

Université de Montréal

Développement de modulateurs allostériques peptidiques inhibiteurs de l'activité des récepteurs de l'interleukine 1 et de la vasopressine

Par  
Christiane Quiniou

Département de Biochimie  
Centre de recherche, CHU Ste-Justine  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph. D. en Biochimie

Juin 2011

©Christiane Quiniou

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Développement de modulateurs allostériques peptidiques inhibiteurs de l'activité des récepteurs de l'interleukine 1 et de la vasopressine

présentée par:  
Christiane Quiniou

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Stephen Michnick: président-rapporteur  
Alexei V. Pshezhetsky : Directeur  
Sylvain Chemtob: Codirecteur  
Jean-François Gauchat: membre du jury  
Jean-Luc Parent : examinateur externe  
Daniel Bichet : représentant du doyen

## Résumé :

L'approche Module X a été créée dans le but de concevoir de petits peptides modulateurs ayant des propriétés allostériques. Module X reproduit de petites parties des portions extracellulaires flexibles des récepteurs. Ces petits peptides vont interagir en s'interposant entre deux sous unités ou entre deux régions de la même sous-unité qui interagissent par des liens hydrogènes, des ponts salins ou des liens disulfure. Ces régions sont spécialement choisies à l'extérieur du domaine de liaison du ligand orthostérique et sont situées dans les régions inter domaines, la portion juxta membranaire ou dans les boucles. Étant donné que les boucles sont exposées durant les changements de conformation, une séquence peptidique reproduisant certaines régions de ces boucles pourrait s'insérer à un endroit approprié dans la structure où se lier à son partenaire de signalisation dans le complexe protéique, ce qui aurait comme effet de déplacer l'équilibre de l'ensemble vers un état particulier et modulerait ainsi la signalisation. De cette façon, certaines voies de signalisation pourraient être partiellement inhibées tandis que d'autres voies ne seraient pas touchées puisque le ligand orthostérique pourrait toujours se lier au récepteur.

Dans une première étude, nous avons conçu des peptides inhibiteurs du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R/IL-1RAcP) plus précisément en reproduisant des régions flexibles de la protéine accessoire, sous-unité signalisatrice du récepteur. IL-1 est un médiateur majeur de l'inflammation, mais le seul antagoniste disponible est l'analogue naturel de IL-1, IL-1Ra qui compétitionne avec IL-1 pour le site de liaison sur le récepteur. Nous avons conçu plusieurs peptides à partir des boucles de la protéine accessoire. Un de ces peptides, rytvela (101.10) a démontré des propriétés de non-compétitivité et de sélectivité fonctionnelle caractéristiques des modulateurs allostériques. 101.10 bloque la prolifération des thymocytes et la synthèse de PGE2 avec un IC<sub>50</sub> de 1 nM mais une efficacité de 100 % et 45 % respectivement et ne déplace pas IL-1 radioactif dans des essais de radiolisations. De plus, 101.10 n'a qu'un effet minime sur l'affinité de IL-1 pour son récepteur. 101.10 démontre, de plus, une activité inhibitrice *in vivo* dans des modèles d'inflammation de l'intestin chez le rat (efficacité supérieure aux corticostéroïdes et à IL-1Ra) et de dermatite chez la souris de même que dans un modèle d'hyperthermie induite par IL-1.

La deuxième étude démontre que Module X peut être utilisé pour concevoir des inhibiteurs pour une autre grande famille de récepteurs : les récepteurs couplés aux protéines G. La vasopressine joue un rôle important dans l'équilibre hydro-osmotique et un moindre rôle dans la vasomotricité. Six peptides ont été conçus à partir de régions juxta membranaires du récepteur de la vasopressine V2R. Le peptide le plus actif, VRQ397 (IC<sub>50</sub> = 0,69 nM dans un modèle de vasorelaxation du crémastère), a démontré de la sélectivité fonctionnelle en inhibant la synthèse de prostacycline mais sans inhiber l'activation de la protéine Gs et la génération d'AMP cyclique. Le peptide VRQ397 ne pouvait déplacer le ligand naturel AVP marqué radioactivement; de même

VRQ397 radioactif ne se liait que sur V2R et non pas sur d'autres récepteurs de la même famille tel que V1R (récepteur de la vasopressine de type I).

Ces études décrivent la caractérisation de petits peptides modulateurs de la signalisation de IL-1R et V2R et présentant des propriétés de modulateurs allostériques.

## Abstract :

The Module X approach was conceived to generate small allosteric peptides that do not (by definition) compete with the natural ligand to inhibit or modulate signalling. Orthosteric inhibition blocks the entire signalling pathways while allosteric modulators will bind to another site on the target and show functional selectivity. By reproducing parts of the flexible regions (loops) of two receptors, the IL-1 and vasopressin receptors, we generated small peptides that showed allosteric properties.

To prove our concept we started with a pro-inflammatory target: IL-1 receptor. Interleukin (IL)-1 is a major pro-inflammatory cytokine which interacts with the IL-1 receptor I (IL-1RI) complex, composed of IL-1RI and IL-1R accessory protein (IL-1RacP) subunits. Presently, there are no small antagonists of the IL-1RI complex. Given this void, we derived 15 peptides from loops of IL-1RacP, which are putative interactive sites with the IL-1RI subunit. Here we substantiate the merits of one of these peptides, rytvela (we termed, 101.10), as an inhibitor of IL-1R and describe its properties consistent with those of an allosteric negative modulator. 101.10 ( $IC_{50} \approx 1$  nM) blocked human thymocyte proliferation *in vitro*, and demonstrated robust *in vivo* effects in models of hyperthermia and inflammatory bowel disease as well as topically in contact dermatitis, superior to corticosteroids and IL-1ra; 101.10 did not bind to IL-1RI deficient cells and was ineffective *in vivo* in IL-1RI knockout mice. Importantly, characterization of 101.10, revealed non-competitive antagonist actions and functional selectivity by blocking certain IL-1R pathways while not affecting others.

The second study involved a representative of the biggest family of membrane proteins: G-protein coupled receptors. Vasopressin type 2 receptor (V2R) exhibits mostly important properties for hydro-osmotic equilibrium and to a lesser extent on vasomotricity. Drugs currently acting on this receptor are analogs of the natural neuropeptide, vasopressin (AVP), and hence are competitive ligands. Six peptides reproducing juxtamembranous regions of V2R were designed and screened; the most effective peptide, CRAVKY (labelled VRQ397), was characterized. VRQ397 was potent ( $IC_{50} = 0.69 \pm 0.25$  nM) and fully effective in inhibiting V2R-dependent physiological function (specifically DDAVP-induced cremasteric vasorelaxation; this physiological functional assay was utilized to avoid overlooking interference of specific signaling events). Dose-response profile revealed non-competitive property of VRQ397; correspondingly, VRQ397 bound specifically to V2R-expressing cells, could not displace its natural ligand, AVP, but modulated AVP binding kinetics (dissociation rate). VRQ397 exhibited pharmacological permissiveness on V2R-induced signals as it inhibited DDAVP-induced  $PGI_2$  generation, but not that of cAMP or recruitment of  $\beta$ -arrestin2. Consistent with *in vitro* and *ex vivo* effects as a V2R antagonist, VRQ397 displayed anticipated *in vivo* aquaretic efficacy. Findings describe the discovery of potent and specific small (peptide) antagonists of IL-1RI and V2R with properties in line with an allosteric negative modulator.

## Table des matières :

<b>Résumé :</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract :</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des matières:</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux :</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des sigles et abbréviations :</b> .....	<b>xi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Partie A : Récepteurs et allostérisme</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Historique :</b> .....	<b>15</b>
1.1 Théorie récepteur-Ligand.....	15
1.1.1 Théorie classique de l'occupation des récepteurs.....	16
1.1.2 Modèle opérationnel .....	17
1.1.3 Modèle « Two-States ».....	18
1.1.4 Modèle ternaire (TCM) .....	19
1.1.5 Modèle ternaire élaboré et modèle ternaire cubique (ETCM) .....	20
1.2 Théorie Récepteur-Ligand et Allostérie .....	23
1.2.1 Définition et historique de la modulation allostérique : .....	23
1.2.2 Jacques Monod et le modèle MWC (Monod, Wyman, Changeux) .....	24
1.2.3 Koshland et le modèle KNF (Koshland, Nemethy, Filmer) : .....	26
1.2.4 Modèle allostérique de Hall (2000) : .....	26
1.2.5 Modèle d'antagonisme allostérique de Elhert (1985, 1988, 2005) .....	27
1.2.6 Modèle quaternaire : .....	27
1.3 Théorie classique et nouveaux concepts.....	29
1.3.1 Modèles classiques et la nouvelle vision de la modulation allostérique .....	29
1.3.2 Transition allostérique dans la théorie des ensembles .....	32
1.4 Caractéristique et caractérisation des allostériques .....	33
1.4.1 Sélectivité fonctionnelle (signalisation biaisée): .....	33
1.4.2 Saturation de l'effet : .....	34
1.4.3 Site de liaison différent du site orthostérique .....	35
1.5 Caractérisation des modulateurs allostériques.....	36
1.5.1 Essais cellulaires.....	37
1.5.2 Méthodes de détection des propriétés allostériques : .....	40
<b>2. Module X</b> .....	<b>45</b>
2.1 Description de Module X .....	45
2.2 Hypothèse à la base de la conception de Module X : .....	45
2.3 Méthodologie de Module X .....	46
2.4. Peptides utilisés pour moduler l'activité biologique : .....	47

<b>Partie B : Preuve de concept de Module X.....</b>	<b>50</b>
<b>1. Récepteur de l'interleukine 1 : Exemple d'un récepteur de cytokine .....</b>	<b>50</b>
1.1 Famille des ligands : Description générale de chacun.....	50
1.1.1 IL-1 $\alpha$ (IL-1F1) : .....	52
1.1.2 IL-1 $\beta$ (IL-1F2) : .....	54
1.1.3 IL-18 (IL-1F4) : .....	59
1.1.4 IL-1F5.....	60
1.1.5 IL-1F6 : .....	61
1.1.6 IL-1F7 : .....	61
1.1.7 IL-1F8 : .....	62
1.1.8 IL-1F9 : .....	62
1.1.9 IL-1F10 : .....	62
1.1.10 IL-33 (IL-1F11) : .....	63
1.1.11 IL-1Ra (IL-1F3).....	64
1.2 Récepteurs de la famille IL-1 .....	65
1.2.1 Généralités : .....	65
1.2.2 IL-1 R : .....	66
1.2.3 Études <i>in silico</i> et cristallographiques .....	67
1.2.4 Souris déficientes en IL-1RI et IL-1R1AcP .....	68
1.3 Régulation de l'activité de IL-1 : Inhibiteurs endogènes de l'activité de IL-1 .....	68
1.3.1 IL-1Ra : .....	68
1.3.2 IL-1R Type II .....	69
1.3.3 sIL-1RI : .....	70
1.3.4 sIL-1RAcP : .....	71
1.4 Pathologies impliquant IL-1 $\beta$ :.....	71
1.4.1 IL-1 $\beta$ et la réponse inflammatoire : .....	71
1.4.2 IL-1 $\beta$ $\square$ costimulateur des cellules T : .....	72
1.4.3 IL-1 $\beta$ et la réponse immunitaire TH2 : .....	73
1.4.4 IL-1 et Th17 : .....	73
1.5 Exemple de pathologies impliquant IL-1 $\beta$ : .....	73
1.5.1 Arthrite rhumatoïde : .....	73
1.5.2 Psoriasis et dermatites : .....	75
1.5.3 Maladies inflammatoires de l'intestin : .....	76
1.5.4 Maladies autoinflammatoire : Un exemple, la goutte : .....	77
1.5.5 Effets hémostatiques et thermorégulateurs de IL-1: hypotension et hyperthermie.....	78
1.6 Pharmacologie de IL-1 $\beta$ .....	79
1.7 Module X et IL-1R : .....	80
1.7.1 Conception des peptides : .....	80
<b>2. Preuve de concept de Module X chez les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs): Inhibiteurs du récepteur de la vasopressine V2R : .....</b>	<b>82</b>
2.1 Généralités, structure, classification et signalisation des GPCR : .....	82
2.1.1 Généralités: .....	82
2.1.2 Structure: .....	82
2.1.3 Classification: .....	85
2.1.4 Signalisation et protéines G: .....	87

2.1.5 Régulation de l'activité des GPCR et désensibilisation:.....	90
2.1.6 Modulateurs allostériques des GPCR:.....	91
2.2 Récepteur de la vasopressine V2R: Exemple d'application de la technologie Module X aux GPCR.....	93
2.2.1. Vasopressine:.....	93
2.2.2. Récepteurs de la vasopressine:.....	95
2.2.3. Agonistes et antagonistes de la vasopressine:.....	96
2.2.4. Structure du V2R:.....	98
2.2.5 Conception des inhibiteurs peptidiques:.....	98
<b>Partie C : Articles publiés .....</b>	<b>100</b>
<b>1. Article 1:.....</b>	<b>100</b>
<b>2. Article 2 :.....</b>	<b>141</b>
<b>Partie D : Discussion .....</b>	<b>177</b>
<b>1. Anti-IL-1R : APG 101.10.....</b>	<b>177</b>
<b>2. Antagoniste du récepteur V2R : VRQ397 : .....</b>	<b>183</b>
<b>3. Changement conformationnel et ligands biaisés.....</b>	<b>186</b>
<b>Partie E : Conclusion : .....</b>	<b>192</b>
<b>Partie F: Bibliographie: .....</b>	<b>193</b>

**Liste des tableaux :**

Tableau 1	Propriétés des antagonistes orthostériques et allostériques .....	35
Tableau 2	Peptides développés à partir de séquences primaires de protéines.....	48
Tableau 3	Ligands de la famille IL-1 .....	53
Tableau 4	Récepteurs de la famille IL-1 .....	66
Tableau 5	Agents thérapeutiques bloquant l'action de IL-1 $\beta$ .....	79
Tableau 6	Peptides anti-IL-1RAcP et IL-1R.....	81
Tableau 7	Ligands des récepteurs de la vasopressine .....	94
Tableau 8	Agonistes des récepteurs de la vasopressine .....	97
Tableau 9	Antagonistes des récepteurs de la vasopressine .....	97
Tableau 10	Activité des agonistes des récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	189

## Liste des figures

Figure 1	Évolution des modèles ligands récepteurs .....	22
Figure 2	Modèle quaternaire illustrant la complexité des interactions allostériques d'un récepteur couplé aux protéines G.....	28
Figure 3	Changements d'équilibre dans les ensembles conformationnels.....	31
Figure 4	Isotherme d'adsorption de Langmuir.....	37
Figure 5	Effet de concentrations croissantes d'un modulateur sur la courbe dose réponse de la réponse biologique en fonction de la concentration d'agoniste orthostérique.....	41
Figure 6	Antagonisme surmontable par un modulateur allostérique.....	42
Figure 7	Illustration de l'antagonisme allostérique insurmontable .....	43
Figure 8	Choix des peptides .....	45
Figure 9	Exemple de structures flexibles choisies pour la conception des peptides avec Module X .....	47
Figure 10	Maturation et sécrétion de IL-1 $\beta$ et inflammasome induite par IL-1 $\beta$ . ....	57
Figure 11	Maturation de IL-1 avec stimulation de TLR .....	58
Figure 12	Récepteurs membres de la famille IL-1 .....	65
Figure 13	Structure du complexe IL-1R-IL-1 $\beta$ -IL-1RAcP .....	67
Figure 14	Signalisation de IL-1 et des inhibiteurs naturels.....	70
Figure 15	Représentation des évènements qui ont lieu dans une articulation inflammée.....	75
Figure 16	Mécanisme inflammatoire de la goutte.....	78
Figure 17	Exemple de régions choisies par la méthode Module X et représentation du modèle de la protéine accessoire .....	81
Figure 18	Comparaison des structures tridimensionnelles de la rhodopsine/opsin, du récepteur $\beta$ -adrénergique et de l'adénosine cristallisées avec certains de leurs ligands.....	84
Figure 19	Cycle d'activation et d'inactivation des GPCR .....	88
Figure 20	Schéma général des voies de signalisation des GPCR.....	90
Figure 21.	Récepteur V2R.....	99
Figure 22.	Profil de flexibilité de IL-1RAcP généré par Protscale .....	178
Figure 23	Efficacité de 101.10 dans un modèle de goutte inflammatoire.....	181
Figure 24.	Efficacité de 101.10 dans un modèle d'arthrite induite par un adjuvant ..	182
Figure 25.	Position de CRAVKY dans la structure de V2R .....	184
Figure 26.	Signalisation biaisée chez les GPCR .....	188
Figure 27.	Antagonisme biaisé.....	190
Figure 28.	La protéine p53 .....	191

## Liste des sigles et abréviations :

AP-1 :	Activator protein-1
BLAST :	Basic Local Alignment Search Tool
BRET ,	Bioluminescence resonance energy transfer
CCR2 :	Chemokine (C-C motif) receptor 2
COX :	Cyclooxygenase
CPPD ,	Calcium Pyrophosphate Dihydrate (Deposition Disease)
CTC :	Cubic ternary complex model
CXCR4 :	CXC ( $\alpha$ chemokine) receptor 4
EC <sub>50</sub> :	Effective concentration required to induce 50% effect
ECL :	Extracellular Loop
E <sub>MAX</sub> ,	Maximum possible effect for an agonist
ERK ,	Extracellular signal-regulated kinase
ETCM ,	Extended ternary complex model
GABA :	gamma-Aminobutyric acid
GPCR :	G protein-coupled receptors
HAX-1 :	HCLS1 (hematopoietic lineage cell-specific protein)-associated protein X-1
HIV :	Human immunodeficiency virus
IC <sub>50</sub> :	Half maximal inhibitory concentration
ICAM ,	Intercellular Adhesion Molecule
ICL :	Intracellular loop
IFN :	Interferon
IL :	Interleukin
IL-1R :	Interleukin-1 receptor
IL-1RAcP :	Interleukin-1 receptor accessory protein
IL-1Rrp2 :	IL-1 receptor-related protein 2
IRAK :	Interleukin-1 receptor-associated kinase
JAK ,	Janus kinase

JNK ,	c — Jun N-terminal kinase
$K_A$ :	Constante de dissociation du complexe récepteur-agoniste
$K_B$ ,	Constante de dissociation du complexe récepteur-antagoniste
$K_D$ :	Constante de dissociation d'un ligand radiolié à un récepteur
$K_E$ ,	Constante de dissociation du complexe activé du récepteur
$K_G$ :	Constante de dissociation complexe activé récepteur-protéine G
$K_i$ ,	Constante d'affinité du composé non lié (qui déplace le composé lié) sur le récepteur
KNF :	Koshland, Nemethy, Filmer model
LFA-1 :	Lymphocyte function-associated antigen 1
MAPK ,	Mitogen-activated protein kinase
MOE ,	Molecular Operating Environment modelisation software
MSU ,	Monosodium urate
MWC ,	Monod, Wyman, Changeux modèle
MyD88 :	Myeloid differentiation primary response gene 88
NALP3 :	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NF $\kappa$ B :	Nuclear Factor kappa B
NOD :	Nucleotide-binding oligomerization domain
NOS :	Nitric oxide synthase
OTR :	Oxytocin receptor
PDB ,	Protein Data Bank
RANK ,	Receptor activator of Nuclear Factor kappa B
RANKL :	Receptor activator of Nuclear Factor kappa B ligand
SAPK :	Stress-activated protein kinases
SIGIRR ,	Single Ig IL-1-related receptor
ST2 :	Interleukin-1 receptor-like 1 (aussi connu sous IL-1RL1)
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription protein
TIR :	Toll/IL-1 receptor domain
TLR :	Toll-like receptor
TM1 à 7 :	Segments transmembranaires 1 à 7

TNF ,	Tumor necrosis factor
V1R :	Vasopressin receptor type 1
V2R :	Vasopressin receptor type 2

**Remerciements :**

Ces travaux et la production de cette thèse n'auraient pas été possibles sans l'appui indéfectible de mon codirecteur de thèse Sylvain Chemtob qui n'a jamais cessé de croire en mes travaux et m'a toujours appuyée en tous contre vents et marées! Je le remercie aussi pour son soutien financier qui m'a permis d'assister à plusieurs congrès internationaux, pour les discussions sur l'allostérisme et la structure des récepteurs et pour la passion de la recherche qu'il m'a inculquée.

Je remercie tous les membres du labo Chemtob pour leur soutien et encouragements, les nombreuses discussions scientifiques et bien sûr aussi pour les réunions pas mal moins scientifiques!

Un merci très spécial à Hensy Fernandez et Isabelle Lahaie, assistantes de recherche au labo Chemtob pour l'amitié, les bons conseils et les pauses-café du matin.

Merci aux membres de mon comité d'examen pré doctoral et aux membres de mon jury de thèse.

Merci aux organismes qui m'ont fourni de l'aide financière : la Fondation Ste-Justine, la Fondation des Maladies du Cœur et le Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

En terminant, un merci particulier à ma fille qui a été mon facteur de motivation principal et la raison derrière ma volonté de terminer mes études

## **Partie A : Récepteurs et allostérisme**

### **1. Historique :**

#### **1.1 Théorie Récepteur-Ligand**

Le concept de récepteur est la notion la plus importante ayant émergé des premières années de la pharmacologie. Les pharmacologistes avaient réalisé que d'infimes quantités de composés pouvaient avoir des effets majeurs sur la physiologie des systèmes. De plus, de petits changements de concentrations de drogues pouvaient entraîner de grandes différences d'activité biologique. Ceci a mené à la notion que quelque chose sur et/ou dans la cellule devait « recevoir » et lire l'information amenée par le composé et le traduire en effets physiologiques; d'où la notion de récepteur, qui existerait pour chaque composé actif. Un pionnier en la matière, Paul Ehrlich, avait d'ailleurs proposé plusieurs termes pour ces récepteurs : chémorécepteurs, amborécepteurs, tricepteurs et polycepteurs. Par ailleurs, John Newport Langley (1852-1926) introduisit le concept d'interrupteurs recevant le signal et pouvant être bloqués ou activés au besoin par des molécules spécifiques (concept de modulation).

Depuis le début de la pharmacologie moderne, plusieurs modèles ont été élaborés pour décrire quantitativement les relations ligands-récepteurs. Ces modèles mathématiques se reflètent maintenant dans les différentes représentations graphiques utilisées par les pharmacologues pour décrire les effets physiologiques de différents composés. Ces concepts étaient basés sur les principes démontrés par la cinétique enzymatique et ont servi à élaborer tous les outils d'investigation nécessaires pour quantifier les effets biologiques des médicaments.

Les modèles mathématiques se sont avérés indispensables en pharmacologie pour concevoir des expériences, prédire les effets des drogues et décrire des systèmes complexes.

À l'époque, par contre, les outils permettant de faire de bonnes études de structure fonction des récepteurs manquaient. Malgré tout, les enzymes pouvaient être étudiés *in vitro* (en tubes) et les principes d'allostérisme décrits plus tard pour les GPCR (G-protein coupled receptors; récepteurs couplés aux protéines G) ont tous été dérivés de théories déjà élaborées pour les enzymes (et les canaux ioniques). Voici un résumé de l'évolution de ces modèles.

### 1.1.1 Théorie classique de l'occupation des récepteurs

La première théorie de la pharmacologie quantitative des récepteurs a été introduite par Alfred Joseph Clark (1885-1941). Il a été le premier à suggérer que les données compilées à partir des études d'activités biologiques (acétylcholine et atropine) découlaient de l'interaction d'une molécule et d'une substance à la surface de la cellule (1, 2).

Les théories de Clark allaient à l'encontre de la pensée plutôt chaotique de l'époque, car il était impossible de concevoir le lien commun entre les différentes réactions physiologiques générées par des molécules comme l'épinéphrine, par exemple. Le concept de récepteur a permis d'identifier ce lien qui, ici, est en l'occurrence, le récepteur  $\beta$ -adrénergique. Ce concept a aussi permis d'introduire de l'ordre dans les principes physiologiques et pharmacologiques et d'amener les notions d'association et dissociation, d'affinité et d'efficacité.

Clark a assumé que la liaison d'un ligand (agoniste) [A] à un récepteur R suivait la loi d'action de masse tel que démontré par l'isotherme d'adsorption de Langmuir; celui-ci avait postulé que chaque molécule avait un taux caractéristique de diffusions sur une surface et un taux de dissociation (condensation et évaporation) correspondant en fait à l'affinité d'une molécule pour sa « surface » (sa capacité de liaison). Overhardus J. Ariens (1918-2002) a solidifié ces concepts et complété le travail de Clark (3, 4). Il a introduit les concepts d'agonistes totaux et d'agonistes ayant une « activité intrinsèque diminuée » appelés plus tard agonistes partiels. Le véritable but de ces travaux était de déterminer l'étendue des effets produits par les drogues sur

les cellules et leurs relations avec les lois de la chimie physique, de prévoir et de quantifier cette prédiction.

La formule principale :

$$\text{Response} = \frac{[\text{A}] \alpha}{[\text{A}] + K_A}$$

où  $K_A$  est la constante de dissociation, révolutionna la théorie récepteur/agoniste en y introduisant le concept de stimuli. Le récepteur avait la capacité d'activer une réponse biologique qui implique non seulement l'agoniste et le récepteur, mais aussi le tissu. La magnitude du stimulus était donc fonction de l'efficacité, du tissu utilisé et de la quantité de récepteurs disponibles.

### 1.1.2 Modèle opérationnel

Le modèle classique d'occupation des récepteurs décrivait une relation strictement linéaire entre l'agoniste et le récepteur (en terme d'occupation) ce qui s'avéra rapidement limitant. En 1989, Black and Leff introduit un concept révolutionnaire qui a permis de contourner le besoin de décrire l'efficacité par une constante (5). L'efficacité biologique d'un ligand à générer une réponse biologique découlait des observations expérimentales, c'est-à-dire de la relation saturable entre la stimulation du récepteur et la réponse observée.

Ce modèle introduisit les notions de  $E_{MAX}$  (réponse maximale de l'agoniste) et la constante d'équilibre de dissociation ( $K_A$ ) qui étaient dépendantes de la capacité de l'agoniste à générer une réponse tissulaire ( $K_E$ ). Il démontrait l'interrelation de la réponse, de la transduction de signal et de l'occupation des récepteurs. C'était une représentation unifiée de l'occupation du récepteur, de la stimulation et la production du signal à travers le processus cellulaire. Ce système a permis la comparaison entre plusieurs agonistes puisqu'il introduisit la possibilité d'identifier différentes activités agonistiques pour un même récepteur et système tissulaire.

Les paramètres pharmacologiques sont encore aujourd'hui déterminés par le modèle opérationnel. Ce modèle a jeté les bases de la caractérisation pharmacologique de la relation agoniste-récepteur.

### **1.1.3 Modèle « Two-States »**

Originellement développé pour les canaux ioniques par Del Castillo et Katz, ce nouveau concept postulait que lorsqu'un canal était lié à l'agoniste, il passait d'une conformation fermée à une conformation ouverte (6).

Les modèles décrivant l'isomérisation des récepteurs entre différents états conformationnels avaient déjà été décrits par Katz et Del Castillo (1957) par leurs travaux sur le récepteur nicotinique qui lie l'acétylcholine et prédisaient l'apparition de conformations actives découlant de l'isomérisation des récepteurs (ou canaux) en présence du ligand. Katz et Del Castillo ont aussi observé qu'une portion de canaux ioniques pouvait être spontanément ouverte sans la présence d'agonistes. Donc ce modèle a permis l'introduction du concept d'activité constitutive.

Ces modèles furent appelés «two-states ou multi-state models» et représentèrent la première illustration d'un mécanisme de sélection conformationnelle. Le «two-state model» était un mécanisme de sélection où le ligand se liait à une conformation préexistante du récepteur et favorisait la formation de cette conformation, ce qui était plus favorable énergétiquement que si le ligand induisait lui-même un changement de conformation. Les deux mécanismes étaient aussi utilisés par les protéines pour induire la signalisation : la sélection et l'induction étaient en fait deux extrêmes d'un mécanisme commun. Ce modèle ne postulait pas nécessairement la présence d'un deuxième site de liaison pour un ligand allostérique. Il expliquait l'allostérisme comme étant la conséquence d'une transition entre deux conformations orthostériques.

Plus la complexité des protéines multimériques augmentait plus il y avait de probabilités d'avoir des sites de liaison potentiellement allostériques. C'est pourquoi nous avons commencé à étudier très tôt les canaux ioniques puisque ceux-ci avaient

déjà démontré leur capacité de former des oligomères pour leur activité. Au contraire, les récepteurs comme les GPCR avaient été considérés originellement comme étant des monomères.

Le modèle « Two-States » a été appliqué aux récepteurs par Hall en 2000 (7) (surtout les GPCR) et a servi de modèle pour expliquer les résultats expérimentaux démontrant l'activité constitutive de ces récepteurs en l'absence d'agonistes (8, 9).

Ce modèle s'est avéré en fait plutôt un concept et a introduit la notion primordiale de conformations multiples et permis d'envisager la relation ligand-récepteur autrement que par la simple loi de l'action de masse. Il a aussi mis en valeur l'influence de la thermodynamique dans la pharmacodynamique.

#### **1.1.4 Modèle ternaire (TCM)**

Dérivé du modèle « Two-State » pour l'adapter aux GPCR, le TCM s'est avéré le modèle le plus simple pour décrire l'isomérisation où un ligand A lié permettait au récepteur R d'adopter une conformation conduisant soit à la signalisation directement ou bien à la liaison avec une protéine G. Ce modèle introduisit de plus une constante décrivant la coopérativité entre le site de liaison à la protéine G et le site de liaison au ligand orthostérique (10).

Ce modèle introduisit pour la première fois le facteur allostérique de façon formelle dans la description de la relation ligand-récepteur-complexe signalétique (aussi introduite pour la première fois). La première interaction allostérique identifiée pour les GPCR fut la protéine G et le complexe récepteur-protéine G fut isolé pour la première fois par Limbird (11) et Ross (12). L'élaboration de modèles pouvant décrire les relations existant entre les GPCR, les ligands orthostériques et un autre ligand à un autre site était basée sur deux idées principales. La première découlait des travaux effectués sur les canaux ioniques qui ont démontré comment l'affinité sélective pour certains états conformationnels pouvait biaiser la population de canaux (13). La deuxième idée concernait le fait que certains récepteurs pouvaient transloquer à travers les membranes et s'associer avec d'autres protéines membranaires. Cela impliquait que plus d'un site de liaison existait sur le récepteur : au moins un pour le ligand

orthostérique et un pour la protéine G. Ces concepts ont donné lieu au modèle ternaire puisque nous sommes en présence de multimètres avec plusieurs sites de liaisons : site du ligand, site de la protéine G, site du GTP. Ce mécanisme tripartite représentait la forme la plus simple d'interactions allostériques entre des sites de liaisons et non pas l'allostérisme entre différents états conformationnels.

L'avènement de systèmes de protéines recombinantes permettant de sélectivement exprimer des récepteurs dans des systèmes cellulaires et ainsi de contrôler la stœchiométrie récepteurs, protéines G et ligands a permis de faire la démonstration expérimentale d'espèces de récepteurs actifs de façon constitutive en démontrant que certaines conformations actives de GPCR se couplaient de façon spontanée à des protéines G sans la présence de ligands. Ces avancées ont mené les modèles déjà élaborés à un autre niveau de complexité.

Le TCM a été le premier modèle vraiment explicite ayant tenté d'expliquer les interactions et la dynamique des relations allostériques et orthostériques. Mais le TCM avait ses limites, c'est-à-dire que l'accessibilité de la protéine G (diminution dans le plan de la membrane) pouvait donner lieu à des courbes de liaison aberrantes qui ne pouvaient être expliquées.

### **1.1.5 Modèle ternaire élaboré et modèle ternaire cubique (ETCM)**

Durant plusieurs années le TCM sera utilisé pour décrire les effets pharmacologiques des récepteurs jusqu'à ce que de nouvelles données expérimentales forcent des modifications du concept original. Les récepteurs formaient spontanément des complexes avec les protéines G et pouvaient donc signaler en absence de ligand. Il a donc fallu modifier le modèle.

Le modèle ternaire de De Léan ne permettait pas d'incorporer l'activité constitutive des GPCR et les nombreux états conformationnels existant possiblement. Samama, P. *et al.*(14) a étendu le modèle de De Léan de façon à y incorporer une forme inactive et active avec leur constante d'isomérisation respective et ainsi permettre d'illustrer les possibilités d'interactions entre les différents états, les

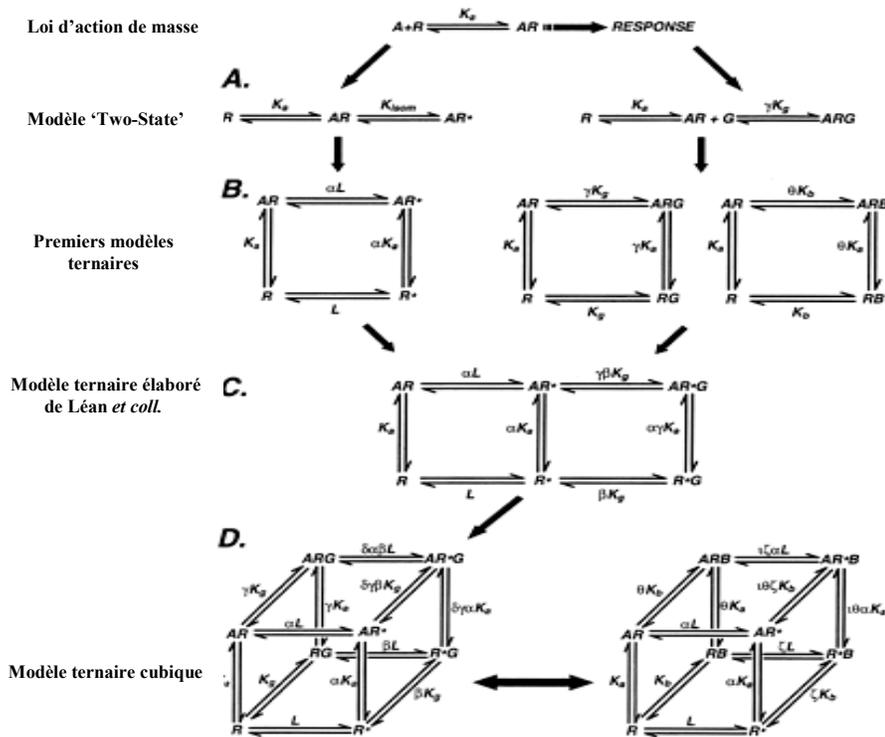
protéines G et le ligand orthostérique. Dans les faits les GPCR ont une infinité de conformations lorsque le ligand est lié et ces conformations diffèrent de celle qui confère l'activité constitutive (15).

Il fut aussi le premier modèle à incorporer les transitions allostériques entre les états conformationnels (gouvernés par les constantes  $L$  et  $\alpha$ ) et les interactions allostériques entre plusieurs sites de liaisons, (gouvernés par les constantes  $\beta, \gamma$ ) (Figure 1).

En terme thermodynamique, cela signifiait qu'il y avait une quantité de récepteurs non occupés inactifs qui interagissaient avec les protéines G de façon à conférer une activité constitutive. C'est pourquoi un troisième modèle a été élaboré qui tient compte de toutes ces différentes possibilités : le modèle cubique ternaire.

Le CTC s'est avéré plus complexe et difficile à utiliser expérimentalement parce qu'il contenait trop de paramètres. Il y a peu d'évidence dans la littérature de l'existence d'un complexe molécule allostérique-récepteur-protéine G inactif dans les cellules, ce que le CTC introduisait dans le nouveau modèle. Deux exemples, le CB1 (cannabinoid receptor) (16) et le humain  $\mu$ -opioid receptor (17) ont permis d'identifier ces complexes, mais ils sont peu nombreux.

Le modèle cubique ternaire permettait d'inclure le potentiel des récepteurs (liés ou non liés par l'agoniste inverse) à séquestrer les protéines G dans une conformation inactive (Figure 1).



(Adapté de Christopoulos, 2002)

**Figure 1. Évolution des modèles ligands récepteurs.** Les premiers modèles étaient basés sur la présomption que la loi d'action de masse dictait la liaison du ligand A au récepteur R et était décrite par la constante d'association  $K_A$ . **A)** L'agoniste lié au récepteur va induire l'isomérisation de ce dernier pour produire un état différent qui pouvant produire une réponse biologique (gauche) ou bien interagir avec une protéine intracellulaire (ex protéine G) (droite). **B)** Le récepteur R peut spontanément changer de conformation vers un état activé  $R^*$  (gauche) ou se coupler à la protéine G (G) ou un ligand allostérique (B) (droite) en présence ou absence du ligand orthostérique. La constante d'isomérisation est dictée par la thermodynamique (L) et les constantes d'associations  $K_A$ ,  $K_B$  et  $K_G$  sont modifiées par les facteurs de coopérativité  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\theta$  lorsque ces mêmes interactions prennent place sur un récepteur occupé. **C)** Le modèle, ETC de de Léan et Samama combine le modèle « Two-state » avec le complexe ternaire, mais permet seulement au récepteur actif d'interagir avec la protéine G. **D)** Le modèle CTC de Weiss (gauche) permet à la forme inactive d'interagir avec la protéine G et l'état actif. Ce modèle est semblable à celui de Hall (2000; à droite) qui décrit les interactions d'un modulateur allostérique et d'un ligand orthostérique sur un récepteur qui peut adopter les conformations actives et inactives (13).

## 1.2 Théorie Récepteur-Ligand et Allostérie

Les modèles d'interactions récepteur-ligand classiques décrivaient des liaisons de protéines sur des sites non orthostériques (ex. protéine G), mais ces modèles présumaient au départ une signalisation classique induite par un ligand orthostérique et ne variant jamais. Cette signalisation était inhibée complètement par un analogue qui compétitionnait avec le ligand naturel.

Par contre, au fur et à mesure de l'évolution de ces modèles, il devenait évident que si l'on voulait être le plus précis possible dans la prédiction et la description des effets pharmacologiques découlant de l'activité de certains récepteurs, on devait inclure aussi, dans ces modèles, toutes les molécules qui se liaient à d'autres sites que le site orthostérique et qui de ce fait influençaient l'activité biologique. C'est pourquoi, peu à peu le concept de modulation allostérique apparut dans les concepts décrivant les interactions récepteur-ligand. La liaison à la protéine G de même que l'activité constitutive des récepteurs sont des exemples de modulation qu'on pouvait attribuer à des actions de molécules se liant ailleurs qu'au site orthostérique.

### 1.2.1 Définition et historique de la modulation allostérique:

L'idée que les protéines possèdent des sites de régulation permettant la liaison d'activateurs ou d'inhibiteurs pour moduler leur activité (sur un site autre que le site de liaison du substrat ou du ligand naturel) intéressait déjà les pharmacologues dans la première moitié du 20<sup>e</sup> siècle. Les exemples classiques, l'aspartame transcaramoylase et l'hémoglobine, possédaient quatre sous unités et démontraient de la coopérativité causée par des changements conformationnels suivant la liaison du ligand.

Historiquement, l'allostérie a été définie par Monod et Changeux (18) comme la régulation d'une protéine par les changements conformationnels dans sa structure quaternaire. À l'époque, la définition de l'allostérisme se limitait à ces changements structuraux dans ce type de protéines.

De 1955 à 1970, Mark Perutz effectua des travaux primordiaux pour la compréhension du comportement des protéines réalisant la première cristallisation et

résolution par rayons X des structures de l'hémoglobine de cheval et humaine (19-21), ce qui conduisit au premier développement important dans la théorie des interactions allostériques. Des évidences expérimentales indiquaient déjà alors que plus d'une molécule de ligand était capable de lier certains enzymes ou canaux ioniques et d'induire un changement dans les propriétés de la protéine, phénomène qui fut appelé coopérativité. Le premier scientifique à décrire les effets d'une molécule qui se lie à une protéine et qui influence la liaison d'un autre ligand lié sur un autre site de cette même protéine fut Archibald Vivian Hill (1910). L'équation de Hill utilisée maintenant pour décrire l'effet dose-réponse d'agonistes (courbe sigmoïde) était utilisée à l'époque pour décrire la liaison coopérative (22).

### **1.2.2 Jacques Monod et le modèle MWC (Monod, Wyman, Changeux)**

L'élaboration de la théorie allostérique s'est véritablement amorcée entre les années 1961 et 1965 parallèlement aux travaux de Perutz et s'est développée en deux temps: le premier concernait le mécanisme de liaison d'un ligand régulateur (tel un inhibiteur rétroactif de l'activité enzymatique) qui contrôlait l'état d'activité d'un site actif même s'il était différent du substrat original. Il a donc été proposé que ces deux espèces moléculaires se liaient à des sites différents qui s'influençaient mutuellement. Le deuxième temps concernait l'analyse de patrons complexes d'activité enzymatique de la L-thréonine déaminase et l'aspartame transcarbamylyase. Ces deux enzymes démontraient des interactions coopératives qui s'entrecoupaient avec des ligands semblables ainsi que des interactions entre différents ligands (ex. une molécule régulatrice et un substrat).

C'est Jacques Monod en 1961 qui a le premier utilisé le terme allostérie qui veut dire en grec « autre site ». Monod *et al.*(23) a non seulement introduit le terme allostérie dans le vocabulaire de la chimie des protéines, ils ont aussi décrit l'habileté des enzymes à modifier leur propre activité biologique. Ils décrivaient ainsi un mécanisme d'une importance extrême dans la régulation des processus biologiques au

niveau moléculaire. Il a identifié trois caractéristiques décrivant les interactions allostériques ligands-protéines sur une même protéine ; 1) deux régions (sites de liaisons) topologiquement distinctes sur le même récepteur (allostérique); 2) Aucun recoupement dans les sites de liaisons des ligands et 3) les interactions allostériques étaient réciproques en nature, car la liaison d'un ligand allait affecter la liaison d'un autre ligand à un autre site. Les effets d'un composé allostérique pouvaient être positifs ou négatifs selon le ligand et le récepteur. Monod a défini ces sites de liaison comme étant « allostériques » en comparaison avec le site de liaison au substrat qu'il a nommé « isostérique » (18).

Le modèle MWC (Monod, Wyman, Changeux (24)) de mécanisme allostérique chez les enzymes insistait sur le fait que la transition conformationnelle était une action concertée entre deux états distincts, mais coexistants. En fait, ils ont proposé deux concepts unifiés dans le MWC : 1) les protéines ont une structure quaternaire (c'est-à-dire une organisation de complexe protéique) avec les sous-unités identiques organisées de façon régulière dans des ensembles ou « oligomères » avec des propriétés symétriques; 2) Le second postulait que les oligomères responsables de la signalisation subissaient des transitions conformationnelles réversibles qui naturellement altéraient l'organisation quaternaire, mais préservaient sa symétrie. En d'autres mots, les changements structuraux coopératifs intrinsèques à la protéine (complexe protéique) déterminaient les propriétés de liaisons entre elles. Ce qui rejoignait ce qui avait déjà été démontré pour l'hémoglobine, c'est-à-dire des changements spontanés (tels des interrupteurs) dans les protéines qui elles mêmes étaient stabilisées par la liaison du substrat ou ligand auxquels elles se liaient préférentiellement. L'hypothèse était donc que les oligomères allostériques existaient avec un minimum de deux conformations (R et T) symétriques.

Ils ont postulé que les réactions coopératives des enzymes polymériques résultaient d'un équilibre allostérique entre deux conformations R (la plus réactive) et T (la moins réactive) qui étaient régulés par leurs substrats autant que par les effecteurs allostériques.

Ils ont par la suite précisé leur modèle qui a donné naissance à un autre principe majeur en allostérisme. Ils ont mis en évidence les interactions entre les différents états conformationnels plutôt qu'entre différentes régions d'une même protéine.

### **1.2.3 Koshland et le modèle KNF (Koshland, Nemethy, Filmer) :**

Koshland *et coll.* (1966)(25) ont par la suite élaboré un modèle tenant compte de l'hétérooligomérisation: le KNF ou modèle séquentiel (contrairement à un mécanisme concerté dans le MWC). Dans ce modèle, les sous-unités changeaient de conformation une à la fois. Donc une forme hybride pouvait exister. La liaison d'un ligand allait changer la conformation d'une sous-unité sans affecter l'autre sous-unité (25).

Le KNF supposait que la liaison d'un ligand/substrat à un polymère protéique induisait un changement conformationnel dans cette protéine qui en retour le propagerait dans les sous-unités voisines. Il était supposé que chaque sous-unité avait deux conformations tertiaires actives et inactives. Ils ont postulé que les changements de structure des enzymes polymériques résultaient d'un équilibre allostérique entre les états conformationnels R (actif) et T (inactif) et étaient régulés par les substrats et les effecteurs allostériques.

### **1.2.4 Modèle allostérique de Hall (2000) :**

Aujourd'hui l'allostérisme est accepté comme concept même chez les protéines monomériques et l'allostérie serait donc une propriété intrinsèque d'une protéine, car toutes ses surfaces sont des sites allostériques potentiels. La seule exception pourrait être les protéines fibreuses extrêmement stables et ne possédant pas ou peu de flexibilité. Après les travaux de Monod et Koshland, plusieurs chercheurs vont appliquer ces principes à la pharmacodynamique des récepteurs.

D.A. Hall a utilisé le modèle de De Léan et Samama pour l'adapter aux modulateurs allostériques où le deuxième site de liaison était occupé par une autre

molécule que la protéine G, c'est-à-dire par un modulateur allostérique. Les différences étaient que le modèle allostérique quantifiait les réponses comme la production d'espèces de récepteurs activés (autres que couplés aux protéines G) comme pour les canaux ioniques et pouvait donc prédire le coagonisme (modulateur allostérique qui modifie à la hausse l'efficacité du ligand orthostérique sans lui-même posséder d'activité intrinsèque).

### **1.2.5 Modèle d'antagonisme allostérique de Elhert (1985, 1988, 2005)**

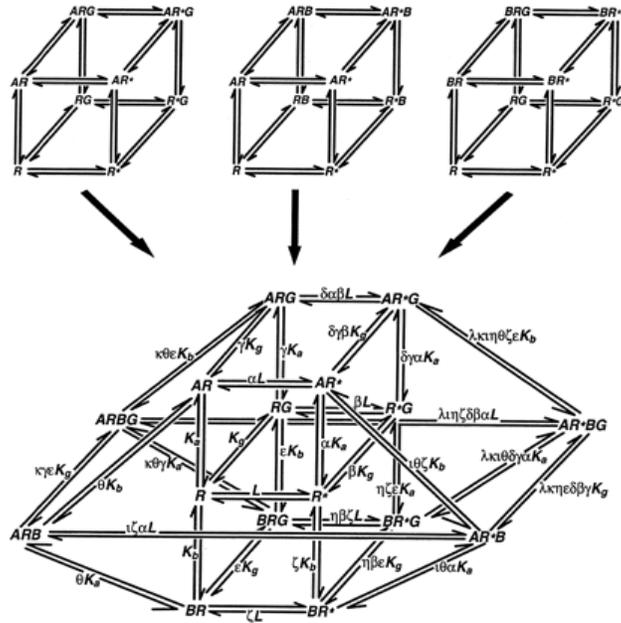
Le modèle classique d'allostérisme antagoniste pour les récepteurs a été développé par Elhert (26-29). Ce modèle décrivait les relations entre le ligand orthostérique, le récepteur et l'antagoniste allostérique à partir du modèle « two-state » et du modèle ternaire de De Léan.

Il a mis en évidence une propriété primordiale des antagonistes allostériques : leurs effets sont saturables (en théorie lorsque la concentration tend vers l'infini). Il introduisit la relation entre les constantes de dissociation et la constante définissant la coopérativité. Il a aussi conceptualisé le principe de perception du ligand allostérique par le récepteur. Ce fut le premier modèle à introduire de façon formelle la sélectivité fonctionnelle et la différence de réponse dépendante de l'agoniste et du modulateur allostérique.

### **1.2.6 Modèle quaternaire**

Le modèle quaternaire fut élaboré par Kenakin et Christopoulos en 2002 afin d'illustrer et de démontrer un lien entre toutes les interactions moléculaires entourant un récepteur couplé aux protéines G. Le but de l'exercice était de combiner tous les modèles (pour la plupart démontrés scientifiquement) et de résumer toutes les probabilités d'interactions. Ce modèle est donc totalement conceptuel, mais illustre bien la complexité des interactions moléculaires entourant l'activité biologique des

protéines. La figure 2 est une représentation graphique de ce modèle. Il est plus thermodynamiquement complet et intègre la liaison simultanée du ligand orthostérique ( $\dot{A}$ ), allostérique (B) et de la protéine G (G). De plus, il tient compte des conformations actives (R) et inactives ( $R \gg$ ) (Figure 2).



