, la réorganisation de l'actine implique l'activation des GTPases de la famille des ARFs et de Rho (105-107, 120). Nous étudierons donc les mécanismes d'activation de ces protéines ainsi que le processus d'ondulation des membranes et la migration des cellules par des techniques établies dans notre laboratoire. Ces expériences seront faites dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FP ou PAF.

D'autre part et en collaboration avec les chimistes et autres biologistes de notre équipe de recherche des IRSC, nous tenterons de développer des petites molécules de nature peptido-mimétiques et allostériques afin de moduler différenciellement les voies de signalisation activées par nos deux récepteurs d'intérêt. Plus précisément, un ligand allostérique est un agoniste ou antagoniste se fixant à un site autre que celui du ligand naturel entraînant un changement de conformation ayant pour conséquence soit une augmentation (effecteur positif),

soit une diminution (effecteur négatif) de l'activité du ligand naturel (59). Nous étudierons également l'effet de composés disponibles commercialement.

Notre hypothèse de recherche est que les molécules dérivées de la structure de la 2^e boucle extracellulaire agissent comme des modulateurs allostériques contrôlant différenciellement les voies de signalisations intracellulaires activées par la stimulation des récepteurs FP et PAF.

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs et anticorps

Le milieu minimal essentiel (MEM) et le sérum bovin foetal (FBS) ont été achetés chez Sigma. Tous les autres produits de culture proviennent d'Invitrogen-Gibco. L'anticorps monoclonal anti-arf6 et l'anticorps polyclonal anti-rac1 ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology. Les billes *HA affinity matrix* proviennent de chez Roche. Les billes de Glutathion-SépharoseTM 4B ont été achetées chez Amersham Biosciences. L'Alexa-Fluor 568-couplé à un anti-souris IgGs a été acheté chez Molecular Probes. Le *minimal SD agar base* et les suppléments d'acides aminés proviennent de chez Clontech.

Les molécules PGF2 α et AL-8810 utilisées pour le récepteur FP ont été achetées chez Cayman Chemical. Les molécules THG113 et THG113.824 ont été produites et modifiées à l'institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC) de l'Université de Montréal. L'AL-8810 a été solubilisé dans de l'éthanol à 100% à une concentration de 5mM, le THG113 et le THG113.824 dans de l'eau nanopure à 100% à une concentration de 1mM.

Les molécules utilisées pour le récepteur PAF ont été fournies par différentes compagnies. Le BN52021 a été acheté chez Biomol International LP; le Carbamyl-PAF (C-PAF), le CV-3988, l'Octylonium Bromide, le FR-49175 et le PCA-4248 chez Biomol. Le ABT-491 a été acheté chez Sigma-RBI. Le BN52021 et le Carbamyl-PAF ont été solubilisés dans de l'éthanol à 100% aux concentrations respectives de 2mM et 1mM. Toujours en utilisant de l'éthanol 100%, le CV-3988, l'Octylonium Bromide et le FR-49175 ont été dissous à une concentration de 5mM, et le PCA-4248 à une concentration de 10mM. L'ABT-491 a été mis en suspension dans de l'eau nanopure à 100% à une concentration de 1mM.

Tous autres réactifs ont été achetés chez Sigma.

2.2. Culture cellulaire

Des cellules HEK293 exprimant de façon stable HA-FP ou HA-PAF ensemencées dans des pétris de 15cm ont été maintenues à 37°C, 5% CO₂, dans un milieu minimal essentiel (MEM) enrichi avec 1mM d'acides aminés non essentiels (NEAA), 1mM de sodium pyruvate, 10% FBS et 150µL de puromycine, antibiotique nécessaire à garder la sélection dans les cellules. Avant les différentes expériences, les cellules ont été réensemencées dans des pétris de 10cm, dans des chambres de Boyden ou sur des lamelles de verre, à différentes concentrations.

2.3. Microscopie confocale

Les cellules HEK293 exprimant de façon stable les récepteurs FP (HEK293 HA-FP) ou PAF (HEK293 HA-PAF) ont été ensemencées à densité moyenne (110000 cellules/puits 35mm) sur des lamelles en milieu DMEM supplémenté de FBS 10% et 150µl de Puromycine. Après 24 heures, les cellules ont été lavées avec du milieu privé de FBS et incubées de nuit dans le même milieu. 24 heures après, les cellules sont soumises à stimulation par les différents composés pendant 45 minutes (antagonistes) et/ou 30 minutes (agoniste naturel). Ensuite les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes et lavées avec du PBS. Les cellules ont été incubées pendant une heure avec la Phalloïdine couplée à l'Alexa 488, nécessaire à la visualisation de la distribution de l'actine. Finalement les cellules ont été examinées par microscopie confocale Zeiss METALSM510.

2.4. Migration cellulaire

Les filtres des chambres de Boyden ont été incubés avec du collagène de type I à une concentration de 6µg, de nuit à 37°C et rincés par la suite avec du PBS. Une fois le filtre recouvert de collagène, les cellules HEK293 HA-FP ou HA-

PAF (selon l'étude effectuée) déprivées du sérum ont étéensemencées sur le filtre à une densité de 40000 cellules dans 100µL de milieu. Après 1 heure (temps nécessaire à l'adhésion des cellules), le milieu des cellules a été changé par un milieu contenant ou pas la PGF2α ou le Carbamyl-PAF. Après 4 heures les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes et colorées avec du cristal violet (MeOH 20%, cristal violet 0.1%) toute la nuit. Le lendemain les cellules ont été rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée (dH₂O). Les cellules n'ayant pas migré sont méticuleusement enlevées avec un coton-tige. Des photographies de cinq champs différents sont prises au hasard pour ensuite effectuer le comptage des cellules qui ont traversé les pores de la membrane.

2.5. Production des protéines de fusion GST-GGA3 et GST-PAK

Le vecteur pGEX2T portant la GGA3 a été transformé dans des bactéries BL21 et la production de protéines a été induite avec 0,5 mM d'IPTG (2 heures à 37°C avec agitation). Les bactéries ont alors été centrifugées et resuspendues dans du tampon STE (7,5 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 3 mM EDTA) contenant ~ 100 µg/mL de lysozome, puis incubées sur glace pendant 15 minutes. Une autre incubation de 10 minutes sur glace a suivi après avoir ajouté du DTT (5 mM) et des inhibiteurs de protéases (100 µM phénylméthylsulfonyl fluoride, 5 µg/mL aprotinine, 10 µg/mL leupeptine, 1 µg/mL pepstatine A, 1 mM benzamine). 1,5% (v/v) de N-lauryl-sarkosyl a été ajouté, puis les échantillons ont été soniqués et centrifugés. Du triton X-100 a été ajouté aux protéines solubles. Les protéines de fusion ont ensuite été purifiées en utilisant des billes de glutathion-sépharose 4B. L'intégrité des protéines de fusion GST a été analysée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

2.6. Essais d'activation d'ARF6 et Rac1 dans des cellules HEK293 HA-FP

Les cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur HA-FP ont été ensemencées en présence du sérum pour 24 heures. Elles ont été privées de sérum pendant la nuit. Les cellules ont été par la suite stimulées avec la PGF2 α (50nM ou 100nM) pour les temps indiqués. Après stimulation, les cellules ont été lysées dans 500 μ L de tampon de lyse E (50 mM Tris HCL, 1% NP-40, 137 Mm NaCl, 10% glycérol, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, 1 mM NaPPI, 1 Mm Na₃VO₄, pH 7,4) contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons ont été incubés avec inversion constante à 4°C pour 30 minutes et centrifugés à 15 000 rpm pendant 20 minutes, afin de récupérer le surnageant. 10 μ L ont été prélevés pour analyse direct du lisat. Des protéines de fusion GST-GGA3, pour Arf6, et PAK, pour Rac1, couplées à des billes de glutathion-sépharose 4B ont été ajoutées à chacun des tubes et les échantillons ont été incubés avec inversion constante à 4°C pendant 1 heure. Les billes ont été récupérées par centrifugation et lavées 3 fois avec du tampon E. Les protéines ont été éluées dans 25 μ L de SDS *sample Buffer* 2X contenant 5% de β -mercaptoéthanol à 95°C pendant 5 minutes. La présence de protéines a été analysée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (10 ou 12%) et les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été testées pour la présence d'Arf6 ou Rac1 activées en utilisant des anticorps spécifiques, Anti-Arf6 ou Anti-Rac1. Les anticorps secondaires étaient conjugués au FITC et la fluorescence a été détectée avec un scanner de type Typhoon 9410 (Amersham). Les données ont été analysées avec le programme ImageQuant 5.2 .

3. Résultats

3.1. Étude de la réponse du récepteur FP suite à la stimulation par différents ligands

3.1.1. Réaction du récepteur FP à son ligand naturel, la PGF2 α

Il a été déjà démontré que le récepteur FP des prostaglandines interagit avec la PGF2 α , qui est son ligand naturel et qui provoque l'activation du récepteur. Notre première étape a été de déterminer la concentration et le temps minimal nécessaire pour activer notre récepteur surexprimé et activer le remodelage de l'actine dans des cellules HEK293. Nous avons effectué des stimulations avec la PGF2 α à 0,05 μ M et à 0,1 μ M, pendant 10, 15 et 30 minutes. Suite à nos analyses la concentration optimale à utiliser pour nos expériences a été fixée à 0,1 μ M, car à une concentration de 0,05 μ M nous avons moins de cellules stimulées. L'utilisation de la PGF2 α à 0,1 μ M provoquait l'activation de presque la totalité des cellules soumises. En ce qui concerne le temps d'activation utilisé, nous avons remarqué que les cellules stimulées pendant 10 et 15 minutes n'arrivaient pas à l'expression maximale du phénotype recherché, par contre à 30 minutes, nous avons une activation presque totale, donc nous avons fixé notre temps de stimulation à 30 minutes. Une fois nos paramètres de recherche établis, nous avons procédé à l'étude du remodelage du cytosquelette d'actine des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FP (HEK293 HA-FP). Nous avons utilisé comme contrôle des cellules HEK293 HA-FP non stimulées. Parallèlement, nous avons effectué la même expérience sur des cellules HEK293 stable au récepteur de l'angiotensine (HEK293 HA-ATR) en utilisant le ligand naturel, l'AngII. Ce modèle a été utilisé comme contrôle positif car c'est une lignée cellulaire modifiée de façon à surexprimer le récepteur ATR, comme dans le cas du récepteur FP. De plus, la stimulation d'ATR conduit à l'activation d'ARF6 et de Rac1, et à l'ondulation

membranaire, des phénomènes que nous étudions aussi pour le récepteur FP. Nous avons répété nos expériences entre 3 et 5 fois.

Les résultats de microscopie confocale obtenus à partir des cellules HEK293 HA-FP ont révélé que, dans des conditions non stimulées, l'actine est située au niveau de la membrane. Suite à la stimulation par la $\text{PGF2}\alpha$, nous pouvons observer la réorganisation de l'actine responsable du phénomène de l'ondulation membranaire. Nous pouvons comparer la morphologie des cellules HEK293 HA-FP non stimulées et stimulées par la $\text{PGF2}\alpha$, à celle des cellules HEK293 HA-ATR non stimulées ou stimulées à l'AngII. Suite à la stimulation par l'AngII nous avons toujours le phénomène de remodelage de l'actine, mais de plus nous avons aussi formation de lamellipodes, qui ne sont pas présents pour les cellules HEK293 HA-FP (Fig. 18).