(Tiré de Christopoulos A, 2002)

**Figure 2** Modèle quaternaire illustrant la complexité des interactions allostériques d'un récepteur couplé aux protéines G.

Légende des symboles :

L	Constante d'isomérisation du récepteur
$K_a$	Constante d'équilibre d'association du ligand orthostérique [ $\dot{A}$ ]
$K_b$	Constante d'équilibre d'association du ligand allostérique [B]
$K_g$	Constante d'équilibre d'association de la protéine G [G]
$\alpha$	Constante de coopérativité de [ $\dot{A}$ ] pour le récepteur non lié
$\beta$	Constante de coopérativité de [G] pour le récepteur non lié
$\gamma$	Coopérativité de liaison entre [ $\dot{A}$ ] et [G]
$\delta$	Coopérativité d'activation entre [ $\dot{A}$ ] et [G]
$\varepsilon$	Coopérativité de liaison entre [B] et [G]
$\zeta$	Coopérativité d'activation de [B] pour le récepteur non lié
$\eta$	Coopérativité d'activation entre [B] et [G]
$\theta$	Coopérativité de liaison entre [ $\dot{A}$ ] et [B]
$\iota$	Coopérativité d'activation entre [ $\dot{A}$ ] et [B]
$\kappa$	Coopérativité de liaison entre [ $\dot{A}$ ], [B], et [G]
$\lambda$	Coopérativité d'activation entre [A], [B], et [G]

L'allostérisme peut donc maintenant officiellement se définir comme étant la régulation de la fonction d'une protéine induite par la liaison d'un modulateur ou d'une autre protéine à un site différent du site actif ou de liaison au ligand appelé site orthostérique (30). Terry Kenakin définit l'allostérisme comme étant l'imposition d'un effet sur une protéine à travers les interactions d'une molécule ayant un site de liaison différent du ligand orthostérique.

### **1.3 Théorie classique et nouveaux concepts**

Comme démontré plus haut, les protéines dans leur état natif étaient vues comme existant en équilibre entre deux différentes conformations : l'état actif et inactif. Cette façon classique de voir les choses est présentement en train d'évoluer vers l'idée que les protéines existent plutôt en tant qu'ensemble de plusieurs conformères et que celles-ci vont souvent subir des changements conformationnels localisés et souvent mineurs et que différentes régions d'une protéine peuvent avoir différentes flexibilités et stabilités (31-35).

#### **1.3.1 Modèles classiques et la nouvelle vision de la modulation allostérique**

Pendant plusieurs années et encore souvent aujourd'hui les protéines allostériques sont vues comme subissant un changement dans leurs conformations et particulièrement dans le site de liaison au substrat et passent de l'état inactif à actif et vice versa tel un interrupteur qui est actionné, cet interrupteur étant l'évènement de liaison de l'allostérique sur son site allostérique. Le dogme du « Two-State » attribue la différence d'efficacité entre différents récepteurs, au système cellulaire, à la concentration de l'agoniste et au fait que certains agonistes sont plus puissants que d'autres (agonistes complets et partiels). Les deux modèles classiques décrits plus haut qui sont les MWC et KNF ont décrit l'allostérie comme étant un évènement de liaison sur un seul site qui altérerait l'activité d'une protéine via un changement conformationnel sur un second site. Le modèle MWC insistait sur le fait que la transition conformationnelle était une action concertée entre deux états distincts (R et T); le

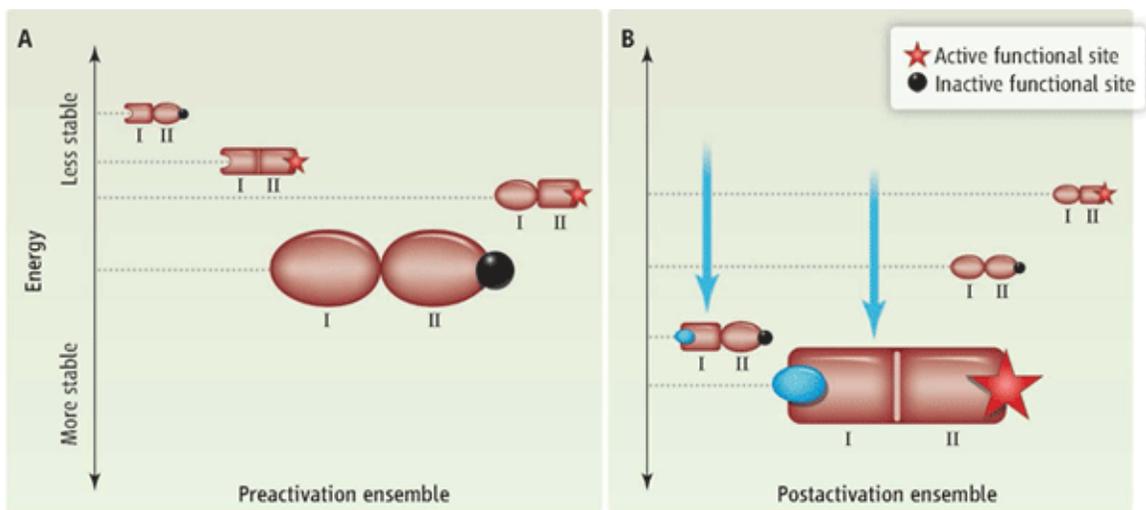
modèle KNF, lui, formulait que la transition allostérique consistait en plusieurs évènements (changements conformationnels) séquentiels au site de liaison du ligand. Ces vues classiques de la mécanique allostérique reposaient sur quatre affirmations : 1) qu'il y avait effectivement deux conformations dont la formation était gouvernée par une constante d'équilibre; 2) que le passage d'un état à l'autre impliquait nécessairement un changement de conformation; 3) que l'agoniste stabilisait nécessairement une conformation active; 4) et qu'une seule conformation active existait.

Durant les 20 dernières années plusieurs travaux (en particulier avec le récepteur  $\beta$ -adrénergique) ont démontré que les récepteurs ne sont pas des structures statiques et que plusieurs conformations actives peuvent exister simultanément (36, 37). Plusieurs études de résonance magnétique ( $^{15}\text{N}$  et résonance paramagnétique) et de fluorescence chez le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique et la rhodopsine (38, 39) ont aussi démontré la flexibilité et la multitude de conformations d'une même protéine qui peuvent exister contrairement à ce que décrivaient jusqu'à présent les résultats de cristallographie. Des méthodes comme le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) sont venues confirmer qu'une corrélation existait entre les changements conformationnels (par exemple dans les boucles) et les changements fonctionnels observés avec différents ligands pour un même récepteur (40).

Il fut constaté que :

- 1) Les récepteurs sont des structures dynamiques qui présentent plusieurs conformations en équilibre thermodynamique
- 2) L'activation des récepteurs se produit à travers un ensemble dynamique de conformations plutôt qu'à travers deux états immuables
- 3) Les ligands (naturels, agonistes et modulateurs allostériques) modulent l'activité en modifiant cet équilibre

- 4) Les ligands vont se lier préférentiellement aux formes actives ce qui va imposer un stress thermodynamique qui conduira à l'enrichissement des formes préférées du ligand au détriment des autres états.
- 5) La forme enrichie produira un certain signal qui peut différer de l'agoniste naturel ou si la forme enrichie est mutée et présente une légère différence de conformation. 1 Å de déplacement d'une boucle peut faire toute la différence.



**Figure 3. Changements d'équilibre dans les ensembles conformationnels.**

La liaison d'un ligand à un complexe (ou monomère) va énergétiquement favoriser un état conformationnel plutôt qu'un autre et déplacer l'équilibre du système vers cet état qui s'en trouvera enrichi. (41)

La nouvelle vision de l'allostérisme reconnaît que les états natifs sont en fait des ensembles de populations de conformères préexistants sous différentes conformations. Ces conformères se replient et se déplient continuellement de façon localisée ce qui résulte en un nombre important de conformations qui diffèrent légèrement (Figure 3). La liaison d'un effecteur allostérique mènera à un déplacement de l'équilibre de certains états conformationnels (41). Cette nouvelle compréhension stipule que la modulation allostérique ne comporte pas nécessairement de changements

de conformations détectables (42). De récentes études démontrent aussi que même s'il n'y a pas de changement visible de la structure tridimensionnelle du squelette de carbone au site de liaison après la liaison d'un modulateur allostérique, il pourrait y avoir tout de même un changement allostérique de l'activité de la protéine (35, 43). Par exemple, une différence de 1 Å peut donner lieu à des effets majeurs sur l'activité (44). Les protéines fluctuent dynamiquement et changent de conformations dépendant de l'énergie thermique du système. Ce concept est vérifié par des simulations informatiques et par la résonance magnétique nucléaire (45-47). Les modèles ont donc évolué de deux états actifs et inactifs à des modèles décrivant les fluctuations thermiques donnant lieu à plusieurs états. La dynamique moléculaire a été utilisée pour déterminer que les protéines signalisatrices ont une quantité particulière de désordres conformationnels ce qui en fait des candidates idéales à la modulation allostérique (31, 48). L'activité biologique contrôlée par un récepteur sera donc définie par la contribution énergétique de micro états faisant partie d'un ensemble (49). Le désavantage d'un tel modèle pour expliquer l'allostérisme est qu'un modulateur allostérique présentant une affinité pour une sous-espèce conformationnelle peu représentée dans le « système » peut avoir des implications cinétiques, car si le site de liaison du modulateur apparaît seulement lorsque cette sous-espèce apparaît, l'équilibre de liaison sera long à atteindre.

### **1.3.2 Transition allostérique dans la théorie des ensembles**

La vision traditionnelle de la « communication allostérique » sous-entend qu'une voie spécifique relie le site allostérique au site du ligand telle une voie énergétique (50). Maintenant, le concept le mieux accepté implique une dynamique de populations et les changements au site allostérique font partie de variations globales de conformations dans un ensemble (51, 52).

Les voies allostériques doivent être vues comme une énergie de contrainte créée par une perturbation au site effecteur et qui irradie autour pour rééquilibrer l'énergie à travers les interactions protéines-protéines. Topographiquement, les structures de

protéines peuvent être divisées entre différents domaines. Les résidus inter-modulaires vont jouer un rôle important dans la transmission du signal et formeront des interactions éloignées.

L'état conformationnel est aussi déterminé par l'énergie libre qui lui est associée ( $\Delta G$ ). Le déplacement d'équilibre qui favorise une espèce plutôt qu'une est purement thermodynamique. Par contre, les interactions résidu-résidu qui vont jouer un rôle dans le changement au site de liaison du ligand (ou site actif) relèvent de la dynamique si il y a effectivement un changement de conformation. Si ce changement ne survient pas, la tension créée par la rigidité (perte d'entropie) sera propagée de la même façon. En conclusion, il faut voir maintenant les modulateurs allostériques comme des « dimmers (variateurs) » plutôt que des interrupteurs (42).

## **1.4 Caractéristique et caractérisation des allostériques**

### **1.4.1 Sélectivité fonctionnelle (signalisation biaisée)**

Auparavant, l'efficacité d'un ligand à générer un effet biologique était considérée linéaire et uniforme. Donc un agoniste lié au récepteur générerait toute la gamme de signaux associés à un récepteur particulier. La signalisation de plusieurs récepteurs étant partiellement connue, on ne regardait souvent que le paramètre classique validé dans la littérature.

Durant ces dernières années, certains agonistes, des récepteurs de la dopamine et sérotonine (53, 54) ont démontré des activités à la fois agonistes et antagonistes dépendamment des effets regardés. Par exemple, un antagoniste du récepteur de la dopamine induisait l'internalisation du récepteur en absence du ligand. Le récepteur de l'angiotensine (Violin et coll. 2010) AT1AR signalait différemment selon le ligand présent : l'angiotensine ou son dérivé SII. Ce dernier ne pouvait activer la protéine Gq, mais induisait l'internalisation du récepteur et activait la protéine kinase Erk, ce qui générerait un effet cardioprotecteur intéressant pour l'industrie pharmaceutique. Ces travaux décrivaient en fait ce que Terry Kenakin appellera de la signalisation biaisée.

Certains ligands vont se lier à des conformations actives favorisées énergétiquement et induire la signalisation correspondante à ce conformère.

Un modulateur allostérique peut aussi démontrer de la sélectivité fonctionnelle et avoir un effet biologique différent selon le ligand orthostérique utilisé, mais aussi peut sélectivement bloquer certaines voies de signalisation partant d'un récepteur donné et non certaines autres (55). Cette propriété élimine des effets comme l'accoutumance aux médicaments dans le cas de traitement d'affections chroniques par exemple et pourrait éviter de bloquer certaines voies de signalisations. La sélectivité fonctionnelle permet aussi d'envisager de développer certains modulateurs contre certaines cibles qui en temps normal jouent un rôle physiologique important, mais dont l'action en condition pathologique doit être bloquée (tel l'exemple de l'AT1AR). Une inhibition compétitive et totale (antagoniste orthostérique) de la signalisation pourrait être préjudiciable tandis qu'il serait possible de concevoir un inhibiteur allostérique capable de bloquer uniquement les voies responsables des signaux cellulaires pathologiques.

Certains ligands allostériques vont produire un effet positif sur l'affinité, mais négatif sur la fonction. De plus, l'effet d'un allostérique sur un ligand pour un récepteur donné (peut être le ligand orthostérique marqué ou autre) est totalement dépendant de celui-ci, c'est-à-dire qu'un antagoniste peut augmenter l'affinité d'un ligand et pas d'un autre. Ces effets diffèrent selon les ligands orthostériques et rendent difficiles les efforts de nomenclature de ce type de médicaments. Voilà pourquoi ils sont désignés « modulateurs » plutôt qu'inhibiteurs. Les modulateurs peuvent donc moduler positivement ou négativement de façon sélective la réponse biologique et/ou la cinétique de liaison du ligand orthostérique.

#### **1.4.2 Saturation de l'effet**

Une des propriétés clé des allostériques est la saturation de leur effet pharmacologique. La liaison de l'allostérique au récepteur (ou protéine en général) est

saturable et permet donc de différencier la durée de l'effet de la puissance de l'effet. Comme les effets des modulateurs allostériques augmentent jusqu'au sommet d'une courbe asymptotique lorsqu'il y a saturation du site allostérique, il est donc possible d'allonger l'effet en administrant plus de modulateurs. D'autant plus que de plus grandes quantités d'inhibiteur allostérique n'auront pas d'effets supplémentaires autres que la prolongation de celui-ci. La saturation de l'effet découle du fait que le ligand allostérique n'occupe pas le site de liaison orthostérique et donc parvient rapidement à la saturation de ces sites de liaisons. De plus, les allostériques n'occasionnent que des changements conformationnels subtils qui atteindront un maximum (28, 29).

### 1.4.3 Site de liaison différent du site orthostérique

Une autre propriété distinctive des modulateurs allostériques est leur potentiel de sélectivité accrue dû à la localisation de leur site. Il serait difficile de la part d'un antagoniste orthostérique d'être sélectif lorsque le ligand orthostérique contre lequel il compétitionne pour la liaison au site lie en fait plusieurs sous-types du même récepteur. Par contre, un inhibiteur allostérique va avoir un site de liaison différent du ligand orthostérique qui peut être sélectif, car souvent ces sites se retrouvent dans des régions stabilisatrices de la protéine qui est souvent sélective pour une structure donnée.

**Tableau 1 Comparaison des propriétés des antagonistes orthostériques et allostériques**

<b>ANTAGONISTES ORTHOSTÉRIQUES</b>	<b>ANTAGONISTES ALLOSTÉRIQUES</b>
Les antagonistes orthostériques bloquent toutes les signalisations d'un même récepteur avec une puissance égale.	Antagonistes allostériques vont moduler différemment l'affinité de ligands agonistes pour un même récepteur.
Les effets de durée et de puissance sont reliés	Les effets de durée et de puissance maximale sont séparés, ce dernier étant saturable tandis que l'effet de

	durée peut être augmenté
De fortes concentrations d'antagonistes vont complètement inhiber le signal	Les effets antagonistes vont être modulés, mais pas totaux sur la signalisation
Pas d'effets de modulation de la signalisation. Tout est inhibé.	Effets de modulation permettant de conserver une partie de la signalisation et d'en inhiber une autre
Tous les récepteurs liés à l'antagoniste sont égaux	Le fait que certains récepteurs (conformères) lient différemment les antagonistes allostériques diminue donc certains effets de résistance dans les cas de maladie chronique

## 1.5 Caractérisation des modulateurs allostériques

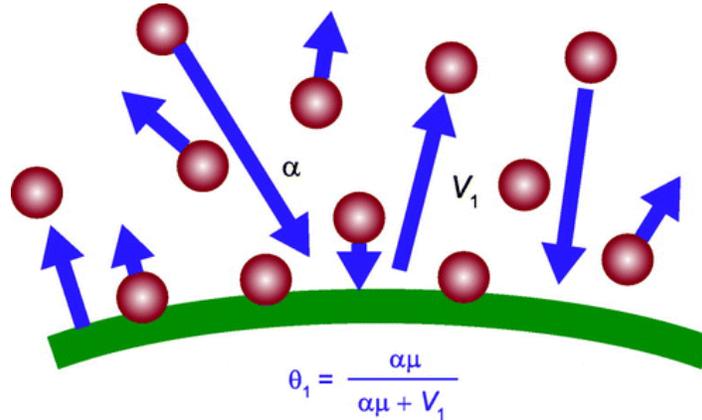
Les ligands allostériques génèrent différentes espèces moléculaires lorsqu'ils se lient aux récepteurs. Toutes ces différentes conformations peuvent avoir différents effets sur la signalisation et/ou bien sur l'affinité du ligand orthostérique. Et donc, il y a une grande variété d'effets qu'un allostérique puisse avoir sur la dose-réponse d'un agoniste.

Deux effets majeurs peuvent avoir lieu lors d'une modulation allostérique. Ces effets ne sont pas mutuellement exclusifs. Le premier est le changement d'affinité du ligand pour son récepteur. Le deuxième est un changement sur l'efficacité de l'agoniste orthostérique à générer une activité biologique.

Avant de décrire les essais de caractérisation des modulateurs allostériques, il serait important de donner une définition précise des effets pharmacologiques que l'on regarde.

L'affinité ( $EC_{50}$ ) est une mesure des forces qui permettent à une molécule de se lier à une surface (ici la portion extracellulaire d'un récepteur) et de rester liée. Cette force est inversement proportionnelle à la constante de dissociation du complexe

molécule-récepteur et est gouvernée par la thermodynamique. Ces interactions, qui font référence à la tension de surface, ont déjà été décrites par Irving Langmuir et son isotherme d'adsorption (Figure 4). Le paramètre  $EC_{50}$  est défini par la concentration du ligand qui produit 50% de l'effet biologique.



**Figure 4. Isotherme d'adsorption de Langmuir.** Langmuir a défini un taux intrinsèque de liaison d'une molécule à une surface (condensation) et un taux d'évaporation (relâche de la molécule) et a défini une relation mathématique décrivant cette dynamique (56). En pharmacologie des récepteurs, cette relation est devenue :

$$p_A = \frac{[A]}{[A] + K_A}$$

Son modèle est toujours utilisé en pharmacologie pour générer les courbes de saturation (isotherme de saturation) qui décrivent la cinétique d'occupation du récepteur par un ligand et son affinité.

L'efficacité, quant à elle, se définit comme l'habileté d'une molécule (ici modulateur allostérique ou ligand orthostérique) à causer le changement de comportement d'un récepteur par rapport à la cellule hôte (57) et concerne la réactivité du récepteur et sa capacité à générer une activité biologique.

### 1.5.1 Essais cellulaires

Les premiers essais en pharmacologie étaient effectués soit sur les tissus ou chez les animaux (essais complets). Les expériences dans les tissus isolés étaient d'ailleurs idéales pour plusieurs raisons, dont le fait que les expériences pouvaient être faites et les effets observés en temps réel; il était donc possible de mesurer, par exemple, la sensibilité d'un tissu à un agoniste et un antagoniste et d'en calculer la constante de dissociation (exemple : prenalterol, un agoniste du récepteur  $\beta$ -adrénergique et un antagoniste l'atenolol qui modulent les battements cardiaques (paramètre mesuré) (58). La cinétique en temps réel sur des tissus isolés s'est donc avérée très utile, mais comme les tissus humains étaient difficiles à obtenir, certains résultats obtenus chez les animaux ne pouvaient être répétés dans les tissus humains dûs à des différences dans les signalisations induites par les récepteurs. De plus, il était impossible de tester un large échantillon de drogues avec des tissus prélevés. La quantité d'entités chimiques à tester a créé le besoin de développer des essais biologiques rapides et permettant un criblage plus large.

Les essais de radio liaisons ont été les premiers véritables essais à grande échelle. Par contre, les essais de liaisons étaient et sont toujours limités par la quantité et la qualité de résultats qu'on peut obtenir. Il est possible d'obtenir des données sur le déplacement d'un ligand orthostérique marqué par compétition directe avec un composé. Si ce composé est allostérique, il est possible de vérifier la différence d'affinité du ligand orthostérique en présence du composé. Par contre, il sera impossible de détecter la présence d'antagonistes qui pourraient avoir un effet au niveau fonctionnel, mais pas sur la liaison du ligand et qui serait dans ce cas indétectable dans un essai de liaison.

Dans les essais fonctionnels, l'arrivée de nouvelles techniques de biologie moléculaire a permis de simplifier le criblage pharmacologique. Malgré tout, aujourd'hui il est évident que différentes cellules ou systèmes d'expression peuvent générer des résultats différents pour un même antagoniste. Certains systèmes d'expression ne comportent pas la bonne combinaison d'expression génique permettant une réponse particulière. Dans les faits, les différents environnements cellulaires peuvent varier en ce qui concerne la stoechiométrie des composés cellulaires, et de ce

fait, produire des réponses différentes en terme de sensibilité ou tout simplement de phénotype.

Trois outils sont primordiaux aux pharmacologistes : 1) les molécules bioactives, naturellement; 2) les modèles mathématiques (exemple : isotherme de Langmuir); 3) et les essais biologiques. La disponibilité de certains essais biologiques a d'ailleurs permis une reclassification de certains composés et ouvert de nouveaux usages thérapeutiques pour ceux-ci (par exemple, le propranolol, antagoniste du récepteur B-adrénergique découvert il y a 44 ans, mais dont on a découvert l'activité agoniste sur la kinase ERK (via la  $\beta$ -arrestine) il y a peu) (59). La découverte d'essais permettant de mesurer l'activité constitutive des GPCR a contribué à la création d'une nouvelle classe de composés pharmacologiques : les agonistes inverses. Donc les essais peuvent donner plus de précision sur les composés et mieux spécifier leurs usages thérapeutiques.

L'efficacité d'une drogue sera dépendante de l'essai utilisé et Galandrin et Bouvier ont nommé cet effet l'efficacité pluridimensionnelle (60). Différents effets vont révéler différentes voies de signalisation modulées différemment et celles-ci combinées vont représenter le phénotype pharmacologique d'un composé en particulier avec un effet thérapeutique qui lui est propre.

Il est de plus en plus démontré dans la littérature que les voies de signalisation classiques des récepteurs ne sont plus les seules à être activées par le ligand orthostérique. Par exemple, les GPCR de même que les récepteurs de cytokine activent aussi des voies de MAPK et SAPK telles que la phosphorylation de Erk et de p38 en plus de leurs signalisations habituelles qui passent par l'activation des protéines G et du complexe JAK/STAT. Un essai fonctionnel qui détecte une réponse élaborée (un effet général comme la prolifération cellulaire) pourra détecter des changements subtils de signalisation avec une meilleure efficacité qu'un essai qui mesure un paramètre seulement (par exemple la production d'AMP cyclique pour un GPCR couplé à la protéine Gs). Un des défauts de l'essai de radio liaison concerne d'ailleurs cet aspect. De là l'avantage d'avoir un système cellulaire complet possédant une machinerie de signalisation élaborée plutôt qu'un système biaisé qui ne détecte qu'un seul signal. La

liaison d'une molécule à un récepteur affectera l'ensemble conformationnels de ce récepteur et déterminera la signalisation subséquente ((61). Un essai complexe pourra déterminer l'activité de la molécule dans sa totalité.

### **1.5.2 Méthodes de détection des propriétés allostériques**

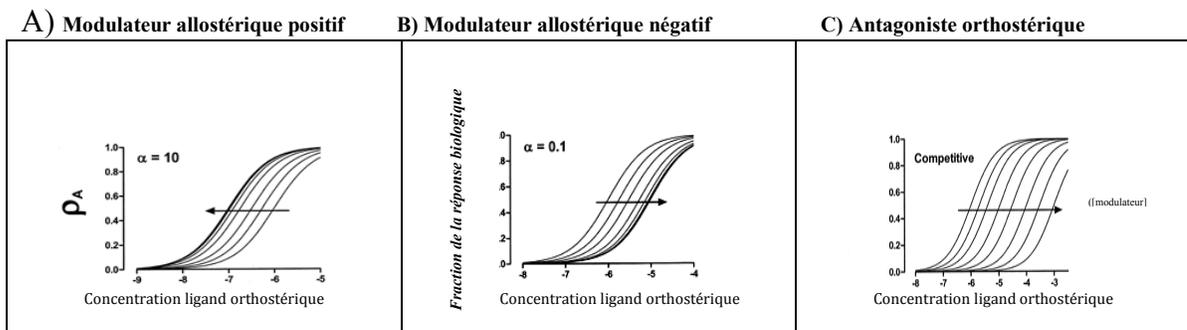
Comme décrit plus haut deux types d'essais sont couramment utilisés pour caractériser l'effet d'un modulateur sur l'affinité et l'efficacité : les essais de liaison et les essais fonctionnels.

#### **Essais de radio liaison :**

Les essais de radioligand utilisent soit le modulateur allostérique marqué ou le ligand orthostérique marqué. Dans un environnement compétitif, un ligand orthostérique sera déplacé (perte du signal) par son analogue non marqué qui compétitionnera pour le même site de liaison. Un ligand allostérique ne pourra pas déplacer (ou très peu) le ligand orthostérique même lorsque l'on augmente sa concentration puisqu'il n'occupe pas le même site sur le récepteur ce qui illustre la propriété de non-compétitivité de ces modulateurs. De plus, lorsqu'il y a compétitivité, l'ajout d'une concentration de plus en plus élevée d'un analogue non marqué (antagoniste orthostérique) diminuera l'affinité à l'infini puisque la simple loi d'action de masse s'applique. Un modulateur négatif allostérique aura un effet saturable sur la diminution d'affinité du ligand orthostérique et une courbe dose réponse de déplacement du ligand orthostérique marqué, par son homologue non marqué subira un déplacement vers la droite saturable en présence du modulateur allostérique (Figure 5).

### Essais fonctionnels :

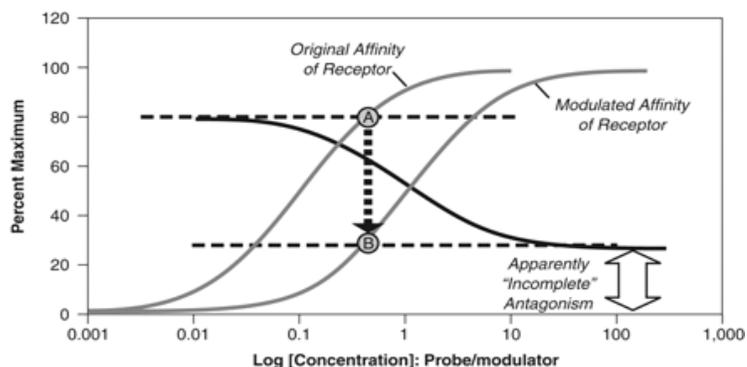
Plusieurs propriétés des modulateurs allostériques peuvent être détectées à l'aide d'essais qui mesurent l'activité biologique des récepteurs ciblés. De même qu'avec les essais de liaison, la saturabilité du modulateur allostérique sera mesurée en effectuant différentes courbes doses réponses de l'effet biologique en fonction de la concentration du ligand orthostérique et en présence de différentes concentrations (une concentration par courbe) de modulateur allostérique. Ces courbes seront déplacées vers la droite jusqu'à saturation (diminution d'activité) lorsque la modulation est négative. Un antagoniste orthostérique diminuera l'affinité à l'infini. Par contre, la réponse maximale ( $E_{MAX}$ ) peut ou non diminuer selon le mécanisme allostérique. (Figure 4)



**Figure 5. Représentations graphiques de l'effet de concentrations croissantes d'un modulateur** sur la courbe dose réponse de la réponse biologique en fonction de la concentration d'agoniste orthostérique (adapté de Christopoulos 2002 (13)).

### La modulation allostérique « surmontable »

Si la présence de l'allostérique n'influence pas ou très peu l'affinité du récepteur et que les courbes doses-réponses sont déplacées parallèlement vers la droite (jusqu'à la saturation de l'effet) et qu'il n'y a pas de différence d'efficacité maximale  $E_{MAX}$ , on est en présence d'un allostérique surmontable. Dans ce cas, le modulateur allostérique ne pourra surmonter la réponse biologique due à des concentrations croissantes de l'agoniste orthostérique et son seul effet sera sur l'affinité (Figure 6).



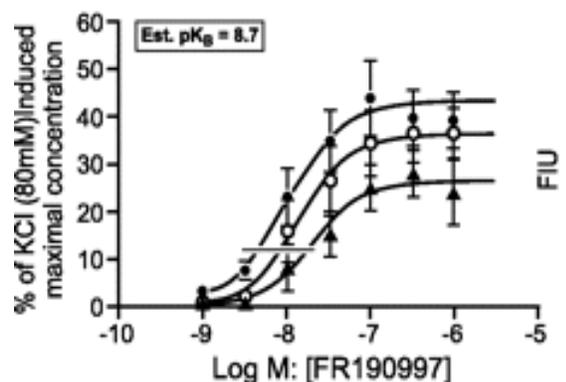
**Figure 6. Antagonisme surmontable par un modulateur allostérique.** L'antagoniste allostérique produit une diminution d'activité, mais pas d'efficacité maximale (62).

### L'antagonisme allostérique insurmontable

Lorsqu'un antagoniste allostérique bloque la réponse maximale d'un ligand orthostérique et que cette inhibition n'est pas influencée par des concentrations croissantes du ligand naturel on est en présence d'un modulateur allostérique insurmontable. Il peut ou non y avoir un effet sur l'affinité.

Une façon très efficace de déterminer l'affinité des allostériques insurmontables est de déterminer le  $pA_2$  (logarithme de la concentration molaire qui produit un déplacement de deux logarithmes de la courbe dose-réponse). Le  $pA_2$  est relié au  $pK_B$  avec la relation suivante :  $pK_B = pA_2 - \text{Log} (1 + 2\alpha [A]/K_A)$ . Cette mesure est aussi influencée grandement par la quantité de récepteurs présents.

La meilleure façon de quantifier et démontrer la non-compétitivité et la caractéristique d'insurmontabilité de l'antagoniste est de dériver un graphique de Schild ( $\text{Log} (\text{DR}(\text{EC}_{50} \text{ de la dose-réponse}) - 1) = \text{Log} \left[ \frac{[B] (1 - \alpha)}{\alpha[B] + K_B} \right]$ ). Plus la constante  $\alpha$  est petite moins la compétitivité est présente. Ce graphique peut être dérivé de courbes dose-réponses de fonction ou de liaison (Figure 7).



**Figure 7. Illustration de l'antagonisme allostérique insurmontable.** Blocage de la réponse de la bradykinine (récepteur B<sub>2</sub>) par l'antagoniste allostérique FR190997 (63). Les cercles pleins représentent la réponse du ligand orthostérique seul, les triangles vides représentent l'antagoniste à 1 nM et les triangles pleins représentent l'antagoniste à 3 nM. Il faut noter le déplacement de la courbe de 10 fois vers la droite et la diminution de 50 % de l'activité maximale de la bradykinine.

#### Nouvelles avenues d'essais cellulaires :

L'efficacité d'un ligand à générer une activité biologique à travers un récepteur devrait toujours être déterminée à faible dose d'agoniste (contexte physiologique) pour s'approcher le plus possible du contexte *in vivo*. De plus, ces essais devraient toujours être effectués avec le ligand naturel et non un ligand optimisé pour sa stabilité (62).

Tels que mentionnés auparavant, les essais fonctionnels ont évolué des tests sur tissus à des expérimentations sur systèmes cellulaires plus complexes malgré que des essais mesurant un seul paramètre sont souvent utilisés, car plus reproductibles et plus rapides, faciles à exécuter et économiques. Les approches récentes qui permettent un criblage à large spectre tel que les approches protéomiques, métaboliques et épigénomiques sont maintenant utilisées et permettent véritablement d'investiguer la sélectivité fonctionnelle des modulateurs allostériques.

Les nouvelles technologies comprennent aussi le transfert d'énergie par résonance et bioluminescence (BRET;(64)), des essais de complémentation enzymatiques (65) ou des gènes rapporteurs activés par des protéines (66). Des bio senseurs sont aussi maintenant utilisés tels que les essais de redistribution de masse dynamique (dynamic mass redistribution) dans des cellules entières (67). Lorsque la cellule reçoit un stimulus, le contenu cellulaire se redistribue et ce changement peut

être quantifié. Cette redistribution de contenu peut aussi être mesurée par des changements d'impédance électrique. Cette approche détecte en temps réel la réponse cellulaire à l'activation d'un récepteur. Cette méthode possède l'avantage de pouvoir obtenir des paramètres précis de cinétique d'activation (68).

Il est donc devenu clair que les essais fonctionnels présentent tout de même le meilleur portrait de l'effet pharmacologique d'un produit donné. De nouvelles techniques telles que les techniques microphysiométriques ouvrent de nouvelles avenues pour mesurer la réponse d'une cellule intacte à la modulation par un agoniste ou antagoniste.

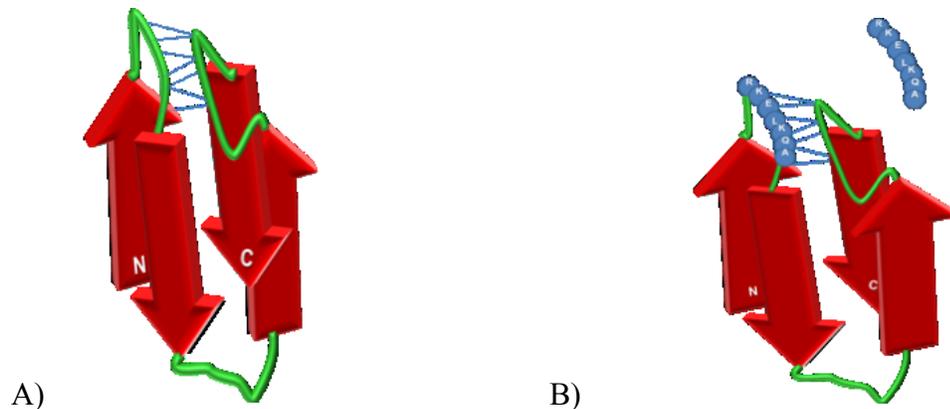
De plus en plus de programmes de recherche et développement dans les entreprises pharmaceutiques incluent maintenant le développement de modulateurs allostériques. Leurs propriétés pharmacologiques en font des outils thérapeutiques sélectifs, efficaces et beaucoup moins toxiques que les agonistes ou inhibiteurs orthostériques.

## 2. Module X

### 2.1 Description de Module X

L'approche Module X a été créée dans le but de concevoir de petits peptides modulateurs ayant des propriétés allostériques. Module X reproduit de petites parties des portions extracellulaires flexibles et des boucles des récepteurs. Ces petits peptides vont interagir en s'interposant entre deux sous-unités ou entre deux régions de la même sous-unité qui interagissent par des liens hydrogènes, des ponts salins ou des liens disulfure.

Ces régions sont spécialement choisies à l'extérieur du domaine de liaison du ligand orthostérique et sont situées dans les régions inter domaines, la portion juxtamembranaire ou dans les boucles (Figure 8).



**Figure 8. Choix des peptides** A) les régions sont choisies dans les parties flexibles de la portion extracellulaire de la protéine. B) Un petit peptide d'environ 8 à 10 acides aminés est dérivé de la structure primaire.

### 2.2 Hypothèse à la base de la conception de Module X

Comme il a été décrit plus haut, les récepteurs existent dans un ensemble dynamique où il y a équilibre entre plusieurs états actifs et inactifs dépendant de l'environnement moléculaire de la protéine. Il y a habituellement un état favorisé thermodynamiquement (par exemple lorsque le ligand se lie l'état permettant la signalisation est favorisé).

Étant donné que les boucles sont exposées durant les changements de conformation, notre hypothèse serait qu'une séquence peptidique reproduisant certaines régions de ces boucles pourrait s'insérer à un endroit approprié dans la structure où se lier à son partenaire de signalisation dans le complexe protéique ce qui aurait comme effet de déplacer l'équilibre de l'ensemble vers un état particulier et modulerait la signalisation. De cette façon, certaines voies de signalisation pourraient être partiellement inhibées tandis que d'autres voies ne seraient pas touchées puisque le ligand orthostérique pourrait toujours se lier au récepteur.

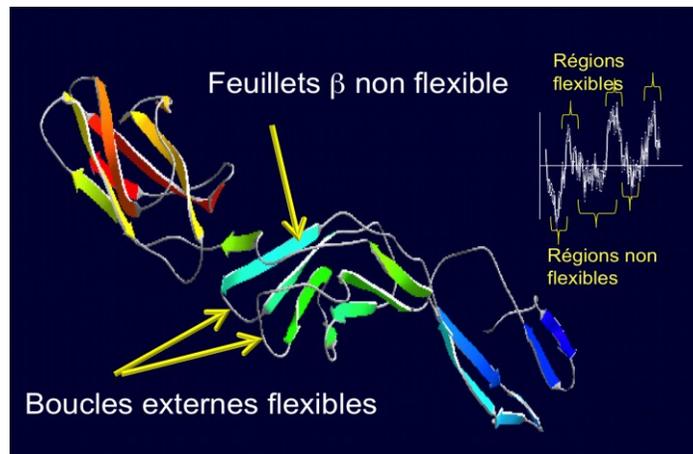
### **2.3 Méthodologie de Module X**

La première étape du processus de conception des peptides par la technologie Module X a été de vérifier si des données structurales (cristallographie et RMN) sont disponibles pour le récepteur cible choisi. Dans le cas où la structure tridimensionnelle n'a pas été résolue, il a été nécessaire de trouver une structure référence possédant la meilleure résolution qui permettra la modélisation par homologie.

Pour modéliser la structure, nous avons utilisé plusieurs algorithmes et méthodes de calcul tel que MOE (Molecular Operating Environment) et FUGUE (69). Étant donné que plusieurs structures références pourraient être nécessaires pour générer un modèle il était important que le paramètre « Z » qui représente la précision du modèle soit élevé.

La structure a ensuite été visualisée à l'aide de logiciels comme PyMol et MOE.

Les structures flexibles telles les boucles et les régions inter domaines ont ensuite été identifiées. De façon à valider la structure générée, nous avons exécuté différentes analyses de flexibilité et d'hydrophobicité à l'aide de Protscale, Predict Protein, Prosite, ProDom et PHDhtm (70-76). Ces analyses ont permis de confirmer les limites des différents domaines et la localisation des boucles dans la structure et de supporter le choix des séquences de nos peptides (Figures 8-9).



**Figure 9. Exemple de structures flexibles choisies pour la conception des peptides avec Module X.**

Une analyse BLAST (73) était ensuite effectuée pour s'assurer de la spécificité de nos séquences.

#### **2.4. Peptides utilisés pour moduler l'activité biologique :**

L'utilisation de peptides dérivés de séquences de protéines a auparavant été utilisée avec succès pour moduler l'activité biologique des protéines. Le tableau 2 présente plusieurs de ces études. Certains de ces peptides ont démontré des propriétés allostériques (77, 78). Module X utilise une combinaison de toutes ces approches en ciblant de plus, les interactions intramoléculaires. Une autre différence majeure est que Module X n'utilise que de petits bouts de séquences et non une région protéique complète.

**Tableau 2 Peptides développés à partir de séquences primaires de protéines**

<b>Peptides inhibant les interactions protéines-protéines</b>		
<b>Description</b>	<b>Activité biologique</b>	<b>Référence</b>
Ac-VZV-R2	C-terminal de la sous unité 2 réductase : Inhibe l'entrée du virus	Gaudreau P et coll. 1992(79)
Peptide dérivé de HLA classe 1	Inhibe fonction des cellules T en se liant à HSP70	Nossner E et al 1996(80)
Peptide dérivé de Fc epsilon R1	Inhibe l'interaction du récepteur avec IgE	McDonnell JM et al 1996(81)
Peptides dérivés de LFA-1 et ICAM-1	Inhibe l'interaction entre les deux protéines	Tibbetts, SA et al 2000(82)
Petits peptides dérivés du peptide b-amyloïde	Inhibe l'agrégation du peptide	Chalifour RJ et al 2003(83)
<b>Peptides dérivés des régions juxtamembranaires de récepteurs</b>		
Peptides dérivés du récepteur PGF2a	Inhibe l'activité biologique	Péri KG et al 2002(77)
Peptides dérivés du récepteur CCR5 (N-terminal)	Inhibe l'entrée du HIV	Khurana S et al 2005(78)
<b>Peptides dérivés de régions transmembranaires de récepteurs</b>		
Peptide dérivé du récepteur de la dopamine D2 – domaine transmembranaire 7 (GPCR)	Inhibe l'activité biologique	George SR et al 2003(84)
Peptide dérivé du récepteur B-adrénergique – domaine transmembranaire 6 (GPCR)	Inhibe la dimérisation et l'activation du récepteur	Hébert TE 1996(85)
Peptide dérivé du récepteur de cellules T (récepteur à un seul domaine transmembranaire)	Inhibe l'activation des cellules T	Huynh NT et al 2003(86)
Peptides dérivés de Erb 2-récepteur tyrosine kinase (RTK)	Inhibe l'activité RTK	Bennasroune A et al 2004(87)
Peptides dérivés du récepteur de l'insuline — tyrosine kinase (RTK)	Inhibe l'activité RTK	Bennasroune A et al 2005(88)
Peptides dérivés du récepteur FGFR3 — tyrosine kinase (RTK)	Inhibe l'activité RTK	Lijiran HE 2010(89)

Deux types de récepteurs structurellement différents ont été choisis comme prototypes pour la preuve de concept de Module X. Les récepteurs de cytokines (petites protéines régulatrices du système immunitaire) possèdent tous au moins deux sous-unités dont une est responsable de la liaison du ligand orthostérique (habituellement nommée sous-unité  $\alpha$ ) et l'autre est responsable de la signalisation

(sauf exception, par exemple le récepteur du facteur de nécrose tumoral qui est un homotrimère). Certains récepteurs partagent la même sous-unité signalisatrice, mais chaque cytokine lie sélectivement une sous-unité  $\alpha$  qui lui est propre. Ces sous-unités ne possèdent qu'un seul domaine transmembranaire.

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) quant à eux, sont formés d'une seule chaîne d'acides aminés dont le repliement et l'insertion dans la membrane plasmique permettent la formation de sept domaines transmembranaires. Contrairement aux récepteurs de cytokine, une seule protéine lie le ligand et la protéine G correspondante (complexe intracellulaire) qui médiera la fonction.

## **Partie B : Preuve de concept de Module X**

### **1. Récepteur de l'interleukine 1 : Exemple d'un récepteur de cytokine**

Le récepteur de l'interleukine 1 a été choisi comme prototype de l'efficacité de Module X pour plusieurs raisons : 1) le rôle pro-inflammatoire majeur de IL-1 $\beta$ , régulateur important de l'immunité innée, dans plusieurs pathologies; 2) Aucun inhibiteur peptidique et/ou allostérique de récepteur de cytokine n'a été développé jusqu'à ce jour contrairement aux récepteurs couplés aux protéines G; 3) Le récepteur de IL-1 représente bien le type de récepteur de cytokine dépendant d'une protéine accessoire spécifique pour sa signalisation.

#### **1.1 Famille des ligands : Description générale**

Onze membres composent la famille des cytokines de IL-1 (voir tableau 3). Les plus étudiées *in vitro* et *in vivo* sont IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , l'antagoniste naturel (IL-1Ra) du récepteur IL-1RI et analogue de IL-1 $\beta$  et IL-18. Chez l'humain, l'inhibition de l'activité de IL-1 présente déjà un potentiel clinique très important et plusieurs approches thérapeutiques inhibant son activité sont maintenant utilisées en clinique. Tous ces ligands ont un rôle à jouer dans le processus immunitaire et inflammatoire, mais chaque membre provient d'un gène séparé et possède soit des fonctions pro ou anti-inflammatoires (90).

Ce qui différencie la famille IL-1 des autres familles de récepteurs de cytokine est le fait que ces protéines exercent un contrôle tant au niveau extracellulaire qu'au niveau des membranes plasmiques et nucléaires.

Le tableau 3 énumère les ligands présentement membres de la famille IL-1. Pour faciliter la compréhension, l'ancienne nomenclature sera utilisée pour IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18 et IL-33.

Les gènes des membres de la famille IL-1 sont tous situés sur le chromosome 2 à l'exception de IL-18 et IL-33. Certains membres sont en fait des duplicatas de gènes

(en terme d'organisation d'introns et d'exons) et IL-1F5 et IL-1F10 sont en fait des duplicatas de IL-1Ra (91). IL-1F9 est aussi relié à IL-1Ra, mais ne fonctionne pas comme un antagoniste du récepteur, mais plutôt un agoniste. IL-33 (IL-1F11) est structurellement relié à IL-18. Par contre, la composition de la famille IL-1 n'est pas déterminée par les similitudes structurales, mais plutôt par l'habilité des cytokines à transmettre le signal agoniste ou antagoniste. IL-1F5 et 7 semblent fonctionner comme des anti-inflammatoires généraux, mais leur mécanisme est encore nébuleux. La diversité des cytokines de la famille IL-1 est plutôt représentée par les récepteurs qui peuvent transmettre des signaux pro et anti-inflammatoires.

IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont les membres de la famille IL-1 les plus impliqués dans le processus inflammatoire, mais IL-1 $\beta$  agit localement et au niveau systémique et est de loin la cytokine de la famille la plus impliquée dans le processus inflammatoire. Toutes deux possèdent par contre les mêmes fonctions biologiques et se lient sur le même récepteur, mais sont les produits de différents gènes. La plus étudiée, IL-1 $\beta$ , (clonée en 1984 par Auron et al. (92) ) induit le recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire en augmentant l'expression de molécules d'adhésion telle que ICAM et la relâche de chimiokines par les cellules stromales. Cette cytokine augmente aussi la production d'enzymes telles que la phospholipase A2, la cyclooxygénase 2 et la synthèse d'oxyde nitrique, ce qui conduira à la synthèse de prostaglandines (PGE2) et d'oxyde nitrique. IL-1 $\beta$  Induis aussi l'expression de métalloprotéinases, mais inhibe la production de protéoglycans et de collagène de type II; ces effets contribuent grandement à la destruction du cartilage articulaire observé dans les arthrites inflammatoires. Au niveau systémique, les effets de IL-1 $\beta$  incluent l'hypotension, la fièvre et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$  particulièrement en phase aigüe. IL-1 $\beta$  est un puissant activateur de NF $\kappa$ B. IL-1 $\beta$  est produit sous forme de précurseur de 31 kDa et clivé pour donner une protéine mature et active de 17 kDa (voir section sur l'inflammasome) tandis que IL-1 $\alpha$  est active surtout au niveau intracellulaire sous forme non clivée.

Voici une brève description des ligands composant la famille IL-1 :

### 1.1.1 IL-1 $\alpha$ (IL-1F1)

IL-1 $\alpha$  est une cytokine clonée en 1984 par March *et al.* (93) et agissant comme facteur de croissance autocrine majoritairement intracellulaire. La calpaïne (cystéine protéase activée par le calcium) peut cliver IL-1 $\alpha$  en une protéine mature, mais cette cytokine, produite par les monocytes, n'est que peu décelée dans la circulation sauf lorsqu'il y a mort des cellules qui la contiennent (94). Une propriété importante de IL-1 $\alpha$  est qu'elle peut être active sans clivage d'aucune sorte (donc sous sa forme précurseur). La plupart des cellules incluant les cellules cancéreuses contiennent des niveaux constitutifs de IL-1 $\alpha$  (95-98). IL-1 $\alpha$  régule la différenciation particulièrement dans les cellules épithéliales et ectodermes. Il a été démontré qu'un antisense oligonucléotide ciblant IL-1 $\alpha$  réduisait la sénescence dans les cellules endothéliales (99). Dans les fibroblastes, IL-1 $\alpha$  constitutif se lie à un substrat de tyrosine kinase, HAX-1, et ce complexe transloque au noyau (100). Lorsque HAX-1 est supprimé, IL-1 $\alpha$  ne se lie plus à l'ADN et ceci résulte en une diminution de la production de IL-6 et du procollagène (100). Par contre, les souris déficientes en IL-1 $\alpha$  ne démontrent aucune déficience de croissance ou de développement (peau, système gastro-intestinal, épithélium)(101).