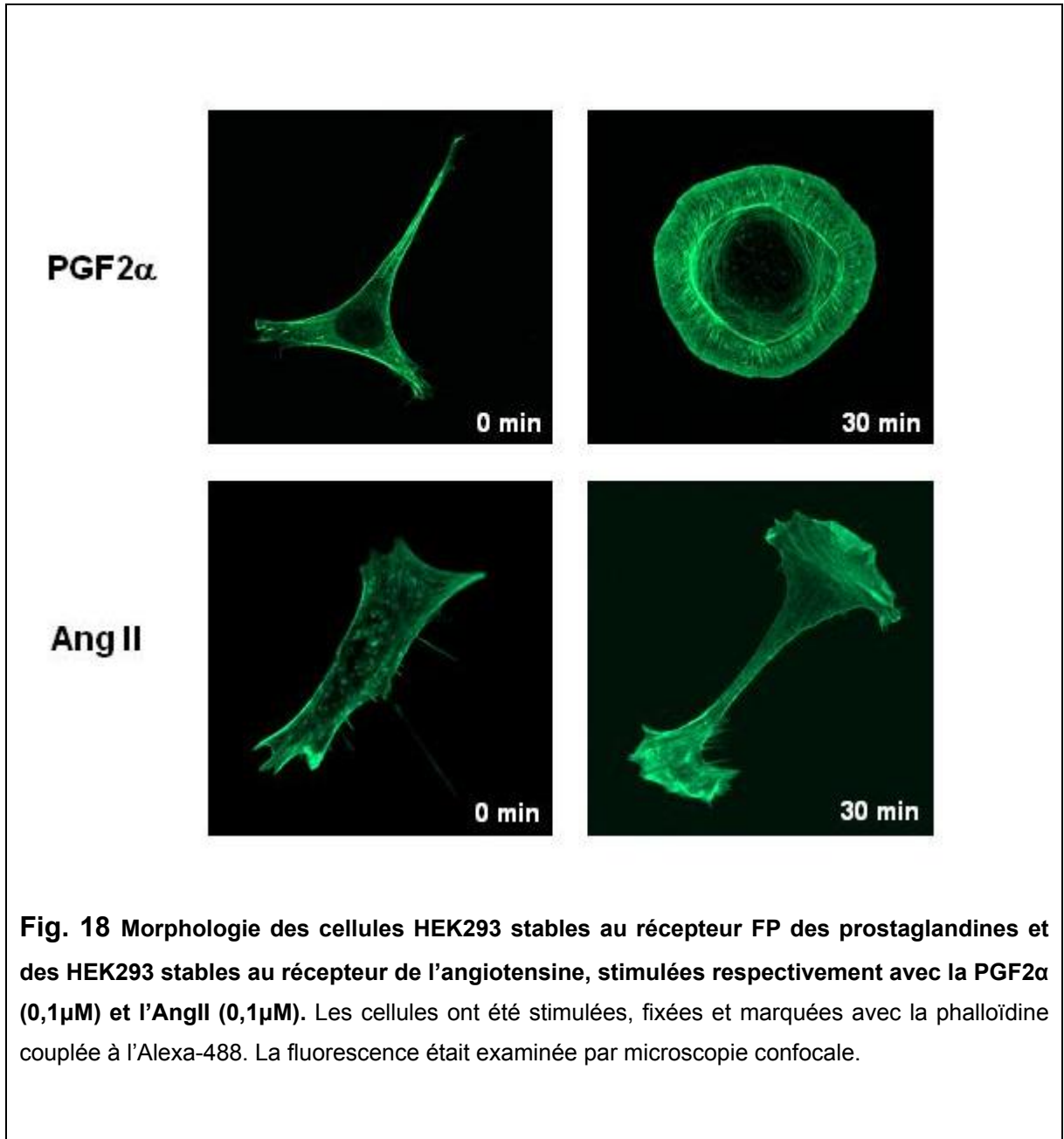


Fig. 18 Morphologie des cellules HEK293 stables au récepteur FP des prostaglandines et des HEK293 stables au récepteur de l'angiotensine, stimulées respectivement avec la PGF2 α (0,1 μ M) et l'AngII (0,1 μ M). Les cellules ont été stimulées, fixées et marquées avec la phalloïdine couplée à l'Alexa-488. La fluorescence était examinée par microscopie confocale.

3.1.2. Réponse du récepteur FP suite à la stimulation par le AL-8810, le THG113 et le THG113.824

Les données obtenues précédemment nous confirment que la PGF2 α active notre récepteur de façon à induire le remodelage de l'actine au niveau du cytosquelette. Donc nous avons effectué des expériences pour tester différents composés et évaluer leur capacité antagoniste face au ligand naturel.

Nous avons pris en examen l'AL-8810, déjà connu pour ses propriétés antagonistes sur le récepteur FP, le THG113 et le THG113.824. Ces deux dernières molécules ont été produites et modifiées à l'Université de Montréal.

Nous avons effectué des expériences visant à déterminer la concentration minimale et le temps d'utilisation pour chaque produit selon la même méthode décrite en 3.1.1. Pour obtenir une meilleure action antagoniste suite à la stimulation, la concentration d'AL-8810, de THG113 et de THG113.824 a été fixée à 0,1 μ M, et le temps de traitement à 45 minutes. Nous avons remarqué qu'en utilisant les produits pour un temps supérieur à 60 minutes nous obtenions une action antagoniste plus faible qu'à 45 minutes, peut-être due à la modification ou dégradation des molécules après un certain temps dans le milieu MEM.

Une fois le temps et la concentration déterminés, nous avons élaboré un protocole d'expériences basé sur les temps d'exposition des cellules aux antagonistes et à l'agoniste naturel. Dans toutes nos expériences nous avons exposé les cellules HEK293 HA-FP à l'antagoniste AL-8810, THG113 ou THG113.824 pendant 15 minutes. Ensuite nous avons ajouté dans le même milieu l'agoniste naturel, la PGF-2 α . Donc nous avons eu en totale un temps d'exposition de 45 minutes à l'antagoniste et un temps d'exposition de 30 minutes à l'agoniste.

Les résultats montrent que l'AL-8810, le THG113 et le THG113.824 ont une action antagoniste d'intérêt sur le récepteur FP, mais ils mettent en évidence aussi la puissance du THG113.824 (Fig. 19).

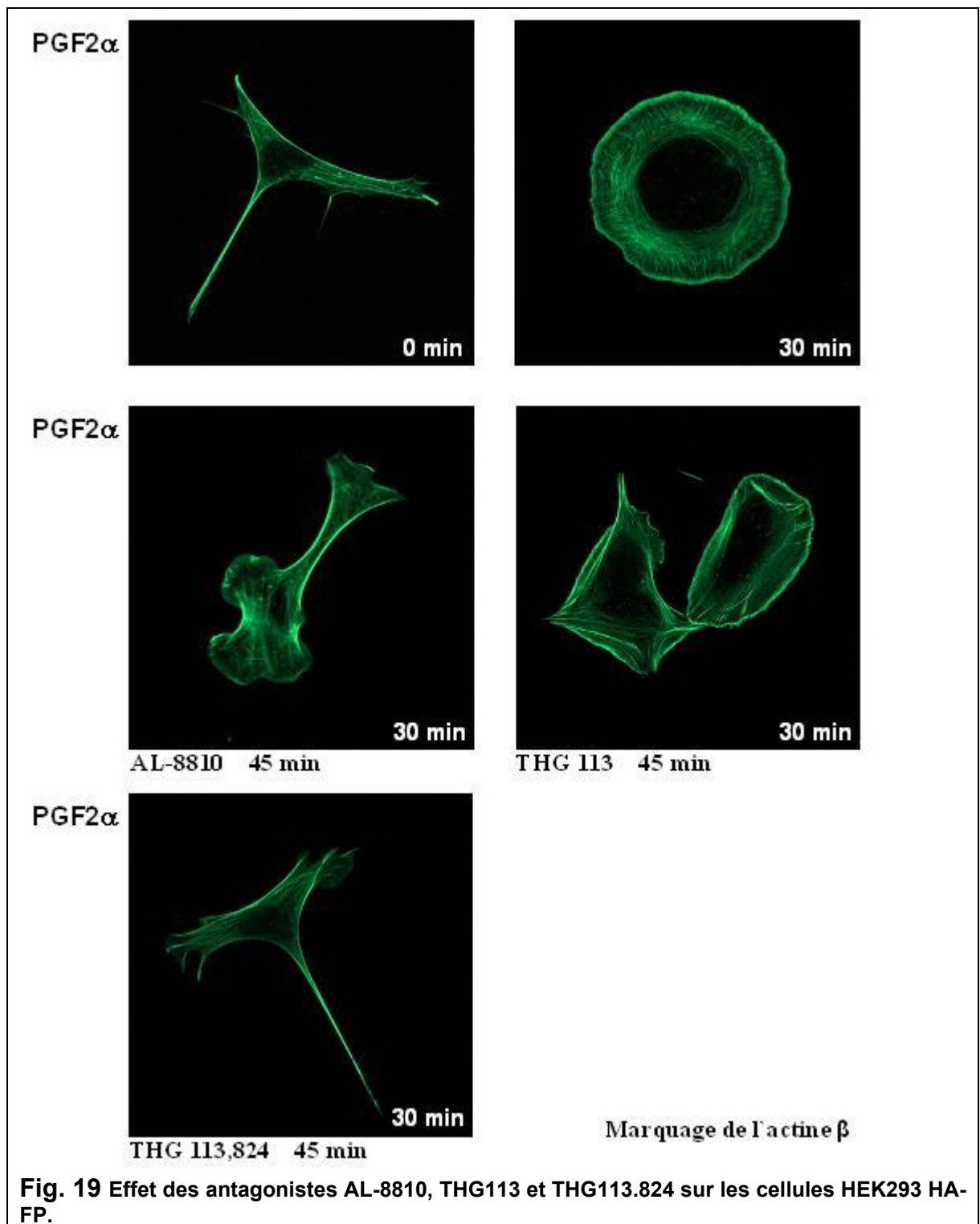
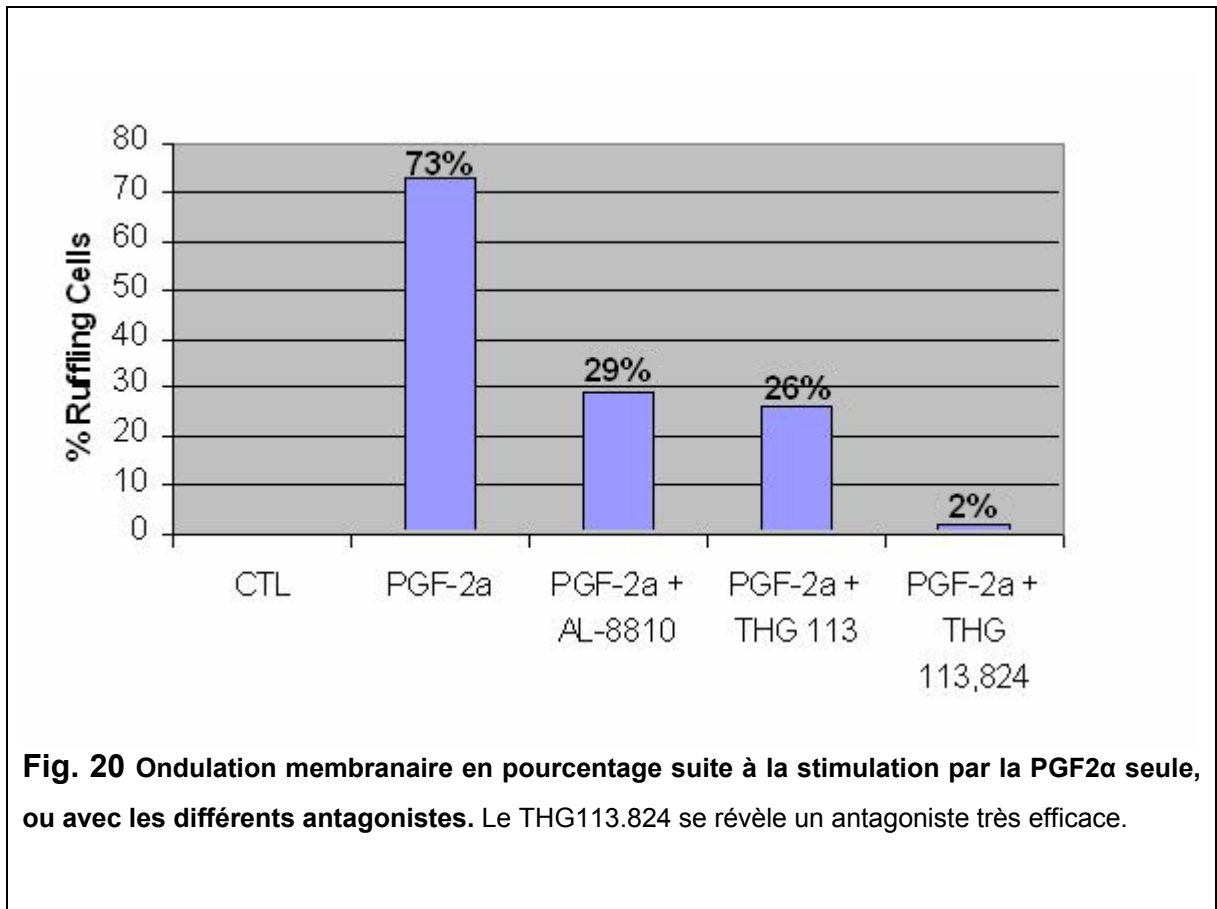


Fig. 19 Effet des antagonistes AL-8810, THG113 et THG113.824 sur les cellules HEK293 HA-FP. La capacité des antagonistes à bloquer le remodelage du cytosquelette d'actine a été examinée par microscopie confocale. Les antagonistes ont été utilisés à 0,1 μ M et ajoutés sur les cellules, 15 minutes avant le traitement avec la PGF2 α . n=3, les expériences étaient effectuées en duplicata.

Voici un graphique avec le pourcentage d'inhibition provoqué par l'utilisation des différentes molécules antagonistes (Fig. 20).