Le précurseur IL-1 $\alpha$  est exprimé constitutivement dans les cellules épithéliales de même que la forme intracellulaire de IL-1Ra, icIL-1Ra. Cette forme de IL-1Ra se lie aussi au récepteur IL-1R et empêche la transduction de signal et compétitionne pour le précurseur IL-1 $\alpha$  pour les sites de liaison nucléaires (102).

**Tableau 3 Ligands de la famille IL-1**

Nouvelle nomenclature	Ancienne nomenclature	Propriété	Activité au noyau
IL-1F1	IL-1 $\alpha$	Agoniste	OUI
IL-1F2	IL-1 $\beta$	Agoniste	NON
IL-1F3	IL-1Ra	Antagoniste du récepteur IL-1RI	NON
IL-1F4	IL-18 : IFN $\gamma$ inducing factor	Agoniste	NON
IL-1F5	FIL-1 $\delta$	Anti-inflammatoire	NON
IL-1F6	FIL-1 $\epsilon$	Agoniste	NON
IL-1F7	FIL-1H4, IL — 1 $\zeta$	Anti-inflammatoire	OUI
IL-1F8	IL-1H2	Agoniste	NON
IL-1F9	IL-1 $\epsilon$	Agoniste	NON
IL-1F10	IL-1Hy2	Antagoniste	NON
IL-1F11	IL-33	Agoniste	OUI

**IL-1 $\alpha$  membranaire :**

Le précurseur de IL-1 $\alpha$  peut être retrouvé à la surface de plusieurs cellules (sur les monocytes et les lymphocytes B) et est appelé IL-1 $\alpha$  membranaire (103, 104). Son activité peut être neutralisée par des anticorps anti IL-1 $\alpha$  mais non anti IL-1 $\beta$ . IL-1 $\alpha$  membranaire joue un rôle important dans l'inflammation et les souris déficientes en IL-1 $\alpha$  démontrent une inflammation réduite dans des modèles où la mort cellulaire et la relâche de IL-1 $\alpha$  ne participent pas au processus (105, 106). Le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé.

Contrairement à IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , sous sa forme précurseure, est biologiquement active et trouvée dans les cellules épithéliales normales, incluant l'épithélium du

thymus et le contenu de cellules nécrosées. De plus, les cellules épithéliales ne contiennent pas de caspase-1 responsable de la maturation de IL-1 $\beta$  et donc, cette dernière comme IL-18 ne se retrouve pas dans ce type cellulaire.

### **Souris déficientes en IL-1 $\alpha$ :**

Les souris déficientes en IL-1 $\alpha$  naissent et se développent normalement. Après une injection de térébenthine qui induit une inflammation locale, les souris normales et celles déficientes en IL-1 $\alpha$  ont développé une fièvre et ont produit des cytokines pro-inflammatoires tandis que des souris déficientes en IL-1 $\beta$  sont restées saines (101). L'expression du mRNA de IL-1 $\beta$  dans le cerveau diminuait de 1.5 fois dans les souris IL-1 $\alpha$  déficientes tandis que l'expression du mRNA de IL-1 $\alpha$  diminuait de plus de 30 fois dans les souris déficientes en IL-1 $\beta$ . Ces données suggèrent que IL-1 $\beta$  exerce un contrôle plus important sur la production de IL-1 $\alpha$  que le contraire. D'ailleurs, ces résultats ont été confirmés par les souris déficientes en caspase-1(107).

Des études ont aussi démontré l'implication de IL-1 $\alpha$  membranaire dans l'athérosclérose. D'ailleurs, son implication était plus importante que IL-1 $\beta$  dans cette maladie (106).

### **1.1.2 IL-1 $\beta$ (IL-1F2) :**

#### **Expression et régulation de IL-1 $\beta$ :**

Les régions régulatrices et promotrices de IL-1 $\beta$ , à la différence d'autres cytokines, sont distribuées le long d'une région de plusieurs milliers de paires de bases en amont du site de départ de la transcription. Le site promoteur de IL-1 $\beta$  contient un site de réponse à l'AMP cyclique ainsi que plusieurs sites de liaison du NF $\kappa$ B et de AP-1 (activating protein-1) (108). Les sources primaires de IL-1 $\beta$  sont les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Les lymphocytes B et les cellules NK

produisent aussi IL-1 $\beta$ . Par contre, les fibroblastes et les cellules épithéliales généralement ne produisent pas d'IL-1 $\beta$ .

Plusieurs lignées cancéreuses expriment la cytokine, particulièrement les mélanomes et les myélomes (leucémie myéloïde juvénile et aigüe) qui démontrent tous une expression constitutive de IL-1 $\beta$  (109).

Pratiquement tous les produits microbiens induisent IL-1 $\beta$  via les ligands des TLR (Toll-like receptors) et IL-1 $\beta$  s'induit lui-même *in vivo* et *in vitro* dans les monocytes (110). À la suite d'une stimulation au LPS, les niveaux d'ARN messager de IL-1 $\beta$  augmentent rapidement, mais déclinent après 4 heures (dû à l'instabilité de l'ARNm). Par contre, si on utilise IL-1 $\beta$  lui-même comme stimulant alors on obtient des ARNm qui demeurent dans l'environnement pour au moins 24 heures (111-114) (voir figures 10 et 11).

#### **Dissociation entre la transcription et la traduction :**

La production d'ARNm de IL-1 $\beta$  dans les monocytes peut être induite par des ligands ne se liant pas aux récepteurs Toll-like (TLR) tel que le dérivé du complément C5a, l'hypoxie, des molécules adhérant à la surface des cellules ou bien par la coagulation sans qu'il y ait de traduction significative de IL-1 $\beta$ . Les ARNm de IL-1 $\beta$  s'assemblent dans de larges polyribosomes sans élongation significative du peptide (115) et la grande majorité de l'ARNm est dégradé. Dans les transcrits de IL-1 $\beta$ , IL-18 et IL-1F7, un élément d'instabilité dans la région cédante explique l'échec de la traduction de l'ARNm en protéine (116). L'ajout de ligands pour les récepteurs TLR aux monocytes en culture permet d'augmenter la stabilité des ARNm de IL-1 $\beta$ .

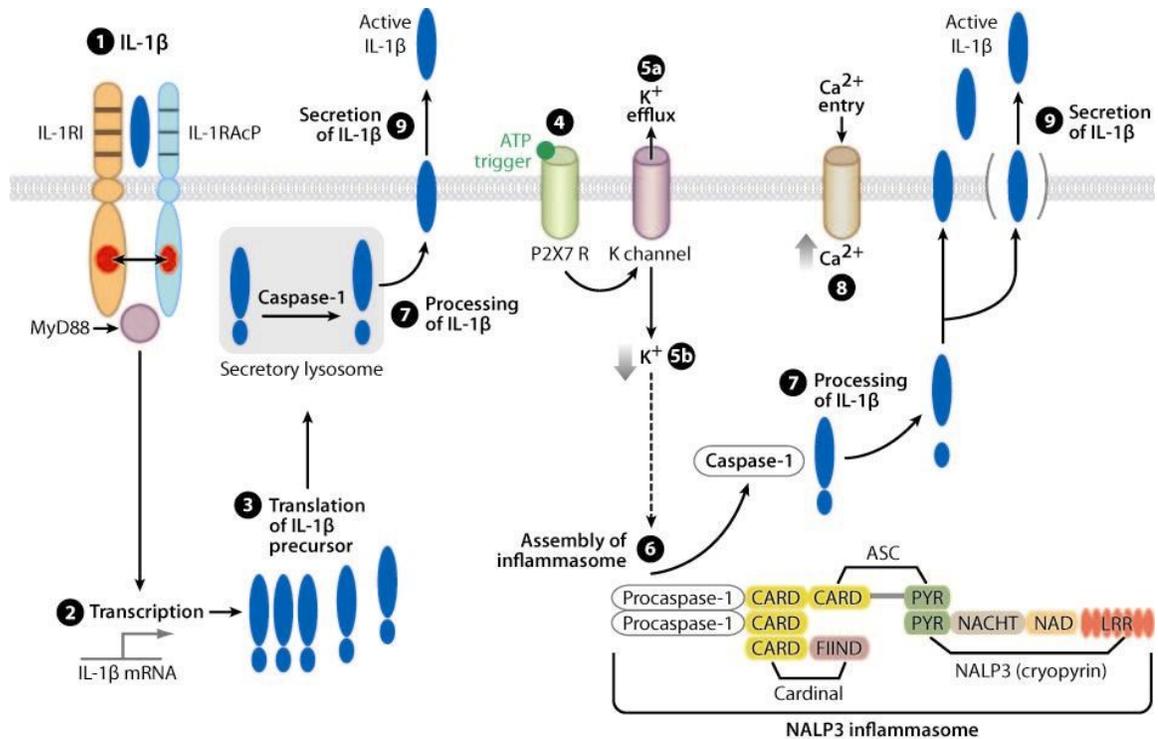
#### **Maturation et sécrétion de IL-1 $\beta$ via l'inflammasome et la caspase-1 :**

Peu importe le stimulus, lorsque les monocytes sont en présence d'un inhibiteur de caspase-1, la quantité de IL-1 $\beta$  diminue et la forme non mature s'accumule dans le cytosol. L'étape limite de la maturation de IL-1 $\beta$  est véritablement l'inflammasome.

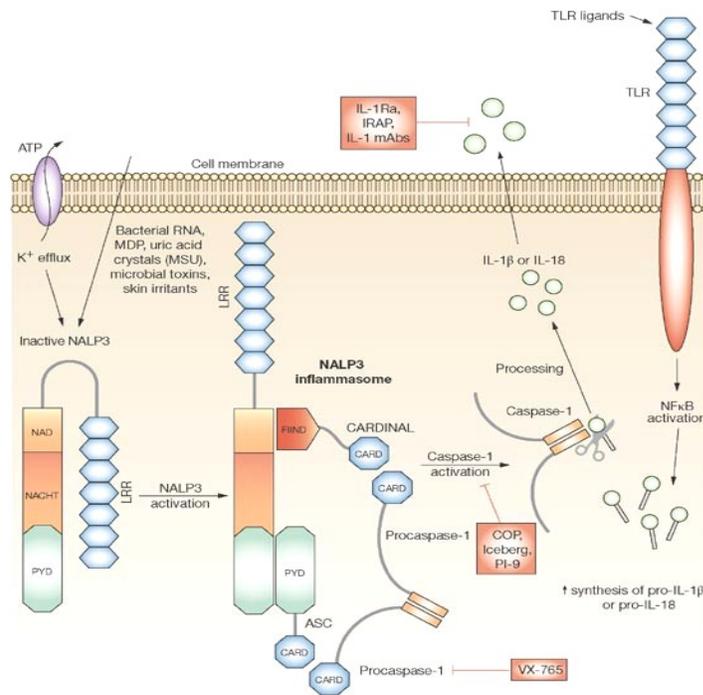
Dans les années 1970, plusieurs études ont été faites sur des maladies inflammatoires rares où des patients développaient de la fièvre, de la fatigue chronique et de la douleur articulaire ce qui fut à l'époque appelée « urticaire familial dû au froid » parce que ces symptômes apparaissaient après une exposition au froid. Le nom fut plus tard changé pour « familial cold autoinflammatory syndrome » (FCAS). Des analyses génétiques ont plus tard révélé que ces patients possédaient une mutation dans un gène qui a été appelé CIAS1 et qui codait pour une protéine qui fut nommée cryopyrine (117). Subséquemment, le nom fut changé pour « nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor protein 3 » qui est devenu NLRP3 (NALP3) membre de la famille des récepteurs NOD importante dans la régulation des fonctions immunitaires innées (118). Plus tard, la formation du complexe protéique responsable de l'activation de la caspase-1 a été élucidée et ce complexe participe à la maturation de IL-1 $\beta$ , IL-18 et IL-33. Il est à noter que ce complexe ne joue aucun rôle dans l'activité de TNF $\alpha$ . La découverte de l'inflammasome et de son rôle dans la maturation de IL-1 $\beta$  a permis de mieux comprendre le mécanisme de maladies appelées auto-inflammatoires pour lesquelles on a démontré l'implication majeure de IL-1 telles que: la goutte, le syndrome Muckle-Wells et le diabète de Type 2 (119-121).

Tel que présenté dans les figures 9 et 10, plusieurs protéines forment un complexe avec NALP3. Le clivage de IL-1 $\beta$  par la caspase-1, prend place dans les lysosomes sécrétoires ou dans le cytoplasme. Plusieurs voies peuvent être activées pour la sécrétion de IL-1 $\beta$  à l'extérieur de la cellule. Ces voies incluent : 1) exocytose du lysosome sécrétoire; 2) libération de microvésicules de la membrane plasmique; 3) transporteurs ou des multi vésicules contenant des exosomes (122, 123).

La libération spontanée de IL-1 $\beta$  dans les monocytes est due à la stimulation par IL-1 $\beta$  endogène, car chez les patients atteints de certaines maladies auto inflammatoires, il y a une diminution d'ARNm de pro-caspase-1 lorsque traités avec IL-1Ra, ce qui suggère que l'IL-1 $\beta$  stimule sa propre production et maturation (Voir figure 10).



**Figure 10. Maturation et sécrétion de IL-1β et inflammasome induites par IL-1β** □ □ 1) Les monocytes ou les macrophages sont activés par IL-1β et le complexe récepteur IL-1R/AcP recrute un complexe protéique incluant la protéine MyD88 (voir figure 11 pour la signalisation attachée au récepteur de IL-1); 2) la transcription se fait ensuite avec l'activation de NFκB et la traduction 3) se fait dans le cytoplasme. Ces étapes permettent la relâche d'ATP (4) qui transloque à la membrane et 5) active le P2X7 et libère du potassium intracellulaire; 6) Cette accumulation dans le cytosol de potassium permet de déclencher l'assemblage de l'inflammasome NALP3 (cryopyrin)/Cardinal/pro-caspase-1; 7) la caspase -1 est activée et clive IL-1 dans le cytosol ou dans un lysosome sécrétoire; 8) la maturation de IL-1 permet l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol (122, 124) ce qui permet la sécrétion de IL-1 dans l'espace intercellulaire (9), car le calcium va activer la phosphatidylcholine phospholipase C et la phospholipase A2 qui vont participer au processus de sécrétion par l'exocytose du contenu du lysosome (tiré de Dinarello C 2009(90)).



**Figure 11 Maturation de IL-1 avec stimulation de TLR** La maturation de IL-1 $\beta$  par les récepteurs Toll-like comporte deux événements majeurs : 1) La liaison d'agents pathogènes aux TLR donne lieu à l'activation de NF $\kappa$ B et à l'induction de l'expression de pro-IL-1 $\beta$ ; 2) La stimulation cellulaire induite par des agonistes tels que l'ATP, les cristaux d'acide urique, l'ARNm bactérien ou des agents irritants va permettre l'assemblage de l'inflammasome et l'activation de la caspase-1 ce qui résulte en la formation de IL-1 $\beta$  mature. Abbreviations: ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; CARD, caspase-recruitment domain; COP, CARD-only protein; IL, interleukin; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IRAP, IL-1 receptor accessory protein; mAb, monoclonal antibody; MDP, muramyl dipeptide; MSU, monosodium urate; NALP, NACHT domain, LRR domain, and pyrin domain-containing protein; NF $\kappa$ B, nuclear factor kappaB; PI9, proteinase inhibitor 9; PYD, pyrin domain; TLR, Toll-like receptor. (Tiré de Church LD, 2008(125)).

### Maturation de IL-1 $\beta$ non dépendante de la caspase-1:

La caspase-1 peut cliver plusieurs substrats de la famille IL-1. Par contre, pour toutes ces cytokines, il existe une voie non dépendante de la caspase-1. Par exemple, l'inflammation générée en conditions stériles va occasionner une forte fièvre, des niveaux de IL-6 élevés et une production augmentée de protéines pro-inflammatoires. Ces réponses seront absentes chez les souris déficientes en IL-1 $\beta$  mais présentes dans

les souris déficientes en caspase-1 (126). Cette forme d'inflammation est associée à une forte infiltration de neutrophiles qui produisent et sécrètent beaucoup de IL-1 $\beta$ . Il a été rapporté que chez les neutrophiles en particulier, IL-1 $\beta$  est clivée par la protéinase-3 (127). D'autres protéases peuvent aussi cliver IL-1 $\beta$  telles que l'élastase, la métalloprotéinase 9 et le granzyme A.

### **Souris déficientes en IL-1 $\beta$ :**

Même après plus de 10 ans de production et d'accouplement de souris déficientes en IL-1 $\beta$ , celles-ci ne présentent aucune maladie particulière. Par contre, lorsque stimulées par un agent pro-inflammatoire, ces souris vont présenter des différences dans l'intensité des signes cliniques d'inflammation par rapport aux souris contrôles. Les différences les plus marquantes se sont produites lorsque les souris ont été injectées en sous-cutané avec la térébenthine. À l'intérieur des premières 24 heures, les souris déficientes en IL-1 $\beta$  ne manifestaient aucun signe d'inflammation aiguë, ne développaient pas d'anorexie et n'avaient aucun IL-6 circulant ainsi qu'aucune fièvre (126, 128) et ces effets s'accordaient avec ceux démontrés lorsque l'anticorps anti-IL-1R type I était utilisé avec les souris normales (128). Par contre, les souris déficientes en IL-1 $\beta$  ont la même réponse au LPS que les souris normales (129).

### **1.1.3 IL-18 (IL-1F4) :**

IL-18 a été identifié premièrement comme un facteur inducteur de la production de IFN $\gamma$  dans les souris subissant un stress causé par une endotoxine (130, 131) et il a été depuis prouvé que IL-18 ne peut fonctionner seul à induire l'interféron et qu'il doit y avoir costimulation de IL-12 et IL-15. Les souris injectées avec IL-18 et IL-12 développent et meurent d'hypoglycémie, d'inflammation intestinale et d'inanition (132). D'ailleurs, le rôle inflammatoire de IL-18 a été identifié dans le lupus, l'arthrite rhumatoïde, le diabète de type I, la maladie de Crohn et le psoriasis.

IL-18 est d'abord synthétisé sous forme de précurseur de 24 kDa et est clivé par la caspase-1 pour donner une cytokine mature et active de 18 kDa. Il y a quelques

exceptions à la dépendance de IL-18 pour la caspase-1 (133). Contrairement à IL-1 $\beta$ , il existe déjà une quantité appréciable de IL-18 mature dans la cellule et la stimulation inflammatoire aura peu d'impact sur la maturation.

Comme IL-1, la production de IL-18 est fortement induite par l'activation des TLR. IL-18 est exprimé dans les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer, les kératinocytes, les chondrocytes, les fibroblastes synoviaux et les ostéoblastes. Les réponses inflammatoires à IL-18 sont les mêmes que IL-1 : activation des MAPK et induction de cytokines (particulièrement IFN $\gamma$ ). Son activité biologique est, par contre, dépendante de costimulations de la part de IL-12 et IL-15.

IL-18 possède aussi son système d'inhibition de son activité biologique. La protéine de liaison de IL-18 (IL-18 BP) a été découverte lors de recherches sur le récepteur soluble dans l'urine humaine (134). IL-18BP est une protéine sécrétée de façon constitutive avec une affinité exceptionnelle pour IL-18 (400 pM). Il existe par contre une homologie limitée entre IL-18BP et le récepteur IL-18. IL-18BP est présente dans le sérum humain à une concentration vingt fois supérieure à IL-18 (135).

Le rôle anti-inflammatoire de IL-18BP est particulièrement important dans les infections virales où IL-18BP virale jouerait aussi un rôle dans l'inhibition des effets inflammatoires de IL-18.

#### **1.1.4 IL-1F5**

IL-1F5 partage environ 47 % d'homologie avec la cytokine antagoniste IL-1Ra (antagoniste naturel de IL-1) et est exprimée dans des monocytes activés par le LPS. La séquence (prédite à partir du gène) ne contient pas de peptide signal dédié à la sécrétion ce qui est en contraste avec IL-1Ra. IL-1F5 n'a pas démontré d'activité agoniste dans un essai de production de IL-6 par des fibroblastes contrairement à IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$  (136) et n'a pas non plus bloqué la production de IFN $\gamma$  induite par IL-1 ou IL-18. IL-1F5 ne possède donc pas l'activité antagoniste du récepteur de IL-1 de IL-1Ra dont il est proche structurellement. IL-1F5 induit IL-4 qui peut réduire l'activité de IL-1 et réduit aussi les effets du LPS. Chez les souris déficientes en IL-4, IL-1F5 est

d'ailleurs moins efficace à générer la production de IL-1 $\beta$  induite par des injections intra cérébroventriculaires (136). Son habileté à diminuer les effets inflammatoires viendrait de son interaction avec une protéine membranaire nommée SIGIRR, aussi connue sous le nom de 'Toll IL-1 receptor 8' (TIR8). SIGIRR est un récepteur orphelin de la famille des récepteurs de IL-1 (136).

#### **1.1.5 IL-1F6 :**

IL-1F6 est une cytokine pro-inflammatoire qui se lie à la protéine (récepteur) IL-1Rrp2 et le complexe formé recrute par la suite IL-1RAcP pour former un hétéro dimère. De hauts niveaux de IL-1F6 ont été trouvés dans les tissus embryonnaires de souris riches en cellules épithéliales (137). Chez l'humain, IL-1F6 a été détectée dans les kératinocytes mais pas dans les fibroblastes et contribuerait à la pathogénicité du psoriasis. Une fois liée à son récepteur, IL-1F6 active la translocation de NF $\kappa$ B de façon similaire à IL-1. De la même façon, IL-1F6 active aussi p38, ERK et JNK.

#### **1.1.6 IL-1F7 :**

IL-1F7 est le membre le plus proche structurellement de IL-18. Il existe 5 isoformes d'épissage (138). À l'exception de IL-1Ra, tous les membres de la famille IL-1 sont d'abord synthétisés comme précurseurs sans peptide signal. Dans le cas de IL-1F7, s'il a été prouvé in vitro que la caspase-1 est responsable de sa maturation, in vivo, il n'a pas été démontré que le peptide C-terminal résultant est sécrété (139). IL-1F7 a été trouvé immunoprécipitant avec IL-18R et lors d'études de liaison, IL-18R liait IL-1F7 (139). Par contre, IL-1F7 n'induit pas la production d'interféron et n'a pas véritablement d'activité agoniste d'autant plus qu'une protéine accessoire n'a toujours pas été décrite pour le récepteur de cette cytokine. IL-1F7 se lie à IL-18BP et lorsque celle-ci est en faible concentration IL-1F7 prévient la liaison de IL-18 à IL-18BP peut-être en formant un complexe avec la chaîne IL-18RAcP et, de ce fait, prévient la liaison de IL-18Ra (140). Une surexpression de IL-1F7 inhibe l'action de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et la production de cytokines par l'activation des récepteurs Toll-like. IL-1F7 (surtout

l'isoforme b) serait un inhibiteur indirect naturel de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, TNF et IL-6.

Un rôle de facteur transcriptionnel a aussi été démontré pour IL-1F7. Comme pour IL-1 et IL-18, le précurseur est clivé par la caspase-1 et transloque au noyau suivant une stimulation par le LPS (141). *In vivo*, IL-1F7 injecté réduit le volume de tumeurs (142).

#### **1.1.7 IL-1F8 :**

Le récepteur de IL-1F8 est le IL-1Rrp2 et est exprimé sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes humains. En réponse à la stimulation par IL-1F8 il y a production accrue de médiateurs pro-inflammatoires (143). IL-1F8 est inductible par IL-1 $\beta$  dans les fibroblastes synoviaux. Mais comme les niveaux de IL-1F8 circulant dans des patients arthritiques et en santé ne varient pas, son rôle n'est pas clair dans l'inflammation.

#### **1.1.8 IL-1F9 :**

IL-1F9 est surtout exprimée de façon constitutive dans le placenta et l'épithélium de l'œsophage. Même si sa structure tridimensionnelle ressemble fortement à IL-1Ra, IL-1F9 est une cytokine pro-inflammatoire se liant à IL-1Rrp2 et le complexe recrute IL-1RAcP. IL-1F9 induit l'activation de NF $\kappa$ B et la phosphorylation des MAPK kinases (144).

#### **1.1.9 IL-1F10 :**

IL-1F10 aussi partage 37 % d'identité de structure avec IL-1Ra (145). Cette cytokine est sécrétée par les cellules et est exprimée dans les tissus de la peau, rate, et les amygdales. IL-1F10 se lierait à IL-1R, mais il n'y a pas d'évidence qu'elle contribue à former un complexe avec le récepteur lui conférant une activité agoniste.

### 1.1.10 IL-33 (IL-1F11) :

Malgré le fait que cette cytokine a le nom le plus récent dans la famille IL-1, dans les faits elle a été découverte, il y a environ 16 ans comme ligand du récepteur orphelin T1/ST2. ST2 est maintenant nommé le récepteur de IL-33 (IL-33R $\alpha$ ). IL-33 active les cellules T<sub>H</sub>2 qui produisent alors des cytokines telles que IL-4 et IL-5 (146). En 1994, le récepteur ST2 avait été identifié comme étant régulé par le facteur de transcription Fos (147). Et parce que le ST2 partage les caractéristiques structurales de IL-1R et IL-18R, alors IL-33 a été catégorisée dans la famille IL-1. IL-33 forme un hétéro dimère avec IL-1RAcP pour la signalisation (148, 149). Le fait que IL-33 subit le même traitement que les autres cytokines par la caspase-1 légitimiste ça place parmi les cytokines de la famille IL-1.

IL-33 joue aussi un rôle de facteur nucléaire exprimé surtout dans les cellules endothéliales des veines (150). Auparavant, ce facteur était nommé NF-HEV. Dans les faits, IL-33 joue un rôle similaire à IL-1 $\alpha$  (151, 152) et fait maintenant partie du nombre sans cesse grandissant des cytokines qui signalent via un récepteur classique et qui régulent la transcription. Ces cytokines sont présentement: IL-1 $\alpha$ , IL-16 et IL-33.

La fonction prédominante de IL-33 est d'induire la production de IL-4, IL-5 et IL-13 dans les cellules T<sub>H</sub>2 et agit donc dans la réaction allergique. IL-33 va aussi induire IL-1, IL-6 et PGE<sub>2</sub> dans les mastocytes. Lorsque IL-33 est injecté dans les souris, celles-ci présentent des caractéristiques pathologiques dans les parois artérielles, les poumons et les tissus intestinaux. IL-33 induit aussi l'infiltration des éosinophiles dans les poumons. L'utilisation de ST2 soluble avait remarquablement réduit aussi l'inflammation dans les articulations, l'hyperplasie synoviale et l'érosion des articulations chez les modèles murins d'arthrites induites par le collagène (153).

IL-33 jouerait un rôle protecteur dans l'athérosclérose. Chez les souris traitées avec IL-33, les plaques déposées sur les parois artérielles diminuaient

considérablement avec l'injection d'IL-33 et l'injection de ST2 soluble au contraire augmentait la taille des plaques (154).

### **1.1.11 IL-1Ra (IL-1F3)**

IL-1Ra est un analogue antagoniste de IL-1. IL-1Ra se lie au même site de liaison que IL-1, mais avec une telle affinité que le complexe ne peut pas lier IL-1RAcP (155). IL-1Ra n'a aucune spécificité d'espèces puisque qu'il existe une grande homologie de séquences entre celles-ci et donc un large éventail de résultats sont disponibles dans les modèles animaux de maladies inflammatoires (156).

### **Implication de IL-1Ra dans les pathologies inflammatoires :**

IL-1Ra commercialisé sous le nom d'Anakinra a été particulièrement efficace pour traiter les maladies auto inflammatoires. Dans la majorité des cas, les réponses au traitement étaient rapides et avaient une durée appréciable, mais l'inflammation revenait lorsque le traitement cessait ((111, 157, 158). IL-1 est hautement toxique pour les cellules pancréatiques $\beta$  qui produisent l'insuline (159) et de hautes concentrations en glucose vont induire la production de IL-1 $\beta$  par ces cellules. Il en résultera une insuffisance à produire de l'insuline et une mort cellulaire. Un traitement avec IL-1Ra dans des patients diabétiques de type 2 résulta en une diminution des niveaux d'hémoglobine glycosylée, de protéine C réactive et de IL-6. Ces effets protecteurs de l'inhibition de l'activité de IL-1 $\beta$  ont été reproduits lors d'un traitement avec un anticorps monoclonal contre la cytokine ((160, 161).

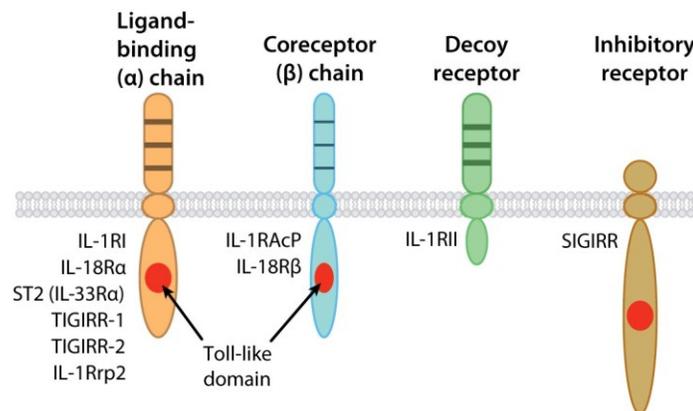
### **Souris déficientes en IL-1Ra :**

Les souris déficientes en IL-1Ra ont des portées moins nombreuses et présentent des retards de croissance à l'âge adulte (162). Ces animaux présentaient aussi des concentrations basales de IL-6 et de protéines inflammatoires plus importantes que les souris normales.

## 1.2 Récepteurs de la famille IL-1

### 1.2.1 Généralités :

Les récepteurs de la famille IL-1 comprennent 10 gènes dont certains sont toujours des récepteurs orphelins. La majorité des sous-unités comprennent trois domaines IgG-like (Figure 12). Le tableau 4 résume les différents membres de la famille (163). IL-1R1, R2 et R3 sont les récepteurs pour IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ . IL-1R4, aussi nommé ST2 n'est plus un récepteur orphelin depuis qu'il a été prouvé que IL-33 s'y liait (146). IL-1R5 était à l'origine un récepteur orphelin appelé IL-1R relatai protein-1 (164) mais IL-18 a ensuite été identifié comme étant son ligand et le récepteur est maintenant appelé IL-18R $\alpha$ . IL-1R7 est maintenant la protéine accessoire de IL-18R et est essentielle pour la transduction de signal (165) (Figure 12).



**Figure 12. Récepteurs membres de la famille IL-1**

**Tableau 4 Récepteurs de la famille IL-1**

Nom	Nomenclature	Ligands	Corécepteur
IL-1R	IL-1R1	IL-1 $\alpha$ , $\beta$ , IL-1Ra	IL-1RAcP (IL-1R3)
IL-1RII	IL-1R3	IL-1 $\beta$ , and precursor	IL-1RAcP (IL-1R3)
ST2/Fit-1	IL-1R4 (IL-1R33 $\alpha$ )	IL-33	IL-1RAcP (IL-1R3)
IL-18R $\alpha$	IL-1R5	IL-18, IL-1F7	IL-18R $\beta$ (IL-1R7)
IL-1Rrp2	IL-1R6	IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9	IL-1RAcP (IL-1R3)
TIGIRR-2/IL1APL	IL-1R8	inconnu	inconnu
TIGIRR-1	IL-1R9	inconnu	inconnu
SIGIRR	TIR8	inconnu	inconnu

Deux membres de la famille sont particulièrement uniques, car ils se retrouvent sur le chromosome X. Ce sont IL-1R8 et 9 qui sont homologues à la protéine accessoire de IL-1R et IL-18R. IL-1R9 présente aussi une grande homologie de séquence vis-à-vis IL-1R8 et ces deux récepteurs sont nommés 'Ig-IL-1-related receptors' (TIGIRR). Ils n'ont pas de ligand connu et sont surtout retrouvés dans le cerveau du fœtus. Des mutations et des délétions dans ces gènes ont été retrouvées chez des patients présentant des déficiences cognitives (166) et l'expression de ces récepteurs chez l'adulte pourrait jouer un rôle important dans la mémoire et l'apprentissage.

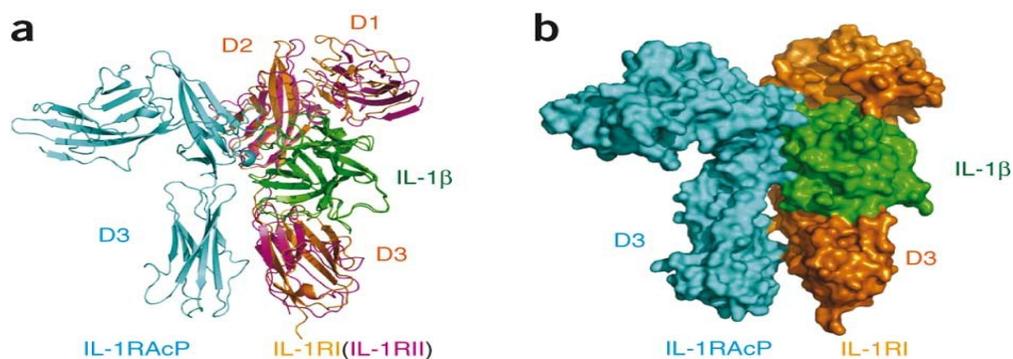
### 1.2.2 IL-1 R :

IL-1R a été cloné pour la première fois à partir des cellules T humaines par Sims JE *et coll.* (1989)(167). Les études de cristallographie ont démontré que IL-1R lie IL-1 $\beta$  ce qui induit un changement de conformation et permet la liaison avec la protéine accessoire (IL-1RAcP). Le domaine cytoplasmique de IL-1R contient une région ayant une grande homologie avec le domaine Toll de la drosophile (domaine TIR). Ce domaine est aussi retrouvé dans la portion cytoplasmique d'une grande famille de récepteurs (dont les récepteurs de la famille IL-1 font partie, y compris IL-1RAcP) : les Toll-like receptors ou TLR. La juxtaposition des domaines TIR de IL-1R

et de la protéine accessoire après la liaison à IL-1 $\beta$  est suffisante pour induire la signalisation. La stimulation de IL-1RI induit l'activation de NF $\kappa$ B et la phosphorylation de kinases telles que p38, Erk et JNK et l'expression de cytokines inflammatoires telles que IL-6 et IL-8 (Figure 14). Pratiquement toutes les cellules expriment IL-1R1 de façon constitutive.

### 1.2.3 Études *in silico* et cristallographiques

La structure du récepteur IL-1R1 lié à IL-1 $\beta$  a été résolue en 1997 par Vigiers Guy P.A. *et coll.*(155). IL-1R1 présente une structure composée de trois domaines « Immunoglobulin-like » qui interagissent tous avec IL-1 $\beta$ . Jusqu'à très récemment, la structure de la protéine accessoire n'avait pas été résolue, mais Wang D. *et coll.* en 2010 (168) ont cristallisé le complexe IL-1RII-IL-1 $\beta$  et IL-1RAcP. Auparavant, Casadio *et al.* (169) avaient proposé deux modèles *in silico* : 1) IL-1RAcP établissait le contact avec l'arrière de IL-1R; 2) IL-1RAcP établissait un contact à droite de la structure de IL-1R1. Dans les deux cas, IL-1RAcP adoptait la même structure concave que IL-1R. Basé sur les données cristallographiques récemment obtenues, les auteurs Wang *et al* proposent plutôt un modèle où la protéine accessoire se lie via les domaines D2 et D3 (et légèrement D1) à gauche du récepteur IL-1R. Il a été confirmé que la protéine accessoire ne lie pas le ligand IL-1 $\beta$  (Figure 13) (155, 169).



**Figure 13. Structure du complexe IL-1R-IL-1 $\beta$ -IL-1RAcP.** La protéine accessoire n'interagit pas avec IL-1, mais le ligand est important pour le bon positionnement de IL-1R1 et l'affinité accrue du complexe pour AcP. Les domaines D2 et D3 des deux sous unités du récepteur interagissent (tiré de Wang D. *et al.* (170)).

#### 1.2.4 Souris déficientes en IL-1RI et IL-1RIAcP

La région la plus proche du promoteur en 5' du IL-1RI ne comporte pas de région TATA ou CAAT et présente des similarités assez étonnantes avec les régions promotrices des gènes de maintenance plutôt que des similarités avec des gènes régulateurs (171, 172). Des médiateurs tels que les phorbols esters, PGE<sub>2</sub>, le dexaméthasone, le EGF (epidermal growth factor), IL-2 and IL-4 augmentent l'expression de IL-1R à la surface.

Les souris déficientes en IL-1RI se développent normalement et ne présentent aucun phénotype particulier. Malgré cela les souris présentent tout de même une réponse inflammatoire atténuée en réponse à des abcès stériles. Les souris déficientes en IL-1RI ont une réponse augmentée à des infections bactériennes telles que *Listeria monocytogenes*. Les lymphocytes des souris déficientes provenant de souris avec infections cutanées produisent plus de IL-4 et IL-10, mais moins de IFN $\alpha$  que les souris normales. IL-1 $\alpha$  se lie tout de même aux cellules déficientes en IL-1RIAcP qui ne peuvent lier que 30 % de IL-1 $\beta$  (173) mais aucune réponse biologique n'est induite.

### 1.3 Régulation de l'activité de IL-1 : Inhibiteurs endogènes de l'activité de IL-1

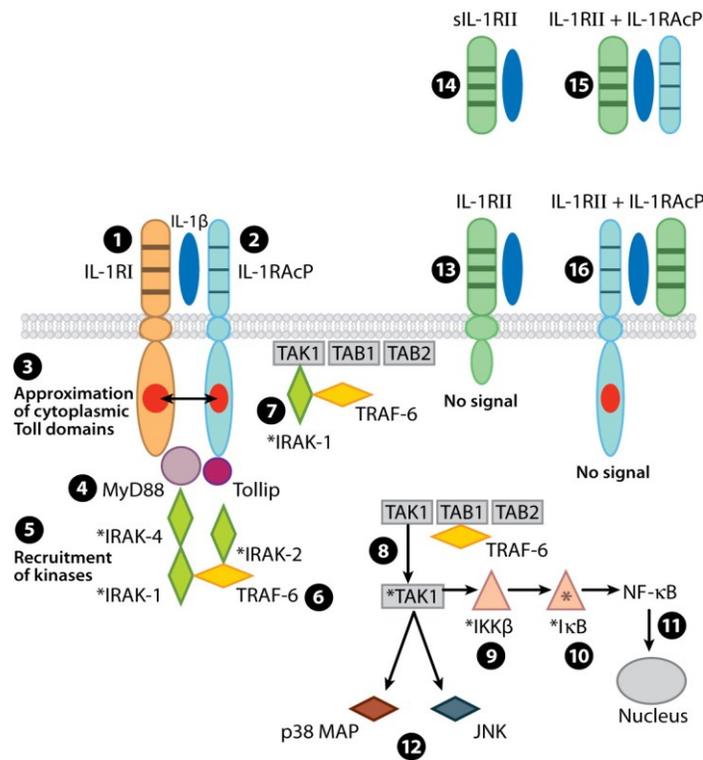
#### 1.3.1 IL-1Ra :

IL-1Ra a été la première cytokine endogène inhibitrice spécifique à avoir été décrite (174). IL-1Ra agit en compétitionnant avec IL-1 pour le site de liaison orthostérique sur IL-1RI. Malgré tout, un excès de IL-1Ra (100 à 1000 fois plus que IL-1) est nécessaire pour bloquer l'activité de IL-1 *in vitro* et *in vivo* (175). Ceci s'explique par la grande quantité de récepteurs IL-1RI présente sur les cellules et la petite quantité nécessaire de IL-1 pour générer un effet biologique. Quatre isoformes de IL-1Ra existent. Une seule est sécrétée : les trois autres isoformes sont emprisonnées dans la membrane (icIL-Ra1, 2 et 3) et sont relâchées lors de lyse cellulaire pour ensuite lier IL-1RI (176).

### 1.3.2 IL-1R Type II

Le type II ne possède qu'un petit domaine cytoplasmique qui ne peut initier de transduction de signal par manque de domaine TIR. C'est pourquoi IL-1RII trappe IL-1 $\beta$  mais ne transmet pas de signal. Au niveau intracellulaire IL-1RII va lier IL-1 $\alpha$  (précurseur) (100). Chez les humains, il existe une forme soluble de RII produite par une protéase ou par épissage alternatif; cette dernière protéine a une grande affinité pour IL-1 $\beta$  et de ce fait, fonctionne aussi comme un antagoniste naturel de IL-1. La liaison de IL-1 $\beta$  au récepteur soluble est pratiquement irréversible.

Le complexe le plus fonctionnel qui peut se former pour inhiber IL-1 est le complexe IL-1 $\beta$ /IL-1RII (membranaire ou soluble)/IL-1RAcP (177) et ce mécanisme prive la cellule de IL-1 $\beta$  et de la protéine accessoire en plus de réduire l'activation des lymphocytes B (178).



### Figure 14. Signalisation de IL-1 et des inhibiteurs naturels

IL-1 $\beta$  se lie à IL-1RI [1] et l'ensemble recrute IL-1RAcP [2]. Il y a rapprochement entre les domaines Toll-like des deux récepteurs et le complexe recrute MyD88 [3-4]. La liaison de MyD88 induit la phosphorylation des kinases associées à IL-1R: IRAK-4, 2 et 1 [5], et TRAF6 est recruté [6]. La kinase IRAK-1 phosphorylée et TRAF6 migrent à la membrane où ils vont s'associer avec TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase)/TAB1/TAB2 (TAB=TAK binding protein) [7]. Le complexe TAK1/TAB1/TAB2/TRAF6 migre dans le cytosol où TAK1 est phosphorylée suite à l'ubiquitination de TRAF6 [8]. TAK1 phosphorylé active IKK $\beta$  [9] qui va phosphoryler I $\kappa$ B [10]. Celui-ci va se dégrader et relâcher NF $\kappa$ B qui pourra entrer dans le noyau [11]. TAK1 va aussi activer les MAPK telles que p38 et JNK [12]. À la surface cellulaire, le récepteur IL-1RII peut lier IL-1 et neutraliser son activité [13]. RII soluble peut aussi lier IL-1 [14] et sIL-1RII peut aussi lier IL-1 et forme un complexe avec IL-1RAcP soluble [15] ou bien avec IL-1RAcP membranaire [16] (tiré de Dinarello, C 2009 (90)).

#### 1.3.3 sIL-1RI :

L'administration de sIL-1RI (IL-1RI soluble) est utilisée dans les modèles d'inflammation et de maladies auto-immunes et une réduction de la sévérité des signes

cliniques a été reportée. Malgré cela, chez l'humain, sIL-1RI agit comme un transporteur de IL-1 $\alpha$ , et, chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, les signes cliniques sont amplifiés (179).

### **1.3.4 sIL-1RAcP :**

IL-1RAcP soluble est produite par épissage alternatif ou bien la protéase est produite par le foie et circule de façon systémique (180). Il forme un complexe inactif avec IL-1RI lié à IL-1. De plus, sIL-1RAcP augmente l'affinité de liaison de IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  à IL-1RII (181). sIL-1AcP inhibe l'activation induite par NF $\kappa$ B dans les lymphocytes B, mais non dans les lymphocytes T, alors que IL-1Ra inhibe IL-1 dans les deux types de cellules (182). La figure 14 résume les différents mécanismes d'inhibition naturelle de l'activité de IL-1.

## **1.4 Pathologies impliquant IL-1 $\beta$ :**

### **1.4.1 IL-1 $\beta$ et la réponse inflammatoire :**

IL-1 $\beta$  stimule la réponse immunitaire locale et systémique et est essentiel au contrôle et à la résolution de l'inflammation en promouvant le recrutement de cellules inflammatoires au site inflammatoire (par l'induction de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales), et par l'induction de la production de chimiokines par les cellules stromales. Au niveau systémique, IL-1 $\beta$  induit aussi la production de plusieurs enzymes telles que la phospholipase A2, la cyclooxygénase 2 (COX2), et la synthèse d'oxyde nitrique (iNOS). Ces médiateurs sont responsables de la réponse hémodynamique et de l'hyperthermie impliquée dans l'inflammation. Conséquemment, IL-1 $\beta$  provoque la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires importants tels que, la prostaglandine PGE2 et l'oxyde nitrique et contribue à l'augmentation d'espèces oxydatives dans le milieu (183, 184).

Contrairement aux autres membres de la famille des cytokines qui affectent directement les fonctions lymphocytaires, leur différenciation et leur prolifération, les

membres de la famille IL-1 n'affectent pas fondamentalement, mais indirectement les fonctions des lymphocytes. IL-1 est important dans la différenciation des T<sub>H</sub> naïves en TH17 en collaboration avec IL-23 (185). Plusieurs études démontrent aussi que IL-1 et IL-17 agissent en synergie pour produire PGE2 et l'oxyde nitrique (NO) et induire des dommages au cartilage. IL-17 va aussi induire la production de IL-1 $\beta$  dans les monocytes humains (186).

Une autre propriété inflammatoire de IL-1 $\beta$  est son habileté à augmenter l'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 sur les cellules mésenchymales et VCAM-1 sur les cellules endothéliales. De plus, IL-1 $\beta$  induit la formation de chimiokines. Toutes ces propriétés permettent l'infiltration de cellules inflammatoires et immunocompétentes de la circulation dans l'espace extravasculaire et ensuite aux tissus où le remodelage est le résultat final de l'inflammation chronique induite par IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  est aussi un pro-métastatique et joue un rôle dans la formation des vaisseaux sanguins. Chez les souris déficientes en IL-1 $\beta$  le facteur de croissance VEGF ne peut pas stimuler la vascularisation tumorale et les cellules cancéreuses ne peuvent se multiplier. IL-1 $\beta$  agit aussi sur la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse. La production de IL-6 est particulièrement sensible à la stimulation à IL-1 $\beta$  et bloquer IL-1 $\beta$  dans des pathologies inflammatoires systémiques réduit les niveaux de IL-6 (187).

#### **1.4.2 IL-1 $\beta$ costimulateur des cellules T :**

IL-1 $\beta$  est un costimulateur de cellules T conjointement avec un agent mitogène ou un antigène. IL-1 $\beta$  peut agir comme facteur de croissance pour les thymocytes et l'épithélium du thymus produit des niveaux constitutifs de IL-1 $\alpha$  ce qui contribue à la prolifération des thymocytes. Par contre, les souris déficientes en IL-1 ou en IL-1RI ont un développement normal du thymus ce qui permet de supposer que IL-1 ne joue pas un rôle essentiel.

### **1.4.3 IL-1 $\beta$ et la réponse immunitaire TH2 :**

Dans certains modèles IL-1 contribue à la polarisation des TH2. Dans les modèles murins d'asthme utilisant la sensibilisation des voies respiratoires par des antigènes, plusieurs agents bronchoconstricteurs sont induits ainsi que l'infiltration d'éosinophiles dans les poumons et l'augmentation de la production de IL-4. Par contre, chez les souris déficientes en IL-1R1 ou bien traitées avec des anticorps neutralisants anti- IL-1 $\beta$ , la réponse aux antigènes est remarquablement réduite (188).

### **1.4.4 IL-1 et Th17 :**

Les souris déficientes en IL-1R1 ne produisent pas de IL-17 après induction avec un antigène. De plus, la combinaison de IL-23 et IL-1 agit en synergie dans l'induction de IL-17. Même l'implication de TNF $\alpha$  dans l'induction par IL-23 de IL-17 est IL-1 dépendante. La nécessité d'avoir IL-1 dans la génération de TH17 est consistante avec les résultats dans les souris déficientes en IL-1Ra. Ces souris qui développent spontanément une inflammation des articulations présentent des niveaux élevés de IL-17 (189). Les souris déficientes en IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  ne développent pas d'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) IL-17 dépendante (186)..