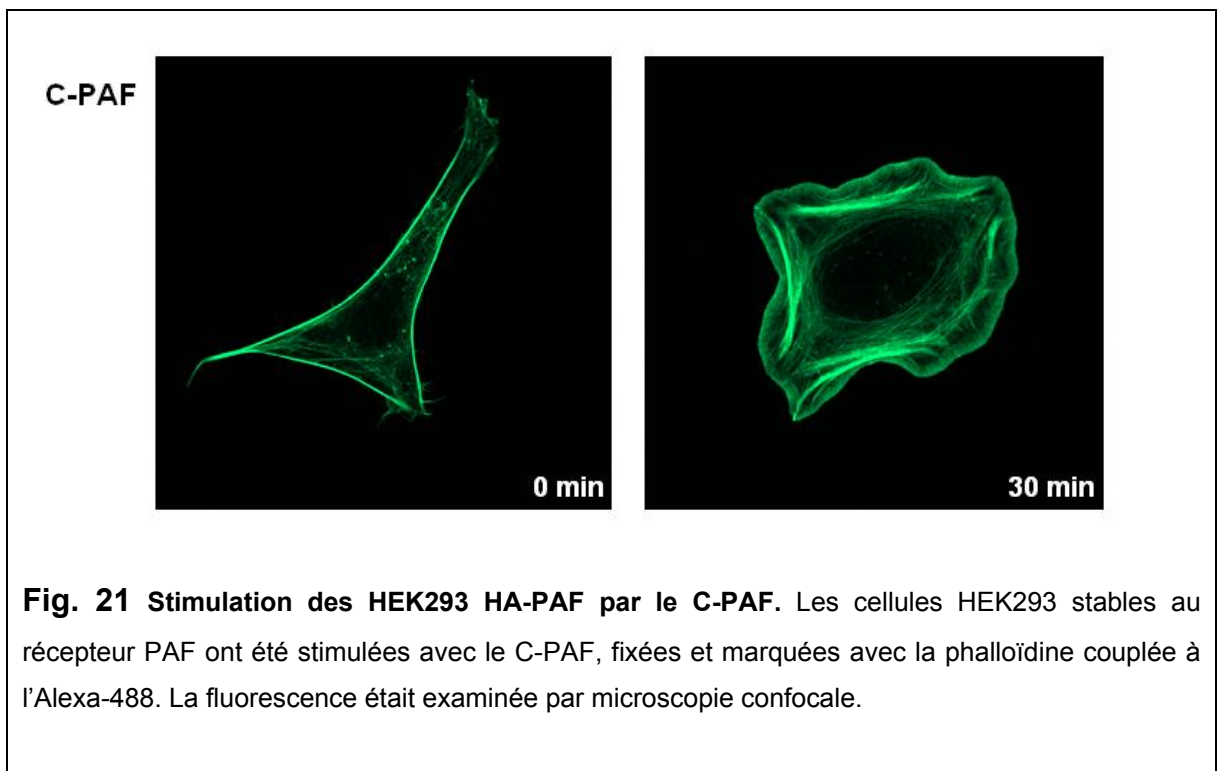


L'utilisation de la PGF2 α seule pour stimuler les cellules HEK293 HA-FP donne des ondulations égales à 73%. Dans les mêmes conditions, en utilisant comme antagoniste l'AL-8810, les ondulations diminuent à 29%, et en utilisant le THG113, nous avons une réduction jusqu'à 26%. Seul le THG113.824 provoque une chute drastique des ondulations à 2% (Fig.20).

3.2. Étude de la réponse du récepteur PAF suite à la stimulation par différents ligands

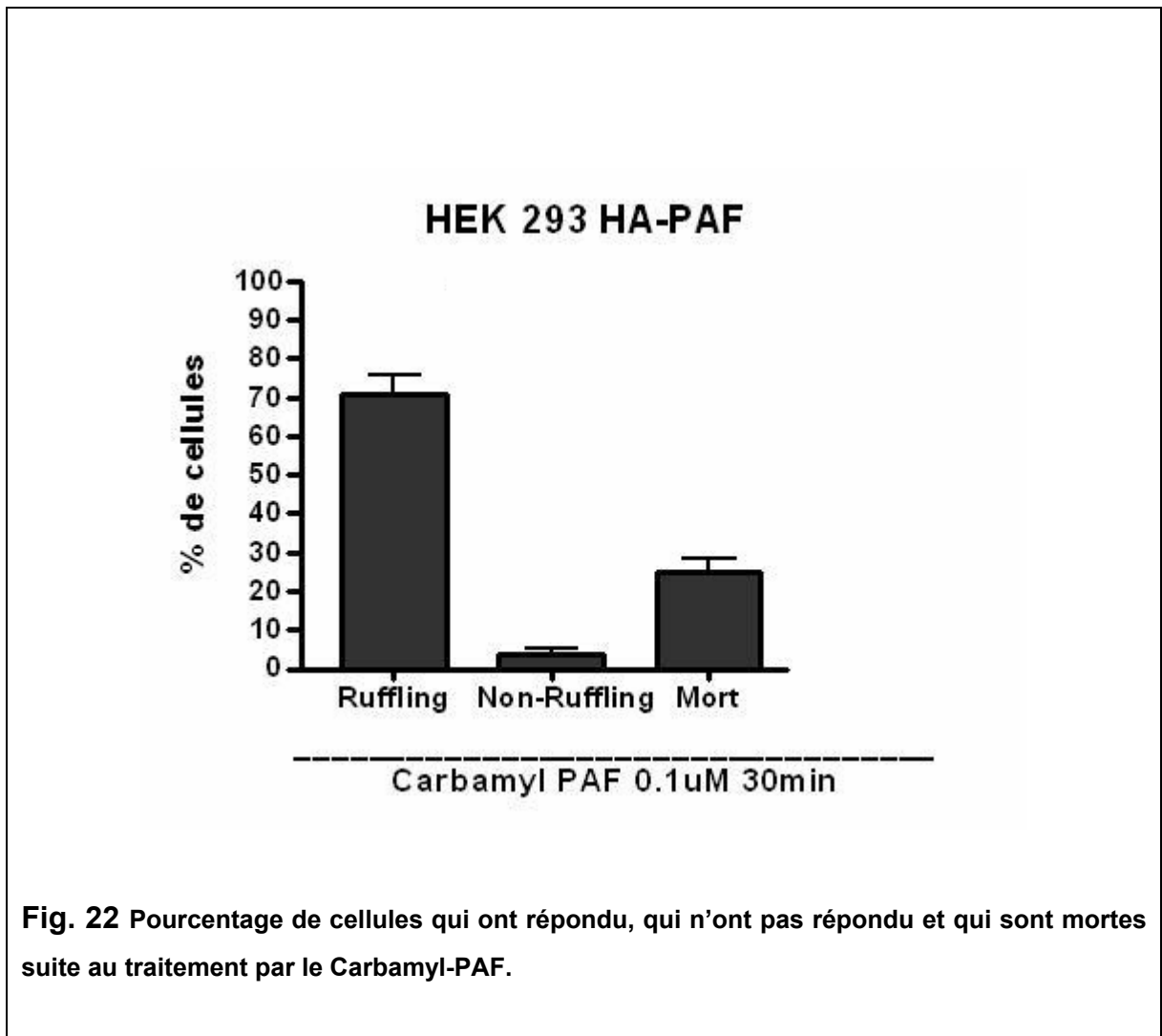
3.2.1 Réaction du récepteur PAF à son ligand naturel, le Carbamyl-PAF

Après avoir établis nos paramètres de recherche, comme dans le cas précédent, nous avons procédé à l'étude du remodelage du cytosquelette d'actine des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur PAF (HEK293 HA-PAF). Nous avons stimulé les cellules exprimant de façon stable le récepteur PAF avec leur ligand naturel, le Carbamyl-PAF (C-PAF). Nous avons utilisé une concentration de C-PAF de $0,1\mu\text{M}$ et un temps de stimulation de 30 minutes. Le C-PAF stimule la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules HEK293 HA-PAF (Fig. 21).



Dans le cas du récepteur du PAF, nous avons observé une ondulation membranaire irrégulière et une augmentation de la formation de fibres de stress, résultat différent en comparaison aux expériences effectuées sur les HEK293 HA-FP (Fig. 18).

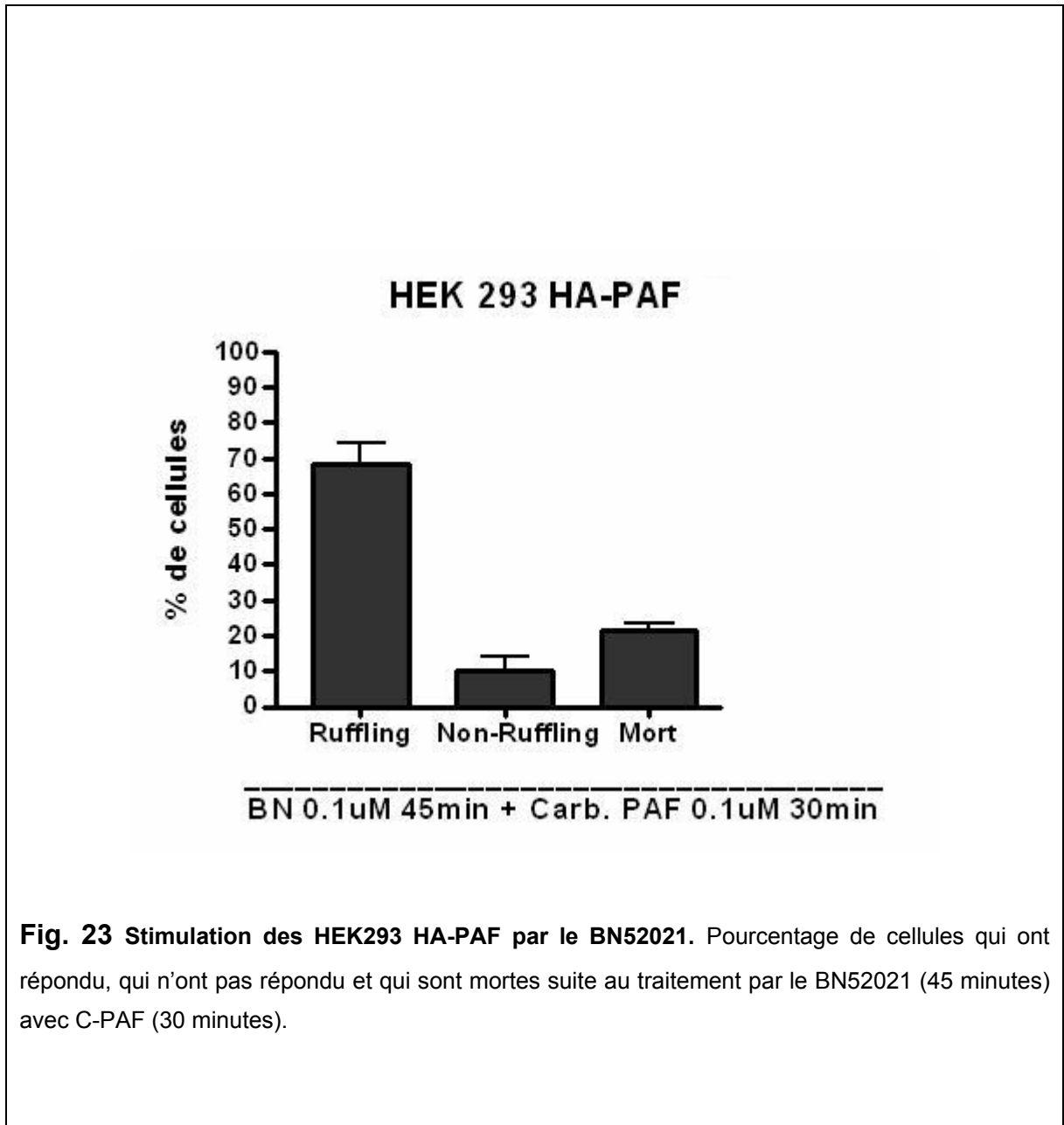
Dans nos expériences, nous avons remarqué aussi un faible indice de mort cellulaire, nous avons donc considéré ce facteur dans l'analyse de nos résultats (Fig. 22).



3.2.2. Réponse du récepteur PAF suite à la stimulation par d'autres ligands, dont l'ABT-491

Les résultats précédents confirment que le C-PAF se lie au récepteur PAF de façon à activer le récepteur et provoquer la réorganisation de l'actine au niveau du cytosquelette. Donc nous avons effectué des expériences pour tester différentes molécules et évaluer leur capacité antagoniste face au ligand naturel.

Nous avons pris en examen différentes molécules : le BN52021 (Fig.23), le CV-3988 (Fig. 24), l'Octylonium Bromide (Fig.25), le FR-49175 (Fig. 26), le PCA-4248 (Fig. 27) et l'ABT-491 (Fig. 28). Ce sont tous des antagonistes classiques amplement utilisés dans la littérature et disponibles commercialement. En particulier, l'ABT-491 est un des antagonistes les plus puissants disponible pour le récepteur PAF, mais plus récent que les autres. Ces molécules sont structurellement très différentes et elles ont donc des chances de se lier diversement au récepteur pour induire des conformations pouvant engendrer des activités distinctes.



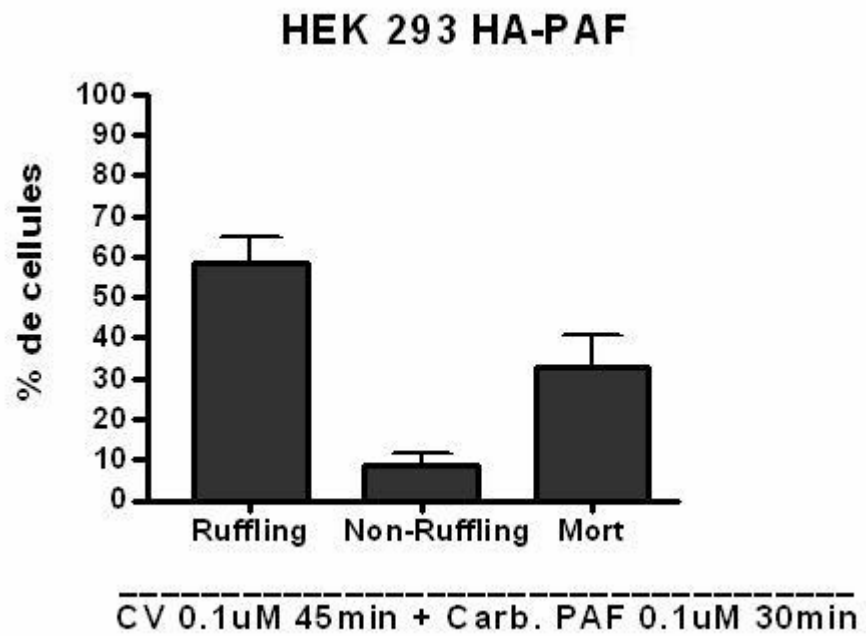
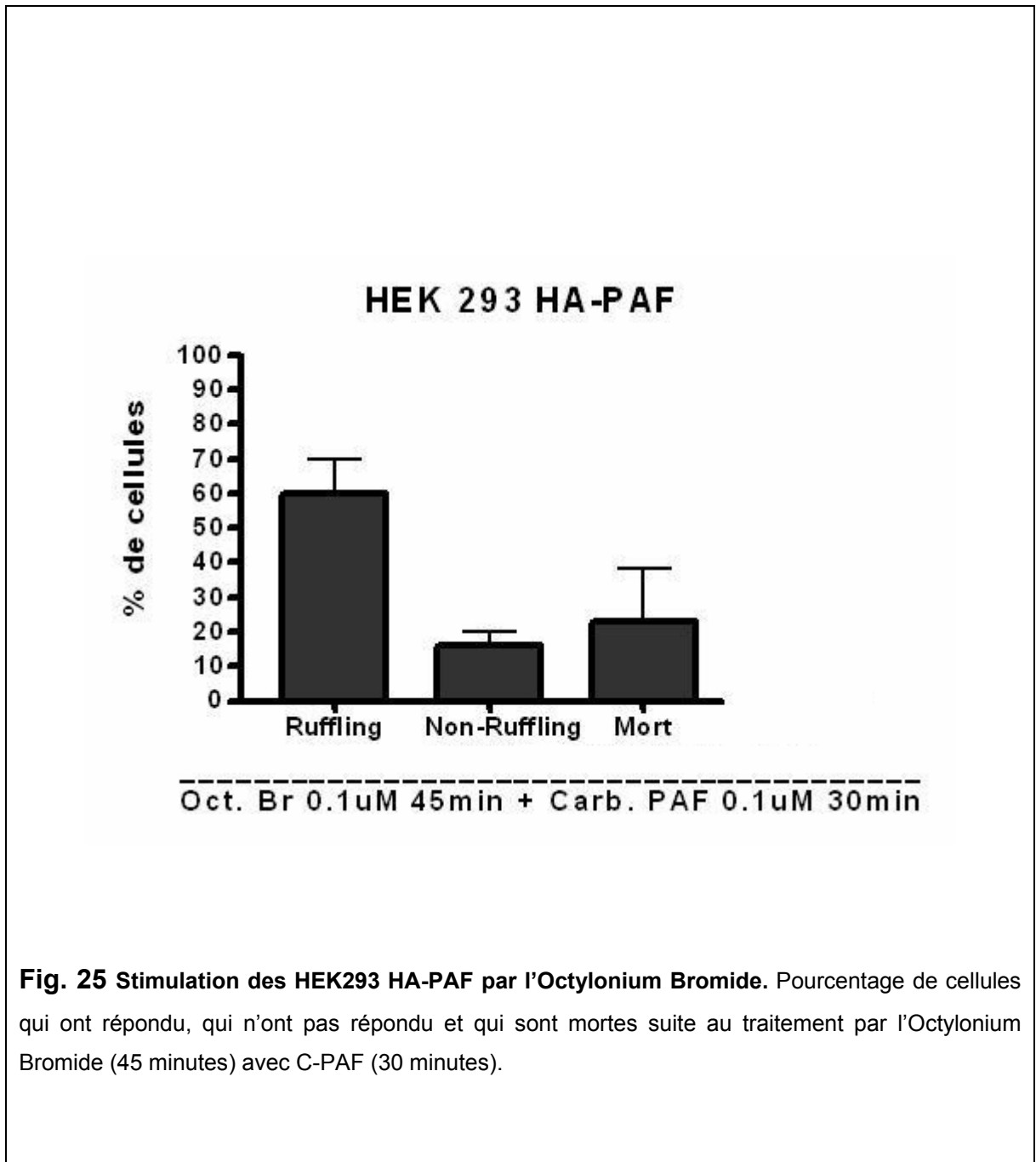


Fig. 24 Stimulation des HEK293 HA-PAF par le CV-3988. Pourcentage de cellules qui ont répondu, qui n'ont pas répondu et qui sont mortes suite au traitement par le CV-3988 (45 minutes) avec C-PAF (30 minutes).



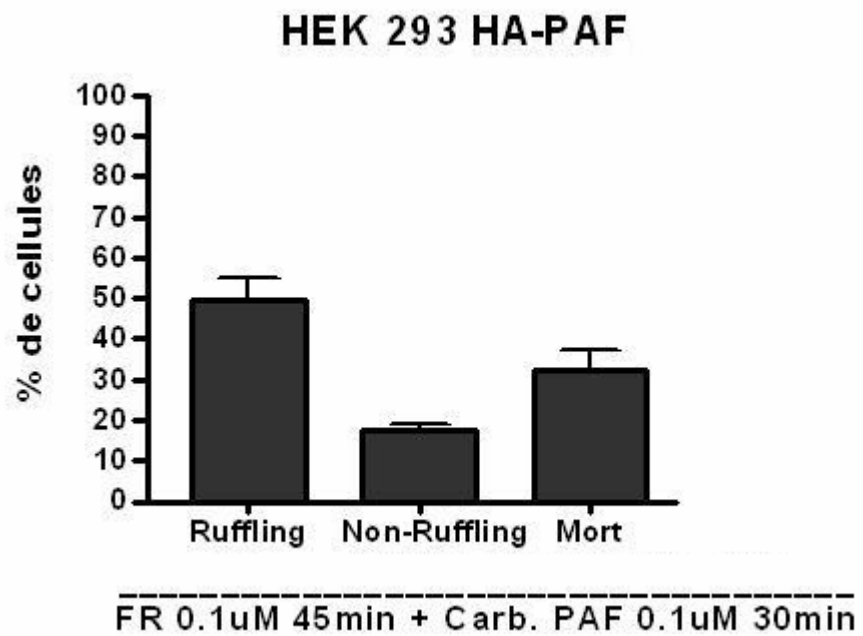


Fig. 26 Stimulation des HEK293 HA-PAF par le FR-49175. Pourcentage de cellules qui ont répondu, qui n'ont pas répondu et qui sont mortes suite au traitement par le FR-49175 (45 minutes) avec C-PAF (30 minutes).

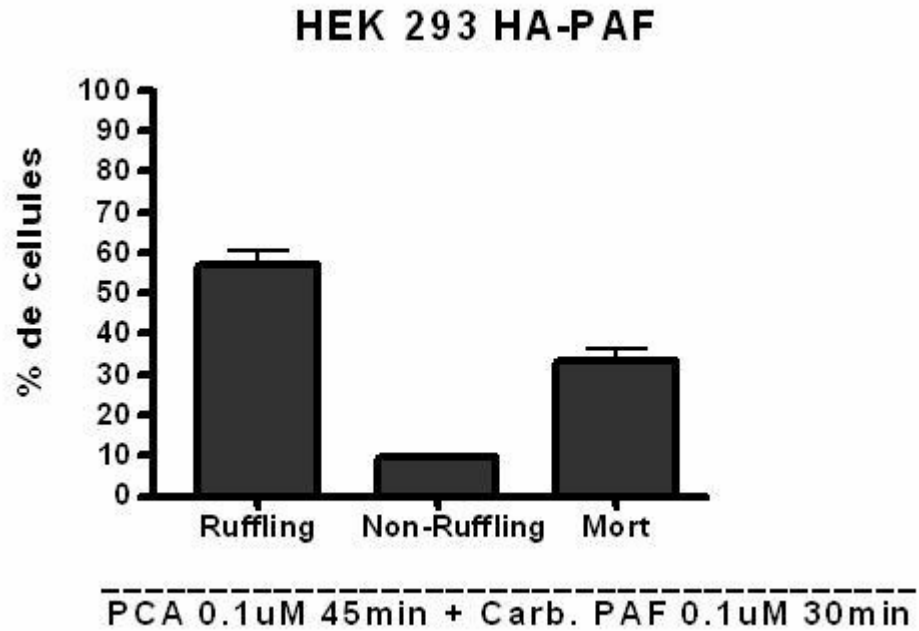


Fig. 27 Stimulation des HEK293 HA-PAF par le PCA-4248. Pourcentage de cellules qui ont répondu, qui n'ont pas répondu et qui sont mortes suite au traitement par le PCA-4248 (45 minutes) avec C-PAF (30 minutes).