## **1.5 Exemple de pathologies impliquant IL-1 $\beta$ :**

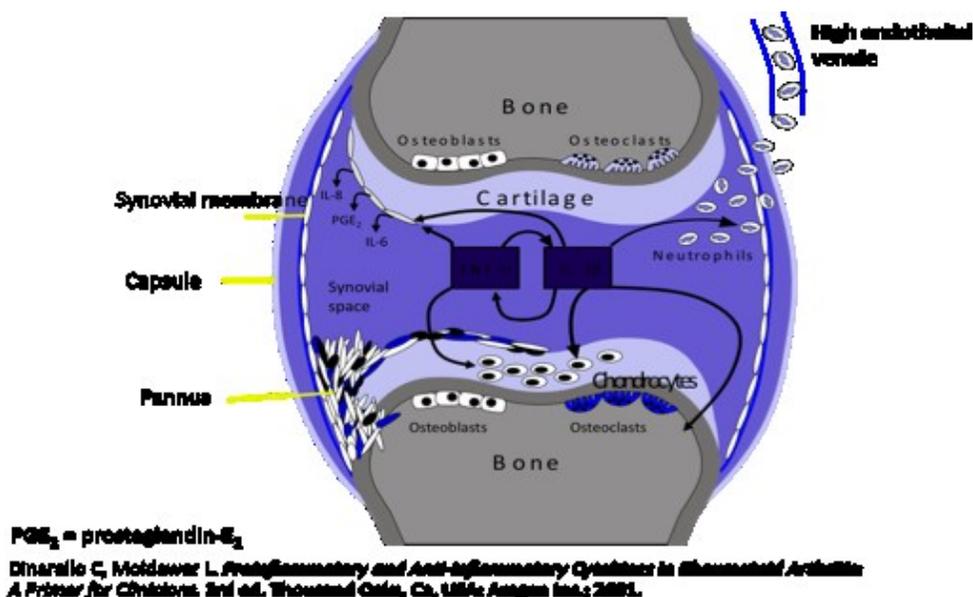
### **1.5.1 Arthrite rhumatoïde :**

L'arthrite rhumatoïde (AR) est la plus commune des arthrites inflammatoires. Les patients souffrent de douleurs chroniques articulaires importantes ce qui rend cette maladie profondément débilite. Plusieurs facteurs génétiques (ex. certaines allèles du complexe d'histocompatibilité majeur de type II (MHCII) et l'antigène de leucocyte humain (HLA) et la présence d'une épitope partagé (EP)) et environnementaux (la cigarette, les infections bactériennes et virales) sont impliqués dans la pathogenèse de

l'AR. Cette forme d'arthrite possède aussi une composante auto-immune représentée par les auto anticorps CPP (cyclic citrullinated peptide), le facteur rhumatoïde et les anticorps anti-collagène de type II.

Le premier site d'inflammation de l'AR est la membrane synoviale composée de synoviocytes de type A (phagocytaires) et de type B (fibroblastiques). Ces derniers sont normalement responsables de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, le collagène, l'acide hyaluronique et de molécules qui facilitent la lubrification des joints articulaires. Dans l'AR, cette membrane fibroblastique devient anormalement épaisse dû à la suractivité et surexpression de chimiokines, de facteurs de croissance et de cytokines et à plusieurs évènements cellulaires (apoptose, prolifération, migration etc.). Une activité importante des chondrocytes et ostéoclastes s'en suit de même que la formation de projections dans la cavité articulaire à l'endroit où le tissu osseux prolifère (pannus) et qui participe à la destruction du joint. Dans la région de la membrane synoviale, l'œdème, la néovascularisation et un nombre plus élevé de cellules augmentent le volume de celle-ci. L'infiltration cellulaire débute alors dans l'espace synovial et inclut les lymphocytes T (CD4+CD45RO+) et B, les cellules dendritiques folliculaires, les cellules NK et les neutrophiles.

Les macrophages et les fibroblastes présents au site inflammatoire sont les principales sources de cytokines dans le synovium de l'AR telles que : IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, IL-32, TNF $\alpha$ , GM-CSF (granulocyte-macrophage colonie-stimulating factor) et de nombreuses chimiokines. Dans l'arthrite rhumatoïde, IL-1 est produite par les monocytes, les lymphocytes B les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes. IL-1 augmente la sécrétion d'autres cytokines et chimiokines dans le synovium (monocytes), et de métalloprotéinases. Il induit aussi l'activation de iNOS et la relâche de prostaglandines. Les espèces oxydatives sont ainsi augmentées. Un des effets majeurs de IL-1 est l'activation des ostéoclastes qui va précipiter la destruction osseuse. Il se produit aussi une diminution de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire et une augmentation de sérine protéases et aggrecanases (Figure 15) (190).



**Figure 15 Représentation des événements qui ont lieu dans une articulation enflammée par la AR**

Dans l'espace synovial enflammé, l'action de IL-1 sur les synoviocytes et les chondrocytes induit la formation de métalloprotéinases et autres protéases (collagénase, gélatinases et sérine protéases) qui détruiront le tissu environnant et la matrice extracellulaire. Une fois le cartilage endommagé, le stress mécanique accentuera la destruction des articulations. De plus, IL-1 induit l'expression du récepteur RANK (receptor activator of NFκB). Ce récepteur lie RANKL sur les ostéoclastes ce qui active la destruction osseuse (191).

### **1.5.2 Psoriasis et dermatites :**

Le psoriasis est une pathologie chronique auto-immunitaire de la peau caractérisée par une hyperprolifération et différenciation des cellules de l'épiderme, une infiltration de cellules inflammatoires dans l'épiderme et dans le derme ainsi qu'une augmentation et dilatation des vaisseaux sanguins du derme (192). Un réseau de cytokine (IL-17, IL-22, IL-23, TNFα) est responsable des lésions psoriasiques. TNFα induit IL-1α dans les kératinocytes et fibroblastes et IL-1β promeut la

différenciation des cellules T en cellules TH17 ainsi que l'infiltration de neutrophiles (responsable de l'augmentation d'espèces oxydatives). Dans l'inflammation de la peau, IL-1 est principalement trouvé dans les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales sous la forme d'une réserve prête à être relâchée lorsqu'il y a inflammation (193).

### **1.5.3 Maladies inflammatoires de l'intestin :**

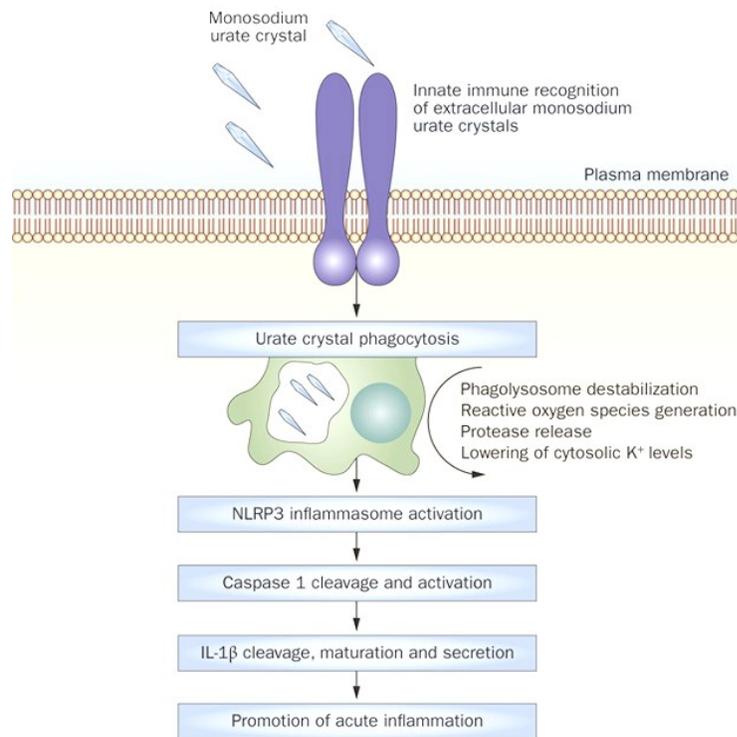
Les maladies inflammatoires de l'intestin sont une famille de pathologies où le système immunitaire a un grand rôle à jouer. Les deux types majeurs sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. L'hypothèse qui fait consensus par rapport à l'étiologie de la maladie est que certains individus sont génétiquement prédisposés. Des facteurs externes tels que la flore normale luminale ainsi que des facteurs appartenant à l'hôte tels que la barrière épithéliale intestinale, l'immunité innée et adaptative vont causer un dérèglement des fonctions immunitaires de la muqueuse que des facteurs environnementaux tels que la cigarette vont augmenter. Les recherches effectuées afin d'identifier un agent déclencheur sont demeurées infructueuses. Les maladies inflammatoires de l'intestin sont donc considérées comme une réponse chronique inappropriée (réponse exagérée des Th1 causant une hypersensibilité à la flore bactérienne de la muqueuse) de la flore intestinale qui peut contenir des composantes auto-immunitaires. Le système digestif normal comprend une barrière intestinale, le système immunitaire de la muqueuse et un certain nombre de cellules stromales.

La colite ulcéreuse et la maladie de Crohn se différencient par leurs effets sur la muqueuse intestinale. Dans la colite ulcéreuse l'inflammation est superficielle et limitée au colon alors que dans la maladie de Crohn l'inflammation est transmurale, plus répandue et le tissu peut contenir des granulomes. La maladie de Crohn est généralement considérée comme une pathologie de type Th1 avec une expression importante d'IFN $\gamma$  et IL-2 de même que les cytokines inflammatoires IL-23, IL-1 et IL-6 (194). Une mutation (augmentation de la fonction) dans le gène *NOD2/CARD15* a été associée à la maladie de Crohn. La protéine NOD est normalement un récepteur

cytosolique qui est relié aux signaux bactériens. Elle est exprimée dans les monocytes et lorsque mutée, potentialise l'activité de NF $\kappa$ B ce qui en retour induit une production anarchique de cytokines inflammatoires telles que IL-1 et TNF $\alpha$ . Les deux cytokines induisent la production de prostaglandines, protéases et d'autres médiateurs inflammatoires en activant les macrophages, neutrophiles, fibroblastes et cellules musculaires lisses (195, 196).

#### **1.5.4 Maladies autoinflammatoires : Un exemple, la goutte**

IL-1 $\beta$  joue un rôle majeur dans les maladies autoinflammatoires puisque son activation est dépendante de l'inflammasome. Par exemple, la goutte est une maladie autoinflammatoire et métabolique caractérisée par de l'hyperuricémie chronique définie par un niveau élevé d'urate (>360 mmol/dl) (197). La goutte se manifeste par des dépôts de cristaux d'urate monosodique monohydrate (MSU) ou de calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD;pseudogoutte) sur les tissus mous et provoque des crises aiguës d'arthrite inflammatoire aux articulations qui sont extrêmement douloureuses. La goutte peut aussi promouvoir l'érosion des articulations et de l'inflammation chronique. Le dépôt de cristaux dans les tissus active l'immunité innée et provoque une cascade inflammatoire qui implique le complément et la relâche de cytokines inflammatoires et qui culmine en la présence de neutrophiles au site enflammé. Cette cascade incluant les TLR et l'activation de l'inflammasome donnera lieu à la maturation et production de IL-1 $\beta$ . (Figure 16).



**Figure 16 Mécanisme inflammatoire de la goutte.** L'absorption des cristaux d'urate par les phagocytes, l'activation de l'inflammasome et la sécrétion de IL-1 promouvoit l'inflammation liée à la goutte. Les cristaux se lient à la surface des phagocytes ce qui active les protéases, la production d'espèces oxydatives et la baisse de potassium cytosolique. L'inflammasome est activé et génère IL-1 via l'activation de la caspase-1 (198)).

L'administration d'anakinra (IL-1Ra recombinant) à des patients souffrant de crises aiguës de goutte a permis de diminuer grandement la douleur et les signes inflammatoires ce qui a contribué à confirmer la pertinence d'une thérapie anti-IL-1 dans le traitement de cette pathologie (198).

### 1.5.5 Effets hémostatiques et thermorégulateurs de IL-1 : hypotension et hyperthermie

IL-1 a aussi plusieurs effets systémiques. IL-1 $\beta$  circulant interagit avec son récepteur sur la vasculature hypothalamique et génère la production de

cyclooxygenase-2, ce qui augmente de ce fait la production de PGE<sub>2</sub> au cerveau qui agit au niveau de l'hypothalamus pour induire la fièvre (124, 199).

## 1.6 Pharmacologie de IL-1 $\beta$

Durant ces 15 dernières années, plusieurs agents thérapeutiques ciblant IL-1 ont été développés. Certains de ces composés sont toujours en pré-clinique et certains sont en développement clinique ou déjà commercialisés (voir tableau 5). Le Rilonacept, protéine de fusion réunissant les portions extracellulaires de IL-1R/IL-1AcP ainsi que le Canakinmab (Ilaris), anticorps anti-IL-1 sont les derniers agents biologiques acceptés par la FDA. La plupart de ces agents ont été testés chez l'humain atteint d'arthrite rhumatoïde avec plus ou moins de succès, mais ont démontré une plus grande efficacité dans le traitement de maladies autoinflammatoires telles que la goutte, le syndrome de Muckle Wells et les maladies liées à la cryopyrine (CAPS) (200, 201). Par contre, les essais cliniques du Canakinumab dans le traitement de la goutte ont été bloqués en Phase III pour cause de risques majeurs d'infections opportunistes.

**Tableau 5. Agents thérapeutiques bloquant l'action de IL-1 $\beta$**

Composé	Caractéristiques moléculaires	Cible	Indication	Compagnie
Anakinra (Kineret)	IL-1Ra recombinant	IL-1RI	RA, maladies autoinflammatoires (goutte, CAPS)	Amgen
Rilonacept (IL-1 trap; Arcalyst)	Protéine de fusion : domaines de liaisons de IL-1R/IL-1RAcP	IL-1 $\alpha$ et IL-1 $\beta$	RA, maladies auto-inflammatoires (MWS, CAPS, Goutte)	Regeneron
Canakinumab	Anticorps monoclonal humain anti IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$	RA, maladies auto-inflammatoires, COPD	Novartis
XOMA052	Anticorps monoclonal humain anti-IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$	Diabète Type I et Type 2 et maladies cardiovasculaires	XOMA (Phase II)
AMG108	Anticorps monoclonal anti IL-1R	IL-1R	RA	Amgen
IL-1RI soluble	Protéine de fusion couplée à Fc IgG1	IL-1 et IL-1Ra	RA	-----
Pralnacasan	Caspase 1 inhibiteur	Caspase 1	RA	Aventis

## **1.7 Module X et IL-1R :**

Les approches mentionnées ci-haut utilisent des agents biologiques ayant un poids moléculaire élevé. Les facteurs limitants de ces approches sont, en autres, le mode d'administration (injection intraveineuse) et leur coût élevé de production. De plus, ces approches bloquent la totalité de la signalisation induite par IL-1 ce qui provoque un effet immunosuppresseur important. Il serait donc judicieux de développer de petits inhibiteurs peptidiques en utilisant l'approche Module X ce qui permettrait ainsi de bloquer une partie de la signalisation. Ces peptides seraient aussi moins coûteux à produire et plus faciles à administrer.

### **1.7.1 Conception des peptides :**

Nous avons utilisé la structure de IL-1R comme structure référence pour la modélisation par homologie de IL-1RAcP. Le modèle a été généré par MOE qui utilise une librairie de rotamères suivie d'un protocole de minimisation d'énergie. Il utilise aussi une librairie de boucles pour la modélisation de base. Cette structure a donné une mesure d'efficacité de modélisation (Z score) de 99 %. Malheureusement, la portion juxtamembranaire n'était pas incluse dans le modèle cristallographique original de IL-1R et une modélisation supplémentaire a dû être exécutée pour la portion juxtamembranaire de IL-1RAcP. Pour ce faire, nous avons utilisé FUGUE (69). FUGUE crible une banque de données de structures, calcule le « Z score » et produit une liste de séquences homologues. La banque de données utilisée est HOMSTRAD (202) et la portion c-terminale (juxtamembranaire) de IL-1RAcP a été modélisée en utilisant une protéine qui se lie au récepteur du facteur de croissance de l'hormone de croissance (PDB 2c5d) avec une efficacité de modélisation de 99 %.

Les régions ont ensuite été sélectionnées et les peptides dérivés de ces structures. La flexibilité et l'hydrophobicité de la structure de AcP ont été vérifiées à l'aide de plusieurs algorithmes (Figure 17 et Tableau 6).

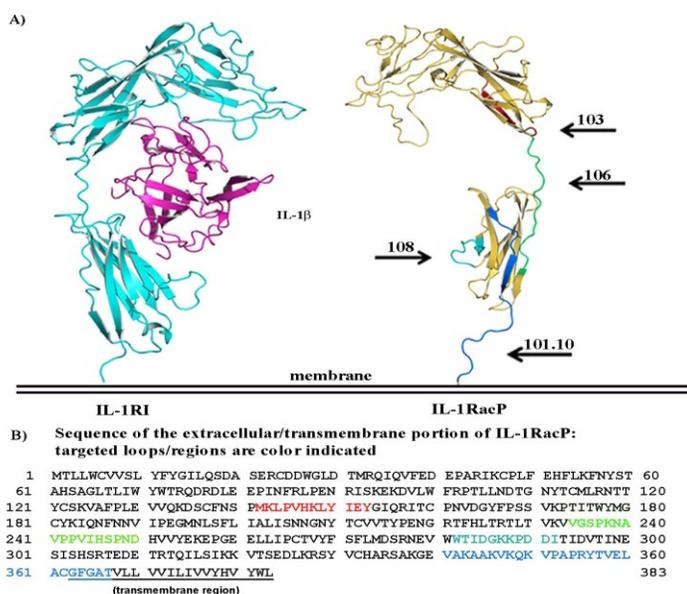


Figure 17. Exemple de régions choisies par la méthode Module X et représentation du modèle généré de la protéine accessoire.

Tableau 6. Peptides anti-IL-1RacP et IL-1R

API-101	APRYTVELA
API-102	VQKSCFNSPM
API-103	MKLPVHKLY
API-104	LLSNNGNYT
API-105	VTYPENGRTE
API-106	VGSPKNAVPPV
API-107	LHSPNDHVY
API-108	WTLDGKKPDDL
API-109	HSRTEDETRTQ
API-110	LYPVTNFQKHM
API-111	LEENKPTRPV
API-112	VAEKHRGNY

## **2. Preuve de concept de Module X chez les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) : Inhibiteurs du récepteur de la vasopressine V2R**

### **2.1 Généralités, structure, classification et signalisation des GPCR :**

#### **2.1.1 Généralités :**

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) composent la famille la plus large de récepteurs membranaires et médient la plupart des réponses cellulaires aux hormones et aux neurotransmetteurs de même que celles responsables de la vision, de l'olfaction et du goût. Le génome humain encode des milliers de GPCR (203) et 350 de ceux-ci détectent des hormones, facteurs de croissance et autres ligands. Le premier récepteur de cette famille à être cloné et caractérisé fut le récepteur  $\beta$  – adrénérgique en 1986 (204).

Les GPCR sont des protéines à sept domaines (hélices) transmembranaires (TM) qui médient leurs interactions avec le milieu intracellulaire à travers un complexe protéique multimérique appelé protéine G. Les protéines G transmettent leur signal à des protéines effectrices telles que des enzymes et/ou des canaux ioniques résultant en un rapide changement dans la concentration de médiateurs secondaires tels que l'AMP cyclique, le GMP cyclique, l'inositol phosphate, diacylglycérol, l'acide arachidonique et les ions cytosoliques (205). La partie extracellulaire peut être glycosylée et les boucles extracellulaires reliant les TM et permettant la liaison du ligand contiennent deux résidus cystéine hautement conservés qui stabilisent la structure.

Étant donné que les GPCR réagissent à la majorité des stimulus hormonaux et environnementaux et médient les réponses physiologiques conséquentes, ils sont donc des cibles thérapeutiques de choix.

#### **2.1.2 Structure :**

Contrairement à d'autres protéines, la communauté scientifique a dû attendre longtemps avant de pouvoir bénéficier d'une première résolution cristallographique de

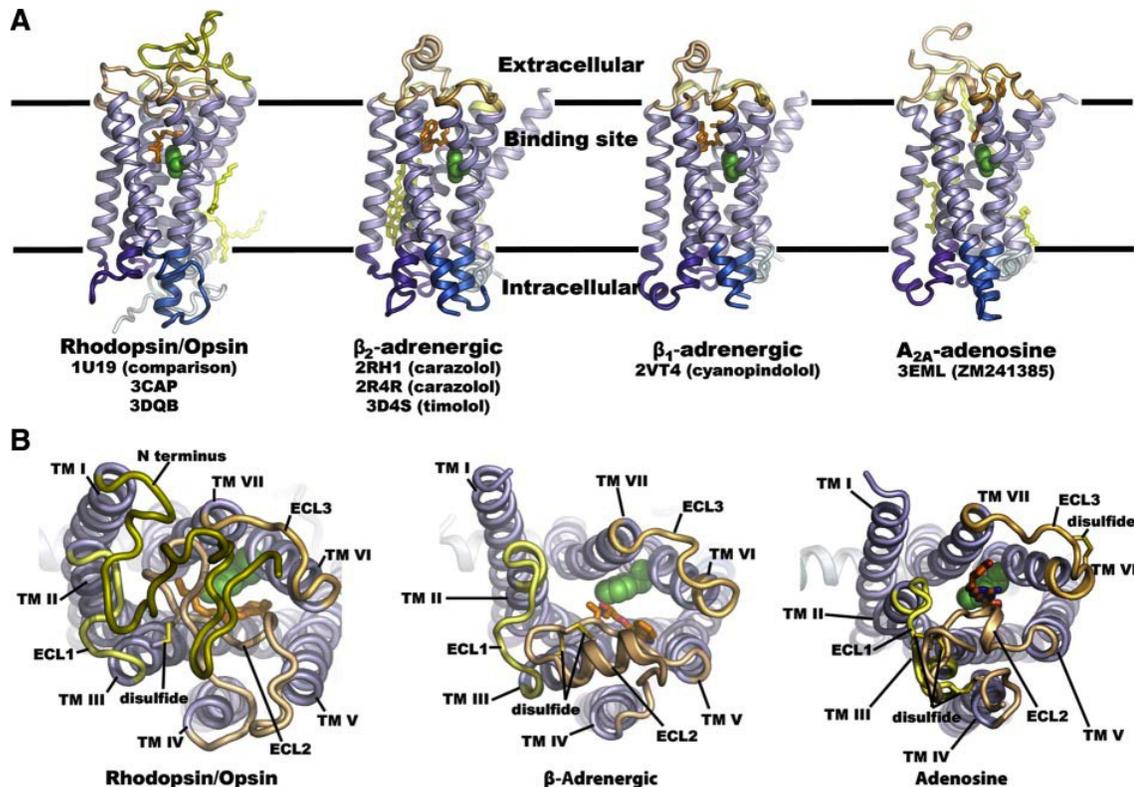
structure tridimensionnelle à haute résolution de protéines membranaires telles que les GPCR. Les premiers modèles étaient basés sur la structure de la bactériorhodopsine qui avait été déterminée par diffraction des rayons X (PDB 1AT9; (206, 207)) et cristallographie, mais à faible résolution (1AP9) (208). En 2000, la première structure de rhodopsine bovine cristallisée a été finalement résolue à plus haute résolution (1F88) (209). La première structure d'un GPCR humain a été résolue en 2007; il s'agissait du récepteur  $\beta$ -adrénergique humain (210-212). Cette structure s'est révélée hautement similaire à la rhodopsine bovine en terme d'orientation des hélices transmembranaires. Par contre, la conformation de la seconde boucle extracellulaire était entièrement différente. Cette boucle jouait un rôle régulateur de la liaison du ligand en recouvrant le site de liaison chez la rhodopsine, ce qui rendait difficile l'alignement par homologie de structure avec d'autres récepteurs GPCR (Figure 18).

Les premières structures cristallographiques de GPCR activées par un ligand ont été obtenues pour les récepteurs  $\beta$ -adrénergique humain ( $\beta_2$ AR), le  $\beta_2$ AR aviaire, le récepteur  $A_{2A}$  adénosine de même que celles des récepteurs de l'opsine et d'une forme activée de la rhodopsine (213-215).

La structure des GPCR est caractérisée par un N-terminal extracellulaire suivi par sept hélices transmembranaires (TM1 à 7) reliées par 3 boucles extracellulaires (ECL) et trois boucles intracellulaires (ICL) et terminée par un C-terminal intracellulaire. La structure dans la membrane prend la forme d'un baril. Ce baril est le site de liaison du ligand et est souvent couvert par ECL2 lorsque sous sa forme inactive. Certains ligands plus volumineux vont utiliser plusieurs boucles extracellulaires comme site de liaison (protéines et peptides). Les récepteurs de glutamate de la famille C utilisent plutôt le N-terminal pour lier le ligand. D'ailleurs, cette classe de récepteurs se distingue des autres classes par son N-terminal plus élaboré. Une grande homologie de séquence des TM a été dénotée chez tous les récepteurs connus tandis que les domaines extra et intracellulaires démontrent des différences marquantes (216). Des sites de *N*-glycosylation sont présents sur le N-terminal et quelquefois sur les ECL. La plupart des GPCR ont aussi des résidus cystéines qui forment des ponts désulfures entre ECL1 et 2 très importants pour le

repliement et une autre cystéine en c-terminal servant de site de palmitoylation. Le c-terminal contient aussi plusieurs sérines/thréonines conservées qui une fois phosphorylées vont permettre la signalisation et l'internalisation.

Lorsque le ligand se lie, il induit un changement de conformation dans les TM qui se répand au C-terminal qui devient alors plus ouvert et expose des résidus importants pour la signalisation.



**Figure 18 Comparaison des structures tridimensionnelles de la rhodopsine/opsin, du récepteur  $\beta$ -adrénergique et de l'adénosine cristallisée avec certains de leurs ligands.** Les ligands sont montrés en orange et les lipides liés en jaune. A. Vue latérale des TM. B. Vue du point de vue extracellulaire. À remarquer l'obstruction du domaine de liaison du ligand chez la rhodopsine comparativement à l'accessibilité du domaine de liaison au ligand chez les autres structures (217).

Cette portion c-terminale joue d'ailleurs plusieurs rôles : certains résidus sérine et thréonine phosphorylés vont lier une famille de protéines appelées  $\beta$ - arrestines. Une fois liées ces protéines empêchent par encombrement stérique le couplage aux protéines G et peuvent recruter d'autres complexes pouvant induire une voie de signalisation indépendante des protéines G (exemple activation de ERK 1 et 2 qui peut

être induite indépendamment des protéines G) ou bien activer l'internalisation du récepteur. Le découplage des protéines G et l'internalisation (endocytose) sont deux mécanismes importants de désensibilisation des GPCR.

### 2.1.3 Classification:

Plusieurs classifications des GPCR ont été faites selon leurs ligands ou leurs similarités de séquences. La superfamille des GPCR a été classée en 5 familles (Classification de GRAFS) (214). Cette classification sous-entend que les GPCR proviennent tous d'un ancêtre commun et ont donc évolué par duplication génique et mélange d'exons. Pour cette raison les récepteurs « Frizzled» qui ne sont pas couplés aux protéines G y sont inclus :

Famille A : Similaire à la rhodopsine « Rhodopsin-like »

Famille B : Sécrétine

Famille C : Glutamate/phéromone

Famille D : Adhésion

Famille E: Famille des Frizzled/Smoothened

Voici une description des familles :

#### **Famille A :**

La famille A (rhodopsin-like) des GPCR est la plus large des familles de GPCR. Elle contient les récepteurs reliés à la rhodopsine, ceux qui lient les amines biogéniques et autres petits ligands, les chimiokines ainsi que les glycoprotéines hormonales. De plus, les GPCR activés par des protéases (PAR) en font partie. Le site orthostérique de liaison de la famille A se situe habituellement au sommet des domaines transmembranaires, mais les petits ligands (catécholamine, adénosine, opiacés) se lient plus dans la partie supérieure des hélices tandis que les ligands plus gros (vasopressine) se lient dans une cavité entre les hélices. Le haut degré de conservation des résidus impliqués dans la liaison sous-tend qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la conservation de l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de ces récepteurs. Parmi ces acides aminés, nous retiendrons l'aspartame du TMII et trois résidus hydrophobes des TMVI et TMVII (proline, phénylalanine, asparagine) qui

seraient importants pour l'activation des récepteurs ainsi que l'arginine du motif Asp-Arg-Tyr (DRY) entre le passage du TMIII et la boucle ICL2. De plus, chez certains récepteurs la portion ECL2 se referme sur le site de liaison au ligand (218). Les ligands peptidiques utilisent beaucoup plus la portion extracellulaire (boucles) et la portion N-terminale (219). Les récepteurs activés par les protéases impliquent un mécanisme protéolytique (ex thrombine) où une protéase clive le récepteur pour créer un nouveau N. terminal. Ce nouveau N-terminal va ensuite agir comme ligand et activer le récepteur (220). Les récepteurs de chimiokines font aussi partie de la famille A (ex. CCR2, CXCR4).

### **Famille B :**

Les récepteurs les mieux caractérisés de la famille B sont les récepteurs qui lient les hormones peptidiques telles que la sécrétine, la calcitonine, le glucagon et le « glucagon-like » peptide. Ces peptides ont des longueurs allant de 27 à 52 acides aminés et le site d'interactions orthostérique est complexe et implique des interactions avec un domaine N-terminal extracellulaire plus élaboré que dans la Famille A ainsi qu'avec les boucles extracellulaires (221).

Une particularité des récepteurs de la famille B est leur modulation par des interactions avec une famille de protéines appelée RAMP (receptor activity modifying protein) (222).

### **Famille C :**

Cette famille qui inclue les récepteurs mGluRs, GABA<sub>B</sub> et les récepteurs Ca<sup>2+</sup>-dépendants sont caractérisés par un large domaine de liaison orthostérique extracellulaire agissant comme une trappe (223). Ces récepteurs forment des dimères de façon constitutive avec un récepteur GABA<sub>B</sub>. Le mécanisme d'action de ces hétérodimères est particulièrement intéressant parce que GABA se lie à une des sous-unités (GABA<sub>B1</sub>) et induit l'activation de la protéine G via une deuxième sous-unité GABA<sub>B2</sub>. Ce mode d'action n'a toujours pas été retrouvé chez d'autres GPCR.

### **Familles D et E :**

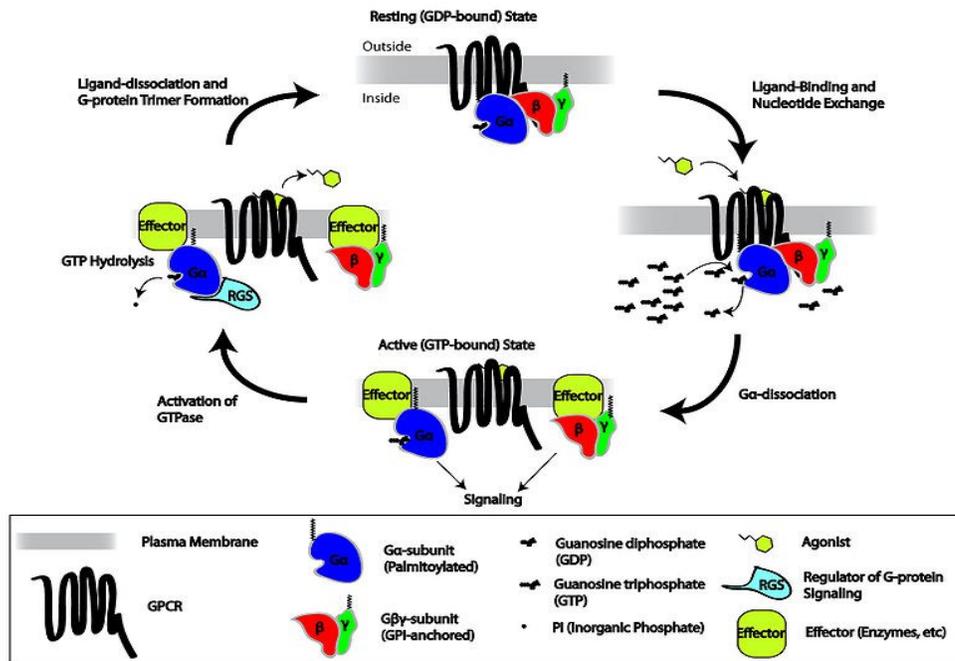
La famille D (Adhésion) contient les récepteurs qui possèdent un volumineux domaine N-terminal leur permettant d'interagir avec de nombreuses espèces moléculaires. Par contre, peu de ligands ont été identifiés (3 pour trente-trois récepteurs) et sont soit des protéines de la matrice extracellulaire ou des protéoglycans.

La famille E des récepteurs *Frizzled* (FZL), comprend les onze récepteurs des protéines WNT et le récepteur secondaire de la voie Hedgehog, appelé Smoothened (SMO). Ces récepteurs présentent des analogies structurales avec les GPCR mais étaient généralement considérés non couplés aux protéines G. Depuis, il a été démontré que certains récepteurs (ex FZD2) utilisaient les protéines G pour leur signalisation (224)

### **2.1.4 Signalisation et protéines G:**

#### **Généralités**

Deux principales voies de signalisation sont activées par les GPCR. Ce sont les voies de l'AMP cyclique et celle du phosphatidylinositol. Lorsqu'un ligand se lie aux GPCR, il s'en suit un changement de conformation et le récepteur agit alors comme facteur d'échange du nucléotide guanine (GEF) c'est-à-dire que le récepteur active alors une protéine G associée en C-terminal en échangeant un guanosine diphosphate (GDP) pour un guanosine triphosphate (GTP). La sous-unité  $\alpha$  de la protéine G (liée au GTP) peut alors se dissocier de ses sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  et poursuivre la signalisation en induisant la production de messagers secondaires ou bien en ciblant directement certaines protéines dépendant du type de sous-unité  $\alpha$  (Figure 19).



**Figure 19 : Cycle d'activation et d'inactivation des GPCR.** À l'état inactif le récepteur est associé avec une protéine G hétéro trimérique avec le GDP lié à sa sous-unité  $\alpha$ . La liaison de l'agoniste induit des changements conformationnels qui se propagent du récepteur au complexe de la protéine G. Il en résulte la libération du GDP qui est vite remplacé par le GTP. Un nouveau changement de conformation de la sous-unité  $\alpha$  permet la dissociation du trimère et l'induction des voies de signalisation appropriées. Le site de liaison du GTP sur  $G\alpha$  hydrolyse GTP en GDP. Ce processus qui peut être activé par de petites protéines appelées RGS (Regulator of G-protein signaling) permet à la sous-unité de se réassocier avec la sous-unité  $\beta\gamma$  et de lier un autre GPCR inactif.

### Signalisation et protéine G:

La protéine G liée à la portion intracellulaire du récepteur non lié par son ligand est inactive. Lorsque le ligand se lie, le récepteur change de conformation et active la protéine G qui se détache alors de celui-ci. La protéine G se compose de trois sous-unités :  $\alpha$  (domaine GTPase 39-52 kDa),  $\beta$ , et  $\gamma$ . Inactive lorsque liée au GDP, mais activée lorsque liée au GTP et un ratio constant dans la cellule de 10:1 GTP:GDP assurent que la possibilité d'un échange de nucléotide aura lieu au besoin (Figure 20).

La signalisation en tant que telle est assurée par différents types de sous-unités  $\alpha$  de la protéine G dont voici les principaux isoformes:

1.  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_{i/o}$  : Le messenger secondaire produit est l'AMP (adénosine monophosphate) cyclique générée par l'adénylate cyclase (AC) qui catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc et qui est activée par  $G\alpha_s$ . Un GPCR couplé à  $G\alpha_{i/o}$  inhibe l'activation de cette enzyme. L'AMPc active par la suite des canaux ioniques de même que des sérines/thréonines kinases A (PKA).
2.  $G\alpha_{q/11/14/15}$  : L'effecteur de cette voie est la phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) qui catalyse le clivage de phosphatidylinositol 5,5-biphosphate (PIP2) membranaire en diacylglycerol (DAG) et inositol (1,4, 5) triphosphate (IP3). IP3 agit par la suite sur des récepteurs de la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui permet la relâche de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol. Le calcium activera de façon allostérique les protéines kinases C (PKC) et d'autres protéines comme la calmoduline.
3.  $G\alpha_{12/13}$  : Ces protéines G activent les trois RhoGEF (p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF et LARG) qui sont liées à  $G\alpha_{12/13}$  et celles-ci activent les petites GTPases Rho. Lorsque liée au GTP, Rho active entre autre des protéines du cytosquelette (régulatrices) telle que la Rho-kinase (ROCK). Plusieurs GPCR qui se couplent déjà à  $G\alpha_{12/13}$  se couple aussi avec une autre classe de protéines G telle que  $G\alpha_{q/11}$ .

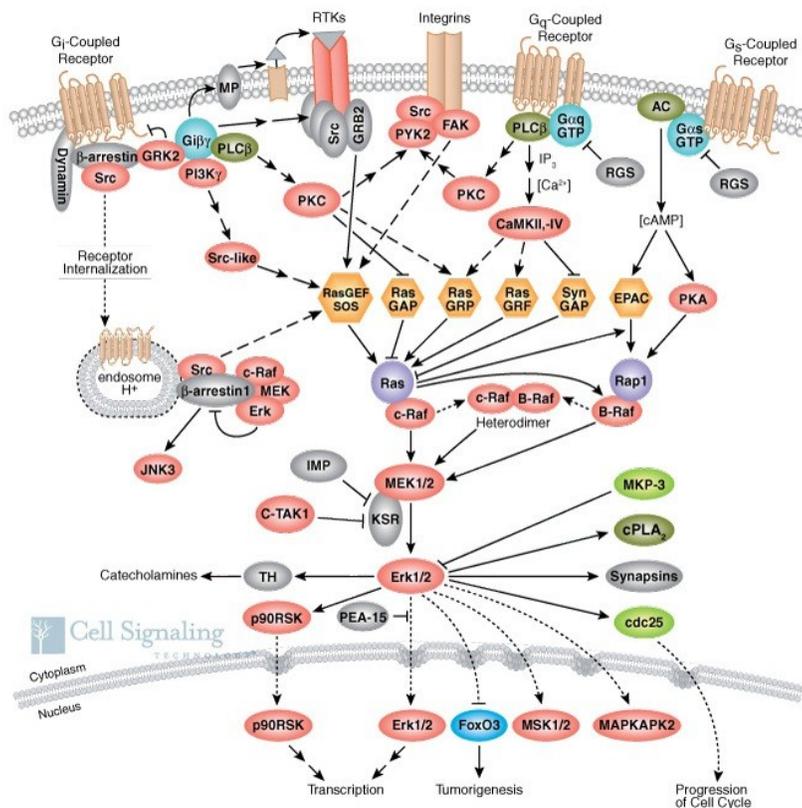
### **Autres voies de signalisation :**

#### **1) Signalisation à partir de l'hétéro dimère $G\beta\gamma$ :**

À l'origine, ce dimère participait à la désactivation du signal chez les GPCR (régulateur négatif). Depuis, plusieurs études ont démontré un rôle des  $G\beta\gamma$  dans la signalisation médiée par Erk  $\frac{1}{2}$  et elles pourraient influencer la dimérisation des GPCR. Les effecteurs pour ces sous-unités sont les canaux ioniques potassiques et calciques et certains isoformes de l'adénylate cyclase, de la kinase PKC et de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) ((225)).

## 2) Signalisation indépendante des protéines G:

Les GPCR peuvent aussi activer la voie des Janus kinases (JNK) et la voie des JAK\STAT normalement réservée aux récepteurs de cytokines à un seul domaine transmembranaire. Il a été démontré que les récepteurs 5-HT et le récepteur de l'angiotensine II pouvaient activer ces voies indépendamment des protéines G (226, 227).



**Figure 20 Schéma général des voies de signalisation des GPCR**  
([http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdfs/MAPK\\_G\\_Protein](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdfs/MAPK_G_Protein))

### 2.1.5 Régulation de l'activité des GPCR et désensibilisation :

Lorsqu'un ligand se lie de façon prolongée sur le récepteur, un processus de désensibilisation est enclenché. Les GPCR se désensibilisent à l'aide de deux mécanismes majeurs : 1) par la désensibilisation homologue lorsque qu'il est inactivé sans le recours de d'autres GPCR et 2) par la désensibilisation hétérologue lorsqu'un

GPCR cause l'inactivation d'un autre GPCR. L'évènement moléculaire majeur qui préside est la phosphorylation du domaine intracellulaire.

Plusieurs voies permettent de moduler l'activité des GPCR:

1) Les PKA: Les protéines G activent les PKA (kinases dépendantes de l'AMPc) qui vont en retour phosphoryler le récepteur en C-terminal. De plus, la désensibilisation par la PKA peut s'effectuer chez d'autres récepteurs que ceux qui ont déclenché le processus.

2) Kinases couplées aux protéines G (GRK) :

La liaison au ligand change la conformation du récepteur et permet le recrutement des GRK qui phosphorylent des sérines et thréonines sur la portion c-terminale intracellulaire du récepteur. Par la suite la  $\beta$ -arrestine est recrutée et empêche la liaison aux protéines G, ce qui débute le processus d'internalisation.

#### **2.1.6 Modulateurs allostériques des GPCR:**

Malgré le grand potentiel thérapeutique que représentent les GPCR et les tentatives de développement de modulateurs sélectifs de leurs activités, peu d'entre eux ont été commercialisés. De plus, plusieurs sont des agonistes et antagonistes orthostériques. Malgré tout, ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été consacrés à développer des modulateurs allostériques de ces récepteurs. Les GPCR sont des molécules allostériques naturellement puisque leur activité est modulée constamment par des interactions protéines/protéines à d'autres sites de liaison que celui du ligand. Leurs interactions avec la protéine G en sont un bon exemple. Tous ces points de contact sont des sites allostériques qui peuvent être considérés comme des cibles potentielles pour des modulateurs allostériques.

Plusieurs travaux ont révélé la localisation de sites sur les protéines qui pouvaient lier des modulateurs allostériques. Les mécanismes de modulation allostériques diffèrent d'une famille de GPCR à l'autre. Un domaine qui comprend un site de liaison orthostérique pour un ligand peut jouer un rôle de domaine de liaison allostérique pour un autre récepteur dans une autre famille (228). Par exemple, chez la Famille A des GPCR, le site orthostérique comprend une partie du domaine

transmembranaire tandis que dans la Famille C le site orthostérique est uniquement en N-terminal et le site allostérique connu est situé au domaine transmembranaire (13).

Les récepteurs de l'acétylcholine (mACh) ont été les plus intensément étudiés au niveau structurel pour ce qui est de leurs sites de liaison et comportements allostériques. En fait, les premiers résultats de modulation allostérique sur des protéines membranaires ont été décrits avec ces récepteurs (13). À partir de ces études, on a pu établir (en utilisant mACh comme prototype) un site commun de liaison allostérique comprenant les secondes et troisièmes boucles extracellulaires de même que le haut du 7<sup>e</sup> segment transmembranaire. Une séquence d'acides aminés « EDGE » spécifique à la 2<sup>e</sup> boucle a longtemps été considérée comme primordiale à la liaison de modulateurs allostériques chargés positivement (ex. telle que la gallamine (229)). Le 7<sup>e</sup> segment transmembranaire a aussi été identifié comme site allostérique potentiel (230).

Les récepteurs de chimiokines comportent aussi des sites de liaison allostériques qui ont été identifiés dans les domaines transmembranaires 4 et 6 (TM4 et TM6) du récepteur CXCR4 (impliqué dans le HIV) (231, 232) et chez le récepteur CCR5 où plusieurs composés se liaient à différents sites allostériques dans les segments transmembranaires 2 et 7 (233). Les GPCR de la famille A tels que mACh et les récepteurs de chimiokines ont servi de prototypes pour développer de meilleures approches de détermination et caractérisation de sites allostériques telles que la mutagenèse dirigée et les essais de liaisons.

Il a été difficile d'identifier des ligands allostériques non peptidiques pour la famille B des GPCR. Un exemple concerne le récepteur du CRF (corticotrophin-releasing factor) 1. Ces antagonistes se liaient sur des sites distincts du site de liaison du peptide. Les sites allostériques identifiés par mutagenèse incluaient certaines régions des TM3 et 5 et de plus, ces allostériques démontraient une spécificité vis-à-vis CRF1 par rapport à CRF2 (deux isoformes de CRF)(221).

Des sites allostériques capables de moduler l'activité biologique des récepteurs de la famille C de récepteurs ont aussi été identifiés. Ceux-ci impliquaient aussi les domaines transmembranaires TM3, 5, 6 et 7 (en outre chez les récepteurs mGluR1 et 5

(234)). Plusieurs modulateurs allostériques ont aussi été identifiés pour les récepteurs  $\text{Ca}^{2+}$ - dépendants (235, 236) et les récepteurs  $\text{GABA}_B$ . Les résidus responsables de la liaison allostérique de ces différents récepteurs sont souvent les mêmes et partagent la même situation dans la structure (228).

En plus de cibler les régions mentionnées ci-haut, d'autres approches peuvent être envisagées pour développer de façon rationnelle des modulateurs allostériques.

Il est de plus en plus accepté dans le monde des GPCR que ceux-ci forment des oligomères à la membrane (237, 238). La formation de ces complexes affecte plusieurs activités des récepteurs de l'activité biologique à l'internalisation. Un ligand orthostérique ou allostérique pour un récepteur modulera la signalisation du partenaire de liaison à travers des changements conformationnels transmis par le contact entre les deux récepteurs. Ces points de contact peuvent aussi constituer des sites allostériques intéressants pour le développement de modulateurs.

Des études de mutagenèse et de cinétique sous-entendent que certains allostériques antagonistes pourraient agir à l'interface domaine extracellulaire/membrane. Matsui *et coll.* en 1995 (239) ont démontré par mutagenèse dirigée qu'un site allostérique important se situait dans la portion juxtamembranaire du récepteur muscarinique. Des sites de modulation allostérique positive et négative ont aussi été décrits pour les récepteurs de calcitonine et de l'angiotensine II respectivement (240, 241).

## **2.2 Récepteur de la vasopressine V2R : Exemple d'application de la technologie Module X aux GPCR.**

### **2.2.1. Vasopressine :**

En 1895, Oliver et Schäfer ont découvert une nouvelle substance qui provenait de l'hypophyse postérieure et qui possédait des effets vasopresseurs (242) et l'ont nommé vasopressine. Le système de la vasopressine agit sur les fonctions cardiovasculaires, sur la balance des fluides, la coagulation et les plaquettes ainsi que sur la mémoire et l'humeur.

**Tableau 7. Ligands des récepteurs de la vasopressine (243)**

<b>Agonistes</b>	<b>Structure des peptides</b>	<b>Récepteur cible</b>
Vasopressine Arginine	CysTyr-Phe-Gln-Asn— Cys-Pro-LArg-Gly-NH <sub>2</sub>	V <sub>1</sub> R, V <sub>2</sub> R, V <sub>3</sub> R
DD-Arginine vasopressine (Desmopressine; DDAVP)	CysTyr-Phe-Gln-Asn— Cys-Pro-DArg-Gly-NH <sub>2</sub>	V <sub>2</sub> R
Terlipressine	CysTyr-Phe-Gln-Asn— Cys-Pro-DArg-Gly-NH <sub>2</sub>   Gly-Gly-Gly	V <sub>1</sub> R>V <sub>2</sub> R
Lysine Vasopressine	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn- Cys-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub>	V <sub>1</sub> R>V <sub>2</sub> R

La vasopressine est une hormone à neuf acides aminés (nonapeptide) possédant un pont disulfure entre deux cystéines (Tableau 7). Elle est synthétisée en tant que pro hormone dans les neurones du noyau paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus et transportée ainsi qu'emmagasinée dans la glande pituitaire. Durant le transport, la vasopressine est clivée et emmagasinée dans des vésicules sécrétoires. Elle sera ensuite relâchée dans les veines portales de la pituitaire pour jouer son rôle physiologique. La vasopressine peut aussi être relâchée par les terminaisons dendritiques des neurones et exercer des effets paracrines.

Les stimuli qui induisent la relâche de vasopressine sont : l'état hyperosmotique et hypovolémique et l'hypotension. La concentration normale de vasopressine dans le plasma varie de 0 à 5 pg/ml. Le gène de la vasopressine est localisé sur le chromosome 20 près du gène de l'ocytocine et ces deux hormones sont reliées phylogénétiquement ne différant que par 2 acides aminés. Par contre, leurs effets biologiques sont totalement distincts étant donné que l'ocytocine est impliquée surtout dans la lactation et la reproduction (grossesse).

### 2.2.2. Récepteurs de la vasopressine :

La vasopressine induit ses effets biologiques via trois différents récepteurs : V1R, V2R et V3R et deux récepteurs non spécifiques (récepteurs de l'ocytocine et P2 purinorecepteurs). Tous ces récepteurs sont membres de la famille A des GPCR.

V1R est responsable de la vasoconstriction par les cellules musculaires lisses vasculaires. Ce GPCR est couplé à la protéine Gq et active la phospholipase C (PLC) avec génération des messagers secondaires IP3 et DAG. Il y a donc accumulation de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol.