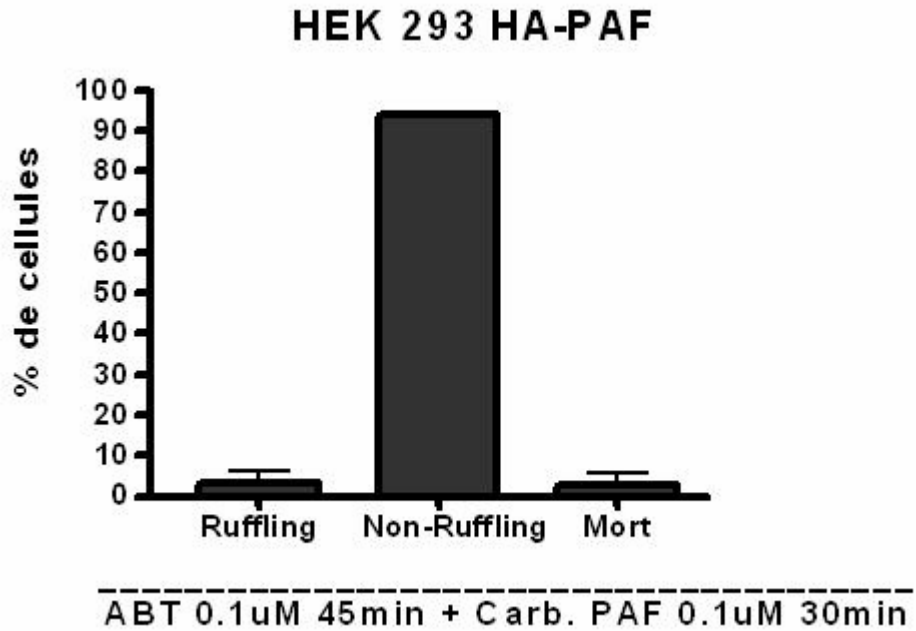
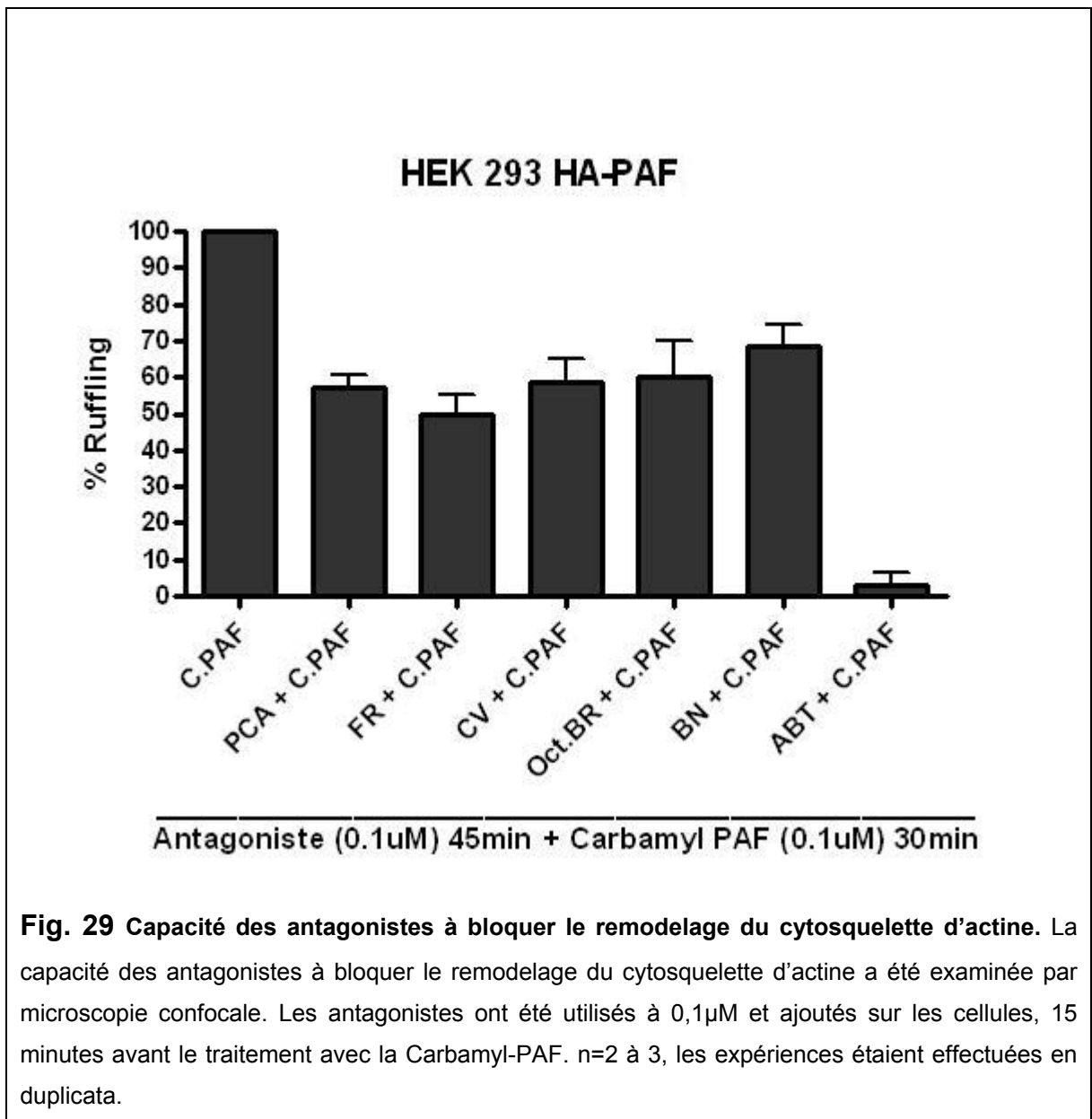


Fig. 28 Stimulation des HEK293 HA-PAF par l'ABT-491. Pourcentage de cellules qui ont répondu, qui n'ont pas répondu et qui sont mortes suite au traitement par l'ABT-491 (45 minutes) avec C-PAF (30 minutes).

Si nous prenons en examen les seuls résultats concernant le pourcentage de cellules qui montrent le phénomène de remodelage du cytosquelette d'actine, nous pouvons remarquer que l'antagoniste le plus efficace est l'ABT-491. Cette molécule est capable de se lier aux récepteurs du PAF en empêchant la liaison avec le ligand naturel, le C-PAF (Fig. 29).

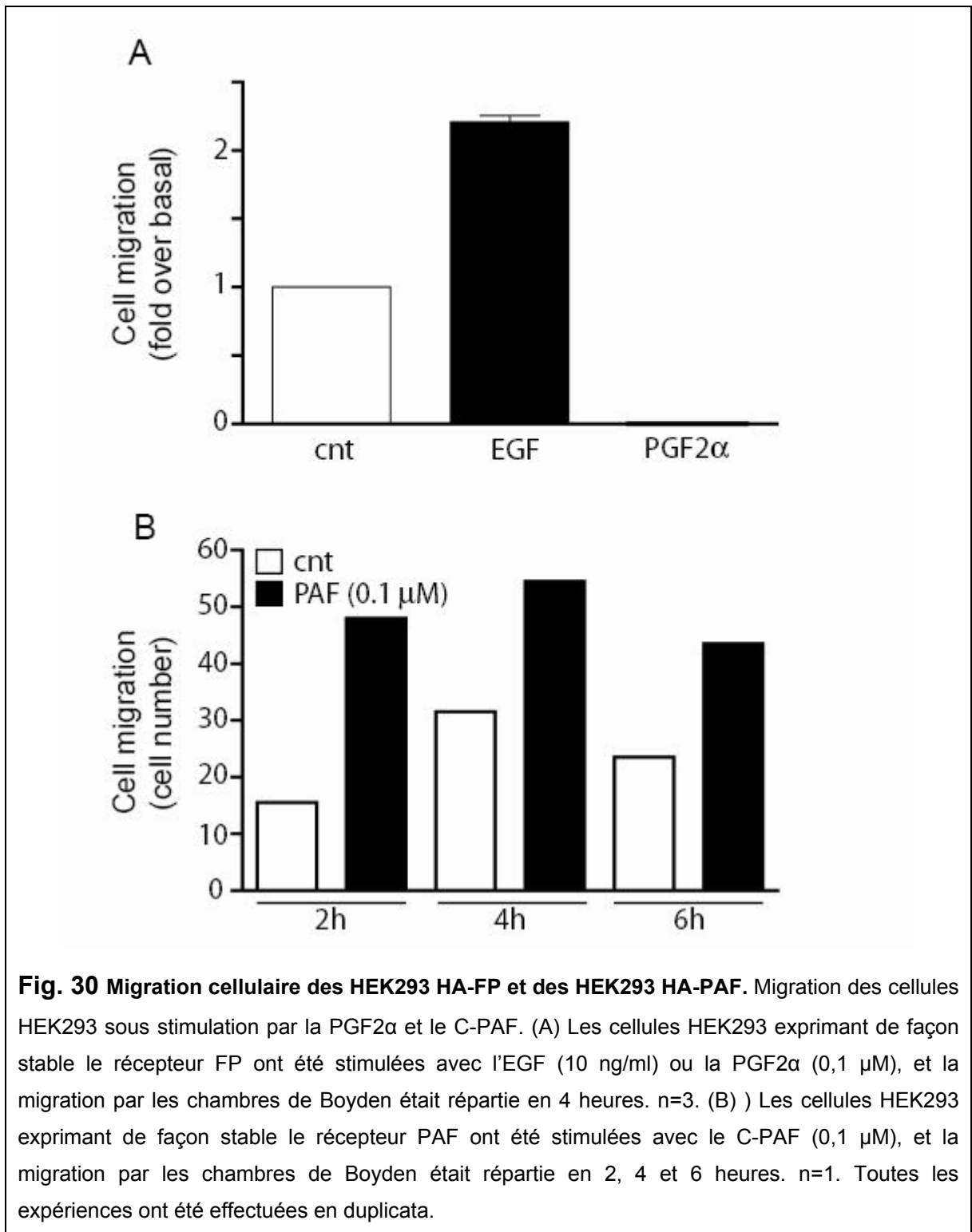


3.3. Migration cellulaire des cellules stables au récepteur FP et des cellules stables au récepteur PAF.

Nous avons ensuite effectué des expériences de migration cellulaire dans des chambres de Boyden, une technique commune utilisée pour estimer la capacité migratoire des cellules étudiées. Nous avons testé la migration basale des cellules sous stimulation par le ligand naturel.

En ce qui concerne les cellules HEK293 HA-FP, nos résultats indiquent qu'elles possèdent une bonne capacité migratoire de base. Par contre, même si la stimulation par la $PGF2\alpha$ entraîne bel et bien le remodelage du cytosquelette d'actine, comme déjà montré par microscopie confocale, elle ne provoque pas la formation de filopodes et lamellipodes nécessaires au phénomène de migration (Fig. 30).

Pour ce qui concerne les cellules HEK293 HA-PAF, elles possèdent une bonne capacité migratoire de base et la stimulation par le Carbamyl-PAF, ligand naturel du récepteur PAF, provoque une augmentation remarquable de l'activité migratoire. La stimulation du récepteur PAF par son ligand naturel a été examinée à des temps différents. Cette donnée est supportée par le résultat de microscopie confocale qui mettait en évidence un phénotype avec formation d'extensions membranaires.

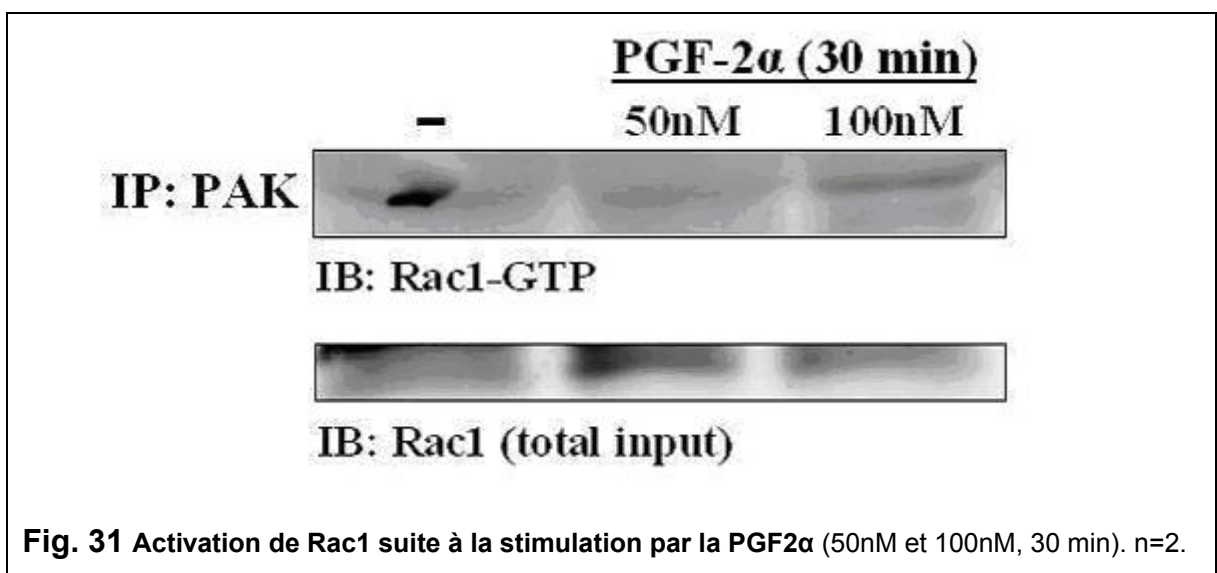


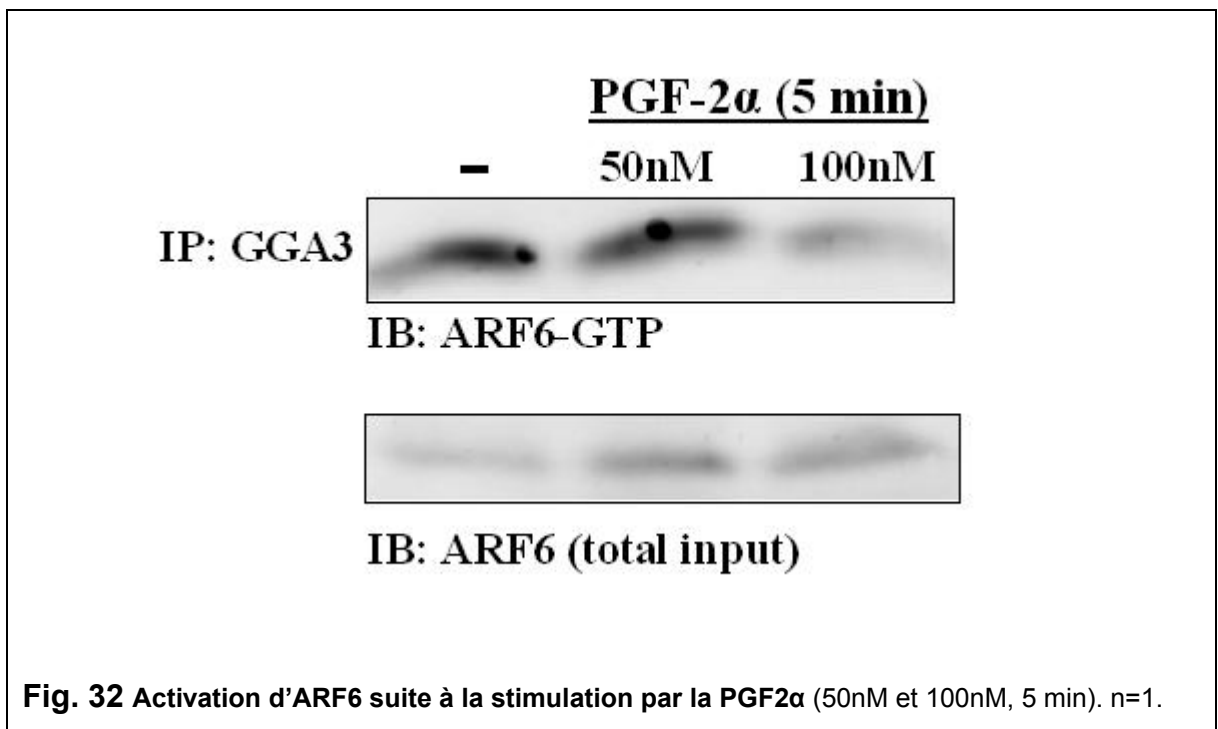
3.4. Activation des protéines Rac1 et ARF6 suite à la stimulation par la PGF2 α .

Suite aux résultats obtenus en microscopie confocale et en migration pour les cellules HEK293 stables au récepteur FP, nous avons décidé de vérifier l'activation des protéines Rac1 et ARF6. Ces protéines jouent en rôle majeur dans le phénomène de remodelage du cytosquelette d'actine.

Les cellules HEK293 HA-FP montrent, en microscopie confocale, une intense activité de remodelage du cytosquelette lors de la stimulation par la PGF2 α , phénomène qui n'est pas accompagné, en revanche, par la formation des extensions membranaires. L'activation de Rac1 est à la base du phénomène de remodelage du cytosquelette d'actine, mais l'activation d'ARF6 joue aussi un rôle très important, car cette protéine est responsable de la formation des filopodes et des lamellipodes.

Nos résultats d'activation de Rac1 et ARF6 montrent que Rac1 est bien activé suite à la stimulation par la PGF2 α (Fig. 31). Contrairement, ARF6 n'est pas activé par la liaison du ligand au récepteur FP, ou mieux il semble être inactivé suite à l'augmentation de la dose de ligand utilisée (Fig. 32).





Ces données confirment les résultats précédents, l'activation de Rac1 dans les cellules HEK293 HA-FP entraîne le remodelage du cytosquelette d'actine. Le fait qu'ARF6 ne soit pas activé pourrait expliquer l'absence de formation de filopodes et lamellipodes, et de migration cellulaire suite à la stimulation par la PGF2 α .

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que la stimulation des cellules HEK 293 exprimant les récepteurs FP ou PAF induit un remodelage du cytosquelette d'actine et l'ondulation des membranes plasmiques. Nous avons testé une série de ligands considérés comme antagonistes orthostériques et allostériques et observés que l'ondulation de membranes induite par le $\text{PGF2}\alpha$ et le PAF est inhibée.

4.1. Le récepteur FP des prostaglandines.

Nous avons étudié les effets au niveau cellulaire suite à l'activation du récepteur FP par son ligand naturel, la $\text{PGF2}\alpha$, et des nouvelles molécules, dont l'effet agoniste ou antagoniste restait à confirmer. Nous avons testé aussi des antagonistes déjà connus dans la littérature, tel que l'AL-8810 (143). Les modulateurs allostériques d'origine synthétique, THG113 et THG113.824, ont été produits à l'Université de Montréal par l'équipe du Dr William Lubell. Nous avons étudié l'habileté des ces composés ou composantes à induire le remodelage du cytosquelette d'actine. Plus précisément, nous avons évalué le pourcentage de cellules démontrant de l'ondulation des membranes ainsi que la migration cellulaire. Toutes ces expériences ont été effectuées dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur FP (HEK293 HA-FP).

Nos résultats de microscopie confocale ont révélé que dans des conditions non stimulées l'actine est située au niveau de la membrane. Par contre, la stimulation des récepteurs FP par la $\text{PGF2}\alpha$ produit la réorganisation de l'actine responsable du phénomène de l'ondulation membranaire. Il est intéressant de noter que ce phénomène n'est pas accompagné par la formation de lamellipodes tel qu'observé lors de la stimulation à l'Ang II (144). Nous avons, alors, décidé de vérifier l'activation des protéines Rac1 et ARF6. Ces protéines jouent un rôle

majeur dans le phénomène de remodelage du cytosquelette d'actine. Comme nous l'avons déjà mentionné, les cellules HEK293 HA-FP montrent, en microscopie confocale, une intense activité de remodelage du cytosquelette lors de la stimulation par la $\text{PGF2}\alpha$, phénomène qui n'est pas accompagné, en revanche, par la formation des extensions membranaires, contrairement à ce que notre groupe a publié pour le récepteur ATR de l'Ang II (144). Ce phénotype ressemble beaucoup au remodelage induit par la surexpression du mutant constitutivement actif de Rac1, le $\text{Rac1Q}^{61}\text{L}$ (144). L'activation de Rac1 est à la base du phénomène de remodelage du cytosquelette d'actine et la formation des lamellipodes. Une régulation du mode d'activation et d'inactivation est cependant nécessaire pour l'obtention de ces structures. L'activation d'ARF6 joue aussi un rôle très important, car cette protéine est impliquée dans la formation des filopodes et des lamellipodes. Nos résultats d'activation de Rac1 et ARF6 montrent que Rac1 est bien activé suite à la stimulation par la $\text{PGF2}\alpha$. Contrairement, ARF6 n'est pas activé par la liaison du ligand au récepteur FP, ou mieux il semble être inactivé suite à l'augmentation de la dose de ligand utilisée. Ces résultats sont préliminaires et restent à être confirmés. Nos résultats suggèrent que l'activation de Rac1, dans les cellules HEK293 HA-FP, pourrait contribuer à entraîner le remodelage du cytosquelette d'actine. Le fait qu'ARF6 ne soit pas activé pourrait expliquer l'absence de formation de filopodes et lamellipodes, qui explique l'absence de migration cellulaire suite à la stimulation par la $\text{PGF2}\alpha$. Ce récepteur pourrait être le premier que nous ayons étudié qui lorsque stimulé découple le processus d'ondulation de membranes de la formation de pseudopodes important pour la migration. Des expériences récentes réalisées par un autre membre de notre équipe de recherche ont démontré que la GTPase RhoA était activée suite à la stimulation des récepteurs FP et que RhoA ainsi que son effecteur ROCK étaient responsables du remodelage du cytosquelette d'actine menant à

l'ondulation de membranes et la formation de fibres de stress (*Goupil et al., en préparation*).

Parallèlement aux études de microscopie confocale, nous avons effectué des expériences de migration cellulaire dans des chambres de Boyden, une technique commune utilisée pour estimer la capacité migratoire des cellules étudiées. Nous avons effectué ces expériences pour tester la migration basale des cellules et sous stimulation par le ligand naturel, la PGF2 α . Nos résultats indiquent que les cellules HEK293 HA-FP possèdent une bonne capacité migratoire de base. Par contre, la stimulation par la PGF2 α provoque la perte de cette capacité migratoire. Nous pouvons peut-être expliquer cette perte grâce à nos résultats de microscopie confocale, car ils nous révèlent l'absence de formation d'extensions cellulaires nécessaire à assurer le déplacement de la cellule. En fait, même si la PGF2 α entraîne bel et bien le remodelage du cytosquelette d'actine, elle ne provoque pas la formation de filopodes et lamellipodes nécessaires au phénomène de migration. Dans certaines lignées de cellules colo-rectales cancéreuses, la stimulation au PGF2 α induit cependant une migration cellulaire (145). Les protéines présentes de façon endogènes dans ces cellules doivent permettre au récepteur FP d'activer des voies de signalisation permettant la formation des lamellipodes.

Par contre, même si la PGF2 α n'est pas capable d'induire la migration des cellules HEK293 par le biais de l'activation d'ARF6, elle reste non moins à la base de la puissante contraction cellulaire induite par son action sur le cytosquelette d'actine en stimulant la formation des fibres de stress. Des études récentes d'un autre membre de notre équipe de recherche ont montré que la stimulation du récepteur FP exprimé de façon endogène dans des cellules myométriales en culture induit leur contraction (*Goupil et al., en préparation*). La création d'antagonistes ou modulateurs négatifs allostériques du récepteur FP pourrait être bénéfique pour bloquer cette contraction cellulaire. Des hauts taux de PGF2 α

déclenchent souvent le travail et mène à des avortements ou à des accouchements prématurés. Par exemple, des molécules comme le THG113 ou le TGH113.824 pourraient être utilisées pour empêcher l'accouchement prématuré.

C'est pour ces raisons que nous avons effectué des expériences pour tester différentes composés et évaluer leur capacité antagoniste face au ligand naturel. Nous avons pris en examen l'AL-8810, déjà connu pour ces propriétés antagonistes sur le récepteur FP, le THG113 et le THG113.824, déjà mentionnés, deux composés de nouvelle synthèse. L'utilisation de la PGF2 α seule pour stimuler les cellules HEK293 HA-FP donne des ondulations de membranes égales à 73%, donc à partir de cette donnée nous avons comparé l'action des différentes molécules testées. Dans les même conditions en utilisant comme antagoniste l'AL-8810 les ondulations diminuent à 30% ; en utilisant le THG113, nous avons une réduction jusqu'à 26%. Seul le THG113.824 provoque une chute drastique des ondulations à 2%. Ces résultats montrent que l'AL-8810, le THG113 et le THG113.824 ont une action antagoniste d'intérêt sur le récepteur FP, en particulier le THG113.824 qui est un peptido-mimétique. Nos collaborateurs ont aussi montré que ce composé bloquait de façon significative la contraction des cellules myométriales (*Goupil et al., en préparation*).

C'est en collaboration avec les autres membres de notre équipe que nous avons pu démontré que le THG113.824 est un modulateur allostérique du récepteur FP puisque que ce composé amplifie l'activation de la voie Gq/PKC/MAPK tandis qu'il inhibe la voie G12/RhoA/ROCK/ruffling/contraction (*Goupil et al., en préparation*). Le THG113.824 pourrait être une molécule intéressante pour des études *in vivo* et successivement cliniques, aboutissant à un nouveau produit thérapeutique.

4.2. Le récepteur PAF.

Nous avons étudié les effets cellulaires induits par l'activation du récepteur PAF par son ligand naturel, le Carbamyl-PAF (C-PAF), et des nouvelles molécules, dont l'effet agoniste ou antagoniste restait à confirmer. Nous avons testé le BN52021, le CV-3988, l'Octylonium Bromide, le FR-49175, le PCA-4248 et l'ABT-491. Nous avons étudié l'habileté des ces composés ou composantes à induire ou bloquer le remodelage du cytosquelette d'actine. Toutes nos expériences ont été effectuées dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur PAF (HEK293 HA-PAF). L'ondulation des membranes a été examinée par microscopie confocale et la migration cellulaire par la technique des chambres de Boyden.

Après avoir établis nos paramètres de recherche, nous avons procédé à l'étude du remodelage du cytosquelette d'actine suite à la stimulation par chaque composé étudié. Seul le C-PAF est capable d'induire la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules HEK293 HA-PAF. Dans le cas du récepteur du PAF, nous avons une ondulation membranaire irrégulière et une augmentation de la formation de fibres de stress. Dans nos expériences, nous avons remarqué aussi un faible indice de mort cellulaire, donc nous avons pris en considération cette facteur dans l'évaluation de nos donnés. Contrairement à ce que nous avons obtenu pour le récepteur FP, dans le cas du récepteur PAF nous avons une morphologie très similaire à celle obtenu pour le récepteur ATR de l'angiotensine II (Ang II). Nous pouvons comparer la morphologie des cellules HEK293 HA-PAF non stimulées et stimulées par le C-PAF, à celle des cellules HEK 293 HA-ATR non stimulées ou stimulées par l'Ang II (144). Dans les deux systèmes cellulaires nous pouvons remarquer que la stimulation par le ligand naturel active le récepteur de façon à générer une ondulation membranaire irrégulière qui donne à la cellule une morphologie allongée et étirée.

Donc nous avons effectué des expériences pour tester les différents composés, déjà mentionnés, et évaluer leur capacité antagoniste face au ligand

naturel. Tous les composés provoquent une baisse de l'ondulation membranaire entre 30 et 40%, seul l'ABT-491 est capable de bloquer quasi totalement l'activation du récepteur en empêchant la liaison avec le ligand naturel. Cette molécule pourrait faire l'objet d'études pour développer des nouveaux produits utilisables dans l'inflammation.