Le récepteur V2R est exprimé dans les canaux tubulaires et médullaires distaux rénaux et génère surtout des effets antidiurétiques. Après la liaison avec la vasopressine, V2R active la guanylate cyclase qui génère l'AMPC résultant en la translocation de l'aquaporine-2, un canal transporteur d'eau de vésicules intracellulaires (244, 245) à la surface luminale des cellules épithéliales tubulaires rénales. V2R induit d'ailleurs aussi la transcription de l'aquaporine-2. Ce mécanisme physiologique permet d'exercer un contrôle extrêmement serré de l'osmolarité sanguine et même de petits changements de l'ordre de 1-2 % dans l'osmolarité induisent la sécrétion de vasopressine et stimulent la soif (246). V2R module aussi l'absorption de sodium et potassium ainsi que la sécrétion de  $H^+/HCO_3^-$  (247). Des études récentes ont aussi démontré que V2R peut activer Erk1/2 (248, 249) via sa liaison avec la  $\beta$ -arrestine. Son interaction avec cette dernière est classique et implique la phosphorylation par les GRK ce qui induit aussi son endocytose (250).

Le V3R (aussi nommé V1bR) est exprimé dans le système nerveux central et est responsable des effets neuromodulateurs de la vasopressine. L'activation de V3R stimule la sécrétion de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) et influence la pression sanguine, la mémoire, la température corporelle et le comportement social. Ce récepteur est aussi exprimé sur les cellules pancréatiques et module la sécrétion d'insuline (251).

Le récepteur de l'ocytocine (OTR) est retrouvé dans les glandes mammaires, les ovaires, l'utérus et l'hypothalamus. L'affinité de la vasopressine pour ce récepteur est très faible alors les effets de l'ocytocine sont très spécifiques et sélectifs. Le P2

purinorécepteur reconnaît et lie l'ATP extracellulaire ce qui augmente la mobilisation calcique au cytosol et active NOS (synthèse d'oxyde nitrique) résultant en une vasodilatation. La vasopressine peut se lier à ces récepteurs situés sur le tissu cardiaque et causer une vasoconstriction.

### **2.2.3. Agonistes et antagonistes de la vasopressine :**

Différents analogues de la vasopressine ont été utilisés cliniquement incluant la tricyl-lysine (terlipressine) et la desmopressine.

La terlipressine a une préférence pour le V1R avec un ratio V1R:V2R de 2.2:1 (252). La desmopressine (DD-arginine vasopressin DDAVP) est un analogue synthétique de la vasopressine et est hautement sélective pour le V2R. L'activation des V2R de l'endothélium par le DDAVP augmente les concentrations plasmatiques du facteur de von Willebrand et de l'activateur plasminogène tissulaire via la génération d'AMPC. DDAVP augmente aussi le facteur VIII dans le plasma et augmente l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire (253).

Les antagonistes quant à eux peuvent être classés selon deux groupes : les peptides et les molécules non peptidiques. Les antagonistes peptidiques ont été abandonnés rapidement par le milieu clinique, car ils causaient de l'immunogénicité et devaient être administrés par voie parentérale. De plus, certains présentaient une activité agoniste. Des antagonistes non peptidiques ont été développés pour la clinique et certains sont devenus les médicaments de choix dans le cas du diabète insipidus. D'autres sont en phase clinique pour plusieurs indications (Tableau 8 et 9).

**Tableau 8 Agonistes des récepteurs de la vasopressine ((243)**

Récepteur	Effet biologique	Indication clinique	Nom clinique
<b>V1R</b>	Vasoconstriction de vaisseaux périphériques	Choc septique	Vasopressine ou terlipressine
		Arrêt cardiaque	Vasopressine
	Vasoconstriction dans la région rachidienne	Saignement de varices oesophagiennes	Terlipressine
	Vasoconstriction dans la région rachidienne et des artérioles rénales	Syndrome hépatorénal	Terlipressine
<b>V2R</b>	Augmentation du facteur Von Willebrand	Désordres de coagulation, médicaments anti-plaquette, héparine	Desmopressine
	Modulation rénale	Diabète insipide	Desmopressine

**Tableau 9. Antagonistes des récepteurs de la vasopressine**

Récepteur	Indication clinique	Nom clinique
<b>anti V1R</b>	Maladie de Raynaud Dysmenorrhée Travail pré-terme	Relcovaptan (Sanofi)
	Vasospasme cérébral	Relcovaptan (Sanofi)
<b>Anti V2R</b>	Polycystite autosomale dominante	Tolvaptan (Otsuka)
	Arrêt cardiaque	Lixivaptan (CardioKine)
<b>anti V1R et V2R</b>	Arrêt cardiaque	Conivaptan (Yamanouchi Astellas)
	Hyponatrémie	Conivaptan (Yamanouchi Astellas)
<b>Anti V2R</b>	Dépression	SSR-149415 (Sanofi) Satavaptan

#### 2.2.4. Structure du V2R :

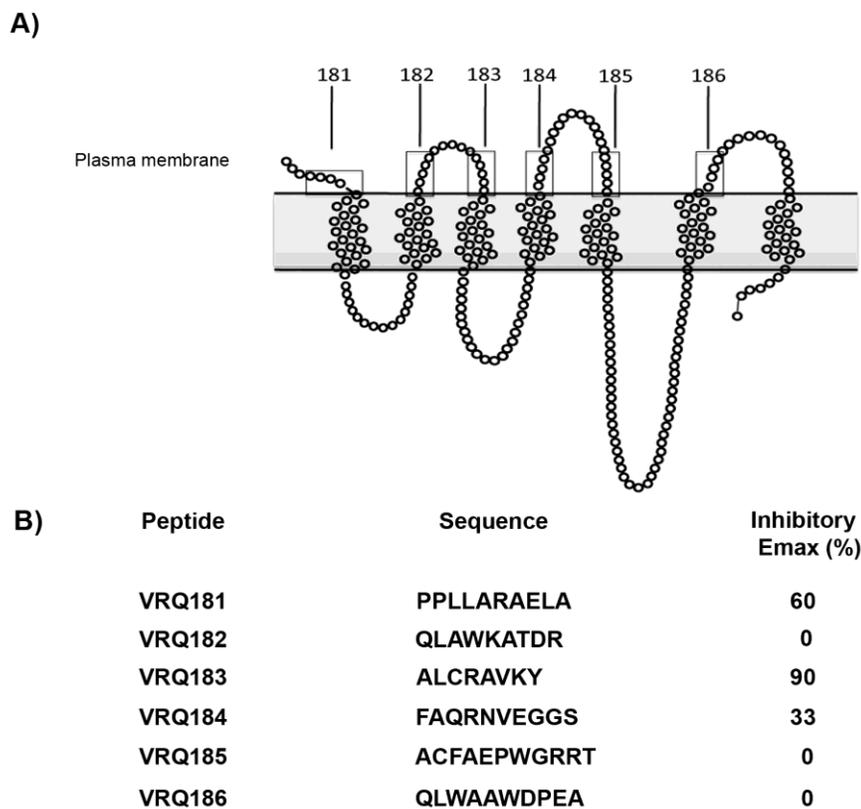
La famille des récepteurs de vasopressine appartient à la classe I (Famille A) rhodopsine des récepteurs GPCR. Les séquences des ICL2 et 3 sont très bien conservées (50 % à 78 %) entre V1Ra, Vi1b et OTR mais divergent de V2R (23 % à 30 %) (254). V2R est couplé à Gs via la ICL3 et des interactions avec le c-terminal (255). La ECL3 de V2R contient 50 acides aminés qui rend difficile la modélisation de novo (256).

Certaines études ont démontré que cette famille de récepteurs pouvait dimériser à la membrane plasmique et la première évidence impliquait le V2R qui pouvait oligomériser avec V1R et OTR (85, 238). Il existe présentement peu de détails sur la structure du V2R. Un modèle *in silico* de V2R incluant la vasopressine et la desmopressine a été créé en 1995 par Czaplewski C. (254) et révélait que plusieurs résidus des TM3 et TM7 étaient importants pour la liaison avec ces agonistes. Plusieurs de ces résidus avaient déjà été identifiés comme étant importants chez les autres récepteurs de cette même sous-famille.

#### 2.2.5 Conception des inhibiteurs peptidiques :

En se basant sur les études de mutagenèse dirigée contre des sites stratégiques, le marquage de photo affinité et un balayage de cystéines, un grand nombre de régions importantes pour l'activation et l'activité des récepteurs couplés aux protéines G ont été identifiées (205). Parmi ces régions, la seconde boucle extracellulaire a particulièrement fait l'objet de recherches concernant son rôle dans la liaison du ligand orthostérique et de l'activation des récepteurs. Les boucles extracellulaires adjacentes (première et troisième) ont aussi fait l'objet de plusieurs recherches et ont démontré plusieurs propriétés structurales (257, 258) y compris dans les récepteurs de la vasopressine (259). Il a de plus été démontré par Matsui *et al* que les résidus situés à l'interface de la région extracellulaire et de la membrane du récepteur muscarinique pouvaient potentiellement faire partie de sites allostériques particulièrement lorsque

situés près du site de liaison au ligand. En nous basant sur le fait que la deuxième boucle extracellulaire se replie présument sur la surface du V2R pour la régulation de son activation et la liaison du ligand (211) et que cet évènement implique la déstabilisation et le réarrangement des interactions avec les autres boucles extracellulaires (particulièrement dans la région juxtamembranaire), nous avons conçu de petits peptides reproduisant les régions juxtamembranaires. La figure 21 illustre l'emplacement et décrit la séquence des peptides.



**Figure 21. Récepteur V2R** **A)** Représentation du récepteur V2R et emplacement sur la structure des peptides conçus. **B)** Séquence des peptides à partir de la séquence primaire de V2R.

## **Partie C : Articles publiés**

### **1. Article 1 :**

#### **Development of a novel non-competitive antagonist of Interleukin-1 receptor**

Running title: Non-competitive antagonist of IL-1RI

Christiane Quiniou\*, Przemyslaw Sapieha\*, Isabelle Lahaie\*, Xin Hou\*, Sonia Brault\*, Martin Beauchamp\*, Martin Leduc\*, Lenka Rihakova\*, Jean-Sébastien Joyal\*, Sylvain Nadeau\*, Nikolaus Heveker\*, William Lubell<sup>†</sup>, Florian Sennlaub<sup>‡</sup>, Fernand Gobeil Jr<sup>§</sup>, Greg Miller<sup>¶</sup>, Alexey V. Pshezhetsky\*, Sylvain Chemtob\*

\*Ste-Justine Hospital Research Centre, Montreal, Canada H3T 1C5; <sup>†</sup>Department of Chemistry, University of Montreal, Montreal Canada H3C 3J7; <sup>‡</sup>Inserm, U872, Paris, F-75006 France; <sup>§</sup>Department of Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada, J1K 2R1; <sup>¶</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1Y6

## **Development of a novel non-competitive antagonist of Interleukin-1 receptor**

Running title: Non-competitive antagonist of IL-1RI

Christiane Quiniou\*, Przemyslaw Sapieha\*, Isabelle Lahaie\*, Xin Hou\*, Sonia Brault\*, Martin Beauchamp\*, Martin Leduc\*, Lenka Rihakova\*, Jean-Sébastien Joyal\*, Sylvain Nadeau\*, Nikolaus Heveker\*, William Lubell†, Florian Sennlaub‡, Fernand Gobeil Jr.§, Greg Miller¶, Alexey V. Pshezhetsky\*, Sylvain Chemtob\*

\*Ste-Justine Hospital Research Centre, Montreal, Canada H3T 1C5; †Department of Chemistry, University of Montreal, Montreal, Canada H3C 3J7; ‡Inserm, U872, Paris, F-75006 France; §Department of Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada, J1K 2R1; ¶Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1Y6

Keywords: Peptides, Cytokine receptors, inflammation.

**ABSTRACT**

Interleukin (IL)-1 is a major pro-inflammatory cytokine which interacts with the IL-1 receptor I (IL-1RI) complex, composed of IL-1RI and IL-1R accessory protein (IL-1RacP) subunits. Currently available strategies to counter pathological IL-1 signalling rely on a recombinant IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), which directly competes with IL-1 for its binding site. Presently, there are no small antagonists of the IL-1RI complex. Given this void, we derived 15 peptides from loops of IL-1RacP, which are putative interactive sites with the IL-1RI subunit. Here we substantiate the merits of one of these peptides, rytvela (we termed, 101.10), as an inhibitor of IL-1R and describe its properties consistent with those of an allosteric negative modulator. 101.10 ( $IC_{50} \approx 1$  nM) blocked human thymocyte proliferation *in vitro*, and demonstrated robust *in vivo* effects in models of hyperthermia and inflammatory bowel disease as well as topically in contact dermatitis, superior to corticosteroids and IL-1ra; 101.10 did not bind to IL-1RI deficient cells and was ineffective *in vivo* in IL-1RI knockout mice. Importantly, characterization of 101.10, revealed non-competitive antagonist actions and functional selectivity by blocking certain IL-1R pathways while not affecting others. Findings describe the discovery of a potent and specific small (peptide) antagonist of IL-1RI, with properties in line with an allosteric negative modulator.

## INTRODUCTION

Of the numerous factors involved in inflammatory conditions, compelling evidence points to a dominant contribution by interleukin-1 (IL-1), a 17 kDa cytokine, in acute bouts of inflammation (260). A role for IL-1 has been clinically validated in a number of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (261), inflammatory bowel disease (IBD), and strongly suggestive in osteoarthritis and psoriasis (262). IL-1 interplays with a number of other important mediators of inflammation, such as tumor necrosis factor (TNF), IL-18 and IL-6. IL-1 exerts its biological effects by interacting with the IL-1 receptor type I (IL-1RI), which is composed of a ligand-binding subunit and a signaling subunit (named the IL-1R accessory protein [IL-1RacP]); IL-1RII (membrane-bound and soluble) is an inhibitory type receptor of IL-1RI (263). Stimulation of IL-1RI leads to activation of various downstream signaling mediators, notably PGE<sub>2</sub> and NF- $\kappa$ B, which partake in conveying hyperthermic and pro-inflammatory effects of IL-1(264).

Presently, a recombinant protein of the natural IL-1 receptor antagonist ([IL-1ra] – 17.5 kDa; Kineret) is the only clinically effective approach to interfere specifically in a competitive manner with IL-1 actions; regrettably its administration is associated with a number of undesirable adverse effects and limited efficacy (265). IL-1ra selectively targets IL-1 by competing with the latter for receptor binding.

Alternatively, targeting IL-1RI with small inhibitors would be advantageous in that it would be potentially simpler to administer, could be effective transepithelially, be hopefully devoid of adverse effects, and be less costly. Such a compound would be further beneficial if it exhibited non-competitive properties (and possibly functional selectivity as an allosteric modulator which would not abolish all functions of IL-1RI (266)); but this has yet to be achieved (264).

The concept that peptides that reproduce the sequence of specific regions of receptors (or enzymes) can interfere with actions of these proteins of interest has been amply documented (77, 81, 83, 85, 267-269). Loop regions of receptors (and other proteins) are particularly relevant in this context as they affect appropriate conformation and/or interactions with other subunits and partners (270); this notion

also applies to different loops of IL-1RacP that interact with the IL-1RI subunit (169). For example, d-peptides (more active and stable than l-peptides (83)) derived from transmembrane and dimerization domains respectively of  $\beta$ -adrenergic and VEGF receptors hinder dimerization (85, 271); similarly, a peptide fragment retaining a motif of the  $\beta$ -amyloid interferes with assembly of this protein into plaques (83). Because regions targeted by these molecules do not need to arise from the ligand binding site, these peptides would conceivably often exhibit allosteric modulatory properties (272) (273). Allosterism can alter signalling modalities (272) and down-stream responses without completely inhibiting receptor function (266), and thus confer greater selectivity. This has for instance been shown for thiochrome, a selective allosteric enhancer of the M4 muscarinic receptor (273), for TNF $\alpha$ -RI (274), and for adhesion molecules such as the LFA-1 integrin of lymphocytes where a peptide binds to an allosteric site and interferes with some (but not all) of its function (275).

Along these lines, in relevance to IL-1R, it has recently been demonstrated that a recombinant of the major extracellular portion of the IL-1RacP (~75kDa) exhibits *in vivo* efficacy in a model of autoimmune arthritis without interfering with all actions exerted by IL-1RI (276). On the basis of the overall rationale presented above, we generated peptides derived from extracellular loops and inter-domain regions of IL-1RacP and screened them against IL-1-induced effects. We hereby describe for the first time 101.10 (rytvela), a small selective peptidic antagonist of IL-1RI, which exhibits properties consistent with those of an allosteric modulator, and is effective in models of acute inflammation.

## Materials and Methods

### Animals, cells and peptides

Animals were used according to a protocol of the Animal Care committee of Hôpital Ste-Justine along with the principles of the Canadian Council on Animal Care. Sprague-Dawley rats and CD-1 mice were obtained from Charles River Laboratories. IL-1RI gene knockout ( $^{-/-}$ ) mice generated on the B6129S1-*Il1r1<sup>tm/Rom1</sup>*/J background and corresponding wild type control B6129SF2/J strain were purchased from Jax Mice Laboratories (Bar Harbour, MA) (277). Human thymocyte TF-1 cells were obtained from ATCC. All (d) peptides were custom synthesized by Sigma Genosys (>96% purity).

### Peptide design

Regions of the IL-1R accessory protein were identified based on crystallography and modeling data (155, 169), which were supported by hydrophobic and flexibility profiles as well as homology domains using computational analysis (ProDom (278), PROSITE (76), Predict Protein (76), ProtScale (279)). Fifteen corresponding homologous peptides (all d-octa-deca, sense [NH<sub>3</sub>-COOH] and anti-sense [COOH-NH<sub>3</sub>]) were derived from primary sequences of extracellular regions (loops and interdomain regions) of the IL-1RacP regions.

### IL-1-induced hyperthermie

Sprague-Dawley rats (300-330 g) were anesthetized with 2% isoflurane and placed under a radiant warmer to maintain core (rectal) temperature at ~37.5°C. A polypropylene tube (PE-90) was inserted in the jugular vein for injections. The femoral artery was catheterized (PE-90) to collect blood samples. The probe of an electronic thermometer was inserted ~4 cm into the rectum to measure temperature. 101.10 (1 mg/kg; estimated concentration in maximum efficacy range [~200 nM]; see

Fig. 2), Ibuprofen (40 mg/kg) or vehicle (normal saline) was injected 10 min prior to IL-1 $\beta$  (5  $\mu$ g/kg). Rectal temperature was measured at different time points thereafter.

For arterial blood pressure (BP) measurements, lipopolysaccharide (LPS; 10 mg/kg) was injected intraperitoneally (ip) 20 min prior to 101.10 (1 mg/kg, ip) in Wild type and IL-1R<sup>-/-</sup> B6129S mice; the left carotid artery was catheterized with a polyethylene PE-10 catheter and BP was recorded using a Statham pressure transducer connected to a Gould recorder. BP measurement variations were recorded for an hour.

For intracerebroventricular injections, a burr hole was drilled through the skull 1.5 mm lateral to the midline and 1.2 mm posterior to the bregma on the right side. A 10 mm 20 gauge stainless steel hypodermic blunt needle was inserted 4-4.5 mm below the surface of the skull into the right lateral ventricle and secured to the skull with acrylic cement (280); EP<sub>3</sub> agonist M&B28767 was injected. The jugular vein was exposed as above. Animals were pre-treated with 101.10 (1 mg/kg iv) and administered intracerebroventricularly with an EP<sub>3</sub> agonist M&B28767 (2  $\mu$ l of 1  $\mu$ M solution; estimated concentration of 50 nM for cerebroventricular volume ~40  $\mu$ l (281)). Rectal temperature was monitored as described above.

#### *Trinitrobenzene sulphonic acid-induced model of inflammatory bowel disease*

The efficacy of 101.10 was tested on a model of colon inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). TNBS was administered intra-rectally to Sprague-Dawley rats anesthetized with 2% isoflurane (282, 283). Briefly, 120 mg/ml TNBS dissolved in 50% ethanol (vol/vol) was injected into the rectum/sigmoid colon (8 cm from anus) (total volume of 0.25 ml per rat [30 mg total]) via a polyethylene tubing (PE50). The control rat received 0.25 ml of vehicle (normal saline). Dexamethasone (0.75 mg/kg/day) (284), IL-1Ra (8 mg/kg/day) (285), and infliximab (10 mg/kg/day) (286) were injected intraperitoneally (within 15 min of TNBS) once a day, and 101.10 (1 mg/kg/day) twice a day. Some animals were also treated with intra-rectal 101.10 (1 mg/kg/day) to assess its efficacy upon local application to epithelium (which could also be of clinical interest).

Forty eight hours after administration of TNBS, rats were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation and colon removed and assessed for macroscopic observations (abdominal adhesions, faecal consistency, ulcerations and discoloration). Tissue was then rolled over ~10 cm length along its transverse axis, fixed and cut for histology; this enabled histological evaluation in the same tissue over a reasonable length (damage to surface epithelium, crypt distortion and ulcerations, neutrophil infiltration). Tissues were stained with hematoxylin and phloxin. Tissue injury was evaluated macroscopically and microscopically by three investigators blinded to treatment assignments, based on an adapted version of Peterson's scale (282); mean of scores was calculated for each animal.

Tissue neutrophil invasion was assessed by myeloperoxidase assay. Myeloperoxidase activity was determined as reported (287). Briefly, tissue specimens (200-400 mg) were homogenized 3 times (30 sec, 4 °C) in 50 mM phosphate buffer pH 6.0 with 0.5 % hexadecyltrimethylammonium bromide, sonicated for 10 sec, and exposed to 3 freeze-thaw cycles. Samples were centrifuged at 20,000g for 20 min. One hundred µl supernatant was diluted in 2.9 ml of 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 containing 526 µM of O-dianisidine hydrochloride. Enzymatic reaction was started with the addition of 0.0005% of peroxide. Myeloperoxidase activity was calculated by dividing the absorbance (460 nm at 25°C) change per min (total 5 min) with the extinction coefficient for *o*-dianisidine ( $\epsilon = 1.13 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), and was normalized to protein concentration; 1 unit myeloperoxidase activity was defined as that degrading one µmole of peroxide per min at 25°C. Values were presented as percent of those in TNBS-injected vehicle-treated (control) rats.

Wright stain was used for histological confirmation of inflammatory cell infiltration into tissues. Intestinal sections were mounted on slides covered with 750 µl of Wright staining solution (Fluka) for 1min, covered with 1.5 ml of distilled water for 2 min and finally washed with distilled water and mounted with Gel/Mount™ (Biomedica corp, Foster City, CA). Digital images of intestine were obtained (Nikon DXM 1200). Intestine total length and intact villi were measured with the Image-Pro

Plus software (5.1 version). The percentage of intact villi was evaluated by dividing the length of intact villi by the total intestinal length (288).

T lymphocytes were counted on intestinal sections incubated for 2 h at room temperature with anti-CD4 antibody (mouse anti-rat CD4, US Biological) diluted in PBS containing 0.4% Triton X-100 (Sigma, St. Louis MO), 1% bovine serum albumin (BSA, fraction V, MP Biomedicals, INC., USA), and counter-stained with a tagged secondary antibody (goat anti-mouse IgG, Molecular Probe). Intestinal sections were mounted and positive T cells counted (per mm<sup>2</sup>) on digitized images as reported (289).

#### *Phorbol myristate acetate-induced dermatitis*

The efficacy of 101.10 (applied topically) was assessed in a model of cutaneous inflammation induced with 0.05% phorbol myristate acetate (PMA) in acetone applied to ears of CD-1 mice, IL-1R knockout mice and wild type congeners B6129S (290). PMA was applied to both ears, while one ear was treated 45 min after PMA with 20 µl of different concentrations of 101.10 in PEG-400. Ear thickness was measured with a calliper. Forty two h after start of treatment Evans blue dye was injected intracardiac to determine capillary extravasation (see below), and 4 mm ear punches made and weighed. Ear punches were then minced and incubates in dimethyl formamide at 80°C for 3 h. Supernatant was centrifuged and absorbance measured at 620 nm with a background correction of 740 nm (291, 292), and normalized for tissue weight; concentration was determined from Evan's blue standard curve. PGE<sub>2</sub> was also measured in the tissue (see below).

#### *Western blots*

Western blots of p38, phospho-p38, JNK, phospho-JNK, Erk1/2, phospho-Erk1/2, I κB, phospho-IκB, and IL-1R were performed as previously described (293). Essentially rat thymocytes or microvascular endothelial cells were pre-incubated (45 min) at 37°C with the peptide 101.10 (10<sup>-7</sup>M), followed by 30 min incubation with IL-

1 $\beta$  50 pM), IL-6 (0.5 ng/ml) or IL-18 (100 ng/ml). Cells were then lysed, run on 12% SDS-PAGE and immunoblots were revealed with specific antibodies (Calbiochem, Santa Cruz, Cell Signalling) of total and phosphorylated proteins.

#### [<sup>3</sup>H] — thymidine incorporation

Cell proliferation was assessed by incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine as we described (294). Essentially human TF-1 cells were cultured in complete RPMI supplemented with GM-CSF (2 ng/ml; BD Biosource). Cells were deprived of growth factors for 18 h prior to pre-incubation with 101.10 followed by treatment with IL-1 $\beta$  (1 ng/ml). For IL-1 $\beta$  dose-response curves and Schild Plot conversion, cells were pre-incubated with a constant concentration of 101.10 and different concentrations of IL-1 $\beta$ . After 24 h [<sup>3</sup>H] — thymidine (1  $\mu$ Ci/well; Amersham) was added for another 24 h. Cells were harvested, washed four times with PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM pH 7,4) and lysed with 0.1 N NaOH/0.1% Triton-X100. Radioactivity was measured (Beckman Multi-Purpose Scintillation Coulter Counter LS6500).

#### PGE<sub>2</sub> concentrations

PGE<sub>2</sub> was measured in cell cultures, plasma and tissues as we described in detail (295). TF-1 cells were pre-incubated 45 min at 37°C with different concentrations of peptides or 9 nM of IL-Ra, afterwhich IL-1 $\beta$  (50 pM) was added to the medium. After 24 h incubation, PGE<sub>2</sub> was measured on growth medium. Measurement of PGE<sub>2</sub> in tissues and plasma was performed as follows. Ears were homogenized in cold indomethacin (10  $\mu$ M)-containing buffer, while plasma was collected in EDTA- and indomethacin (10  $\mu$ M)-containing tubes; both were passed through C18 columns afterwhich PGE<sub>2</sub> was measured by radioimmunoassay (Amersham).

### Radiolabelled ligand binding

Radiolabelled binding of cytokines was performed as comparably described (296, 297). Freshly isolated rat thymocytes ( $10^6$ ) were suspended in binding buffer (PBS, HEPES 10 mM, 0,02 %  $\text{NaN}_3$ , 0,05% gelatine and preincubated (20 min) with increasing concentrations of non-radiolabelled IL-1 $\beta$  or 101.10 followed by incubation with [ $^{125}$ I]IL-1 $\beta$  for 2 h at room temperature. Similarly, thymocytes were preincubated (20 min) with 101.10 ( $10^{-11}$  —  $10^{-6}$  M), afterwhich [ $^{125}$ I]101.10 (6 and 60 nM) was added. For saturation isotherms, freshly isolated thymocytes from B6129S wild type and IL-1RI knockout (-/-) mice were incubated with different concentrations of [ $^{125}$ I]101.10 (1 h) with and without a 1000-fold excess unlabelled peptide to determine specific binding for each concentration of [ $^{125}$ I]101.10; réaction volume was 100  $\mu$ l at 37 °C. Cells were washed 4 times with PBS buffer and lysed with 0.1 N NaOH/0.1% Triton-X100. Bound radioactivity was measured on cell lysates with a Packard Cobrall autogamma counter. Affinity and inhibitory constants were determined using the GraphPad Prism 4 software. To ascertain binding profiles performed in thymocytes (low number of IL-1 binding sites (298, 299), experiments were also conducted on NIH3T3 cells (~5,800 IL-1 binding sites/cell).

Binding of [ $^{125}$ I]101.10 to IL-1R-expressing cells was confirmed by cross-linking. IL-1R-expressing and deficient thymocytes ( $10^6$ ) were prepared as described above with [ $^{125}$ I]101.10 (100 nM) in absence or presence of 1 and 10  $\mu$ M unlabelled 101.10 for 45 min at 37°C (ascertaining equilibrium for peptide binding). The non-permeable cross-linker (Bis(sulfosuccinimidyl)suberate [BS3]; 11 Å) was then added to a final concentration of 2.5 mM and samples were incubated at 4°C for 30 min to minimize active internalization of BS3 (300) (Pierce). The reaction was quenched with 20 mM TRIS pH 7.5 for 15 min at room temperature. Cells were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, lysed for 30 min on ice (150  $\mu$ l RIPA buffer), and electrophoresed on SDS-PAGE under non-reducing conditions. Autoradiography and Western Blot analysis with anti-IL-1R antibody were then performed.

**Data analyses**

Results were analyzed by one- or two-way analysis of variance factoring for concentration or treatments. Post-anova comparisons among means were performed using the Tukey-Kramer method. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### Peptides and screening of efficacy

Using the rationale presented above regarding intramolecular peptides that interfere with actions of the protein of interest (77, 81, 83, 85, 267-269) we identified extracellular regions of the IL-1RacP reported to interact with IL-1RI subunit (1ITB). Fifteen corresponding homologous peptides (all d-octa-deca, sense [NH<sub>3</sub>-COOH] and anti-sense [COOH-NH<sub>3</sub>]) were designed based on crystallography and modeling data (155, 169), which were supported by hydrophobic and flexibility profiles as well as homology domains using computational analysis (ProDom (278), PROSITE (76), Predict Protein (76), ProtScale (279)); BLAST analysis was coherent with selectivity of peptides for IL-1RacP. IL-1RacP regions chose exhibited interspecies homology for human, rat and mouse. Screening of peptide efficacy was performed on IL-1-induced PGE<sub>2</sub> formation. Four of the peptides (termed 103, 106, 108 and 101.10 [all d-]) (0.1 μM) derived from regions of the IL-1RacP depicted in Fig. 1 and presented in Table I effectively inhibited PGE<sub>2</sub> formation to varying degrees (Fig. 2A). Interestingly, IL-1-induced p38 phosphorylation was only inhibited by 101.10 (rytvela) and as expected by human recombinant IL-1ra (Fig 2A); whereas 103 and 108 increased p38 phosphorylation, and 106 was ineffective, consistent with possible allosteric modulation of receptor signalling by 103, 106 and 108 (169, 301). Since 101.10 was reproducibly effective even in inhibiting IL-1-induced IκB phosphorylation (data not shown) and exhibited high potency (see below), we decided to focus and further characterize this small heptapeptide (0.8 kDa).

### Efficacy and potency of 101.10

Compilation of data reveals that 101.10 inhibited dose-dependently IL-1-induced PGE<sub>2</sub> formation (IC<sub>50</sub> = 0.5 nM; E<sub>max</sub> ≈ 50%, consistent with screening) and IL-1-induced human thymocyte (TF-1 cell) proliferation (IC<sub>50</sub> = 2 nM; E<sub>max</sub> ≥ 90%) (Fig. 2B). Similar effects were observed in a different IL-1-responsive cell type,

specifically microvascular endothelial cells; scrambled peptide (verytla) was ineffective.

$[^{125}\text{I}]101.10$  bound specifically in a saturable manner with an affinity constant ( $K_D$ ) of 5 nM only to thymocytes containing IL-1RI (from wild type animals) but hardly to those from IL-1R<sup>-/-</sup> animals (Fig. 3A,B). Binding of  $[^{125}\text{I}]101.10$  to IL-1RI-expressing thymocytes using 11 Å BS3 cross-linker was confirmed by autoradiogram; immunoblot overlay coincided with IL-1RI and IL-1RI/IL-1RacP complex (non-reducing conditions; Fig. 3C); more importantly, no  $[^{125}\text{I}]101.10$  cross-linking was detected on autoradiogram in cells devoid of IL-1RI.

We next determined if effects of 101.10 inhibited IL-1-induced TF-1 cell proliferation in a competitive or non-competitive manner. TF-1 cell proliferation was studied in cells pre-treated with different concentrations of 101.10 in presence of increasing concentrations of IL-1. 101.10 diminished maximum TF-1 proliferation induced by IL-1 with an estimated  $pA_2$  value of 5 nM (101.10 concentration needed to double  $EC_{50}$ ), and augmented in a saturable manner its  $EC_{50}$  by 100-fold; accordingly, a plateaued Schild plot was detected (Fig. 4A), indicative of non-competitive effects of 101.10 on IL-1-induced effects. In line with these observations, 101.10 marginally displaced bound  $[^{125}\text{I}]IL-1$  (Fig. 4B); consistently, bound  $[^{125}\text{I}]101.10$  was displaceable by (unlabelled) 101.10 (inhibitory constant  $K_i=4$  nM) (Fig. 4C), but hardly by IL-1 (not shown). Importantly, 101.10 diminished IL-1 binding affinity by increasing the  $K_i$  (on  $[^{125}\text{I}]IL-1$ -pre-bound cells) by approximately 13-16-fold in thymocytes (Fig. 4D) as well as in NIH3T3 which contain approximately 5,500 101.10 binding sites/cell (8% non-specific binding) (Fig. 4E); this strongly suggested that 101.10 modulated IL-1 binding affinity.

#### Selectivity of 101.10

Selectivity of 101.10 was further tested on effects of homologous cytokine of the IL-1 family, namely IL-18, as well as on other pro-inflammatory cytokines such as IL-6. IL-18-induced respectively TNF $\alpha$ - and lipopolysaccharide-dependent JNK and p38 phosphorylation were unaffected by 101.10 (Fig. 5A). Likewise, IL-6-induced Erk-1/2 phosphorylation was unaltered by 101.10 (Fig. 5A).

IL-1 causes hyperthermia via formation of prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> that in turn activates its EP<sub>3</sub> receptor (184, 302). We tested if this effect can be attenuated by 101.10. IL-1 caused a ~1°C increase in core temperature associated with a rise in PGE<sub>2</sub> plasma levels (Fig. 5B). 101.10 (1 mg/kg; estimated concentration in maximum efficacy range [~200 nM]) markedly diminished IL-1-induced peak hyperthermia and attenuated the associated rise in plasma PGE<sub>2</sub> in rat (Fig. 5B). As expected the prostaglandin synthase inhibitor ibuprofen (40 mg/kg, as we have shown to inhibit PGE<sub>2</sub> formation (295)) also diminished IL-1-induced hyperthermia (Fig. 5C). To ascertain that observed effects of 101.10 *in vivo* were not mediated via another relevant receptor, namely EP<sub>3</sub>, animals were treated with EP<sub>3</sub>-selective agonist PGE<sub>2</sub> analog M&B28767 (303) in absence and presence of 101.10. M&B28767-induced a comparable hyperthermia, which was unaffected by 101.10, consistent with *in vitro* selectivity of 101.10 (Figs. 3, 5A).

IL-1 is also known to contribute to systemic hypotension secondary to bacterial endotoxins such as LPS (304). We tested the effects of 101.10 in wild type and IL-1RI<sup>-/-</sup> animals. LPS caused a (maximum) 35% decrease in mean blood pressure (MBP) of wild type mice; 101.10 pretreatment attenuates the drop in MBP to 15 % (Fig. 5D), without affecting baseline (~100 mm Hg). IL-1RI<sup>-/-</sup> mice have a nearly identical baseline MBP to wild type animals. In IL-1RI<sup>-/-</sup> mice LPS caused a decrease in MBP similar to that seen in 101.10-treated wild type mice; 101.10 did not further affect MBP in IL-1RI-deficient animals treated with LPS (Fig. 5D). Data further substantiate *in vivo* specificity of 101.10.

#### In vivo efficacy of 101.10 in animal models of inflammatory conditions

IL-1 contributes significantly to numerous inflammatory conditions such as inflammatory bowel disease (196, 305) and contact dermatitis (306) including respectively in the trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced model of inflammatory bowel disease (307) and phorbol ester-induced dermatitis (308). Intra-sigmoidal TNBS caused pronounced inflammation of intestinal mucosa and submucosa

at 48 h, as revealed by destruction of epithelium, crypts and submucosal region, associated with invasion of inflammatory cells (Fig. 6B). 101.10 dose-dependently improved preservation of intestinal integrity during this hyper-acute phase of inflammatory destruction by TNBS, and its effects were significantly superior to dexamethasone (Fig. 6 G and Table II); the scrambled peptide was ineffective. Interestingly, focus on microscopic evaluation of villus integrity (the most important overall criteria) (Fig. 6G), T-cell abundance (Fig. 6H-K), and myeloperoxidase activity (which reflects neutrophil infiltration) (Table II), suggested superior efficacy of 101.10 (non-competitive IL-1RI inhibitor [Fig. 4]) over the competitive inhibitor IL-1ra (265); Fig. 6G). In addition, 12 h after administration of the pro-inflammatory irritant TNBS, systemic treatment with 101.10 was also found to diminish mucosal and submucosal destruction, albeit without affecting myeloperoxidase activity (Table II), likely because of insufficient time to clear invading neutrophils, which are however less cytotoxic during inhibition of IL-1RI. Interestingly, pre-treatment with intra-rectal 101.10 (1 mg/kg/day) also attenuated the index of neutrophil invasion (myeloperoxidase activity) to  $56 \pm 9\%$  of control values ( $p < 0.05$ ).

Because of transepithelial (rectal) efficacy of 101.10 in TNBS-induced model of gut inflammation, we proceeded to verify the efficacy of topical 101.10 in a model of cutaneous inflammation induced by PMA; topical application of phorbol esters such as PMA induces an acute inflammatory reaction contributed by IL-1 (308). 101.10 (in PEG-400) applied twice a day to PMA-treated ears of CD-1 mice diminished dose- and time-dependently redness and edema formation measured by ear thickness and ear weight (estimated  $EC_{50} \approx 10$  nM; Fig. 7). These observations were consistent with a dose-dependent reduction in capillary extravasation (measured by Evan's Blue tissue concentration) and a decrease in tissue  $PGE_2$  concentrations (Fig. 7C); topical IL-1ra was ineffective (not shown), as usually expected with proteins. Finally, parameters of PMA-induced edema (ear weight and thickness [latter not shown]) were (as expected) diminished in IL-1RI<sup>-/-</sup> animals to levels approaching those after 101.10 in wild type mice; 101.10 was ineffective in IL-1RI<sup>-/-</sup> animals (Fig. 7E).

### Discussion

Based on evidence that IL-1RacP interacts with the IL-1R subunit of the IL-1RI receptor complex (169) and that recombinant extracellular portion of IL-1RacP can interfere with IL-1RI actions (276), we designed peptides that reproduce various relevant IL-1RacP regions. Of these one small heptapeptide, termed 101.10, was found to be particularly effective in inhibiting IL-1-induced effects *in vitro*, although not necessarily fully (as seen with PGE<sub>2</sub>). 101.10 was a potent, selective and reversible non-competitive inhibitor of IL-1RI, and also exhibited modulatory properties, notably by not interacting with the ligand binding (orthosteric) site albeit by affecting IL-1 binding affinity and by interfering variably with different *in vitro* responses to IL-1. These features distinguish it from the large molecule competitive inhibitor IL-1ra (309). Consistent with IL-1-induced *in vitro* and *in vivo* (specifically hyperthermia) effects, 101.10 displayed effective anti-inflammatory capacity in acute inflammatory conditions involving IL-1. Findings describe a new small unprecedented non-competitive antagonist of IL-1RI with valuable and increasingly desirable modulatory pharmacologic properties, consistent with those of an allosteric negative modulator which exhibits functional selectivity (266), (61, 310-314).

The peptides we designed arose from loops and inter-domain regions of the IL-1RacP (Fig. 1) and possess high flexibility profiles, enabling interaction with the IL-1RI subunit (169), which requires appropriate conformational changes. Primary sequence peptides reproducing specific protein regions have successfully been used to interfere with the effects of various receptors (77, 83, 85, 267, 268, 315), and the effects of such peptides coincide with those of specific corresponding mutations (228, 316). Because these regions of interest are often remote from the natural ligand binding site (orthosteric site), derived molecules are non-competitive and can modulate ligand binding affinity; these features are in line with characteristics of allosteric modulators (311, 317-319), and based on data presented, apply to 101.10. 101.10 binds specifically to IL-1R (including after cross-linking [11 Å]) but not to the IL-1 binding site, and accordingly is a non-competitive antagonist (272),(273) of IL-1-induced effects (Figs.

3 and 4); because 101.10 appears to modulate (rather than totally interfere with) IL-1 binding to the IL-1RI (Fig. 4D,E), which in turn facilitates complex formation with IL-1RacP (263), 101.10 can partly but not necessarily fully dissociate the complex, as suggested by cross-linking of [<sup>125</sup>I]101.10 to the IL-1RI/IL-1RacP complex (Fig. 3C). The non-competitive property of 101.10 on IL-1-induced actions is further substantiated by the inability of increasing concentrations of IL-1 to overcome antagonist effects of 101.10 on IL-1-induced TF-1 proliferation, which is correspondingly reflected in plateauing of the Schild plot (Fig. 4A); in contrast, orthosteric antagonism by definition can be overcome by increasing concentrations of the natural ligand (88).

Another feature observed with allosteric modulators relates to their ability to modulate ligand binding affinity; this was also seen with 101.10 which diminished binding affinity of IL-1 as revealed by the right shift of the curve of [<sup>125</sup>I]IL-1 displacement by IL-1 (Fig. 4D). The magnitude of change in both affinity and efficacy induced by such a receptor modulator is indicative of conformational modifications represented by the cooperativity constant  $\alpha$  - a measure of how the orthosteric and allosteric ligand perceive each other (29, 61, 228). Crystallographic analyses of protein complexes often fail to detect small conformational changes ( $\leq 2$  Å) which may have profound effects on receptor function and are more readily appreciated by pharmacological binding and efficacy profiles (44). The  $\alpha$  constant for 101.10 to induce a two-fold shift of the IL-1-induced proliferation dose-response was positive but below a value of 1, which again suggests non-competitive negative modulation on IL-1 potency towards its receptor (320). Altogether, one notes that 101.10 moderately decreases binding affinity of IL-1 but markedly depresses (some of) its function (Fig. 4); these observations contrast with those of orthosteric (competitive) inhibitors where changes in ligand binding somewhat correspond to those in function (310, 311, 321).

As alluded to above specific mutations (228, 322) or small molecules can affect some but not all functions evoked by a receptor (323-325). This property is referred to as pharmacological permissivity (61, 266, 311). This concept also appears to apply to 101.10, which partially inhibited IL-1-induced PGE<sub>2</sub> production but fully antagonized

p38 (Fig. 2); this paradigm is further illustrated with peptides arising from other IL-1RacP regions (Fig. 1), namely 103, 106 and 108, which affected differently IL-1-induced PGE<sub>2</sub> and p38 phosphorylation (Fig. 2). This functional selectivity is made possible by ligands which bind in ways that affect the dynamic conformation of the receptor to interact with its natural ligand and associated proteins needed to activate normal signalling pathways (61, 320, 321); hence, such ligands can alter signalling modalities (272), which may confer greater selectivity (273) and reduce side effects (311), compared to orthosteric antagonists which disable all functions triggered by the receptor. These features seem to apply to 101.10 in line with what has lately been reported by other (non-cytokine) receptors (323-326).

In agreement with its specific anti-IL-1RI actions *in vitro*, 101.10 exerted corresponding effects *in vivo* by curtailing IL-1-induced hyperthermia and hypotension (Fig. 5). Given the dominant role of IL-1 in acute bouts of inflammation a contribution for IL-1 in models of inflammatory conditions is also anticipated (260, 307, 308). Indeed, colon inflammation is characterized by a Th1 response, with high levels of IL-12, IL-6, IL-18, TNF $\alpha$ , and IL-1, mostly produced by monocytes and macrophages (327, 328). In skin, IL-1 is mainly found in keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells, and is a sequestered pool ready to be released upon injury (329). 101.10 was effective in *in vivo* models of inflammatory conditions, as demonstrated in two distinct models of inflammation induced in gut by TNBS and on cutaneous tissue by PMA (Table II; Figs. 6 & 7), consistent with reported efficacy of IL-1ra in analogous models (330-333). In contrast to genetically intact animals, 101.10 was ineffective on IL-1-dependent physiologic and inflammatory parameters induced in IL-1RI<sup>-/-</sup> mice (Figs. 5 and 7), consistent with its specificity (Figs. 3 and 5).

In summary, we hereby document the discovery and pharmacological properties of a small stable (d-) peptide antagonist of IL-1RI, namely 101.10, which is rationally derived from an extracellular loop region of IL-1RacP (see Fig. 1) and exhibits properties consistent with those of an allosteric negative modulator. As a competitive inhibitor of IL-1, IL-1ra interferes with all actions of IL-1RI, including desirable ones related to innate immunity, and hence increases the risk of cancer and

seemingly of infections [85]. In this report we have described the first small molecule (peptide) antagonist of a cytokine receptor, notably of IL-1RI, which seems to integrate allosteric modulatory properties; 101.10 is specific, potent and effective *in vitro* and *in vivo* in (IL-1-implicated) models of inflammation after systemic and topical applications. Since 101.10 appears to some extent more effective than the competitive antagonist IL-1ra in *in vivo* inflammatory conditions (Table II and Fig. 6), 101.10 (and small like-compounds) could present therapeutic benefits, including those pertaining to simpler modes of administration (eg. transepithelial; Fig. 7) , and likely costs; moreover pharmacologically, they expose new and interesting properties (notably functional selectivity) in countering undesired exaggerated IL-1-elicited inflammation.

#### Acknowledgments,

We thank Hendrika Fernandez for technical assistance.

## References

1. McCulloch, C.A., G.P. Downey, and H. El-Gabalawy. 2006. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 5:864-876.
2. Kavanaugh, A. 2006. Anakinra (interleukin-1 receptor antagonist) has positive effects on function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *Adv Ther* 23:208-217.
3. Mee, J.B., M.J. Cork, F.S. di Giovine, G.W. Duff, and R.W. Groves. 2006. Interleukin-1: a key inflammatory mediator in psoriasis? *Cytokine* 33:72-78.
4. Dower, S.K., J.E. Sims, T.H. Stanton, J. Slack, C.J. McMahan, M.A. Valentine, and K. Bomsztyk. 1990. Molecular heterogeneity of interleukin-1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* 594:231-239.
5. Dinarello, C.A., S. Gatti, and T. Bartfai. 1999. Fever: links with an ancient receptor. *Curr Biol* 9:R147-150.
6. Arend, W.P. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 54:167-227.
7. Urban, J.D., W.P. Clarke, M. von Zastrow, D.E. Nichols, B. Kobilka, H. Weinstein, J.A. Javitch, B.L. Roth, A. Christopoulos, P.M. Sexton, K.J. Miller, M. Spedding, and R.B. Mailman. 2007. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1-13.
8. Zhou, N., Z. Luo, J. Luo, X. Fan, M. Cayabyab, M. Hiraoka, D. Liu, X. Han, J. Pesavento, C.Z. Dong, Y. Wang, J. An, H. Kaji, J.G. Sodroski, and Z. Huang. 2002. Exploring the stereochemistry of CXCR4-peptide recognition and inhibiting HIV-1 entry with D-peptides derived from chemokines. *J Biol Chem* 277:17476-17485.
9. McDonnell, J.M., A.J. Beavil, G.A. Mackay, B.A. Jameson, R. Korngold, H.J. Gould, and B.J. Sutton. 1996. Structure based design and characterization of peptides that inhibit IgE binding to its high-affinity receptor. *Nat Struct Biol* 3:419-426.
10. Chalifour, R.J., R.W. McLaughlin, L. Lavoie, C. Morissette, N. Tremblay, M. Boule, P. Sarazin, D. Stea, D. Lacombe, P. Tremblay, and F. Gervais. 2003. Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem* 278:34874-34881.
11. Zhang, T.T., B. Cui, D.Z. Dai, and X.Y. Tang. 2005. Pharmacological efficacy of CPU 86017 on hypoxic pulmonary hypertension in rats: mediated by direct inhibition of calcium channels and antioxidant action, but indirect effects on the ET-1 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:727-734.
12. Peri, K.G., C. Quiniou, X. Hou, D. Abran, D.R. Varma, W.D. Lubell, and S. Chemtob. 2002. THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* 26:389-397.
13. Hebert, T.E., S. Moffett, J.P. Morello, T.P. Loisel, D.G. Bichet, C. Barret, and M. Bouvier. 1996. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271:16384-16392.

14. Gusic, R.J., M. Petko, R. Myung, J. William Gaynor, and K.J. Gooch. 2005. Mechanical properties of native and ex vivo remodeled porcine saphenous veins. *J Biomech* 38:1770-1779.
15. Slingsby, C., O.A. Bateman, and A. Simpson. 1993. Motifs involved in protein-protein interactions. *Mol Biol Rep* 17:185-195.
16. Casadio, R., E. Frigimelica, P. Bossu, D. Neumann, M.U. Martin, A. Tagliabue, and D. Boraschi. 2001. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett* 499:65-68.
17. Tan, D.C., R.M. Kini, S.D. Jois, D.K. Lim, L. Xin, and R. Ge. 2001. A small peptide derived from Flt-1 (VEGFR-1) functions as an angiogenic inhibitor. *FEBS Lett* 494:150-156.
18. Presland, J. 2005. Identifying novel modulators of G protein-coupled receptors via interaction at allosteric sites. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8:567-576.
19. Lazareno, S. 2004. Determination of allosteric interactions using radioligand-binding techniques. *Methods Mol Biol* 259:29-46.
20. Murali, R., X. Cheng, A. Berezov, X. Du, A. Schon, E. Freire, X. Xu, Y.H. Chen, and M.I. Greene. 2005. Disabling TNF receptor signaling by induced conformational perturbation of tryptophan-107. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10970-10975.
21. Anderson, M.E., B.A. Tejo, T. Yakovleva, and T.J. Siahaan. 2006. Characterization of binding properties of ICAM-1 peptides to LFA-1: inhibitors of T-cell adhesion. *Chem Biol Drug Des* 68:20-28.
22. Smeets, R.L., L.A. Joosten, O.J. Arntz, M.B. Bennink, N. Takahashi, H. Carlsen, M.U. Martin, W.B. van den Berg, and F.A. van de Loo. 2005. Soluble interleukin-1 receptor accessory protein ameliorates collagen-induced arthritis by a different mode of action from that of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 52:2202-2211.
23. Labow, M., D. Shuster, M. Zetterstrom, P. Nunes, R. Terry, E.B. Cullinan, T. Bartfai, C. Solorzano, L.L. Moldawer, R. Chizzonite, and K.W. McIntyre. 1997. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* 159:2452-2461.
24. Vigers, G.P., L.J. Anderson, P. Caffes, and B.J. Brandhuber. 1997. Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature* 386:190-194.
25. Boeckmann, B., A. Bairoch, R. Apweiler, M.C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M.J. Martin, K. Michoud, C. O'Donovan, I. Phan, S. Pilbout, and M. Schneider. 2003. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* 31:365-370.
26. Rost, B., P. Fariselli, and R. Casadio. 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* 5:1704-1718.
27. Kyte, J., and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132.
28. Isbil-Buyukcoskun, N., G. Gulec, K. Ozluk, and I.H. Ulus. 2001. Central injection of captopril inhibits the blood pressure response to intracerebroventricular choline. *Braz J Med Biol Res* 34:815-820.

29. Brault, S., A.K. Martinez-Bermudez, A.M. Marrache, F. Gobeil, Jr., X. Hou, M. Beauchamp, C. Quiniou, G. Almazan, C. Lachance, J. Roberts, 2nd, D.R. Varma, and S. Chemtob. 2003. Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Iso-prostaglandin F2alpha: possible role in ischemic brain injury. *Stroke* 34:776-782.
30. Peterson, T.C., C.E. Cleary, A.M. Shaw, D.A. Malatjalian, and S.J. Veldhuyzen van Zanten. 2000. Therapeutic role for bismuth compounds in TNBS-induced colitis in the rat. *Dig Dis Sci* 45:466-473.
31. Strober, W. 1985. Animal models of inflammatory bowel disease--an overview. *Dig Dis Sci* 30:3S-10S.
32. Stein, J., J. Ries, and K.E. Barrett. 1998. Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: possible role of mast cells. *Am J Physiol* 274:G203-209.
33. Sandberg, J.O., D.L. Eizirik, and S. Sandler. 1997. IL-1 receptor antagonist inhibits recurrence of disease after syngeneic pancreatic islet transplantation to spontaneously diabetic non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 108:314-317.
34. Zwerina, J., S. Hayer, M. Tohidast-Akrad, H. Bergmeister, K. Redlich, U. Feige, C. Dunstan, G. Kollias, G. Steiner, J. Smolen, and G. Schett. 2004. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 50:277-290.
35. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson. 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87:1344-1350.
36. Nadeau, S., and S. Rivest. 2002. Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14. *J Immunol* 169:3370-3381.
37. Tomonari, K. 1988. A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28:455-458.
38. Rauschmayr, T., R.W. Groves, and T.S. Kupper. 1997. Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5814-5819.
39. Wamberg, S., N.C. Sandgaard, and P. Bie. 2002. Simultaneous determination of total body water and plasma volume in conscious dogs by the indicator dilution principle. *J Nutr* 132:1711S-1713S.
40. Dombrowicz, D., V. Flamand, I. Miyajima, J.V. Ravetch, S.J. Galli, and J.P. Kinet. 1997. Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* 99:915-925.
41. Gobeil, F., A. Fortier, T. Zhu, M. Bossolasco, M. Leduc, M. Grandbois, N. Heveker, G. Bkaily, S. Chemtob, and D. Barbaz. 2006. G-protein-coupled

- receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol* 84:287-297.
42. Fan, L., W.V. Yotov, T. Zhu, L. Esmailzadeh, J.S. Joyal, F. Sennlaub, N. Heveker, S. Chemtob, and G.E. Rivard. 2005. Tissue factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties. *J Thromb Haemost* 3:1056-1063.
  43. Li, D.Y., P. Hardy, D. Abran, A.K. Martinez-Bermudez, A.M. Guerguerian, M. Bhattacharya, G. Almazan, R. Menezes, K.G. Peri, D.R. Varma, and S. Chemtob. 1997. Key role for cyclooxygenase-2 in PGE2 and PGF2alpha receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am J Physiol* 273:R1283-1290.
  44. Banks, W.A. 1999. Characterization of interleukin-1alpha binding to mouse brain endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 291:665-670.
  45. Marrache, A.M., F. Gobeil, Jr., S.G. Bernier, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, S. Choufani, G. Bkaily, A. Bourdeau, M.G. Sirois, A. Vazquez-Tello, L. Fan, J.S. Joyal, J.G. Filep, D.R. Varma, A. Ribeiro-Da-Silva, and S. Chemtob. 2002. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* 169:6474-6481.
  46. Takeuchi, M., S. Nagai, H. Nakada, H. Aung, N. Satake, H. Kaneshima, and T. Izumi. 1992. Characterization of IL-1 inhibitory factor released from human alveolar macrophages as IL-1 receptor antagonist. *Clin Exp Immunol* 88:181-187.
  47. Howe, R.C., J.W. Lowenthal, and H.R. MacDonald. 1986. Role of interleukin 1 in early T cell development: Lyt-2-L3T4- thymocytes bind and respond in vitro to recombinant IL 1. *J Immunol* 137:3195-3200.
  48. Cox, G.W., B.J. Mathieson, S.L. Giardina, and L. Varesio. 1990. Characterization of IL-2 receptor expression and function on murine macrophages. *J Immunol* 145:1719-1726.
  49. Gao, Z.G., S.K. Kim, A.P. Ijzerman, and K.A. Jacobson. 2005. Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. *Mini Rev Med Chem* 5:545-553.
  50. Lazarus, M. 2006. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol Nutr Food Res* 50:451-455.
  51. Romanovsky, A.A., M.C. Almeida, D.M. Aronoff, A.I. Ivanov, J.P. Konsman, A.A. Steiner, and V.F. Turek. 2005. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci* 10:2193-2216.
  52. Boie, Y., R. Stocco, N. Sawyer, D.M. Slipetz, M.D. Ungrin, F. Neuschafer-Rube, G.P. Puschel, K.M. Metters, and M. Abramovitz. 1997. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 340:227-241.
  53. Gardiner, S.M., P.A. Kemp, J.E. March, J. Woolley, and T. Bennett. 1998. The influence of antibodies to TNF-alpha and IL-1beta on haemodynamic responses to the cytokines, and to lipopolysaccharide, in conscious rats. *Br J Pharmacol* 125:1543-1550.

54. Rogler, G., and T. Andus. 1998. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 22:382-389.
55. Maeda, S., L.C. Hsu, H. Liu, L.A. Bankston, M. Iimura, M.F. Kagnoff, L. Eckmann, and M. Karin. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307:734-738.
56. Corsini, E., and C.L. Galli. 1998. Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett* 102-103:277-282.
57. Galvez, J., M. Garrido, M.E. Rodriguez-Cabezas, I. Ramis, F.S. de Medina, M. Merlos, and A. Zarzuelo. 2003. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. *Inflamm Bowel Dis* 9:363-371.
58. Ha, H.Y., Y. Kim, Z.Y. Ryoo, and T.Y. Kim. 2006. Inhibition of the TPA-induced cutaneous inflammation and hyperplasia by EC-SOD. *Biochem Biophys Res Commun* 348:450-458.
59. Carter, D.B., M.R. Deibel, Jr., C.J. Dunn, C.S. Tomich, A.L. Laborde, J.L. Slightom, A.E. Berger, M.J. Bienkowski, F.F. Sun, R.N. McEwan, and et al. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344:633-638.
60. Kenakin, T., and O. Onaran. 2002. The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference? *Trends Pharmacol Sci* 23:275-280.
61. Kenakin, T. 2004. Allosteric modulators: the new generation of receptor antagonist. *Mol Interv* 4:222-229.
62. Kenakin, T. 2004. G-protein coupled receptors as allosteric machines. *Receptors Channels* 10:51-60.
63. Kenakin, T. 2004. Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25:186-192.
64. Kenakin, T. 2004. Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* 65:2-11.
65. Kenakin, T. 2005. New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* 4:919-927.
66. Gonzalez-Ruiz, D., and H. Gohlke. 2006. Targeting protein-protein interactions with small molecules: challenges and perspectives for computational binding epitope detection and ligand finding. *Curr Med Chem* 13:2607-2625.
67. May, L.T., K. Leach, P.M. Sexton, and A. Christopoulos. 2007. Allosteric modulation of g protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:1-51.
68. Miedlich, S.U., L. Gama, K. Seuwen, R.M. Wolf, and G.E. Breitwieser. 2004. Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site. *J Biol Chem* 279:7254-7263.
69. Kenakin, T., S. Jenkinson, and C. Watson. 2006. Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 319:710-723.

70. Lukong, K.E., M.A. Elsliger, J.S. Mort, M. Potier, and A.V. Pshezhetsky. 1999. Identification of UDP-N-acetylglucosamine-phosphotransferase-binding sites on the lysosomal proteases, cathepsins A, B, and D. *Biochemistry* 38:73-80.
71. Xie, Y., S.M. Massa, S.E. Ensslen-Craig, D.L. Major, T. Yang, M.A. Tisi, V.D. Derevyanny, W.O. Runge, B.P. Mehta, L.A. Moore, S.M. Brady-Kalnay, and F.M. Longo. 2006. Protein-tyrosine phosphatase (PTP) wedge domain peptides: a novel approach for inhibition of PTP function and augmentation of protein-tyrosine kinase function. *J Biol Chem* 281:16482-16492.
72. Ehlert, F.J. 2005. Analysis of allosterism in functional assays. *J Pharmacol Exp Ther* 315:740-754.
73. Koshland, D.E., Jr. 1998. Conformational changes: how small is big enough? *Nat Med* 4:1112-1114.
74. Christopoulos, A. 2002. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1:198-210.
75. Christopoulos, A., L.T. May, V.A. Avlani, and P.M. Sexton. 2004. G-protein-coupled receptor allosterism: the promise and the problem(s). *Biochem Soc Trans* 32:873-877.
76. Hemstapat, K., M.T. Smith, and G.R. Monteith. 2004. Measurement of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured rat embryonic hippocampal neurons using a fluorescence microplate reader: potential application to biomolecular screening. *J Pharmacol Toxicol Methods* 49:81-87.
77. Maillet, E.L., N. Pellegrini, C. Valant, B. Bucher, M. Hibert, J.J. Bourguignon, and J.L. Galzi. 2007. A novel, conformation-specific allosteric inhibitor of the tachykinin NK2 receptor (NK2R) with functionally selective properties. *Faseb J*
78. Rodriguez, A.L., Y. Nong, N.K. Sekaran, D. Alagille, G.D. Tamagnan, and P.J. Conn. 2005. A close structural analog of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine acts as a neutral allosteric site ligand on metabotropic glutamate receptor subtype 5 and blocks the effects of multiple allosteric modulators. *Mol Pharmacol* 68:1793-1802.
79. Lysikova, M., Z. Havlas, and S. Tucek. 2001. Interactions between allosteric modulators and 4-DAMP and other antagonists at muscarinic receptors: potential significance of the distance between the N and carboxyl C atoms in the molecules of antagonists. *Neurochem Res* 26:383-394.
80. Litschig, S., F. Gasparini, D. Rueegg, N. Stoehr, P.J. Flor, I. Vranesic, L. Prezeau, J.P. Pin, C. Thomsen, and R. Kuhn. 1999. CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol Pharmacol* 55:453-461.
81. Neurath, M.F. 2000. Immunotherapy of inflammatory bowel diseases: current concepts and future perspectives. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48:81-84.
82. Kim, H.S., and A. Berstad. 1992. Experimental colitis in animal models. *Scand J Gastroenterol* 27:529-537.
83. Hauser, C., J.H. Saurat, A. Schmitt, F. Jaunin, and J.M. Dayer. 1986. Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J Immunol* 136:3317-3323.

84. Kondo, S., B.P. Barna, T. Morimura, J. Takeuchi, J. Yuan, A. Akbasak, and G.H. Barnett. 1995. Interleukin-1 beta-converting enzyme mediates cisplatin-induced apoptosis in malignant glioma cells. *Cancer Res* 55:6166-6171.
85. Kondo, S., S. Pastore, H. Fujisawa, G.M. Shivji, R.C. McKenzie, C.A. Dinarello, and D.N. Sauder. 1995. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 105:334-338.
86. Zhu, F., J. Qian, G. Pan, and S. Quan. 1998. [The effect of interleukin-1 beta interleukin-8 in the pathogenesis of experimental colitis and evaluation of interleukin-1 receptor antagonist therapy]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 20:388-394.
87. Ricci, S., G. Macchia, P. Ruggiero, T. Maggi, P. Bossu, L. Xu, D. Medaglini, A. Tagliabue, L. Hammarstrom, G. Pozzi, and D. Boraschi. 2003. In vivo mucosal delivery of bioactive human interleukin 1 receptor antagonist produced by *Streptococcus gordonii*. *BMC Biotechnol* 3:15.
88. Matthews, J.C. 1993. *Fundamentals of Receptor, Enzyme and Transport Kinetics*, 1<sup>st</sup> ed. CRC Press eds. Boca Raton, Fl. 63-94.

## Footnotes,

This study was supported in part by grants from Valorisation Recherche Québec and the Canadian Institute of Health Research (CIHR). S. Chemtob is recipient of a Canada Research Chair in perinatology and N Heveker a Scientist Award from CIHR. C Quiniou, P Sapieha, S Brault, M Beauchamp, M Leduc and J-S Joyal are recipients of fellowships/studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada (CQ, PS, ML), CIHR (SB, MB) and the Canadian Child Health Clinician Scientist Program-CIHR (J-SJ).

1. \*Dr. Sylvain Chemtob PhD, MD. FRCPC

Ste-Justine Hospital Research Centre

University of Montreal

3175 Cote-Ste-Catherine

Montreal, Quebec

H3T 1C5

## Abbreviations:

TNBS: 2,4, 6-Trinitrobenzanesulfonic acide

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

MB28767 : (+) -15? — Hydroxy-9-oxo-16-phenoxy-17, 18,19, 20-tetranorprost-13-trans-enoic acide

Legends

**Figure 1. A) Ribbon-like model of IL-1RI (1ITB), IL-1 and IL-1RacP and identification of regions of derived effective peptides.** B) Primary sequence of the IL-1RacP. Colored sequences refer to corresponding loops indicated on the (A) panel; blues : 101.10, turquoise : 108, green: 106, red: 103.

**Figure 2. *In vitro* efficacy of IL-1RacP-derived peptides.** A) Effects of peptides (0.1  $\mu$ M) and IL-1ra (9 nM) on IL-1 (50 pM) — induced PGE<sub>2</sub> formation and p38 phosphorylation on human TF-1 cells. Value on top of p38 gels refer to time (min). Values are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments each performed in duplicate; \*  $p < 0.01$  compared to IL-1-induced. B) Dose response of 101.10 and scrambled peptide (verytla) on IL-1 (1 ng/ml)-induced PGE<sub>2</sub> synthesis and cell proliferation in human TF-1. Values are mean  $\pm$  SEM of 8 experiments each performed in duplicate; \*  $p < 0.01$  compared to scrambled peptide or  $10^{-13}$  M 101.10 concentration (ANOVA).

**Figure 3. Binding of [<sup>125</sup>I]101.10.** A) Saturation isotherm of [<sup>125</sup>I]101.10 in thymocytes from wild type and IL-1RI<sup>-/-</sup> mice. Values are mean  $\pm$  SEM of percent of maximum binding in 3 experiments each performed in duplicate. B) Western blot of IL-1R in thymocytes from wild type and IL-1RI<sup>-/-</sup> animals. C) Representative (of n=3) autoradiogram of electrophoresed (non-reducing conditions) [<sup>125</sup>I]101.10 (100 nM)-bound cells following chemical cross-linking of IL-1RI-expressing (+) and IL-1RI-devoid (-) thymocytes using the 11 Å BS3 crosslinker; superimposition of immunoblot for IL-1RI reveals full IL-1RI and its subunit(s) in IL-RI-expressing cells, and totally clear autoradiogram in IL-1RI-devoid cells.

**Figure 4. Non-competitive effects of 101.10.** A) Dose-response of 101.10 on IL-1-induced TF-1 cell proliferation, and Schild plot conversion; note plateaued curve indicative of non-competitive action of 101.10. Values are mean of triplicate experiments. B) Displacement of bound [<sup>125</sup>I]IL-1 (25 pM) by IL-1 or 101.10 in rodent

thymocytes; values are mean  $\pm$  SEM of 6 experiments each performed in triplicate. C) Displacement of [ $^{125}$ I]101.10 by (unlabelled) 101.10 at 2 different initial concentrations of [ $^{125}$ I]101.10;  $K_i = 4$  nM. D) Displacement of bound [ $^{125}$ I]IL-1 (25 pM) by IL-1 in the presence of increasing concentrations of 101.10 in rodent thymocytes. E) Displacement of bound [ $^{125}$ I]IL-1 (25 pM) by IL-1 in the presence of increasing concentrations of 101.10 in NIH3T3 cells; insert reveals 101.10 binding sites/cell in NIH3T3 cells. For D and E note right shift of displacement curves by 101.10. For C-E panels, values are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments each performed in duplicate.

**Figure 5. Selectivity of 101.10.** A) Effects of TNF $\alpha$  (1 ng/ml)- and lipopolysaccharide (LPS; 5  $\mu$ g/ml)-dependent IL-18-induced (100 ng/ml) JNK and p38 phosphorylation in microvascular endothelial cells (EC) in absence or presence of 101.10 (1  $\mu$ M); pre-incubations with TNF $\alpha$  and LPS enhance IL-18 receptor expression. Effects of IL-6 (0.5 ng/ml) in EC cells in absence or presence of 101.10 (1  $\mu$ M). Blots are representative of 3 experiments. B) Effects of 101.10 on IL-1-induced hyperthermia and plasma PGE $_2$  concentrations in rat (101.10 1 mg/kg iv) and IL-1 (5  $\mu$ g/kg iv). C) Effect of 101.10 on EP $_3$ -selective PGE $_2$  analog M&B28767-induced hyperthermia. Left panel, inhibition of IL-1- (5  $\mu$ g/kg iv) induced hyperthermia by prostaglandin synthase inhibitor ibuprofen (ibu; 40 mg/kg iv) ascertains role of prostaglandins. Right panel, intra-cerebroventricular injection of M&B28767 (2  $\mu$ l of 1  $\mu$ M solution; estimated concentration of 50 nM for cerebroventricular volume  $\sim$ 40  $\mu$ l (281) causes a comparable hyperthermia, which is unaltered by 101.10. D) Effects of 101.10 (1 mg/kg ip) on LPS-induced maximum hypotension (10 mg/kg ip) in wild type and IL-1RI $^{-/-}$  mice. 101.10 significantly attenuated LPS-induced hypotension in wild type but not in IL-1RI $^{-/-}$  mice; note that effects of LPS in IL-1RI $^{-/-}$  are nearly identical to those in 101.10-treated wild type animals. Values for B-D panels are mean  $\pm$  SEM of 2-5 experiments; \*  $p < 0.05$  compared to IL-1 alone (B,C panels) or other corresponding values without asterisks (D panel; ANOVA).

**Figure 6. Efficacy of 101.10 in TNBS model of inflammatory bowel disease.** Sprague-Dawley rats were administered TNBS intra-sigmoidal in absence or presence of ip treatment with B) saline, C) dexamethasone (0.75 mg/kg/day), D) IL-1ra (8 mg/kg/day), E) infliximab (10 mg/kg/day) and F) 101.10 (1 mg/kg/day) as compared to vehicle control A). Animals were euthanized 48 h later and colons collected for macroscopic and histological examination. Representative histology is shown (A-F). Arrows point to following: epithelial denudation (blue arrows); crypt disruption (red arrows); neutrophil infiltration (black arrows). Values are mean  $\pm$  SEM of 3-8 experiments; \* $\dagger$   $p < 0.05$  compared to other values without same symbol. G) Quantification of intact intestinal villi normalized across total intestinal surface collected. H-J) Lymphocyte (CD4+) accumulation in intestinal tissue in normal and TNBS-exposed animals treated or not with 101.10. K) Quantification of T cell abundance in normal and TNBS-exposed tissues. Values are mean  $\pm$  SEM of 3-8 experiments; \*  $p < 0.01$  compared to all other values;  $\dagger$   $p < 0.05$  compared to TNBS with saline.

**Figure 7. Efficacy of topical 101.10 in PMA-induced dermatitis.** CD-1 mice ears were treated either with PMA (0.05%, applied once daily) or PMA followed immediately with 101.10 mixed in PEG-400 (applied topically twice daily to contralateral ear). Ear thickness was measured throughout the experiment. At 42 h animals were euthanized and 4 mm ear punches made and weighed; some animals were injected with Evan's blue to detect extravasation. A) Photographic representations of dose-dependent response to 101.10 applied to right ear; note marked reduction in redness of 101.10-treated right ears compared to untreated left ones. B) Time- and dose-dependent effect of 101.10 on ear weight and thickness of ear punches. C) Concentration-dependent effect of 101.10 on degree of capillary extravasation (measured by Evans blue in tissue). D) Efficacy of 101.10 (100 nM) on tissue PGE<sub>2</sub> concentrations. For B-D values are mean  $\pm$  SEM of 3-5 experiments; \*  $p < 0.01$  compared to values without asterisks. E) Effects of 101.10 (100 nM) on PMA-induced inflammatory edema in wild type and IL-1RI<sup>-/-</sup> B6129S1 mice. 101.10 attenuated

edema formation in wild type but not in IL-1RI<sup>-/-</sup> mice, wherein edema is less pronounced than in wild type congeners. Values are mean  $\pm$  SEM percent of control (without PMA) of 3-4 experiments; \*  $p < 0.01$  compared to PMA in corresponding animal group.

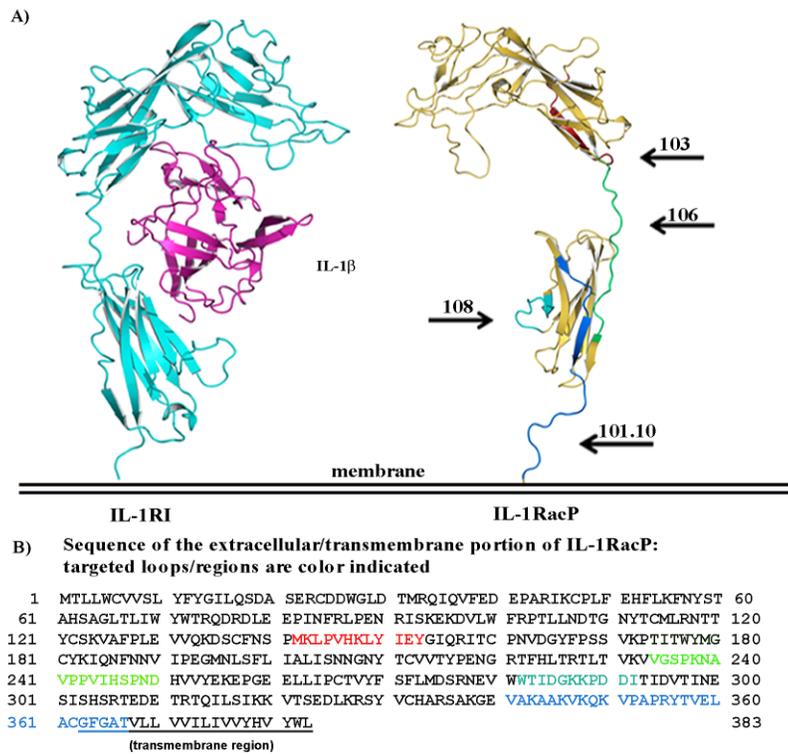
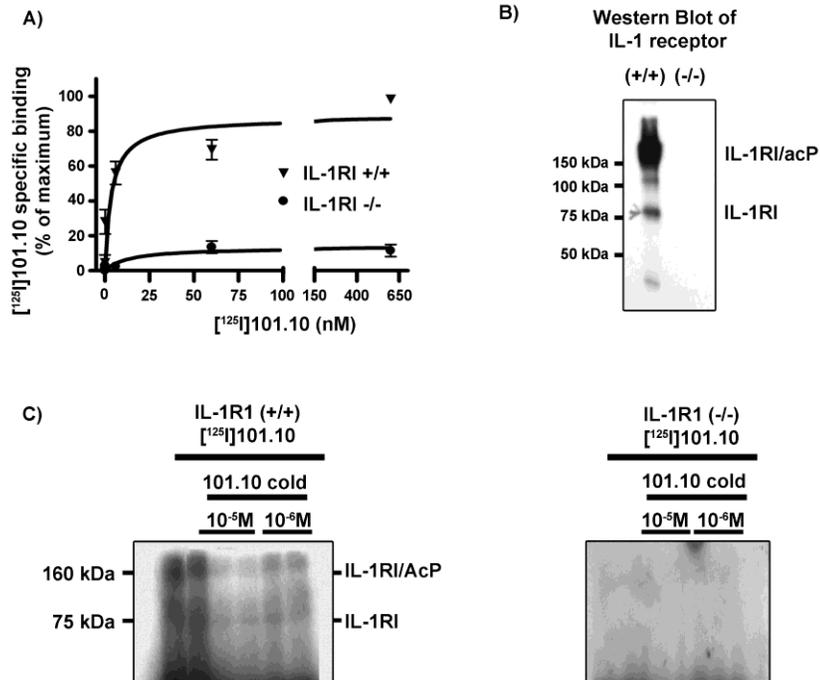
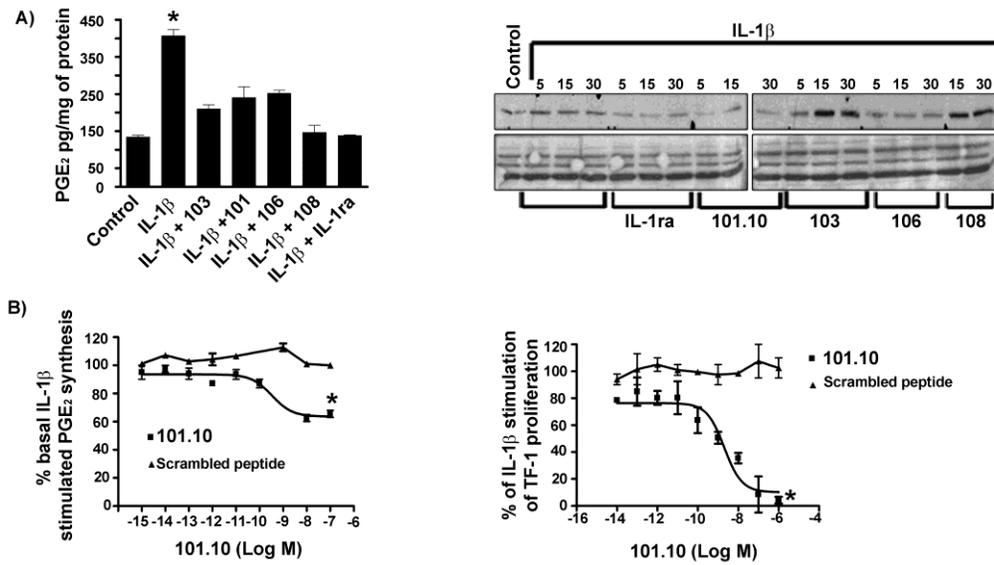


Figure 1



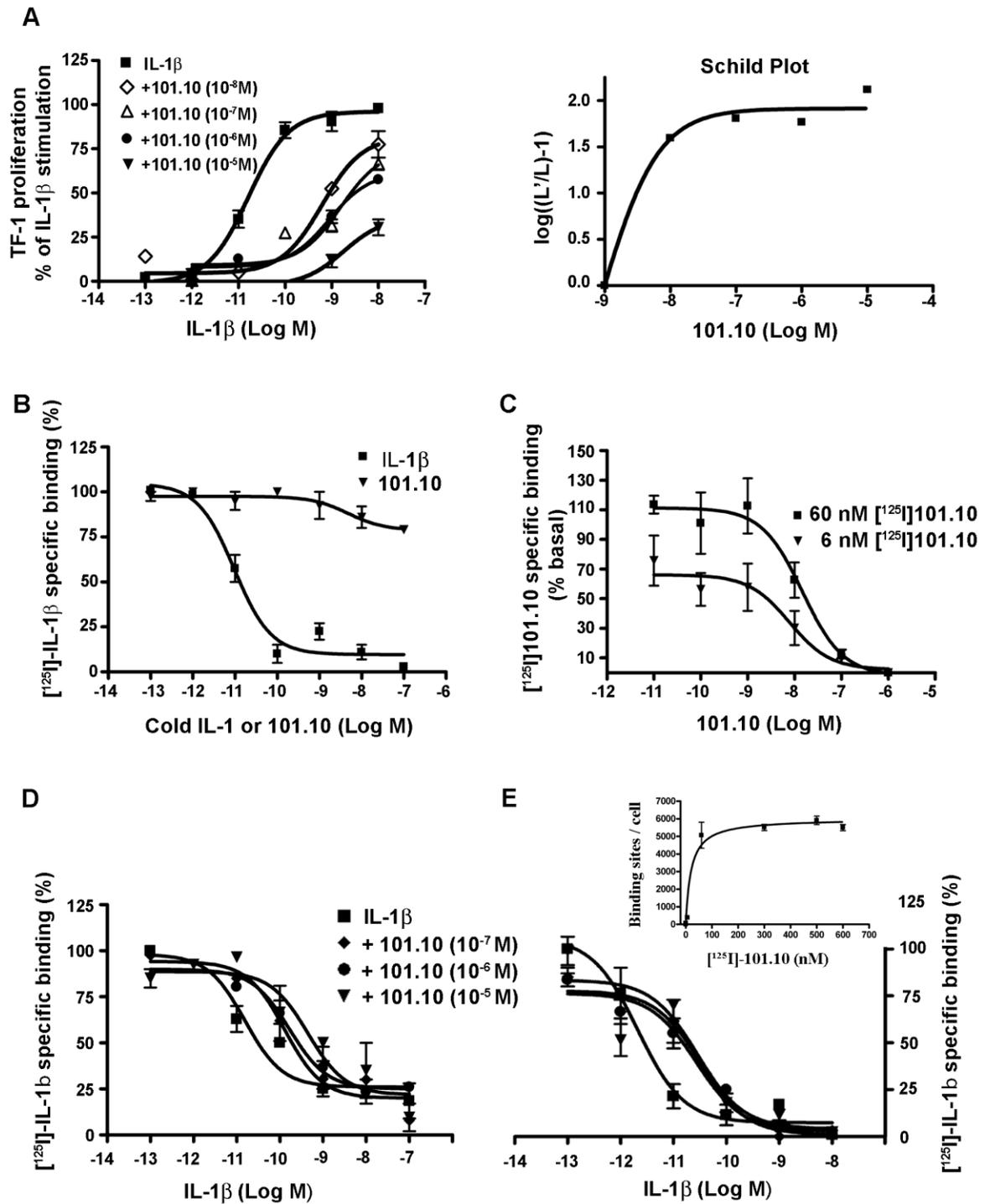


Figure 4

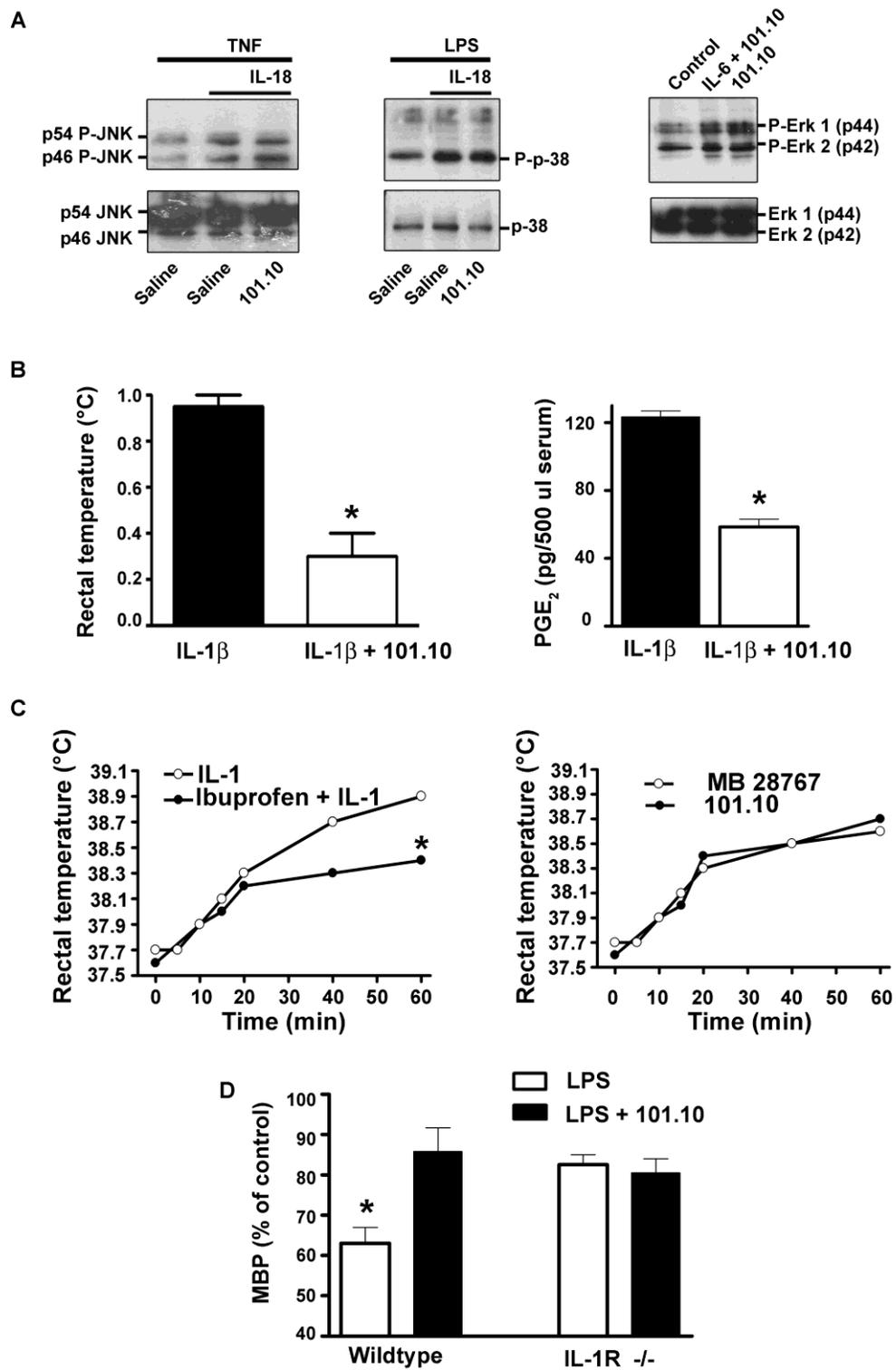


Figure 5

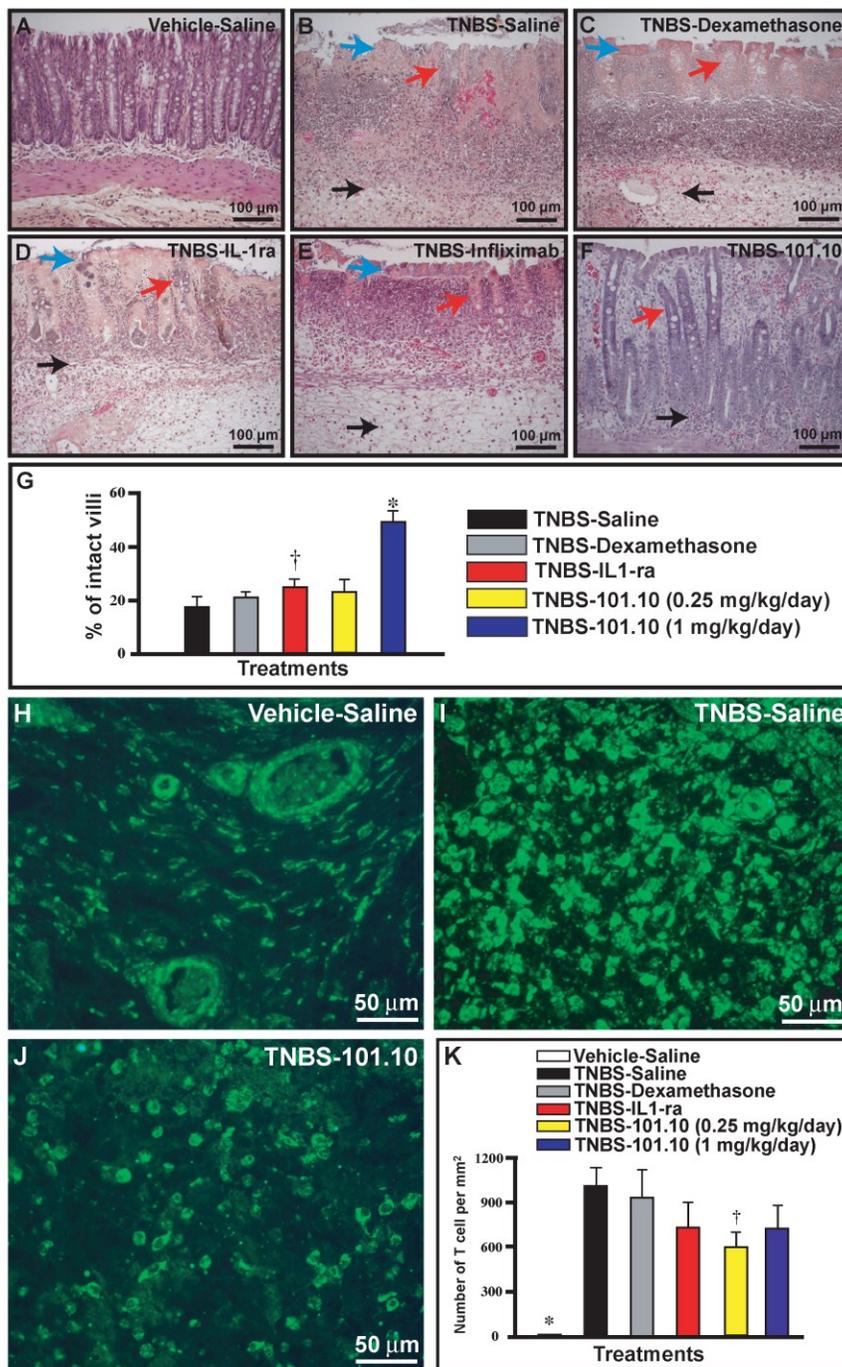


Figure 6

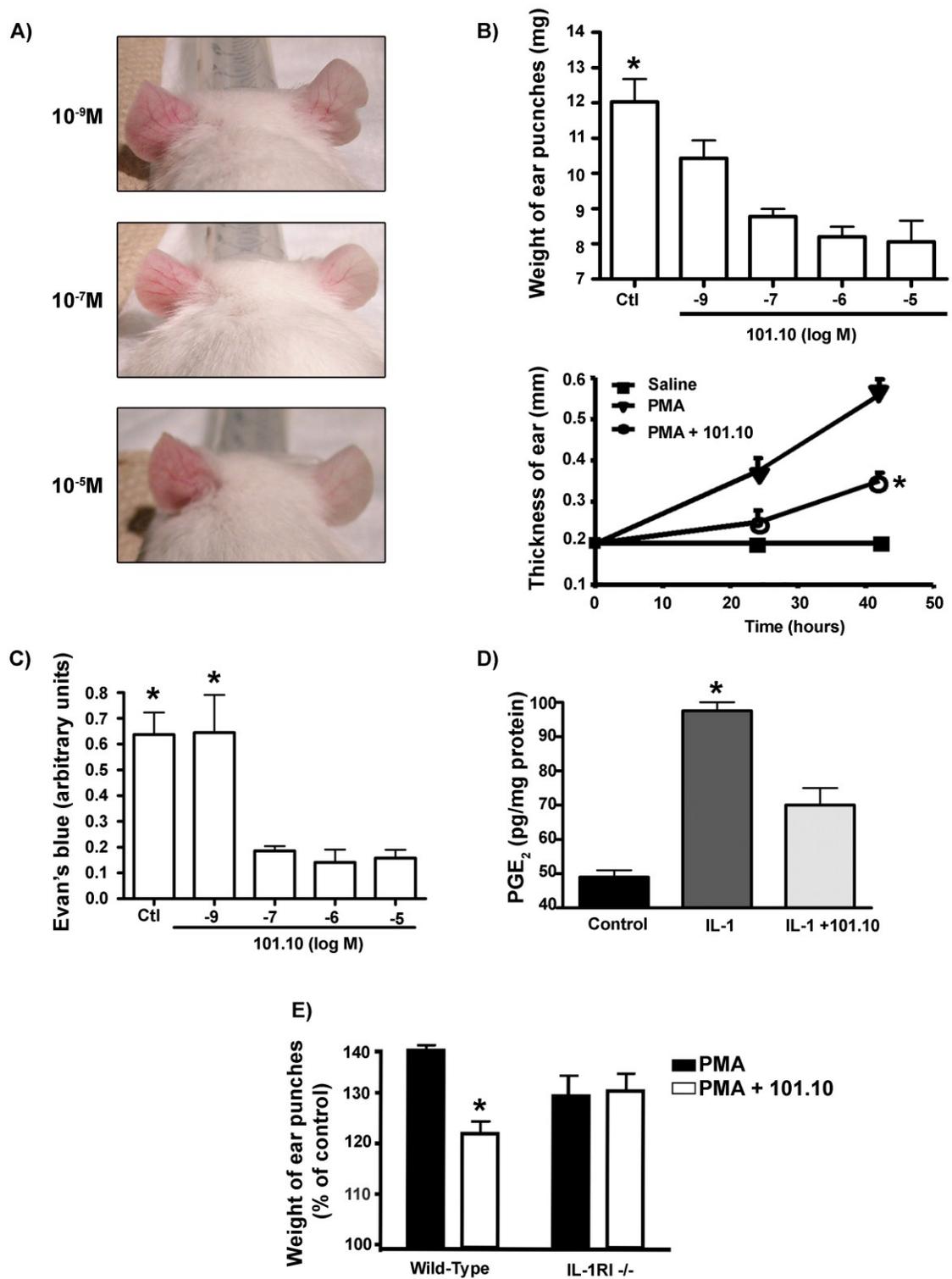


Figure 7.



Peptide assigned number	Peptide sequences (sense)	IL-1RAcP target loops sequences	IL-1RAcP regions targeted
101.10	NH <sub>2</sub> -rytvela-COOH	NH <sub>2</sub> -VAKAAKVKQK VPAPRYTVELAC- COOH	D3-jxtamembranous
103	NH <sub>2</sub> -mklpvhkly-COOH	NH <sub>2</sub> -PMKLPVHKLY IEY-COOH	Loop D1-D2
106	NH <sub>2</sub> -vgspknavppv-COOH	NH <sub>2</sub> -VKVVGSPKNA VPPVIHSPND-COOH	Loop D2-D3
108	NH <sub>2</sub> -wtldgkdpddl-COOH	NH <sub>2</sub> -WWTIDGKKPD DI-COOH	Loop in D3

Table I. Sequence of peptides and targeted regions of the extracellular portion of the accessory protein

**Preventive**

<b>Treatment</b>	<b>Macroscopy (score of 2)</b>	<b>Microscopy ( score of 5)</b>	<b>Myeloperoxidase (% of control [TNBS])</b>
<b>TNBS (n=8)</b>	<b>1.57 ± 0.04</b>	<b>3.7 ± 0.2</b>	<b>100</b>
<b>+ 101.10 (n=8)</b>	<b>0.7 ± 0.1*</b>	<b>2.4 ± 0.3*</b>	<b>47 ± 7*</b>
<b>+ IL-1ra (n=3)</b>	<b>0.84 ± 0.1*</b>	<b>2.0 ± 0.5*</b>	<b>63 ± 5*</b>
<b>+ Infliximab (n=3)</b>	<b>0.87 ± 0.1*</b>	<b>2.4 ± 1.4*</b>	<b>60 ± 7*</b>
<b>+ Dexamethasone (n=8)</b>	<b>ND</b>	<b>3.2 ± 0.3†</b>	<b>66 ± 18†</b>

**Treatment**

<b>101.10 (n=7)</b>	<b>1.1 ± 0.1*</b>	<b>2.7 ± 0.1*</b>	<b>123 ± 18</b>
---------------------	-------------------	-------------------	-----------------

Macroscopy and microscopy scores are adapted from Peterson's scale (24). Values are mean ± SEM.

\*p < 0.05 compared to TNBS alone; † p < 0.05 compared to 101.10 (pre-treatment)

Table II – Effect of 101.10 and other drug treatments on histologic evaluation of TNBS-induced colon inflammation in rat

*2. Article 2 :*

**VRQ397 (CRAVKY): a novel non-competitive V2 receptor antagonist**

Rihakova L<sup>1\*</sup>, Quiniou C,<sup>1\*</sup> Hamdan F,<sup>2</sup> Kaul R,<sup>3</sup> Brault S,<sup>1</sup> Hou X,<sup>1</sup> Lahaie I,<sup>1</sup> Sapiha P,<sup>1</sup> Hamel D,<sup>1</sup> Shao Z,<sup>1,5</sup> Gobeil F Jr,<sup>4</sup> Hardy P,<sup>1</sup> Joyal J-S,<sup>1</sup> Nedev, H,<sup>5</sup> Duhamel F,<sup>1</sup> Beauregard K,<sup>1</sup> Heveker N,<sup>2</sup> Saragovi H Uri,<sup>5</sup> Guillon G,<sup>6</sup> Bouvier M,<sup>2</sup> Lubell WD,<sup>3</sup> Chemtob S,<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hôpital Ste Justine, Research Center, Departments of Pediatrics and Pharmacology, Montreal, Canada H3T 1C5; <sup>2</sup>Departments of Biochemistry and <sup>3</sup>Chemistry, Université de Montréal, Montreal Canada H3C 3J7; <sup>4</sup>Department of Pharmacology, Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada; <sup>5</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1Y6; <sup>6</sup>Department of Endocrinology, INSERM U661, Université Montpellier I, France.

Short title: Novel non-competitive antagonist of V2R

**VRQ397 (CRAVKY): a novel non-competitive V2 receptor antagonist**

Rihakova L<sup>1\*</sup>, Quiniou C,<sup>1\*</sup> Hamdan F,<sup>2</sup> Kaul R,<sup>3</sup> Brault S,<sup>1</sup> Hou X,<sup>1</sup> Lahaie I,<sup>1</sup>  
Sapieha P,<sup>1</sup> Hamel D,<sup>1</sup> Shao Z<sup>1,5</sup> Gobeil F Jr,<sup>4</sup> Hardy P,<sup>1</sup> Joyal J-S,<sup>1</sup> Nedev, H,<sup>5</sup>  
Duhamel F,<sup>1</sup> Beauregard K,<sup>1</sup> Heveker N,<sup>2</sup> Saragovi H Uri,<sup>5</sup> Guillon G,<sup>6</sup> Bouvier M,<sup>2</sup>  
Lubell WD,<sup>3</sup> Chemtob S,<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hôpital Ste Justine, Research Center, Departments of Pediatrics and Pharmacology,  
Montreal, Canada H3T 1C5; <sup>2</sup>Departments of Biochemistry and <sup>3</sup>Chemistry,  
Université de Montréal, Montreal Canada H3C 3J7; <sup>4</sup>Department of Pharmacology,  
Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada; <sup>5</sup>Department of Pharmacology and  
Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1Y6;  
<sup>6</sup>Department of Endocrinology, INSERM U661, Université Montpellier I, France.