Nous avons ensuite effectué des expériences de migration cellulaire dans des chambres de Boyden pour estimer la capacité migratoire des cellules étudiées. Nous avons testé la migration basale des cellules et sous stimulation par le ligand naturel. Les cellules HEK293 HA-PAF possèdent une bonne capacité migratoire de base et la stimulation par le Carbamyl-PAF, ligand naturel du récepteur PAF, provoque une augmentation remarquable de l'activité migratoire.

Malheureusement, les chimistes de notre groupe n'ont pas réussi à développer de nouvelles molécules. Notre objectif de développer des modulateurs allostériques pour le récepteur du PAF demeure donc en cours.

5. Conclusion

L'ensemble de notre étude concernant le récepteur FP démontre que le THG113.824 est un modulateur allostérique. Nos résultats ont démontrés que ce peptido-mimétique conçu à partir de la structure de la 2^e boucle extracellulaire du récepteur module de façon positive la voie Gq/PKC/MAPK et agit négativement sur la voie G12/RhoA/ROCK/fibres de stress/ondulation des membranes/contraction. Nos résultats indiquent donc que ce composé modifie la structure tridimensionnelle du récepteur activé par son ligand naturel lui permettant de moduler sélectivement la transduction signalétique intracellulaire. Nos résultats nous encourage ainsi à développer des nouvelles molécules qui agirait négativement sur la voie menant à la contraction cellulaire en ayant aucun effet sur la voie des MAPK souvent impliquée dans le processus de prolifération cellulaire. Ces composés pourraient éventuellement être utilisés en clinique pour prévenir les contractions utérines lors de l'accouchement prématuré.

En ce qui concerne le récepteur PAF, nos résultats nous indiquent que, parmi les molécules testées, la plus efficace était l'ABT-491, étant capable d'inhiber presque à 100% l'action du ligand naturel, le C-PAF. Le développement de nouvelles molécules demeure en cours.

Nos travaux, faits dans le cadre d'une collaboration multidisciplinaire, démontrent que nous sommes maintenant en mesure de développer des modulateurs allostériques qui contrôleraient spécifiquement les voies de signalisation impliquées dans l'initiation d'une réponse cellulaire bien précise. Ces composés offrent plusieurs avantages par rapport aux antagonistes et agonistes orthostériques qui vont bloquer ou activer toutes les voies de signalisation engendrées par le récepteur.

6. Références:

1. Bockaert, J. and Pin J.P., *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success*. *Embo J*, 1999. 18(7): 1723-29.
2. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. *Mol Pharmacol*, 2003. 63(6): 1256-72.
3. Bargmann, C.I., *Neurobiology of the Caenorhabditis elegans genome*. *Science*, 1998. 282(5396): 2028-33.
4. Dohlman. H.G., Thorner, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., *Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors*. *Annu Rev Biochem*, 1991. 60: 653-688.
5. Plakidou-Dymock, S., Dymock, D., and Hooley, R., *A righer plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins*. *Curr Biol*, 1998. 8(6): 315-324.
6. Botto, J.M., Guillemare, E., Vincent, J.P., and Mazella, J., *Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the Xenopus oocyte expression system: agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor*. *Neurosci Lett*, 1997. 223(3): 193-6.
7. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M., *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. *Science*, 2000. 289(5480): 739-745.

8. Baldwin, J.M., *The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors*. *Embo J*, (1993). 12(4): 1693-1703.
9. Schertler, G.F., Villa, C., and Henderson, R., *Projection structure of rhodopsin*. *Nature*, 1993. 362(6422): 770-2.
10. Lefkowitz, R.J., *The superfamily of heptahelical receptors*. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(7): E133-6.
11. Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J., *Seven-transmembrane receptors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(9): 639-50.
12. Kolakowski, L.F., Jr. GCRDb: a G protein-coupled receptor database. *Receptor Channels*, 1994. 2(1): 1-7.
13. Attwood, T.K., and, Findlay, J.B., *Fingerprinting G protein-coupled receptors*. *Protein Eng*, 1994. 7(2): 195-203.
14. Schiöth, H.B., and, Fredriksson, R., *The GRAFS classification system of G-protein-coupled receptors in comparative perspective*. *Gen Comp Endocrinol*, 2005. 142(1-2): 94-101.
15. Ulrich, C.D., and, Holtmann, M., and, Miller, L.J., *Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors*. *Gastroenterology*, 1998. 114(2): 382-97.
16. Gether, U., *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G-protein-coupled receptors*. *Endocr Rev*, 2000. 21(1): 90-113.

17. Devi, L.A., *The G protein-coupled receptors handbook*. 1 ed. Contemporary clinical neuroscience. 2005, Totowa, NJ: Humana Press. 432.
18. Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R., and, Hamm, H.E., *Insights into G protein structure, function, and regulation*. *Endocr Rev*, 2003. 24(6): 765-81.
19. Rhee, S.G., *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C*. *Annu Rev Biochem*, 2001. 70: 281-312.
20. Freedman, N.J., and Lefkowitz, R.J., *Desensitization of G protein-coupled receptors*. *Recent Prog Horm Res*, 1996. 51: 319-351.
21. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. *Pharmacol Rev*, 2001. 53(1): 1-24.
22. Pitcher, J.A., Freedman, N.J., and Lefkowitz, R.J., *G protein-coupled receptor kinases*. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: 653-92.
23. Anderson, R.G., Vasile, E., Mello, R.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L., *Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution*. *Cell*, 1978. 15(3): 919-33.
24. Chuang, D.M., Dillon-Carter, O., Spain, J.W., Laskowski, M.B., Roth, B.L., and Coscia, C.J., *Detection and characterization of beta-adrenergic receptors and adenylyl cyclase in coated vesicles isolated from bovine brain*. *J Neurosci*, 1986. 6(9): 2578-84.

25. Gonzales-Calero, G., Martin, M., Cubero, A., and Andres, A., *Bovine brain coated vesicles contain adenosine A1 receptors. Presence of adenylate cyclase coupled to the receptor.* J Neurochem, 1990. 55(1): 106-113.
26. Sweitzer, S.M., and Hinshaw, J.E., *Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation.* Cell, 1998. 93(6): 1021-29.
27. Anderson, R.G., *The caveolae membrane system.* Annu Rev Biochem, 1998. 67: 199-225.
28. Ostrom, R.S., and Insel, P.A., *The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology.* Br J Pharmacol, 2004. 143(2): 235-245.
29. Parton, R.G., and Richards, A.A., *Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms.* Traffic, 2003. 4(11): 724-738.
30. Haasemann, M., Cartaud, J., Muller-Esterl, W., and Dunia, I., *Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae.* J Cell Sci, 1998. 111(Pt7): 917-928.
31. Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K., *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(22): 10339-10343.
32. Trigatti, B.L., Anderson, R.G., and Gerber, G.E., *Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. 255(1): 34-39.

33. Claing, A., Perry, S.J., Achiriloaie, M., Walker, J.K., Albanesi, J.P., Lefkowitz, R.J., and Premont, R.T., *Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(3): 1119-24.
34. Roseberry, A.G., and Hosey, M.M., *Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt4): 739-746.
35. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. *Prostanoid receptors : subtypes and signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. 41: 661-90.
36. Hata AN, Breyer RM. *Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors : multiple roles in inflammation and immune modulation*. Pharmacol Ther, 2004. 103: 147-66.
37. Slíva J., Procházková M., and Dolezal T., *The role of cyclooxygenase in pain processing in CNS*. Cesk Fysiol, 2004. 53(4): 176-80.
38. Skarzynski D.J., Ferreira-Dias G., and Okuda K., *Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication*. Reprod Domest Anim, 2008. 43(2): 57-65.
39. Peskar BM., *Radioimmunoassay of prostaglandins*. Z Gastroenterol, 1978. 16(5): 341-8.
40. van Oijen M.G., Laheij R.J., Koetsier M., de Kleine E., Te Morsche R.H., van Kerkhoven L.A., Jansen J.B., and Drenth J.P., *Effect of a specific*

cyclooxygenase-gene polymorphism (A-842G/C50T) on the occurrence of peptic ulcer hemorrhage. Dig Dis Sci, 2006. 51(12): 2348-52.

41. William F. Ganong, *Physiologie Médicale* (traduction de la 21^e édition américaine par Michel Jobin), 2^e édition. De Boeck, 2005.
42. Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., and Kihara Y., *Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. Circ J, 2009. 73(3): 411-8.*
43. Liu L., and Clipstone N.A., *Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. J Cell Biochem, 2007. 100(1): 161-73.*
44. Negishi M., and Katoh H., *Cyclopentenone prostaglandin receptors. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: 611-7.*
45. Olson D.M., and Ammann C., *Role of the prostaglandins in labour and prostaglandin receptor inhibitors in the prevention of preterm labour. Front Biosci, 2007. 12: 1329-43.*
46. Brater D.C., *Anti-inflammatory agents and renal function. Semin Arthritis Rheum, 2002. 32(3 Suppl 1): 33-42.*
47. Martin, R., *Compilation des résultats des troupeaux caprins et ovins inscrits aux PATLQ – 2001. 2002.*
48. Husted S., Sjögren C., and Andersson K.E., *Direct effects of adenosine and adenine nucleotides on isolated human urinary bladder and their influence on electrically induced contractions. Urol, 1983. 130(2): 392-8.*

49. Korita D., Itoh H., Sagawa N., Yura S., Yoshida M., Kakui K., Takemura M., Nuamah M.A., and Fujii S., *Cyclic mechanical stretching and interleukin-1alpha synergistically up-regulate prostacyclin secretion in cultured human uterine myometrial cells*. *Gynecol Endocrinol*, 2004. 18(3): 130-7.
50. Dray F., *Prostaglandins and reproduction. I. Physiological aspects*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 1991. 20(1): 7-17.
51. Sharif NA., *Synthetic FP-prostaglandin-induced contraction of rat uterus smooth muscle in vitro*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2008. 78(3): 199-207.
52. Abran D., Varma D.R., and Chemtob S., *Regulation of prostanoid vasomotor effects and receptors in choroidal vessels of newborn pigs*. *Am J Physiol*, 1997. 272(3 Pt 2): R995-1001.
53. Wan K.S., and Wu W.F., *Eicosanoids in asthma*. *Acta Paediatr Taiwan*, 2007. 48(6): 299-304.
54. Nagai H., *Prostaglandin as a target molecule for pharmacotherapy of allergic inflammatory diseases*. *Allergol Int*, 2008. 57(3): 187-96.
55. Clive P. Page, Michael J. Curtis, Morley C. Sutter, Brian B. Hoffman, and Michael J., *Pharmacologie intégrée (traduction de la 1^e édition anglaise par Georges Cheymol)*. De Boeck Université, 1999.
56. Holzgrabe U., De Amici M., and Mohr K., *Allosteric modulators and selective agonists of muscarinic receptors*. *J Mol Neurosci* 2006. 30(1-2): 165-8.

57. Halab L., Becker J.A., Darula Z., Tourwe D., Kieffer B.L., Simonin F. and Lubell W.D., *Probing opioid receptor interactions with azacycloalkane amino acids. Synthesis of a potent and selective ORL1 antagonist.* J Med Chem 2002, 45: 5353-7
58. Kaul R., Surprenant S. and Lubell W.D., *Systematic study of the synthesis of macrocyclic dipeptide beta-turn mimics possessing 8-, 9-, and 10-membered rings by ring-closing metathesis.* J Org Chem 2005, 70: 3838-44.
59. Halab L. and Lubell W.D., *Effect of sequence on peptide geometry in 5-tert-butylprolyl type VI beta-turn mimics.* J Am Chem Soc 2002, 124: 2474-84.
60. Benveniste J., Le Couedic J.P., Polonsky J., and Tence M., *Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases.* Nature, 1977. 269: 170-1.
61. Dempoulous C.A., Pinckard R.N., and Hanhan D.J., *Evidence for 1-O-alkyl 2-acetyl-sn-glycerophosphocholin as active component.* J Biol Chem, 1979. 254: 9355-8.
62. Snyder F., *Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators.* Am J Physiol, 1990. 259: C697-C708.
63. Prescott S.M., Zimmerman G.A., and McIntyre T.M., *Platelet-activating factor* (minireview). J Biol Chem, 1990. 265: 17381-4.
64. McIntyre T.M., Zimmerman G.A., and Prescott S.M., *Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response*

to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J Clin Invest*, 1985. 76: 271-80.