Short title: Novel non-competitive antagonist of V2R

\* Both authors contributed equivalently to this manuscript

Corresponding author:

Sylvain Chemtob, MD, PhD

Hôpital Ste Justine, Research Center

3175 Côte Ste Catherine

Montreal, Qc, H3T 1C5

Tel: (514) 345-4931 #2978; Fax: (514) 345-4801

## Abstract

Vasopressin type 2 receptor (V2R) exhibits mostly important properties for hydro-osmotic equilibrium and to a lesser extent on vasomotricity. Drugs currently acting on this receptor are analogs of the natural neuropeptide, vasopressin (AVP), and hence are competitive ligands. Peptides that reproduce specific sequences of a given receptor have lately been reported to interfere with its action and if such molecules arise from regions remote from the binding site they would be anticipated to exhibit non-competitive antagonism; but this has yet to be shown for V2R. Six peptides reproducing juxtamembranous regions of V2R were designed and screened; the most effective peptide, CRAVKY (labelled VRQ397), was characterized. VRQ397 was potent ( $IC_{50} = 0.69 \pm 0.25$  nM) and fully effective in inhibiting V2R-dependent physiological function (specifically DDAVP-induced cremasteric vasorelaxation; this physiological functional assay was utilized to avoid overlooking interference of specific signaling events). Dose-response profile revealed non-competitive property of VRQ397; correspondingly, VRQ397 bound specifically to V2R-expressing cells, could not displace its natural ligand, AVP, but modulated AVP binding kinetics (dissociation rate). Specificity of VRQ397 was further confirmed by its inability to bind to homologous V1 and oxytocin receptors and its inefficacy to alter responses to stimulation of these receptors. VRQ397 exhibited pharmacological permissiveness on V2R-induced signals as it inhibited DDAVP-induced  $PGI_2$  generation, but not that of cAMP or recruitment of  $\beta$ -arrestin2. Consistent with *in vitro* and *ex vivo* effects as a V2R antagonist, VRQ397 displayed anticipated *in vivo* aquaretic efficacy. We hereby describe the discovery of a first potent non-competitive antagonist of V2R, which exhibits functional selectivity, in line with properties of a negative allosteric modulator.

Keywords: vasopressin, V2 receptor, allosteric modulator, G-protein coupled receptor

## Introduction

Arginine vasopressin (AVP) is a neuropeptide that exerts significant effects on circulatory and water homeostasis. AVP acts on three G protein-coupled receptors (GPCR), namely V1a, V1b and V2 (334). V1a affects smooth and myocardial muscle contractility, V1b acts on the pituitary to elicit adrenocorticotrophic hormone release, while V2 receptor (V2R) is mostly expressed in epithelium of the renal collecting tubule, where it mediates the hydro-osmotic effects of vasopressin (335, 336). V2R is also present on vascular endothelium to elicit vasorelaxation (337-341). Several clinical conditions have been associated with inappropriately elevated levels of AVP including heart failure, cirrhosis of the liver and the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone; a role for vasopressin in shock has also been documented (342). Under these conditions V2R plays a dominant role in retaining water and in inhibiting myocardial contractility (343, 344). Congruently, mutations in the V2R gene have been associated with X-linked recessive nephrogenic diabetes insipidus disorder (loss of function) (345, 346) and with the nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (gain of function) (347). Accordingly, a number of AVP antagonists have been proposed for clinical applications. In this context, V2R antagonists exhibit notable efficacy as aquaretics for heart failure, hepatorenal syndrome with inappropriate secretion of AVP, possibly in patients with polycystic kidneys, and may improve myocardial contractility during shock secondary to burns (342); conversely V2R agonists are useful for diabetes insipidus (334, 348, 349). Most of these drugs are analogs of AVP (334) and hence exhibit competitive antagonist or agonist properties by interacting with the orthosteric binding site of the ligand; some of these compounds identified by random screening (350) partially bind to the orthosteric site (351). In contrast, efficacy of complete non-competitive antagonists would either be unaffected by orthosteric agonist concentrations if cooperativity is neutral between the two agents, or the antagonism accrued if there is negative cooperativity of the drug on the orthosteric agonist; these properties may result in functional selectivity (266), but such compounds have yet to be developed for V2R.

The concept that peptides, which reproduce the sequence of specific regions of proteins, can interfere with their actions has been adequately documented (81, 83, 352). In this context, the extracellular loops of GPCRs (including vasopressin receptors) exhibit important roles on ligand affinity and hence on receptor conformation (257, 259, 353, 354). There is increasing evidence that peptides arising from various juxtamembranous and extracellular regions of GPCRs remote from the natural ligand binding site can interfere with their respective actions as documented for instance for PGF<sub>2α</sub> receptor (77), CCR5 (78), β<sub>2</sub>-adrenoceptors (85), and protease-activated receptor 1 (355, 356); consequently, these compounds exert non-competitive properties. Also, diverse ligands that can act on the same receptor have the potential of affecting certain but not all signaling pathways; thus one ligand can preferentially activate one pathway, whilst another can preferentially activate a second pathway. The latter concept termed functional permissiveness confers greater selectivity and has been described for numerous compounds (266, 357, 358) including non-competitive antagonists (359, 360).

On the basis of the overall rationale presented above, we generated peptides derived from extracellular juxtamembranous regions of V2R and screened them against V2R agonist-induced effects. Compounds were tested on a (complex) multi-signal-dependent physiological function, notably vasomotricity to identify relevant effective molecules, rather than separate signaling markers which may not detect compounds exhibiting significant functional selectivity (266, 357, 358). We hereby describe for the first time a selective non-competitive (peptide) antagonist of V2R, VRQ397, which exhibits functional selectivity, and *in vivo*, is an effective aquaretic.

## Materials and Methods

### Animals

Male Sprague-Dawley rats (250-300 g) and non-pregnant female CD1 mice (Charles Rivers, St. Constant, Quebec) were used according to a protocol of the Ste-Justine Hospital Animal Care Committee as well as along the principles of the *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* of the Canadian Council on Animal Care. Animals were anesthetized with isoflurane (2.5%, v/v), cremasteric muscle or uterus were respectively excised and placed in an ice-cold Krebs buffer (pH 7.4) of the following composition: 120 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 27 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 mM glucose. All chemicals were purchased at Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

### Peptide synthétise

Peptides (CRAVKY [labeled VRQ397] and analogs) were synthesized on an ACT-348-Omega peptide synthesizer at 25-umol scale using a five-fold excess of Fmoc-L-amino acids (125mM) relative to the Fmoc-L-AA-Wang resin (commercial loadings between 0.4 and 0.9 mmol/g; 0.9 mmol/g for Fmoc-Tyr-Wang Resin). Fmoc protecting group removal was performed using 20% piperidine in DMF. Double coupling was performed using 1:1:1 amino acid/1,3 — diisopropylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole hydrate. In between the deprotection and coupling steps, the resin was washed successively with DMF, MeOH and DMF. Final peptide cleavage was performed with 81.5:5:5:5:2.5:1 TFA/thioanisole/phénol/water/1,2 — ethanedithiol /triisopropylsilane, and the solution was freeze-dried. Typically 5-7 mg of the crude peptide was taken in 0.5-0.7 mL of a 9:1 mixture of water: DMSO and agitated for 30s on a bench-top centrifuge. The contents were filtered through 0.2 µm syringe filter. The resulting filtrate was lyophilized to a dry powder (2-5 mg), which was further analyzed by HPLC followed by mass spectrometry (MS) analysis. Crude

peptides were analyzed on a Varian ProStar HPLC on a Phenomenex Jupiter 5u C-18, 300A column, 150x4.6 mm. The gradient was 0-100%B over 20 min. The solvent A was 10% aqueous ACN with 0.1% TFA, the solvent B was 70% ACN/30% water with 0.1% TFA. The flow rate was 1mL/min and the detection was at 220 nm. Peptides were in this way esteemed to be >95% pure prior to biological examinations.

### Cell culture

Native HEK 293 cells and 293 cells stably expressing the human V2 receptor were cultured in DMEM high glucose (10% Fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin; GIBCO Invitrogen, Burlington, ON, Canada) (361); stably transfected cells were grown in presence of G418 (200? g/mL; Promega , Madison WI, USA).

### Vasomotor response

Microvessels from the rat cremasteric muscles were visualized *ex vivo* and recorded with a video camera (model CCD72, MTI) mounted on a dissecting microscope (model M-400, Nikon), as amply reported (295, 362). To determine the vasomotor response, vascular diameter was measured with a digital image analyzer (Sigma Scan software, Jandel Scientific, Corte Madera, CA); measurements were repeated 4 times and presented a variability of <2%.

Briefly, cremasteric muscles were pinned securely to a wax base of a 20 mL bath containing Krebs buffer saturated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37°C. The tissue was allowed to equilibrate for 45 min before recording vasomotor responses of third order arterioles (30-70 μm). Vascular diameter was recorded before and after topical application of the agents described below.

Responses to the vasorelaxant DDAVP (Desmopressin [L-desamino-8-arginine-vasopressin]; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) were determined on tissues pre-constricted with either KCl (20 mmol/L) or the thromboxane A<sub>2</sub> mimetic

U46619 (0.1  $\mu$ M, Cayman Chemical/Cedarlane, Hornby, ON, Canada)) for 30 min; because effects of KCl and U46619 were analogous, experiments were pursued mostly with U46619. Cremasteric muscle was pre-incubated or not for 30 min with drugs of interest, specifically the V1a receptor antagonist SR49059 (363), the V2 receptor antagonist SR121463A (364) [both compounds were generous gifts of C. Serradeil-LeGal, Sanofi Research, Toulouse, France], peptides described in the Results section, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 100  $\mu$ M [(365)]; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), ibuprofen (10  $\mu$ M [(366)]; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), or respective vehicle (ineffective); response to DDAVP was subsequently determined. DDAVP alone had EC<sub>50</sub> 10 nM. Vasorelaxation to substance P (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), bradykinin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and carbacyclin (Cayman Chemical/Cedarlane, Hornby, ON, Canada) was tested in a similar manner. Some experiments were also conducted after endothelial denudation. Endothelial denudation was performed as previously described using intravenous administration of 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propylsulfonate (CHAPS; 5 mg/l for 10 min) (367); as expected CHAPS abolished endothelium-dependent relaxation to acetylcholine, but did not affect relaxation to carbacyclin (1  $\mu$ M) or constriction to U46619 (0.1  $\mu$ M). We also tested constriction of cremasteric vessels to AVP in presence or absence of VRQ397. Vasorelaxation was expressed as the percentage of reversal of KCl or U46619-induced constriction, while vasoconstriction as the percentage of the constriction to AVP.

#### Isometric contraction of myometrial preparations

Uterine strips (2-3 mm wide and 1-2 cm long) from CD1 mice were suspended in organ baths containing Krebs buffer treated with bubbles of 21% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at 37°C and equilibrated for at least 1 h, as previously described (77). Initial tension was set at 2 g. After a one hour period of equilibration, the uterine strips were pretreated with vehicle, VRQ397 or atosiban (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), and thereafter stimulated with oxytocin (American Peptide Company, Sunnyvale, CA,

USA). Changes in mean basal tension, as well as frequency of contractions were recorded using a Kent digital polygraph system.

### ***Binding assays***

Peptide iodination was performed using the chloramine T method labeling of peptides and proteins by radioiodination (368). Binding assay with [<sup>125</sup>I]VRQ397 (2200 Ci/mmol) was performed on whole cells as described (55, 295, 297). Essentially, HEK293 cells stably expressing V2R and native cells, were plated in 24 well-dishes pre-treated with poly-D-lysine (Sigma) for 12 h prior to the experiment; cells were 90% confluent on the experimental day. Cells were then placed on ice, washed twice with 1 mL of binding buffer (PBS/0.05% BSA) and treated with [<sup>125</sup>I]VRQ397 (10 nM) in binding buffer in presence or absence of non-iodinated VRQ397 (1 μM) for 2 h. Unbound ligand was washed away with ice cold binding buffer (3 x 1 ml) and the remaining cell-bound ligand concentration was determined using a gamma-counter after cell lysis at room temperature (0.1 N NaOH/0.1%); non-specific binding of [<sup>125</sup>I]VRQ397 was ~35%.

Similarly, binding assay with [<sup>3</sup>H]AVP and [<sup>3</sup>H]oxytocin (respective specific activity: 61.9 and 46.3 ci/mmol; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) was performed as previously reported (369). Briefly, 1 nM [<sup>3</sup>H]AVP or [<sup>3</sup>H]oxytocin was added to the incubation medium in presence or absence of excess 1 μM unlabeled AVP or oxytocin, or in case of AVP increasing concentrations of DDAVP or VRQ397; non-specific binding of [<sup>3</sup>H]AVP or [<sup>3</sup>H]oxytocin was ~10-12%. After filtration through GF/C filters, the radioactivity on cell membrane was determined. The specific binding was calculated for each condition and expressed as a percent of the specific binding determined in the absence of unlabeled compound. Hill coefficient of saturation isotherm was calculated using the software GraphPad Prism, to determine if the binding followed a law of mass action or cooperativity. Saturation curves of [<sup>3</sup>H]AVP and [<sup>125</sup>I]VRQ397 were also performed on HEK293 stably expressing V2R in presence

of different concentrations of labelled ligand and excess cold ligand. Binding assays were also performed on HEK293 cells stably expressing V1a receptor (V1R) or oxytocin receptor (OTR). To determine the dissociation rate of [<sup>3</sup>H]AVP in presence or not of VRQ397, HEK293 V2R-expressing cells were incubated with [<sup>3</sup>H]AVP (10 nM [saturation]) for 2 h (at equilibrium). Thereafter, a time course of displacement was performed by washing out [<sup>3</sup>H]AVP with excess unlabelled AVP (1 μM) in presence or absence of VRQ397 (0.1 μM); reaction was stopped by removing the medium and lysing the cells.

### ***Measurements of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and cAMP***

The levels of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (stable metabolite of PGI<sub>2</sub>; Cayman Chemical/Cederlane, Hornby, ON, Canada) were measured in cremasteric tissue by radioimmunoassay, as previously detailed (295). The production of cAMP in HEK293 cells was also measured by radioimmunoassay as per instructions of the manufacturer (GE Healthcare, USA). Briefly, cells were stimulated with DDAVP (different concentrations) for 15 min in presence or absence of VRQ397 or SR121469 (100 nM). Culture media was removed and 1-propanol added to extract cAMP from cells for 1 h at 4°C. Extracts were dried and reconstituted in assay buffer, and protein concentration was determined on the cells using the Bradford technique; cAMP was determined by radioimmunoassay

### **BRET assay**

Stable HEK293 cell lines co-expressing V2R-VENUS and β-arrestin2-*Renilla* luciferase (Rluc) were employed for monitoring V2R signaling by BRET as we described (64). A monolayer of cells were washed once with PBS and then gently detached by pipetting in PBS supplemented with 0.1% D-glucose. Approximately 30,000 cells were dispensed into 96 well white opaque plates (Corning, USA). To measure the BRET signal, the BRET<sup>1</sup> substrate for Rluc, coelenterazine-h (Prolume,

Pinetop, AZ, USA), was added to a final concentration of 5  $\mu$ M, and the BRET1 was measured on the FUSION (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) plate reader, which allowed the sequential integration of signals detected in  $470 \pm 30$  nm and  $550 \pm 40$  nm windows. The BRET signal was calculated as a ratio of the light emitted by VENUS ( $550 \pm 40$ nm) over the light emitted by Rluc ( $470 \pm 30$  nm). DDAVP-induced BRET was calculated by subtracting the BRET ratio obtained in the absence of the agonist from the one obtained in the presence of an agonist with or without antagonist.

### Measurement of diuresis

Rats were anesthetised with isoflurane (2.5% v/v) and the jugular vein was cannulated with polypropylene catheter (PE-90) for infusion of saline (150 ml/kg/day; Harvard pump) with or without VRQ397 (begun 2 h after baseline urine output determined); carotid artery was also catheterized to collect blood for creatinine and osmolality measurements at baseline and hourly for 3 h (after VRQ397 administration). A midline abdominal incision was also made to reveal the bladder from which urine was collected via an inserted cannula. Bladder was emptied and strict 60 min urine collected for volume, creatinine and osmolality measurements; a 2-hour baseline was established afterwhich VRQ397 was infused. Creatinine clearance was calculated as:  $(U_{\text{creat}} \times \text{urine volume}) / P_{\text{creat}}$ , where  $U_{\text{creat}}$  and  $P_{\text{creat}}$  refer to urinary and plasma creatinine concentrations. Water clearance was calculated as urine volume – osmolar clearance; osmolar clearance =  $(U_{\text{osm}} \times \text{urine volume}) / P_{\text{osm}}$ , where  $U_{\text{osm}}$  and  $P_{\text{osm}}$  refer to urinary and plasma osmolality (370).

### ***Statistical analyses***

Data were analyzed by 2-way ANOVA factoring for concentration and drug followed by post-hoc Dunnett test for comparison among means. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### Screening of peptides derived from extracellular juxtamembranous regions

Six L-peptides which reproduce extracellular juxtamembranous regions of V2R were designed (Fig. 1). We intentionally avoided the 7<sup>th</sup> juxtamembranous region of V2R wherein the transmembrane domain is important for AVP binding (254, 371), as we aimed to generate non-competitive antagonists. Regions of the receptor chosen exhibited homology for human, rat and mouse. Compounds were screened against desmopressin (DDAVP)-induced cremasteric vasorelaxation of previously U46619-generated vasoconstriction. DDAVP-induced cremasteric vasorelaxation was confirmed as V2R-dependent, as established V2R-selective competitive antagonist SR121463 (363, 364) abolished the vasorelaxation (Fig. 2A); the V1aR selective antagonist SR49059 was ineffective (Fig. 2A). VRQ181, VRQ184 and more profoundly VRQ183 (ALCRAVKY [1  $\mu$ M]) inhibited DDAVP-induced vasorelaxation; elimination of the cysteine residue (substituted with serine [ALSRAVKY]) abrogated efficacy of the compound (Fig. 2B). Because of the reproducibility of ALCRAVKY's high efficacy, experiments were pursued with this peptide. In the course of determining sufficient sequence required for activity, amino acid deletions of the tyrosine with or without lysine virtually abolished inhibitory efficacy (<10%). Whereas sequential deletion of the alanine and leucine yielded respectively fully effective LCRAVKY ( $IC_{50} = 58 \pm 22$  nM) and the more potent hexapeptide CRAVKY (termed VRQ397;  $IC_{50} = 0.69 \pm 0.25$  nM) (Fig. 2B); VRQ397 was as effective and potent as SR121463 ( $IC_{50} = 0.65 \pm 0.2$  nM; Fig. 2A).

### Selectivity and non-competitive properties of VRQ397

We next determined the selectivity of VRQ397 for V2R. [<sup>125</sup>I]VRQ397 saturably bound to HEK293 cells expressing V2R (Fig. 3A); the Hill coefficient was  $0.88 \pm 0.12$ , consistent with single binding site for VRQ397. The number of [<sup>125</sup>I]VRQ397 binding sites on these cells was equivalent to those observed with [<sup>3</sup>H]AVP binding (Fig. 3B; [K<sub>d</sub> values were respectively 1 and 1.36 nM]; the Hill

coefficient for [ $^3\text{H}$ ]AVP was  $0.6 \pm 0.1$  as reported (372, 373). [ $^{125}\text{I}$ ]VRQ397 negligibly bound to V2R-devoid HEK293 cells (even at high concentrations [100 nM] possibly due to minute presence of G protein coupled receptors in native HEK293 cells (77, 374); Fig. 3C). In line with these observations [ $^{125}\text{I}$ ]VRQ397 hardly bound to HEK293 cells expressing V1a or oxytocin receptor (Fig. 3C, and Suppl Fig. 1); the latter was tested because vasopressin and oxytocin receptors are closely related (375), including in the corresponding region from which CRAVKY arises (oxytocin receptor sequence: CRLVKY). Findings suggested that VRQ397 bound to V2R.

The selectivity of VRQ397 for V2R-induced effects was further studied on V1a and oxytocin receptor-evoked effects. Cremasteric vasoconstriction to AVP was unaffected by VRQ397, as this is a V1a-dependent process fully inhibitable by the V1a antagonist SR49059 (Fig. 4A). VRQ397 (up to 10  $\mu\text{M}$ ) was also ineffective in preventing oxytocin-induced myometrial (abundant in oxytocin receptor) contraction, whereas the oxytocin antagonist Atosiban ((376); 10  $\mu\text{M}$ ) fully prevented it (Fig. 4B). Consistent with these observations, along the same lines of reasoning, since cremasteric vasorelaxant effects of DDAVP are endothelium-dependent (see below), we tested if VRQ397 interfered with effects of distinct endothelium-dependent mediators, notably bradykinin and substance P. Bradykinin- and substance P-induced vasorelaxation was unaltered by VRQ397 (Fig. 4C,D). In addition, effects of (endothelium-independent) carbacyclin were also unaffected by VRQ397 (Fig. 4E).

We then tested if VRQ397 bound to the same V2R site as DDAVP. VRQ397 but not DDAVP dose-dependently fully displaced bound [ $^{125}\text{I}$ ]VRQ397 in V2R-expressing HEK293 cells (Fig. 5A), and likewise DDAVP but not VRQ397 dose-dependently displaced bound [ $^3\text{H}$ ]AVP (Fig. 5B). These observations were corroborated by determining if VRQ397 inhibited DDAVP-induced vasorelaxation in a competitive or non-competitive manner. Vasorelaxation was studied in tissues pre-treated with different concentrations of VRQ397 in the presence of increasing concentrations of DDAVP. VRQ397 diminished concentration-dependently maximum vasorelaxation induced by DDAVP (Fig. 5C and Supplementary Table 1). We further investigated if VRQ397 affected AVP dissociation rate ( $k_{\text{OFF}}$ ). In the absence of

VRQ397 dissociation half-life ( $t_{1/2}$ ) of AVP was  $10.07 \pm 2.2$  min with a  $k_{\text{OFF}}$  of  $0.069 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ , while in the presence of VRQ397 the dissociation  $t_{1/2}$  was more rapid and the  $k_{\text{OFF}}$  accordingly greater, respectively  $3.6 \pm 0.55$  min and  $0.193 \pm 0.057 \text{ min}^{-1}$  (Fig. 5D). Collectively, these findings infer that VRQ397 specifically binds to V2R at a site distinct from that of the orthosteric ligand (AVP/DDAVP) binding site as a non-competitive antagonist, but modulates AVP binding (249).

### **Mechanism of VRQ397 antagonism of DDAVP-induced vasorelaxation**

Vasorelaxation to V2R stimulation is foremost considered to be secondary to induction of endothelium-derived relaxant prostaglandin generation, notably prostacyclin (339, 340, 377-379). Accordingly, endothelial denudation (acetylcholine- and substance P-insensitive vasorelaxation) using CHAPS and the cyclooxygenase inhibitor ibuprofen, abolished DDAVP-induced relaxation (Fig. 6A); (contraction to U46619 and relaxation to carbacyclin were not affected by CHAPS, indicating integrity of smooth muscle (Fig. 6A)). ODQ, the inhibitor of the major NO target, guanylate cyclase, was ineffective. Consistent with these observations, DDAVP increased formation of  $\text{PGI}_2$  (measured through its stable metabolite 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ) in cremasteric muscle, was as expected prevented by ibuprofen and SR121463, as well as by VRQ397 (Fig. 6B).

V2R classically associates with  $G_s$  to elicit cAMP formation (380); the same applies with the  $\text{PGI}_2$  receptor, IP (381). Attempt to measure cAMP generation in response to DDAVP stimulation of cremasteric tissue was unsuccessful, possibly because the marginal increase generated by the microvasculature of this ubiquitously abundant cyclic nucleotide could not be detected. On the other hand, stimulation of V2R-expressing HEK293 cells induced a concentration-dependent increase in cAMP formation which was unaltered by VRQ397 (Fig. 6C,D) but largely inhibited by the V2R orthosteric antagonist SR121463 (363) (Fig. 6C). Likewise, another coupling event of V2R, specifically  $\beta$ -arrestin2 recruitment (detected by BRET assay) (249) measured on V2R-expressing HEK293 cells, was as expected prevented by SR121463

but not by VRQ397 (up to 10  $\mu$ M; Fig. 6D); the calculated  $EC_{50}$  ( $\sim$  1 nM) of AVP-promoted BRET was in agreement with the  $EC_{50}$  of AVP for V2R, as reported from classical cAMP assays (382) and cremasteric relaxation (Fig. 5C), indicating the suitability of the established doubly transfected stable cell line for monitoring V2R activation using BRET (data not show).

### **Efficacy of VRQ397 on diuresis**

Water retention effects of vasopressin are largely dependent upon redistribution of aquaporin-2 on renal epithelial apical cell surface (383).  $PGI_2$  has recently been suggested to also partake in this process (384). Since vasopressin-dependent formation of  $PGI_2$  (339, 340, 377-379) is affected by VRQ397 (Fig. 6B), we reasoned that VRQ397 would exhibit diuretic properties. VRQ397 increased urine output and water clearance (Fig. 7), without altering creatinine clearance; the latter remained stable (over the same 3 h time span) at  $7 \pm 0.7$  and  $6.3 \pm 0.7$  ml/kg/min respectively in vehicle- and VRQ397-treated animals, from an average baseline value of 6.7 (0.6 ml/kg/min).

## Discussion

Based on site-directed mutagenesis, photo-affinity labeling and cysteine-scan approaches a number of crucial regions of GPCR function have been identified [see review (205)]. Although the second extracellular loop has been highlighted (385, 386) for its roles in both ligand binding and receptor activation, adjacent loops (first and third) also exhibit important properties for various GPCRs (257, 258, 354) including for vasopressin receptors (259). On the basis that the second extracellular loop is presumed to fold over the surface of the GPCR requiring destabilization of its interactions with membrane-anchored adjacent loops for ligand binding and activation (211), we designed peptides that reproduce these juxta-membranous regions, and in this process identified an effective hexapeptide, labelled VRQ397 (CRAVKY; directly derived from the original VRQ183 [ALCRAVKY]). We hereby describe a novel potent, selective, reversible non-competitive antagonist of V2R, which interferes variably with different signaling responses of V2R; these features distinguish it from competitive antagonists currently available (334). Consistent with *in vitro* and *ex vivo* effects as a V2R antagonist, VRQ397 displayed anticipated *in vivo* aquaretic efficacy.

VRQ397 arose from regions that are distinct from the V2R natural ligand binding site (orthosteric site) (Fig. 1), which is located mostly deep within transmembrane regions primarily of transmembrane helix 7 (254, 371). Because the region from where VRQ397 arises is remote from the orthosteric binding site, derived molecules are non-competitive antagonists and may affect differently ligand-triggered functions (29, 61, 387). These features apply to VRQ397. VRQ397 binds specifically to V2R, but does not displace binding of its natural ligand vasopressin (Fig. 5A-C), albeit it modulates vasopressin binding kinetics (Fig. 5D). The non-competitive nature of VRQ397 is further substantiated by the inability of high concentrations of DDAVP to surmount antagonistic effects of VRQ397 on DDAVP-induced vasorelaxation (Fig. 5C); in contrast, orthosteric antagonism by definition can be overcome by increasing concentrations of the natural ligand (388).

Consistent with the selectivity of VRQ397 to bind V2R-expressing cells but not to V2R-devoid congener cells, VRQ397 did not bind V1a and oxytocin receptors (Fig. 3C) and did not affect smooth muscle contraction to stimulation of V1a and oxytocin receptor (Fig. 4), both of which exhibit different amino acid sequences of the corresponding third juxta-membranous region (respectively, CRVVKH and CRLVKY). This specificity of VRQ397 is further corroborated by its inability to inhibit DDAVP-unrelated endothelium-dependent cremasteric vasorelaxation (to substance P and bradykinin [Fig. 4C,D]) as well as to downstream mediators of DDAVP-induced vasorelaxation, namely PGI<sub>2</sub> (using the more stable carbacyclin [Fig. 4E]).

It has repeatedly been demonstrated that the ability of a compound to modulate a given signaling pathway cannot be directly extrapolated to another signaling pathway triggered by the same receptor (358-360). This infers that such molecules can affect some but not all functions evoked by a receptor. These properties referred to as pharmacological permissiveness or functional selectivity apply to VRQ397. We initially utilized a (complex) multi-signal-dependent physiological functional assay to determine efficacy of peptides designed, in order to avoid overseeing antagonistic properties based on single *in vitro* signalling responses. VRQ397 inhibited V2R-dependent vasorelaxation (induced by DDAVP; Fig. 2A, B) and downstream signal, notable PGI<sub>2</sub> génération (Fig. 6A, B). On the other hand, other signals induced by DDAVP, specifically cAMP generation and  $\beta$ -arrestin recruitment, which were fully inhibited by the orthosteric (competitive) antagonist SR121463, were unaffected by VRQ397 (Fig. 6C,D). This functional selectivity is likely made possible as a ligand binds the receptor in such a manner as to stabilize its conformation to activate or conversely avoid specific effector systems, characteristic of an allosteric modulator (266, 357, 358). Hence, by restricting signalling modalities such ligands may confer greater selectivity and possibly reduce side effects (360), compared to orthosteric antagonists which disable all functions triggered by the receptor. These features of functional selectivity and allosteric modulation are displayed by VRQ397 and are

congruent with those reported for other compounds acting on distinct GPCRs (324, 326).

### **Perspectives and significance**

Drug discovery efforts have identified a myriad of orthosteric ligand-based drugs, which by definition interact with the natural ligand binding site. However difficulties encountered with orthosteric ligands relate to interference of some desirable actions. Allosteric ligands on the other hand have the potential to provide “texture” to the signalling efficacy of the receptor (360), and thus can preserve desirable actions evoked by receptor stimulation. We hereby exploited these potential advantages by generating the first potent allosteric non-competitive antagonist of V2R, which derives from the third juxtamembranous region of the receptor (at a site remote from the orthosteric binding site [(254, 371)]). VRQ397 affects certain DDAVP-induced signaling modalities but not others (Fig. 6); this functional selectivity is consistent with characteristics of a negative allosteric modulator (359, 360). VRQ397 (and alike compounds) thus exposes new and interesting properties (notably pharmacological permissiveness) to counter undesired exaggerated effects of V2R stimulation. On the basis of pharmacological characteristics of VRQ397, specifically allosteric non-competitive antagonist exhibiting pharmacological permissiveness, which are analogous to those we recently described for an antagonist of IL-1 receptor, labeled 101.10 (55, 295, 297), we propose the following term for compounds sharing these properties, namely ‘allosteramer’.

### **Acknowledgments**

The authors thank Hendrika Fernandez for technical assistance. This study was supported in part by grants from Valorisation Recherche Québec and the Canadian Institute of Health Research (CIHR), including specifically the CIHR team grant CTiGAR. SC and MB are recipients of Canada Research Chairs. CQ, PS and SB are recipients of fellowships/studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada (CQ, PS) and CIHR (SB).

## Figure Legends

**Figure 1.** A) Two-dimensional amino acid sequence model of V2R, identifying regions of derived peptides. B) Peptide sequences and maximum inhibitory efficacy ( $E_{max}$ ) of DDAVP-induced cremasteric vasorelaxation.

**Figure 2.** Antagonism of DDAVP-induced vasorelaxation. A) Ascertainment that DDAVP-induced cremasteric vasorelaxation is V2R-dependent. Rat cremaster was pretreated (30 min) with indicated molecules, V2R-specific competitive antagonist SR121463 (1  $\mu$ M), V1aR-specific antagonist SR49059 (1  $\mu$ M), or VRQ397 (CRAVKY; 10  $\mu$ M). Microvessels were precontracted with U46619 (0.1  $\mu$ M) and tissues treated thereafter with DDAVP (10 nM). Vasodilatation is expressed as a percentage of the inhibition of DDAVP-induced dilatation in absence of antagonist. Data are mean  $\pm$  SEM of 4-6 experiments each performed in duplicates. \* $p$ <0.01 compared with control (DDAVP in absence of antagonists). B) DDAVP-induced vasorelaxation in presence of increasing concentrations of indicated peptides. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments each performed in duplicates; \* $p$ <0.01 compared with ALSRAVKY (2-way ANOVA).

**Figure 3.** A) Saturation isotherm curves of [ $^{125}$ I]VRQ397 and B) [ $^3$ H]AVP;  $K_d$  values were respectively 1 and 1.36 nM. Data are representative of 3 separate experiments each performed in duplicate. C) Specific binding of [ $^{125}$ I]VRQ397 (at maximum efficacy, 20 nM) to HEK293 cells stably expressing V2R, V1R, OTR or native HEK293 cells (devoid of the receptors); specific binding was calculated by subtracting non-specific binding in presence of excess VRQ397 (1  $\mu$ M). Data are mean  $\pm$  SEM of 4-6 experiments; \*  $p$ <0.01 compared to all other values.

**Figure 4.** Specificity of VRQ397. A) Inefficacy of VRQ397 on AVP-induced cremasteric muscle vasoconstriction. Tissues were pretreated (30 min) with vehicle, VRQ397 (10  $\mu$ M) or SR49059 (1  $\mu$ M) and vasoconstriction subsequently induced by

AVP. Note that SR49059 but not VRQ397 prevented AVP-induced constriction. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments. \* $p < 0.01$  compared to curves without asterisks (2-way ANOVA). B) Inefficacy of VRQ397 on oxytocin-induced myometrial contraction. Uterine myometrial strips from CD1 mice were pretreated with vehicle, VRQ397 (10  $\mu$ M) or oxytocin receptor antagonist atosiban (10  $\mu$ M), and isometric contraction induced by oxytocin at concentrations indicated; tension and frequency of contraction were recorded on polygraph. Typical tracing of 3 representative experiments reveal absence of antagonism of oxytocin-induced contraction compared to atosiban. C,D,E) Inefficacy of VRQ397 (10  $\mu$ M) to antagonize cremasteric vasorelaxation to bradykinin, substance P and carbacyclin. Tissues were prepared as described in Fig. 1 legend. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments each performed in duplicates.

**Figure 5.** Non-competitive nature of VRQ397. A) Displacement of bound [ $^{125}$ I]VRQ397 in presence of increasing concentrations of unlabelled VRQ397 or DDAVP. B) Displacement of bound [ $^3$ H]AVP by DDAVP or VRQ397. For (A) and (B) data are representative of 3 separate experiments each performed in duplicate. C) Dose-response of VRQ397 on DDAVP-induced vasorelaxation (described in Fig. 1 legend). Values are mean  $\pm$  SEM of 4-6 experiments each performed in triplicate. \*  $p \leq 0.015$  compared to other values without asterisk (simultaneous non-linear regression). D) Dissociation curves of [ $^3$ H]AVP (10 nM) in presence or not of VRQ397 (100 nM); dissociation was performed with excess unlabelled AVP (1  $\mu$ M). Values are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments each performed in duplicate. \*  $p \leq 0.05$  compared with other curve (simultaneous non-linear regression).

**Figure 6.** Functional selectivity of VRQ397. A) DDAVP (10 nM)-induced cremasteric vasorelaxation is endothelium and cyclooxygenase-dependent. Animals were perfused with CHAPS as described in methods to denude endothelium; relaxation to endothelium-dependent acetylcholine was abolished, whereas constriction to U44619

and relaxation to carbacyclin remained relatively unaltered. In another set of experiments tissues were pretreated with the guanylate cyclase inhibitor ODQ (100  $\mu$ M) or the cyclooxygenase inhibitor ibuprofen (10  $\mu$ M). Data are mean  $\pm$  SEM of 4-6 experiments. \* $p$ <0.01 compared to values without asterisks. B) Net 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  generation in cremasteric muscle stimulated with DDAVP (100 nM) in absence or presence of pretreatment (30 min) with VRQ397 (100 nM), ibuprofen (10  $\mu$ M), or SR121463 (100 nM). Data are mean  $\pm$  SEM of 3-4 experiments. \* $p$ <0.01 compared to values without asterisks. C) Net cAMP generation in HEK293 cells expressing V2R and native V2R-devoid cells in response to DDAVP stimulation (100 nM) in absence or presence of VRQ397 (100 nM) or SR121463 (100 nM). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments performed in duplicates. \* $p$ <0.001 compared to values without asterisks. D) cAMP response to increasing concentrations of DDAVP in V2R-expressing HEK293 cells in presence or absence of VRQ397 (100 nM). Data are mean  $\pm$  SEM of 3 experiments performed in duplicates. E) DDAVP-induced BRET signal in HEK293 cells stably transfected with V2R-VENUS and  $\beta$ -arrestin2-Rluc, seeded at 30,000 cells/well. Cells were pre-incubated for 15 min with SR12463A (100 nM) or VRQ397 (1 or 10  $\mu$ M), and subsequently stimulated with DDAVP (10 nM). BRET signal was measured as described in the Methods section and data presented as % of BRET signal obtained in absence of antagonists. Inset shows DDAVP concentration-dependent recruitment of  $\beta$ -arrestin2-Rluc to agonist activated V2R-VENUS in co-expressing HEK293 cells. BRET results are mean  $\pm$  SEM of 3-5 separate experiments, each performed in duplicate; \* $p$ <0.001 compared to values without asterisks.

**Figure 7.** VRQ397 induces aquaresis. Rats were prepared as described in Methods section. A) Treatment of animals with VRQ397 (70  $\mu$ g/kg/h) induced an increase in urine output (A) and water clearance at 3 h (B). Data are expressed relative to basal values as mean  $\pm$  SEM of 3 experiments; \*  $p$ <0.05 compared to vehicle.

**Supplementary Fig. 1.** Specific binding of [<sup>3</sup>H]AVP and [<sup>3</sup>H]oxytocin (OT) (at maximum efficacy, 40 nM) to HEK293 cells stably expressing V1R, OTR or native HEK293 cells (devoid of the receptors). Specific binding was calculated by subtracting non-specific binding in presence of excess ligand (1 μM). Data are mean ± SEM of 3 experiments; \* p<0.01 compared to untransfected cells

## References

1. **Ali F, Guglin M, Vaitkevicius P, and Ghali JK.** Therapeutic potential of vasopressin receptor antagonists. *Drugs* 67: 847-858, 2007.
2. **An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, and Goetzl EJ.** Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 619-622, 1997.
3. **Avlani VA, Gregory KJ, Morton CJ, Parker MW, Sexton PM, and Christopoulos A.** Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem* 282: 25677-25686, 2007.
4. **Bailey GS.** Labeling of peptides and proteins by radioiodination. *Methods Mol Biol* 32: 441-448, 1994.
5. **Barrett LK, Singer M, and Clapp LH.** Vasopressin: mechanisms of action on the vasculature in health and in septic shock. *Crit Care Med* 35: 33-40, 2007.
6. **Barrow SE, Dollery CT, Heavey DJ, Hickling NE, Ritter JM, and Vial J.** Effect of vasoactive peptides on prostacyclin synthesis in man. *Br J Pharmacol* 87: 243-247, 1986.
7. **Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, and Stasch JP.** NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* 1: 13, 2001.
8. **Belch JJ, Small M, McKenzie F, Hill PA, Lowe GD, McIntyre DE, Forbes CD, and Prentice CR.** DDAVP stimulates prostacyclin production. *Thromb Haemost* 47: 122-123, 1982.
9. **Bichet DG.** Vasopressin receptor mutations in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28: 245-251, 2008.
10. **Buemi M, Di Pasquale G, Ruello A, Floccari F, Aloisi C, Latassa G, Corsonello A, Sturiale A, Corica F, and Frisina N.** Effect of a prostacyclin analogue, iloprost, on urinary aquaporin-2 excretion in humans. *Nephron* 91: 197-202, 2002.
11. **Cain SA, Woodruff TM, Taylor SM, Fairlie DP, Sanderson SD, and Monk PN.** Modulation of ligand selectivity by mutation of the first extracellular loop of the human C5a receptor. *Biochem Pharmacol* 61: 1571-1579, 2001.
12. **Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, Sarazin P, Stea D, Lacombe D, Tremblay P, and Gervais F.** Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem* 278: 34874-34881, 2003.
13. **Charest PG and Bouvier M.** Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 278: 41541-41551, 2003.
14. **Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, and Stevens RC.** High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318: 1258-1265, 2007.

15. **Czaplewski C, Kazmierkiewicz R, and Ciarkowski J.** Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex. *J Comput Aided Mol Des* 12: 275-287, 1998.
16. **Deen PM, van Balkom BW, and Kamsteeg EJ.** Routing of the aquaporin-2 water channel in health and disease. *Eur J Cell Biol* 79: 523-530, 2000.
17. **Derick S, Cheng LL, Voirol MJ, Stoev S, Giacomini M, Wo NC, Szeto HH, Ben Mimoun M, Andres M, Gaillard RC, Guillon G, and Manning M.** [1-deamino-4-cyclohexylalanine] arginine vasopressin: a potent and specific agonist for vasopressin V1b receptors. *Endocrinology* 143: 4655-4664, 2002.
18. **Di Scala-Guenot D and Strosser MT.** Oxytocin receptors on cultured astroglial cells. Regulation by a guanine-nucleotide-binding protein and effect of Mg<sup>2+</sup>. *Biochem J* 284 ( Pt 2): 499-505, 1992.
19. **Ehlert FJ.** Analysis of allosterism in functional assays. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 740-754, 2005.
20. **Feldman BJ, Rosenthal SM, Vargas GA, Fenwick RG, Huang EA, Matsuda-Abedini M, Lustig RH, Mathias RS, Portale AA, Miller WL, and Gitelman SE.** Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med* 352: 1884-1890, 2005.
21. **Galandrin S, Oligny-Longpre G, and Bouvier M.** The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 28: 423-430, 2007.
22. **Gimpl G and Fahrenholz F.** The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81: 629-683, 2001.
23. **Granier S, Terrillon S, Pascal R, Demene H, Bouvier M, Guillon G, and Mendre C.** A cyclic peptide mimicking the third intracellular loop of the V2 vasopressin receptor inhibits signaling through its interaction with receptor dimer and G protein. *J Biol Chem* 279: 50904-50914, 2004.
24. **Guyton AC and Hall JE.** *Textbook of medical physiology*. Philadelphia ; Montreal: W.B. Saunders, 1996.
25. **Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J, and Bouvier M.** High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* 10: 463-475, 2005.
26. **Hardy P, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, and Chemtob S.** Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res* 79: 504-511, 1996.
27. **Hasunuma K, Yamada K, Tamura Y, and Yoshida S.** Cardiovascular and renin responses to desmopressin in humans: role of prostacyclin and beta-adrenergic systems. *Am J Physiol* 260: H1031-1036, 1991.
28. **Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, and Bouvier M.** A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271: 16384-16392, 1996.
29. **Hibert M, Hoflack J, Trumpp-Kallmeyer S, Mouillac B, Chini B, Mahe E, Cotte N, Jard S, Manning M, and Barberis C.** Functional architecture of vasopressin/oxytocin receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 19: 589-596, 1999.

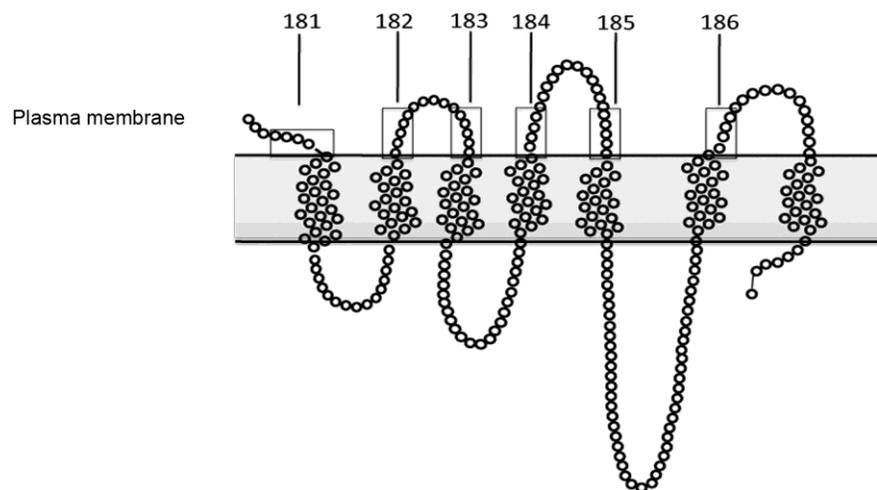
30. **Holmes CL, Landry DW, and Granton JT.** Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care* 8: 15-23, 2004.
31. **Kenakin T.** Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16: 232-238, 1995.
32. **Kenakin T.** Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 407-415, 2007.
33. **Kenakin T.** New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* 4: 919-927, 2005.
34. **Kenakin T and Onaran O.** The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference? *Trends Pharmacol Sci* 23: 275-280, 2002.
35. **Khurana S, Kennedy M, King LR, and Golding H.** Identification of a linear peptide recognized by monoclonal antibody 2D7 capable of generating CCR5-specific antibodies with human immunodeficiency virus-neutralizing activity. *J Virol* 79: 6791-6800, 2005.
36. **Klco JM, Nikiforovich GV, and Baranski TJ.** Genetic analysis of the first and third extracellular loops of the C5a receptor reveals an essential WXFG motif in the first loop. *J Biol Chem* 281: 12010-12019, 2006.
37. **Klco JM, Wiegand CB, Narzinski K, and Baranski TJ.** Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat Struct Mol Biol* 12: 320-326, 2005.
38. **Kooli A, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Bossolasco M, Hou X, Honore JC, Dennery PA, Sapieha P, Varma D, Lachapelle P, Zhu T, Tremblay S, Hardy P, Jain K, Balazy M, and Chemtob S.** trans-Arachidonic acids induce a heme oxygenase-dependent vasorelaxation of cerebral microvasculature. *Free Radic Biol Med* 44: 815-825, 2008.
39. **Krautwurst D, Degtiar VE, Schultz G, and Hescheler J.** The isoquinoline derivative LOE 908 selectively blocks vasopressin-activated nonselective cation currents in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349: 301-307, 1994.
40. **Kristiansen K.** Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103: 21-80, 2004.
41. **Kubo S, Ishiki T, Doe I, Sekiguchi F, Nishikawa H, Kawai K, Matsui H, and Kawabata A.** Distinct activity of peptide mimetic intracellular ligands (pepducins) for proteinase-activated receptor-1 in multiple cells/tissues. *Ann N Y Acad Sci* 1091: 445-459, 2006.
42. **Lacour C, Galindo G, Canals F, Segondy D, Cazaubon C, Serradeil-Le Gal C, Roccon A, and Nisato D.** Aquaretic and hormonal effects of a vasopressin V(2) receptor antagonist after acute and long-term treatment in rats. *Eur J Pharmacol* 394: 131-138, 2000.
43. **Leach K, Sexton PM, and Christopoulos A.** Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 28: 382-389, 2007.