65. Whatley R.E., Fennell D.F., Kurrus J.A., Zimmerman G.A., McIntyre T.M., and Prescott S.M., *Synthesis of platelet-activating factor by endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1990. 265: 15550-9.
66. Eliakim R., Karmeli F., Razin E., and Rachmilewitz D., *Role of platelet-activating factor in ulcerative colitis : Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine and prednisolone*. *Gastroenterology*, 1988. 95: 1167-72.
67. Sawyer D.B., and Anderson O.S., *Platelet-activating factor is a general membrane perturbant*. *Biochem Biophys Acta*, 1989. 987: 129-32.
68. Braquet P., Paubert-Braquet M., Koltai M., Bourgain R., Bussolino F., and Hosford D., *Is there a case for PAF antagonists in the treatment of ischemic states?* *TIPS*, 1989. 10: 23-30.
69. Arnould T., Michels C., and Romacle J., *Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia : involvement of PAF/CD18/CD11b, and ICAM-1*. *Am J Physiol*, 1993. 264: C1102-10.
70. Grino J.M., *BN25021, a PAF antagonist for preventing post-transplant renal failure*. *Ann Int Med*, 1994. 121: 345-7.
71. Rosam A.C., Wallace J.L., and Whittle B.J.R., *Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach*. *Nature*, 1986. 319: 54-6.
72. Wallace J.L., *Lipid mediators of inflammation in gastric ulcer*. *Am J Physiol*, 1990. 258: G1-11.

73. Michel L., Denizot Y., Thomas Y., Jean-Louis F., Pitton C., Benveniste J., and Dubertret L., *Biosynthesis of paf-acether by human skin fibroblasts in vitro*. J Immunol, 1988. 141: 948-53.
74. Michel L., Denizot Y., Jean-Louis F., Pitton C., Benveniste J., and Dubertret L., *Production of paf-acether by human epidermal cells*. J Invest Dermatol, 1990. 95: 576-81.
75. Michel L., Denizot Y., Thomas Y., Benveniste J., and Dubertret L., *Release of paf-acether and precursors during allergic cutaneous reactions*. Lancet, 1988. 8607: 404.
76. Mencia-Huerta J.M., Lewis R.A., Razin E., and Austen K.F., *Antigen-initiated release of platelet-activating factor (paf-acether) from mouse bone marrow-derived mast cells sensitized with monoclonal Ig E*. J Immunol, 1983. 131: 2958-64.
77. Honda Z., Nakamura M., Miki I., Minami M., Watanabe T., Seyama Y., et al. *Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung*. Nature, 1991. 349: 342-6.
78. Kajihara A., Komooka H., Kamiya K., Yoneda T., Yoneda S., Nakamura M., et al. *Three dimensional model of the human PAF receptor*. J Lipid Med Cell Sig, 1994. 9: 185-96.
79. Hwang S., *Specific receptors of platelet activating factor, receptor heterogeneity and signal transduction mechanisms*. J Lipid Mediators, 1990. 2: 123-58.

80. Haslam R.J., and Vanderwel M., *Inhibition of platelet adenylate cyclase by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor)*. J Biol Chem, 1982. 257: 6879-85.
81. Avdonin P.V., Cheglakov I.B., and Tkachuk V.A., *Stimulation of non-selective cation channels providing Ca²⁺ influx into platelets by platelet-activating factor and other aggregation inducers*. Eur J Biochem, 1991. 198: 267-73.
82. Shukla S.D., and Halenda S.P., *Phospholipase D in cell signalling and its relationship to phospholipase C*. Life Sci, 1991. 48: 851-66.
83. Honda Z., Takano T., Gotoh Y., Nishida E., Ito K., and Shimizu T., *Transfected PAF receptor activates MAP kinase and MAP kinase kinase in chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1994. 269: 2307-15.
84. Ho Y., Lee W.M.F., and Synderman R., *Chemoattractant-induced activation of c-fos gene expression in human monocytes*. J Exp Med, 1987. 165: 1524-38.
85. Squinto S.P., Block A.L., Braquet P., and Bazan N.G., *Platelet-activating factor stimulates a fos/jun/AP-1 transcriptional signalling system in human neuroblastoma cells*. J Neurosci Res, 1989. 24: 558-66.
86. Mazer B., Domenico J., Sawami H., and Gelfand .,W., *Platelet-activating factor induces an increase in intracellular calcium and expression of regulatory genes in human B lymphoblastoid cells*. Immunology, 1991. 146: 1914-20.
87. Tripathi Y.B., Kandala J., Guntaka R.V., Lim R.W., and Shukla S.D., *Platelet-activating factor induces expression of early response genes c-fos*

and T15-1 in human epidermal carcinoma A-431 cells. *Life Sci*, 1991, 46: 1761-7.

88. Blank M.L., Lee Y.J., Cress E.A., and Snyder F., *Stimulation of the de novo pathway for the biosynthesis of PAF via cytidyltransferase activation in cells with minimal endogenous cell production*. *J Biol Chem*, 1988. 263: 565-1.
89. Moss J., and Vaughan M., *Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes*. *J Biol Chem*, 1995. 270(21): 12327-30.
90. Kanh R.A., and Gilman A.G., *Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin*. *J Biol Chem*, 1984. 259(10): 6228-6234.
91. Nie Z., Hirsch D.S, and Randazzo P.A., *Arf and its many interactors*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(4): 396-404.
92. Tsuchiya M., Price S.R., Tsai S.C., Moss J., and Vaughan M., *Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells*. *J Biol Chem*, 1991. 266(5): 2772-2777.
93. Cavenagh M.M., Whitney J.A., Carroll K., Zhang C., Boman, A.L., Rosenwald A.G., Mellman I., and Kanh R.A., *Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane*. *J Biol Chem*, 1996. 271(36): 21767-21774.
94. Radhakrishna H., and Donaldson J.G., *ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway*. *J Cell Biol*, 1997. 139(1): 49-61.

95. Pasqualato S.J., Menetrey M., Franco M., and Cherfils J., *The structural GDP/GTP cycle of human Arf6*. EMBO Rep, 2001. 2(3): 234-8.
96. Goldberg J., *Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching*. Cell, 1998. 95(2): 237-248.
97. Macia E., Luton F., Partisani M., Cherfils P., Chardin P., and Franco M., *The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 11): 2389-98.
98. Cherfils J., and Chardin P., *GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins*. Trends Biochem Sci, 1999. 24(8): 306-311.
99. Weiss O., Holden J., Rulkka C., and Kahn R.A., *Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor*. J Biol Chem, 1989. 264(35): 21066-21072.
100. Randazzo P.A., and Hirsch D.S., *Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling*. Cell Signal, 2004. 16(4): 401-13.
101. Lenhard J.M., Kahn R.A., and Stahl P.D., *Evidence for ADP-ribosylation factor (ARF) as a regulator of in vitro endosome-endosome fusion*. J Biol Chem, 1992. 267(18): 13047-52.
102. Serafini T., Orci L., Amherdt M., Brunner M., Kahn R.A., and Rothman J.E., *ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein*. Cell, 1991. 67(2): 239-53.

103. Chavrier P., and Goud B., *The role of ARF and Rab GTPase in membrane transport*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(4): 466-75.
104. Honda A., Nogami M., Yokozeki T., Yamazaki M., Nakamura H., Watanabe H., Kawamoto K., Nakayama K., Morris A.J., Frohman M.A., and Kanaho Y., *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation*. *Cell*, 1999. 99(5): 521-32.
105. Radhakrishna H., Al-Awar O., Khachikian Z., and Donaldson J.G., *ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements*. *J Cell Sci*, 1999. 112(Pt 6): 855-866.
106. Donaldson J.G., *Multiple roles of Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane*. *J Biol Chem*, 2003. 278(43): 41573-6.
107. Santy, L.C., and Casanova J.E., *Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D*. *J Cell Biol*, 2001. 154(3): 599-610.
108. D'Souza-Schorey C., Li G., Colombo M.I., and Stahl P.D., *A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis*. *Science*, 1995. 267(5201): 1175-8.
109. Takai Y., Sasaki T., and Matozaki T., *Small GTP-binding proteins*. *Physiol Rev*, 2001. 81: 153-208.
110. Wherlock M., and Mellor H., *The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story*. *J Cell Sci*, 2002. 115: 239-240.

111. Burridge K., and Wennerberg K., *Rho and Rac take center stage*. Cell, 2004. 116: 167-179.
112. Coleman M.L., Marshall C.J., and Olson M.F., *RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5: 355-366.
113. Zohn I.M., Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L., and Der C.J., *Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested*. Oncogene, 1998. 17: 1415-1438.
114. Ridley A.J., and Hall A., *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. 70: 389-399.
115. Adamson P., Paterson H.F., and Hall A., *Intracellular localization of the P21rho proteins*. J Cell Biol, 1992. 119: 617-627.
116. Jahner D., and Hunter T., *The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1991. 11: 3682-3690.
117. Fritz G., Kaina B., and Aktories K., *The Ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments*. J Biol Chem, 1995. 270: 25172-25177.
118. Adamson P., Marshall C.J., Hall A., and Tilbrook P.A., *Post-translational modifications of p21rho proteins*. J Biol Chem, 1992. 267: 20033-20038.

119. Bishop A.L., and Hall A., *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000. 348(Pt 2): 241-255.
120. Hall A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. 279: 509-514.
121. Kozma R., Ahmed S., Best A., and Lim L., *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1995. 15: 1942-1952.
122. Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., and Hall A., *The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. Cell, 1992. 70: 401-410.
123. Allen W.E., Jones G.E., Pollard J.W., and Ridley A.J., *Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages*. J Cell Sci, 1997. 110(Pt 6): 707-720.
124. Kozma R., Sarnar S., Ahmed S., and Lim,L., *Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid*. Mol Cell Biol, 1997. 17: 1201-1211.
125. Toksoz D., and Merdek K.D., *The Rho small GTPase: functions in health and disease*. Histol Histopathol, 2002. 17: 915-927.
126. Wasserman S., *FH proteins as cytoskeletal organizers*. Trends Cell Biol, 1998. 8: 111-115.

127. Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka A., Saito Y., Nakao K., Jockusch B.M., and Narumiya S., *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin*. EMBO J, 1997. 16: 3044-3056.
128. Perona R., Montaner S., Saniger L., Sanchez-Perez I., Bravo R., and Lacal J.C., *Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins*. Genes Dev, 1997. 11: 463-475.
129. Montaner S., Perona R., Saniger L., and Lacal J.C.. *Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases*. J Biol Chem, 1998. 273: 12779-12785.
130. Baeuerle P.A., and Baltimore D., *NF-kappa B: ten years after*. Cell, 1996. 87: 13-20.
131. Cammarano M.S., and Minden A., *Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways*. J Biol Chem, 2001. 276: 25876-25882.
132. Frost J.A., Swantek J.L., Stippec S., Yin M.J., Gaynor R., and Cobb M.H., *Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1*. J Biol Chem, 2000. 275: 19693-19699.
133. Sulciner D.J., Irani K., Yu Z.X., Ferrans V.J., Goldschmidt-Clermont P., and Finkel T., *Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 1996. 16: 7115-7121.
134. Sahai E., and Marshall C.J., *RHO-GTPases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. 2: 133-142.

135. Yamamoto M., Marui N., Sakai T., Morii N., Kozaki S., Ikai K., Imamura S., and Narumiya S., *ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle*. *Oncogene*, 1993. 8: 1449-1455.
136. Olson M.F., Ashworth A., and Hall A., *An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1*. *Science*, 1995. 269: 1270-1272.
137. Braga V., *Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases*. *Exp Cell Res*, 2000. 261: 83-90.
138. Evers E.E., Zondag G.C., Malliri A., Price L.S., ten Klooster J.P., van der Kammen R.A., and Collard J.G., *Rho family proteins in cell adhesion and cell migration*. *Eur J Cancer*, 2000. 36: 1269-1274.
139. Schmitz A.A., Govek E.E., Bottner B., and Van Aelst L., *Rho GTPases: signaling, migration, and invasion*. *Exp Cell Res*, 2000. 261: 1-12.
140. Ridley A.J., *Rho GTPases and cell migration*. *J Cell Sci*, 2001. 114: 2713-2722.
141. Symons, M., Rusk, N. (2003). *Control of vesicular trafficking by Rho GTPases*. *Curr. Biol.* 13, R409-R418.
142. Qualmann, B., Mellor, H. (2003). *Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases*. *Biochem. J.* 371, 233-241.

143. Griffin, B.W., Klimko, P., Crider, J.Y., and Sharif, N.A., *AL-8810: a novel prostaglandin F2 alpha analog with selective antagonist effects at the prostaglandin F2 alpha (FP) receptor*. J Pharmacol Exp Ther. 1999 Sep; 290(3): 1278-84

144. Cotton, M., Boulay , P.L., Houndolo, T., Vitale, N., Pitcher, J.A., and Claing, A., *Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration*. Mol Biol Cell. 2007 Feb;18(2):501-11

145. Qualtrough, D., Kaidi, A., Chell, S., Jabbour, H.N., Williams, A.C., and Paraskeva, C., *Prostaglandin F(2 alpha) stimulates motility and invasion in colorectal tumor cells*. Int J Cancer. 2007 Aug 15; 121(4): 734-40