44. **Li DY, Hardy P, Abran D, Martinez-Bermudez AK, Guerguerian AM, Bhattacharya M, Almazan G, Menezes R, Peri KG, Varma DR, and Chemtob S.** Key role for cyclooxygenase-2 in PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>α receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am J Physiol* 273: R1283-1290, 1997.
45. **Lippe C and Ardizzone C.** Actions of vasopressin and isoprenaline on the ionic transport across the isolated frog skin in the presence and the absence of adenylyl cyclase inhibitors MDL12330A and SQ22536. *Comp Biochem Physiol C* 99: 209-211, 1991.
46. **Litschig S, Gasparini F, Rueegg D, Stoehr N, Flor PJ, Vranesic I, Prezeau L, Pin JP, Thomsen C, and Kuhn R.** CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol Pharmacol* 55: 453-461, 1999.
47. **Macion-Dazard R, Callahan N, Xu Z, Wu N, Thibonnier M, and Shoham M.** Mapping the binding site of six nonpeptide antagonists to the human V<sub>2</sub>-renal vasopressin receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 564-571, 2006.
48. **Marrache AM, Gobeil F, Jr., Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, Bkaily G, Bourdeau A, Sirois MG, Vazquez-Tello A, Fan L, Joyal JS, Filep JG, Varma DR, Ribeiro-Da-Silva A, and Chemtob S.** Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* 169: 6474-6481, 2002.
49. **Martinez MC, Aldasoro M, Vila JM, Medina P, and Lluch S.** Responses to vasopressin and desmopressin of human cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 622-627, 1994.
50. **Martinez MC, Vila JM, Aldasoro M, Medina P, Flor B, and Lluch S.** Relaxation of human isolated mesenteric arteries by vasopressin and desmopressin. *Br J Pharmacol* 113: 419-424, 1994.
51. **Matthews JC.** *Fundamentals of receptor, enzyme, and transport kinetics.* Boca Raton: CRC Press, 1993.
52. **McDonnell JM, Beavil AJ, Mackay GA, Jameson BA, Korngold R, Gould HJ, and Sutton BJ.** Structure based design and characterization of peptides that inhibit IgE binding to its high-affinity receptor. *Nat Struct Biol* 3: 419-426, 1996.
53. **Medina P, Segarra G, Vila JM, Chuan P, Domenech C, and Lluch S.** V<sub>2</sub>-receptor-mediated relaxation of human renal arteries in response to desmopressin. *Am J Hypertens* 12: 188-193, 1999.
54. **Melin P, Trojnar J, Johansson B, Vilhardt H, and Akerlund M.** Synthetic antagonists of the myometrial response to vasopressin and oxytocin. *J Endocrinol* 111: 125-131, 1986.
55. **Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, and Bouvier M.** Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V<sub>2</sub> vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 105: 887-895, 2000.
56. **Mutlu GM and Factor P.** Role of vasopressin in the management of septic shock. *Intensive Care Med* 30: 1276-1291, 2004.

57. **Naitoh M, Suzuki H, Murakami M, Matsumoto A, Ichihara A, Nakamoto H, Yamamura Y, and Saruta T.** Arginine vasopressin produces renal vasodilation via V2 receptors in conscious dogs. *Am J Physiol* 265: R934-942, 1993.
58. **Okamura T, Toda M, Ayajiki K, and Toda N.** Receptor subtypes involved in relaxation and contraction by arginine vasopressin in canine isolated short posterior ciliary arteries. *J Vasc Res* 34: 464-472, 1997.
59. **Peri KG, Quiniou C, Hou X, Abran D, Varma DR, Lubell WD, and Chemtob S.** THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* 26: 389-397, 2002.
60. **Petry R, Craik D, Haaima G, Fromme B, Klump H, Kiefer W, Palm D, and Millar R.** Secondary structure of the third extracellular loop responsible for ligand selectivity of a mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Med Chem* 45: 1026-1034, 2002.
61. **Phalipou S, Cotte N, Carnazzi E, Seyer R, Mahe E, Jard S, Barberis C, and Mouillac B.** Mapping peptide-binding domains of the human V1a vasopressin receptor with a photoactivatable linear peptide antagonist. *J Biol Chem* 272: 26536-26544, 1997.
62. **Quiniou C, Sapiha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, Leduc M, Rihakova L, Joyal JS, Nadeau S, Heveker N, Lubell W, Sennlaub F, Gobeil F, Jr., Miller G, Pshezhetsky AV, and Chemtob S.** Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol* 180: 6977-6987, 2008.
63. **Rangasetty UC, Gheorghide M, Uretsky BF, Orlandi C, and Barbagelata A.** Tolvaptan: a selective vasopressin type 2 receptor antagonist in congestive heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* 15: 533-540, 2006.
64. **Robertson GL.** Regulation of arginine vasopressin in the syndrome of inappropriate antidiuresis. *Am J Med* 119: S36-42, 2006.
65. **Rodriguez AL, Nong Y, Sekaran NK, Alagille D, Tamagnan GD, and Conn PJ.** A close structural analog of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine acts as a neutral allosteric site ligand on metabotropic glutamate receptor subtype 5 and blocks the effects of multiple allosteric modulators. *Mol Pharmacol* 68: 1793-1802, 2005.
66. **Samoilova M, Wentlandt K, Adamchik Y, Velumian AA, and Carlen PL.** Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 210: 762-775, 2008.
67. **Samson M, LaRosa G, Libert F, Painsavoine P, Detheux M, Vassart G, and Parmentier M.** The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol Chem* 272: 24934-24941, 1997.
68. **Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Valette G, Garcia G, Pascal M, Maffrand JP, and Le Fur G.** Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. *Prog Brain Res* 139: 197-210, 2002.
69. **Sica DA.** Hyponatremia and heart failure--treatment considerations. *Congest Heart Fail* 12: 55-60, 2006.
70. **Sun K, Lin BC, Wang CH, and Zhu HN.** Comparison of selective arginine vasopressin V1 and V2 receptor antagonists on burn shock in the rat. *Cardiovasc Res* 25: 265-269, 1991.

71. **Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, and Bouvier M.** Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* 17: 677-691, 2003.
72. **Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, and Mailman RB.** Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 1-13, 2007.
73. **Vargas-Poussou R, Forestier L, Dautzenberg MD, Niaudet P, Dechaux M, and Antignac C.** Mutations in the vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 genes in 12 families with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 8: 1855-1862, 1997.
74. **Verbalis JG.** AVP receptor antagonists as aquaretics: review and assessment of clinical data. *Cleve Clin J Med* 73 Suppl 3: S24-33, 2006.
75. **Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, and Chemtob S.** Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1343-1360, 2001.
76. **Yamamura Y, Ogawa H, Yamashita H, Chihara T, Miyamoto H, Nakamura S, Onogawa T, Yamashita T, Hosokawa T, Mori T, and et al.** Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 105: 787-791, 1992.

A)



B)

Peptide	Sequence	Inhibitory Emax (%)
VRQ181	PLLARAELA	60
VRQ182	QLAWKATDR	0
VRQ183	ALCRAVKY	90
VRQ184	FAQRNVEGGS	33
VRQ185	ACFAEPWGRRT	0
VRQ186	QLWAAWDPEA	0

Figure 1

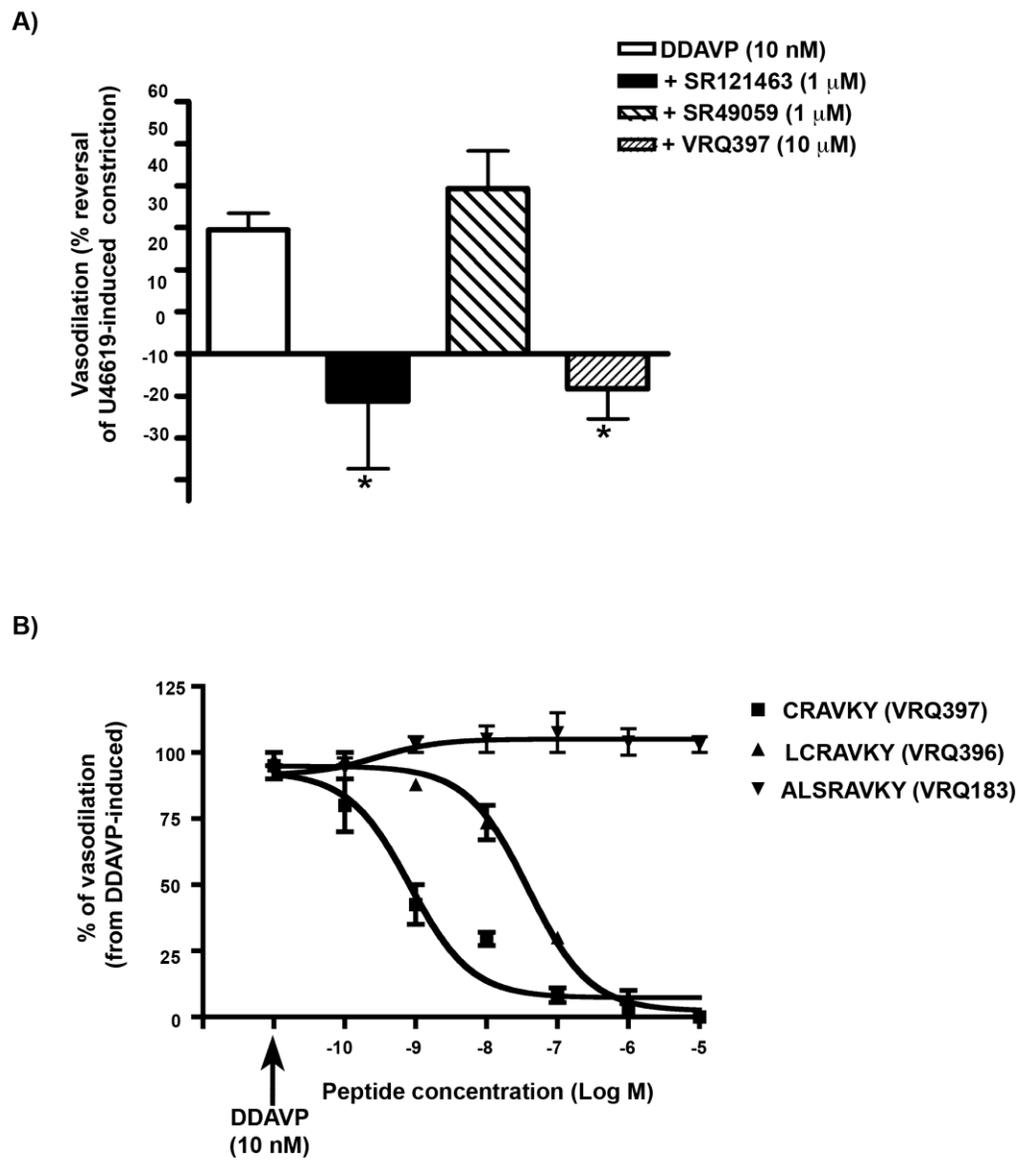


Figure 2

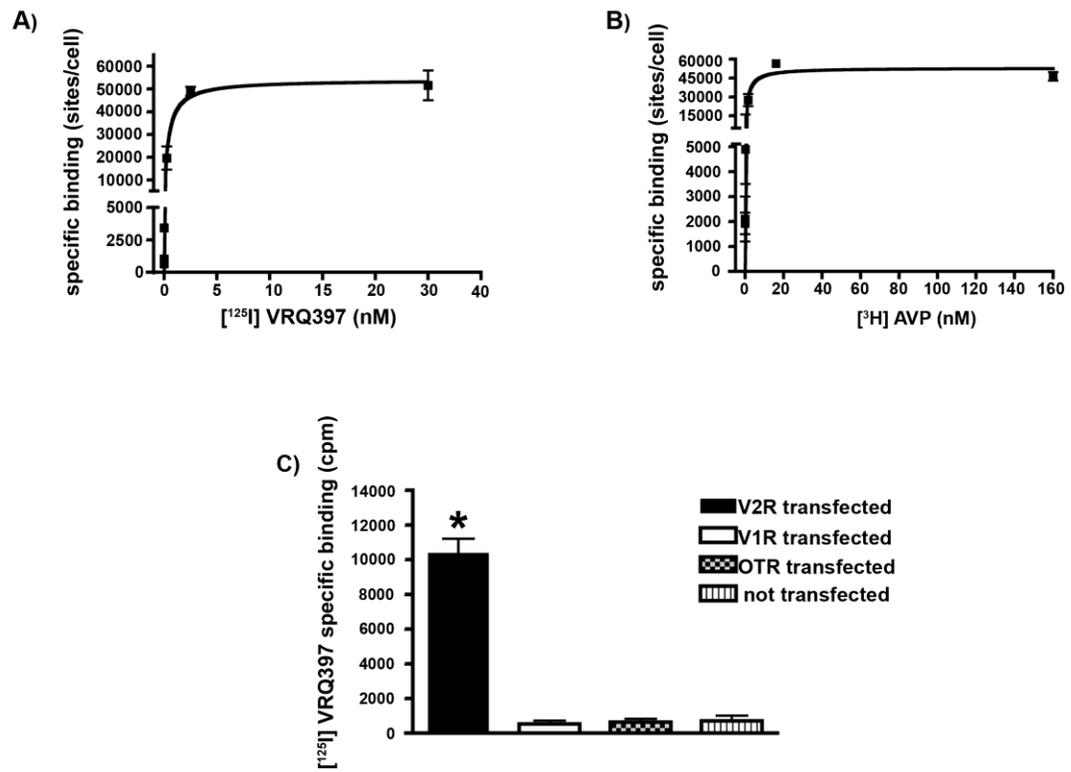


Figure 3

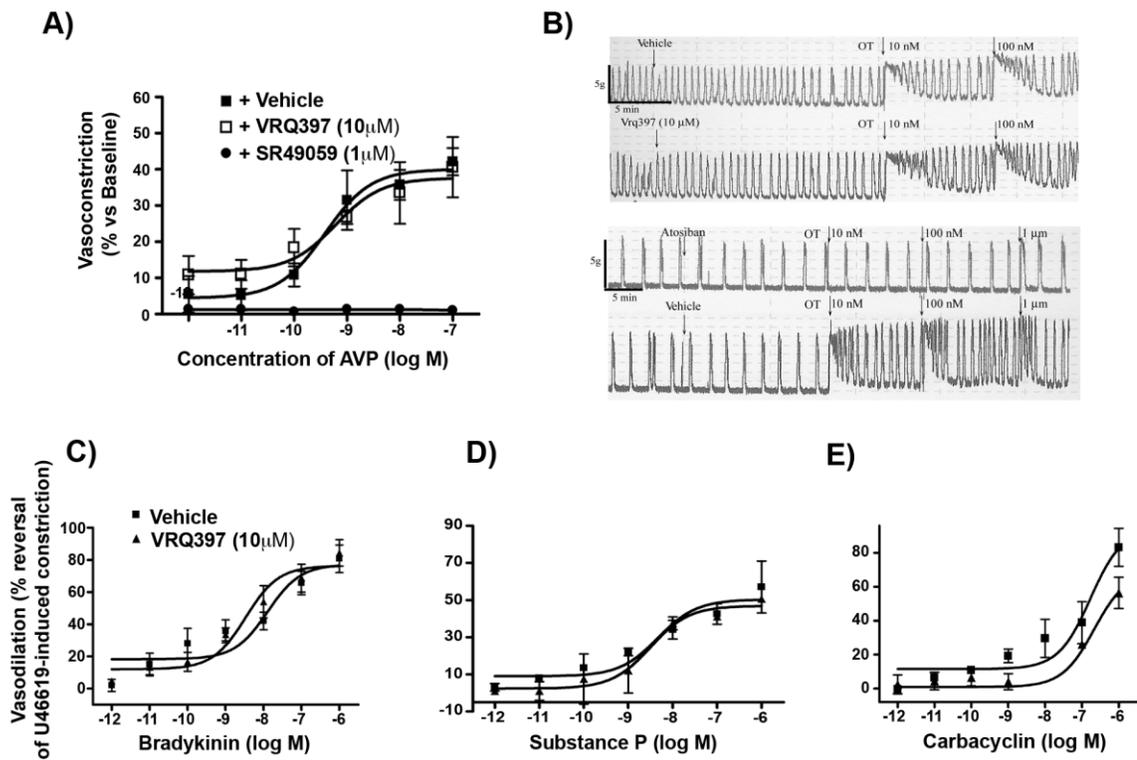


Figure 4

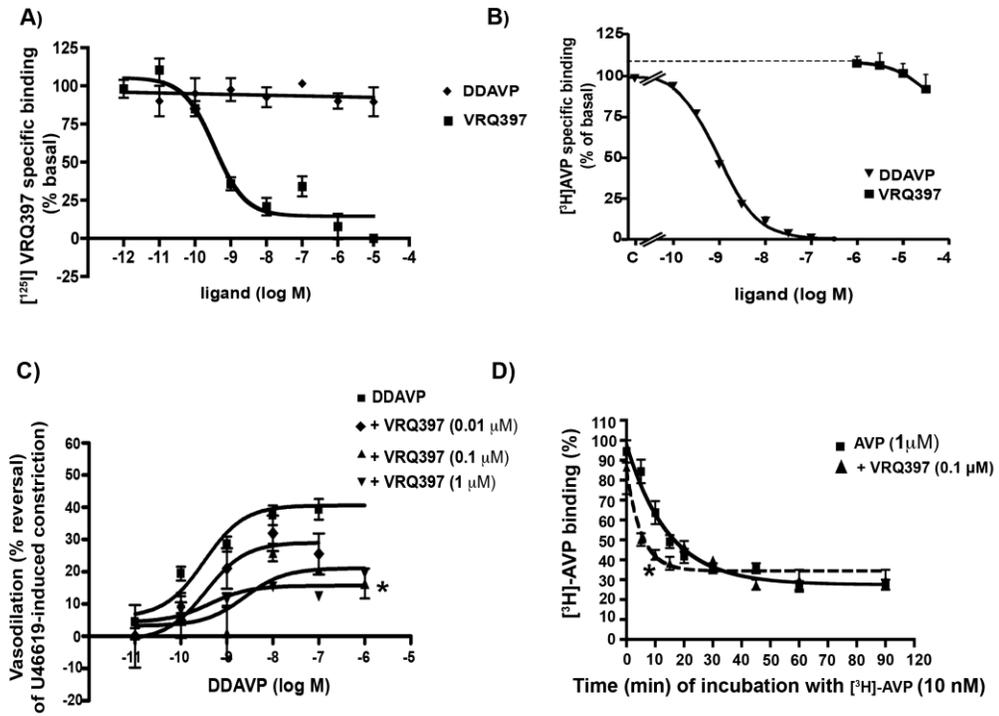


Figure 5

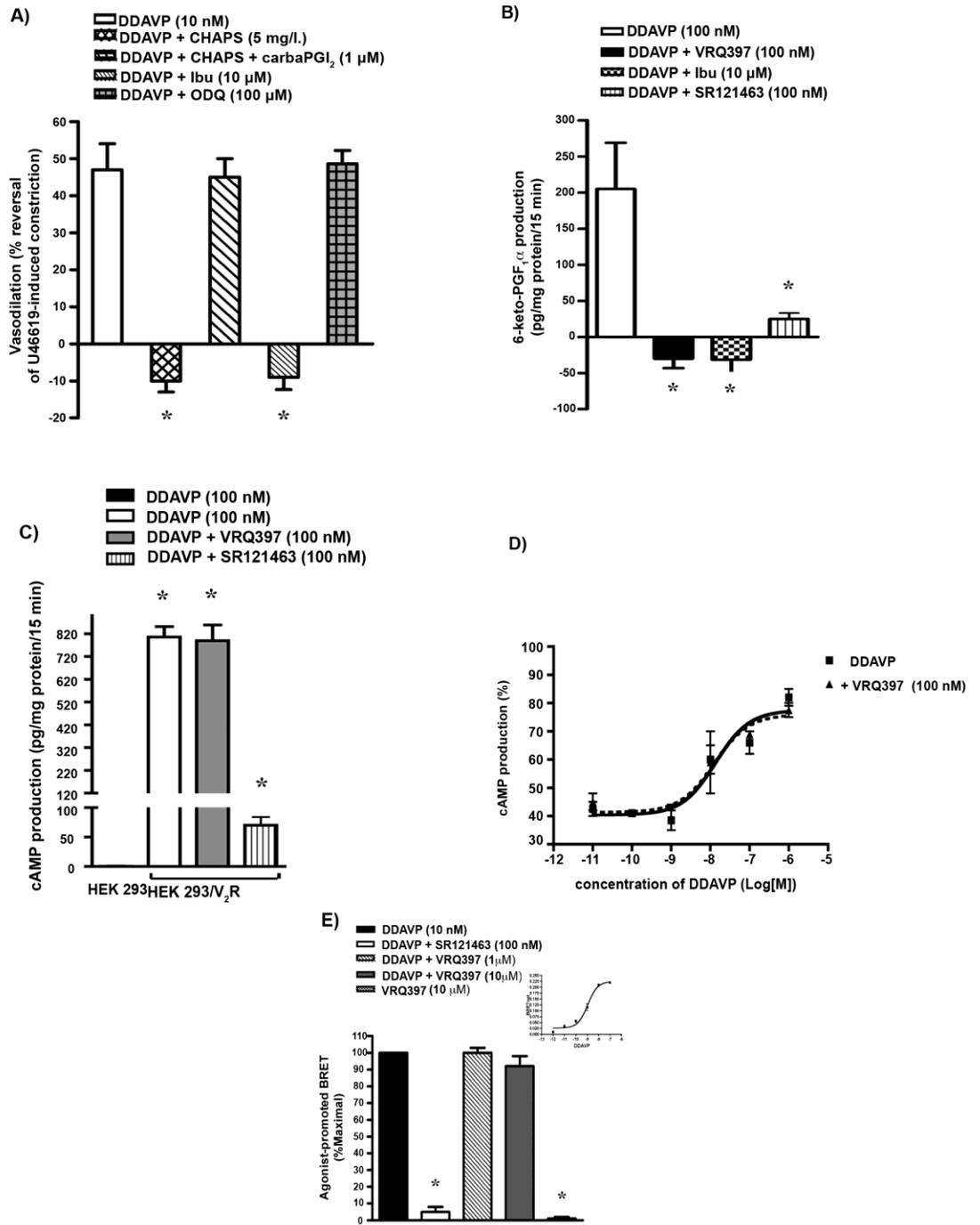


Figure 6

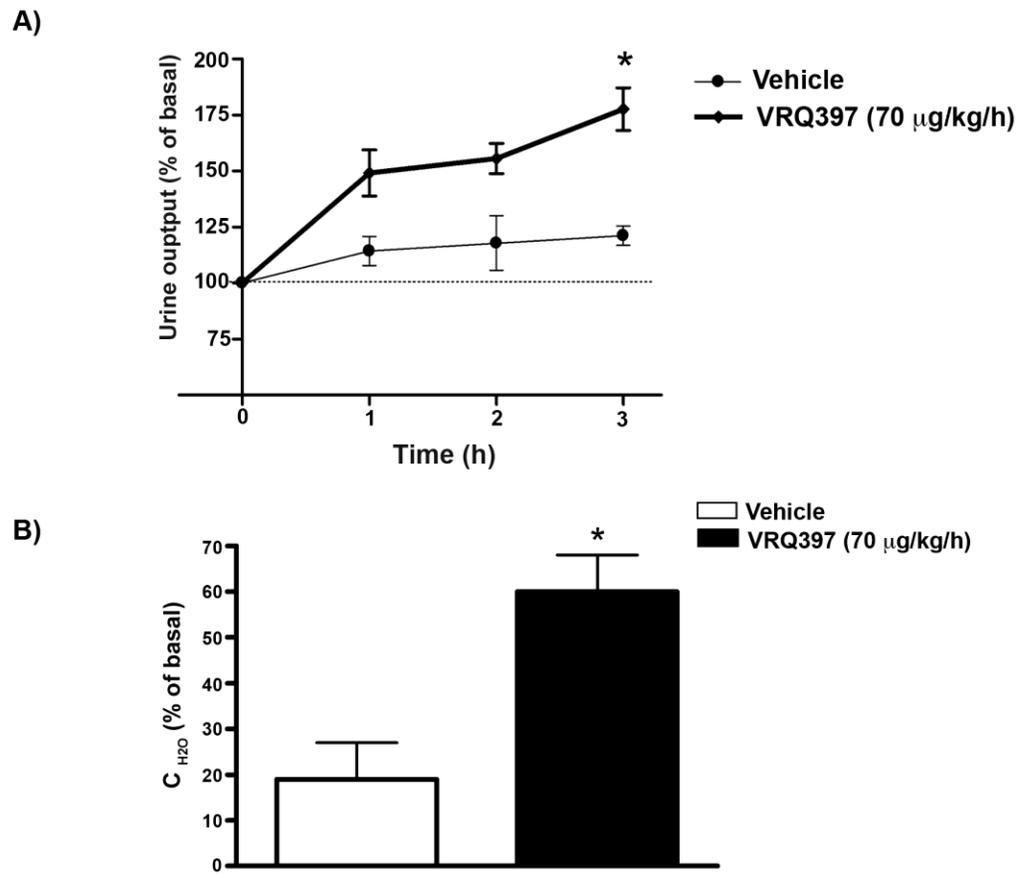


Figure 7

**Supplementary Table 1. Log EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> of DDAVP-induced vasorelaxation in presence of increasing concentrations of VRQ397 (data from Figure 5C).**

[VRQ397] log	Log EC <sub>50</sub> ± SEM	E <sub>max</sub> ± SEM
DDAVP only (n=6)	9.87 ± 0.24	39.2 ± 1.1
-8 (n=5)	9.40 ± 0.10	29.2 ± 1.0
-7 (n=6)	9.37 (0.16)	20.2 (1.1)*
-6 (n=6)	10.10 (0.2)	14.7 (1.1)*

\*p < 0.015 (simultaneous non linear regression compared to all); EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> refer respectively to effective concentration at which 50% efficacy is achieved, and maximum efficacy.

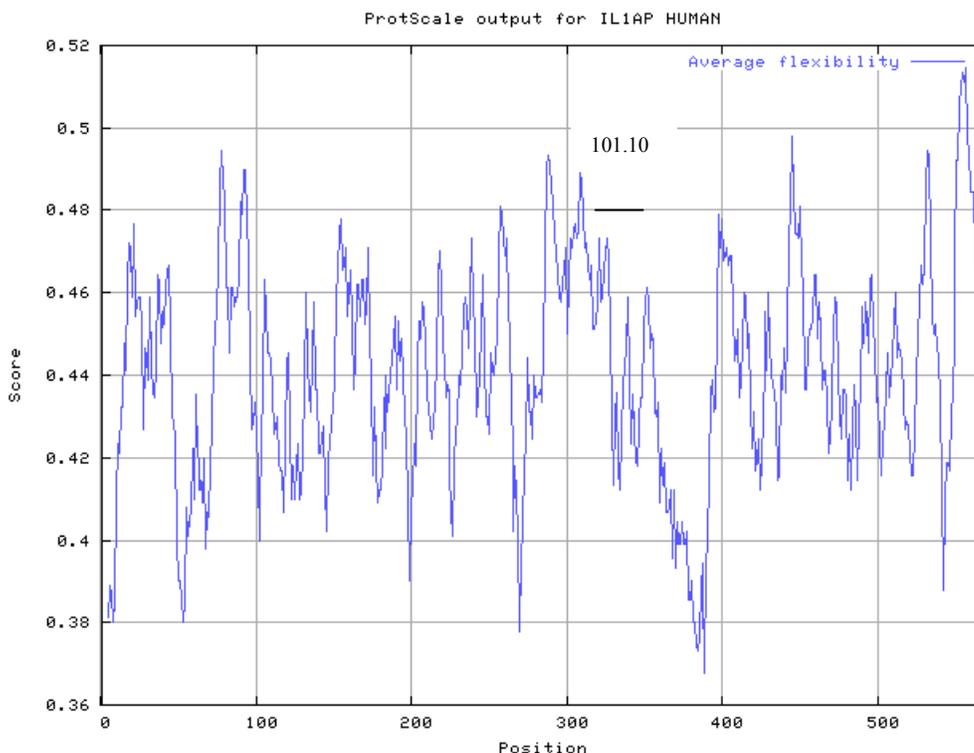
## Partie D : Discussion

### 1. *Anti-IL-1R : APG 101.10*

Basée sur le fait que IL-1RAcP interagit avec le complexe IL-1R/IL-1 (169) et que la portion extracellulaire recombinante de IL-1RAcP peut interférer avec IL-1R (168, 182), nous avons conçus des petits peptides qui reproduisent plusieurs régions de la protéine accessoire. De ces peptides, celui appelé 101.10, inhibait de façon particulièrement efficace les effets biologiques de IL-1 $\beta$  *in vitro* et démontrait une modulation de ces effets, par exemple en inhibant 100% de la prolifération des thymocytes et 50% de la formation de PGE<sub>2</sub>. 101.10 est efficace, sélectif et est un inhibiteur réversible et non-compétitif. Il démontre des propriétés de modulateur en ne se liant pas au site orthostérique de liaison du substrat bien qu'il affecte légèrement l'affinité du ligand pour le récepteur et interfère de façon variable avec différentes réponses *in vitro* de IL-1. La séquence de 101.10 est située dans la portion juxta membranaire de la protéine accessoire qui n'interagit pas avec le ligand. Ces caractéristiques le distingue de l'inhibiteur compétitif Kineret (IL-1Ra) (309). En accord avec les effets que IL-1 induit *in vitro* et *in vivo* (spécifiquement l'hyperthermie), 101.10 a démontré une efficacité anti-inflammatoire dans l'inflammation aigüe impliquant IL-1. Ces résultats décrivent un nouvel antagoniste peptidique de 850 daltons présentant pour la première fois un mécanisme antagoniste non-compétitif de IL-1R et démontrant des propriétés modulateurs d'inhibition des effets biologiques de IL-1 présentant donc les caractéristiques d'un inhibiteur allostérique (modulateur négatif) présentant de la sélectivité fonctionnelle (61, 266, 311-314).

La structure de IL-1R liée à IL-1 $\beta$  a été résolue en 1997 (155) et consiste en trois domaines IgG-like (1ITB). La protéine accessoire IL-1RAcP n'avait pas été cristallisée au moment de la conception de ces peptides. Très récemment Wang D *et al*

(168) ont déterminé la structure de la protéine accessoire en présence de IL-1 $\beta$  et de IL-1RII et ont pu par la suite modéliser l'interaction IL-1R1\IL-1RAcP.



**Figure 22. Profil de flexibilité de IL-1RAcP généré par ProtScale.**

Les peptides ont été conçus à partir des boucles et régions inter-domaines de la protéine accessoire qui possèdent des indices de flexibilité élevées (Figure 22). Ces régions étaient donc susceptibles d'être impliquées dans des changements de conformation. Plusieurs peptides ayant démontré une activité modulatrice sont dérivés de portions de la protéine accessoire situées dans des régions identifiées par Wang et coll. comme interagissant entre elles.

La séquence du peptide API-103 se situe entre les domaines D1 et D2 à l'opposé de IL-1R dans la boucle entre les deux domaines. Le peptide pourrait alors stabiliser une conformation de la protéine accessoire pouvant se lier avec IL-1R, mais permettant de potentialiser la phosphorylation de p38.

Le peptide API-106 est tiré de la région flexible entre D2 et D3 qui interagit avec IL-1R1 et pourrait avoir un certain effet sur la conformation et la cinétique de formation du complexe IL-1R1-IL-1/IL-1RAcP qui se reflète dans sa capacité d'inhiber la synthèse de PGE2, mais qui n'a aucun effet sur la phosphorylation de p38. API-108 reproduit une boucle  $\beta$  entre deux brins  $\beta$ . Le peptide API-101 représente la portion juxtamembranaire de la protéine accessoire.

Des séquences peptidiques dérivées des séquences primaires des protéines ont déjà été utilisées avec succès pour inhiber l'activité biologique de plusieurs récepteurs (77, 83, 85, 268, 315, 389) et les effets de ces peptides coïncident avec les effets de mutations spécifiques (228, 316). Étant donné que ces régions d'intérêt sont à des endroits différents des sites de liaison orthostériques, ces peptides étaient des antagonistes non-compétitifs et pouvaient moduler l'affinité de la liaison du ligand à son site; ces caractéristiques correspondent à celles d'un modulateur allostérique (312, 318) et basé sur les résultats présentés, ces critères s'appliquent aussi à 101.10. 101.10 se lie spécifiquement à IL-1R (incluant la liaison par agent réticulant), mais pas au site de liaison de IL-1; de ce fait il est un antagoniste non-compétitif (272, 390) par rapport à l'activité biologique générée par IL-1. Étant donné que 101.10 fonctionne en modulant (plutôt qu'en interférant totalement) la liaison de IL-1 à son site orthostérique sur IL-1RI il permet tout de même la liaison du complexe IL-1RI et de la protéine accessoire IL-1RAcP, 101.10 peut aussi être impliqué dans la dissociation partielle et non complète du complexe comme le suggère les expériences de liaison avec un agent réticulant. La propriété non-compétitive de 101.10 sur les effets biologiques générés par IL-1 est renforcée par le fait que malgré des concentrations de plus en plus élevées de 101.10, son effet antagoniste sur la prolifération des cellules TF-1 induite par IL-1 atteint un plateau, ce qui est démontré par le graphique de Schild. Au contraire, l'effet d'un antagoniste orthostérique, par définition, peut être surmonté par des concentrations de plus en plus élevées de ligand naturel.

Une autre propriété des modulateurs allostériques vient de leur habileté à moduler légèrement l'affinité de liaison du ligand orthostérique. Ceci a été démontré par 101.10 qui diminuait l'affinité de IL-1 pour IL-1RI; en effet, la courbe de

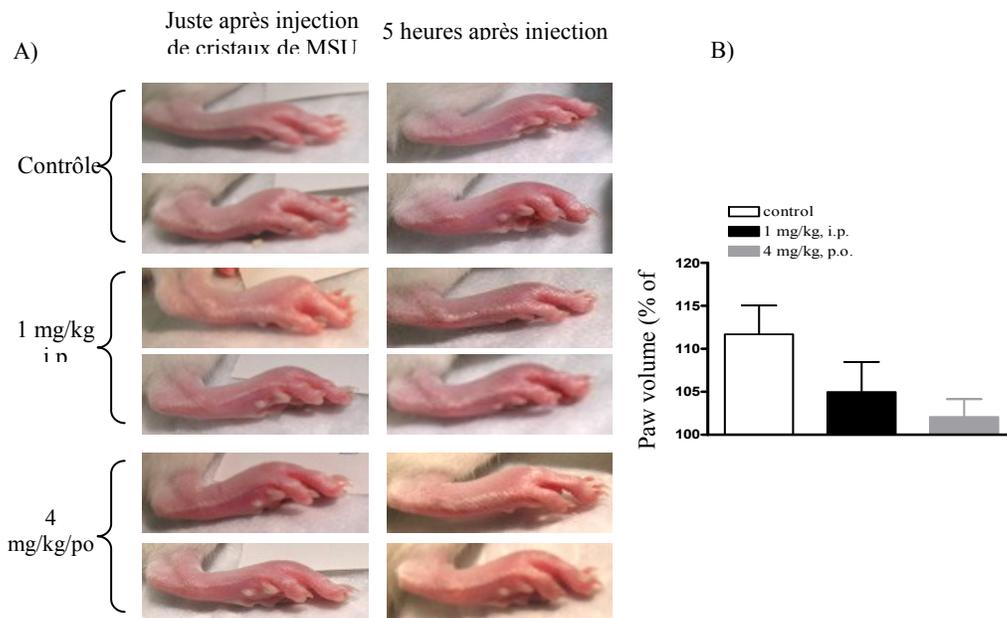
déplacement de [<sup>125</sup>I]-IL-1 par IL-1 était déplacée vers la droite en présence de 101.10. L'intensité du changement d'affinité et d'efficacité induite par un modulateur tel que 101.10 indique qu'un changement structural coopératif est intervenu, une mesure de la perception qu'ont les ligands orthostériques et allostériques de chacun (29, 61, 228, 391). Les études cristallographiques vont échouer à détecter des changements de conformation subtils, mais ceux-ci peuvent avoir de profonds effets sur l'activité biologique qui peuvent être mieux évalués par des essais de fonction et de liaison. On peut d'ailleurs constater que 101.10 a un effet modéré sur la diminution de l'affinité de liaison de IL-1, mais par contre a un effet modulateur sur plusieurs voies de signalisation. Ces observations contrastent avec les effets d'un inhibiteur compétitif où le changement d'affinité se reflète avec la même intensité sur la fonction biologique générée par le ligand (13, 312, 321).

La différence majeure entre un essai fonctionnel et un essai de liaison est que l'on regarde des isoformes différents. L'essai de liaison regarde uniquement le récepteur en complexe avec son ligand (marqué) tandis que l'essai fonctionnel regarde les formes de récepteurs actives qui génèrent une réponse au niveau du cytoplasme en interaction avec les complexes protéiques cytoplasmiques (7, 312).

101.10 a aussi une activité biologique *in vivo* qui concorde avec les effets pro-inflammatoires de IL-1. 101.10 inhibait les effets hypotenseurs et hyperthermiques de IL-1. Étant donné le rôle de IL-1 dans les crises inflammatoires, sa contribution dans des modèles animaux de maladies inflammatoires était prévisible (260, 308). En effet, l'inflammation du colon est caractérisée par une implication des cellules Th1 avec de hauts niveaux de IL-23, IL-6, 8, 18, TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . Cette dernière est majoritairement produite par les monocytes/macrophages (327) (328). Dans l'inflammation de la peau, IL-1 est principalement trouvé dans les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales sous la forme d'une réserve prête à être relâchée lorsqu'il y a inflammation (193, 392). 101.10 était efficace dans des modèles d'inflammation chez les animaux, c'est-à-dire, dans un modèle d'inflammation de l'intestin induite par le TNBS et dans un modèle d'inflammation de la peau induite par le PMA, ce qui concordait avec les résultats déjà publiés à propos de l'efficacité de IL-1Ra dans des

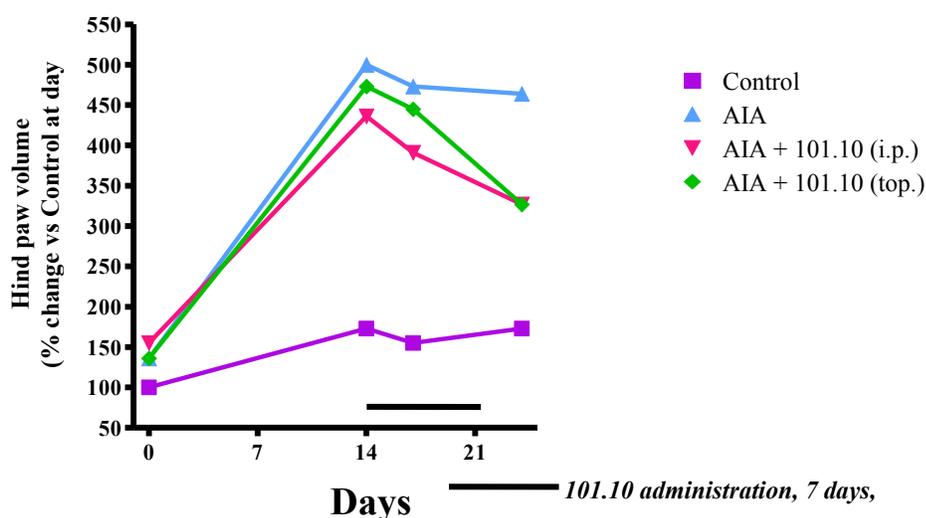
modèles similaires (392) (333, 393). Au contraire, dans des modèles inflammatoires induits chez les animaux déficients en IL-1RI, 101.10 était totalement inefficace à prévenir les signes d'inflammation.

La protéine recombinante IL-1Ra commercialisée sous le nom Anakinra a démontré une efficacité à inhiber l'œdème causé par la goutte (394) confirmant le rôle inflammatoire majeur de IL-1 dans cette pathologie. Nous avons donc vérifié si 101.10 démontrait une activité inhibitrice dans un modèle murin de la goutte. Des cristaux d'urate monosodique monohydrate ont été injectés dans les articulations de rats Sprague-Dawley. Dans un modèle de goutte, 101.10 administré oralement (4 mg/kg/jour) a démontré une efficacité à diminuer l'œdème et la rougeur caractéristique de l'inflammation due à l'accumulation de cristaux. Ces résultats sont en accord avec le rôle de premier plan joué par IL-1 $\beta$  dans les maladies auto inflammatoires (Figure 23).



**Figure 23 Efficacité de 101.10 dans un modèle de goutte (injection de MSU) inflammatoire.** A) Représentation photographique des signes inflammatoires avec et sans 101.10. B) Volume des pattes mesuré avec un pied à coulisse électronique.

De plus, 101.10 a démontré une efficacité à diminuer l'œdème des pattes dans un modèle murin d'arthrite induite par adjuvant. Au jour 1, 100  $\mu$ l d'adjuvant complet de Freund est injecté dans les articulations des pattes et au jour 14, 101.10 est administré de façon topique (1 mg/kg/jour deux fois par jour) et par injection intra-péritonéale (2.5 mg/kg/jour bid). Les animaux ont été pesés et le volume des pattes mesurés chaque jour. Au jour 21 les animaux ont été sacrifiés (Figure 24).



**Figure 24. Efficacité de 101.10 dans un modèle d'arthrite induite par un adjuvant.**

Peu d'inhibiteurs allostériques ayant pour cible un récepteur de cytokines (à un seul domaine transmembranaire) ont été développés jusqu'à présent. Murali R *et al.* ont démontré en 2005 que la liaison d'une petite molécule nommée F002 induisait un changement d'orientation du tryptophane 107 du récepteur TNF. Trp107 était situé à distance du site orthostérique et du site allostérique de F002. La liaison de F002 inhibait la phosphorylation de p38 et l'activation de NF $\kappa$ B. De plus, dans un modèle d'arthrite induite par le collagène, F002 inhibait les signes inflammatoires.

Un décapeptide RDP58 (dérivé de molécules du complexe d'histocompatibilité classe 1; séquence : Arg-Norleucine(Nle)-Nle-Arg-Nle-Nle-Nle-Gly-Tyr) a aussi démontré une activité inhibitrice lorsque administré oralement dans un modèle de

colite ulcéreuse (395). Ce peptide se lie au complexe MyD88-IRAK-TRAF6 gouvernant la signalisation des TLR, de IL-1RI et IL-18R.

En résumé, nous avons conçu un petit peptide possédant des propriétés antagonistes de IL-1RI, 101.10, qui est dérivé d'une région flexible de la protéine accessoire IL-1RAcP et qui présente des propriétés correspondant à celles d'un modulateur négatif allostérique. Contrairement à IL-1Ra qui agit comme un compétiteur de IL-1 et interfère avec toutes les actions biologiques de IL-1RI, incluant les effets pouvant être bénéfiques tels que dans le système immunitaire inné (ce fait augmente les risques d'infections secondaire et même de développement tumoral) notre peptide démontre une sélectivité fonctionnelle. Nous avons aussi décrit le premier peptide inhibiteur de récepteur de cytokine.

## **2. Antagoniste du récepteur V2R : VRQ397 :**

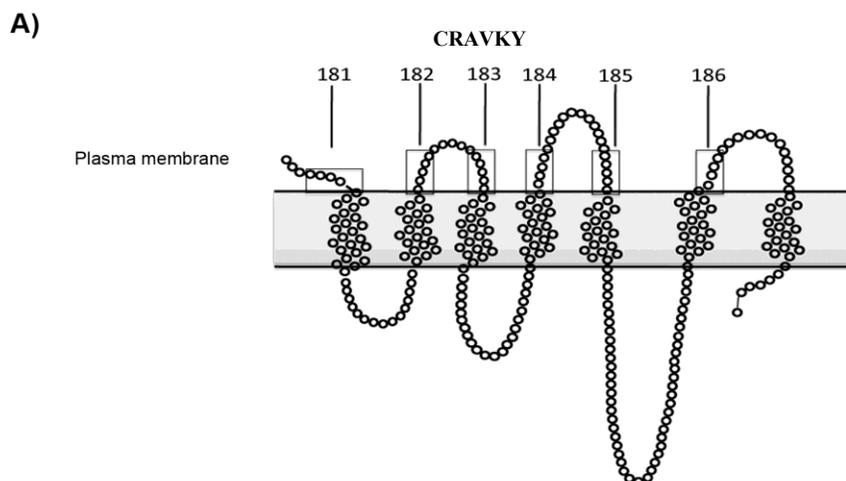
En se basant sur les études de mutagenèse dirigée contre des sites stratégiques, le marquage de photo affinité et un balayage de cystéines, un grand nombre de régions importantes pour l'activation et l'activité des récepteurs couplés aux protéines G ont été identifiées (205). Parmi ces régions, la seconde boucle extracellulaire a particulièrement fait l'objet de recherches concernant son rôle dans la liaison du ligand orthostérique et de l'activation des récepteurs (386). Les boucles adjacentes (première et troisième) extracellulaires ont aussi fait l'objet de plusieurs recherches et ont démontré plusieurs propriétés structurales (257, 258) y compris dans les récepteurs de la vasopressine (259). En se basant sur le fait que la deuxième boucle extracellulaire se replie possiblement sur la surface du V2R pour la régulation de son activation et la liaison du ligand (211) et que ce repliement implique la déstabilisation et le réarrangement des interactions avec les autres boucles extracellulaires (particulièrement dans la région juxtamembranaire) nous avons conçu de petits peptides qui reproduisent les régions juxtamembranaires. Des études de mutagenèse et de cinétique sous-entendent que certains allostériques antagonistes pourraient agir à l'interface domaine extracellulaire/membrane. Matsui *et al.* ont démontré, en 1995, par

mutagenèse dirigée qu'un site allostérique important se situait dans la portion juxtamembranaire du récepteur muscarinique. Des sites de modulation allostériques positive et négative ont aussi été décrits pour les récepteurs de calcitonine et de l'angiotensine II respectivement (240, 241).

Parmi les peptides anti-V2R que nous avons conçus, CRAVKY (nommé VRQ397), un dérivé du peptide original VRQ183 (ALCRAVKY) a démontré la plus importante activité inhibitrice du récepteur V2R. CRAVKY inhibe de façon variable différentes voies de signalisation activées par la liaison de la vasopressine sur le V2R. Cette variabilité le distingue des inhibiteurs déjà présents en pharmacologie pour le V2R (148). Les résultats obtenus *in vitro* ont d'ailleurs été reproduits *in vivo*. VRQ397 inhibe aussi l'activité diurétique de la vasopressine.

VRQ397 provient d'une région différente de la région de liaison du ligand orthostérique (Figure 25) (vasopressine) qui s'enfonce dans la région intramembranaire et qui implique particulièrement la septième hélice transmembranaire ((83, 254).

Étant donné que la région d'où provient VRQ397 est éloignée de la région orthostérique, ce peptide possède une activité inhibitrice non-compétitive et affectera de



**Figure 25. Position de CRAVKY dans la structure de V2R**

façon différente les fonctions liées à la liaison du ligand orthostérique (29, 61, 62). VRQ397 se lie de façon spécifique mais ne déplace pas le ligand orthostérique; VRQ397 cependant module la cinétique de liaison de la vasopressine. De plus, de fortes concentrations de DDAVP (agoniste analogue de la vasopressine) ne peuvent contrer l'effet inhibiteur de VRQ397 ce qui confirme son caractère non compétitif. Au contraire, un antagonisme compétitif et orthostérique peut être atténué et surmonté par des concentrations de plus en plus élevées du ligand orthostérique.

VRQ397 se liait à des cellules contenant le V2R, mais non à celles qui n'en contenaient pas. De la même façon, le peptide ne se liait pas à des cellules transfectées par le V1R ou le récepteur de l'ocytocine, OTR. Ces derniers récepteurs présentent des séquences primaires d'acides aminés de la région d'où est dérivé CRAVKY différentes du V2R (c'est-à-dire, CRVVKH et CRLVKY). Cette spécificité de VRQ397 est par la suite corroborée par son incapacité à inhiber une vasodilatation induite par la substance P et la bradykinine (plutôt que DDAVP) ainsi que la vasodilatation induite par la carbacycline (analogue stable de PGI<sub>2</sub>) en aval de DDAVP.

VRQ397 présente une autre caractéristique importante des inhibiteurs allostériques : la possibilité d'inhiber de façon sélective, certaines voies de signalisation plutôt que d'autres. VRQ397 n'inhibe pas la production d'AMP cyclique et le recrutement de  $\beta$ -arrestine induite par DDAVP contrairement à l'inhibiteur orthostérique SR121463. Cette sélectivité fonctionnelle pourrait être le résultat de la liaison de VRQ397 à une conformation particulière de V2R, stabilisant ainsi cette conformation et déplaçant l'équilibre dynamique en faveur de cette dernière. De cette façon, certaines conformations qui sont favorisées vont activer ou non certaines voies de signalisation (60, 61, 266). De ce fait, en modulant les voies de signalisation activées à partir du V2R, ces ligands allostériques vont conférer une plus grande sélectivité et moins d'effets secondaires (62). Au contraire, les inhibiteurs orthostériques vont complètement inhiber toutes les fonctions du récepteur en empêchant le ligand de se lier, ouvrant la voie à de nombreux effets secondaires non désirés.

Récemment, Goupil E *et al.* (396) ont démontré qu'un inhibiteur allostérique (PDC113.824) du récepteur de PGF2 $\alpha$  (récepteur FP) inhibait la voie des Rho kinases, mais activait la protéine kinase C et les MAPK. Au contraire, la voie classique des inositols phosphates (FP est couplé à Gq) n'était pas affectée. De même que CRAVKY n'affecte pas la voie classique de l'AMPc mais plutôt la synthèse de prostacycline, l'exemple du récepteur FP et de PDC113.824 illustre bien le concept de ligand biaisé et de sélectivité fonctionnelle qui sont les caractéristiques de véritables modulateurs allostériques.

### 3. Changement conformationnel et ligands biaisés

Les peptides 101.10 et VRQ397 illustrent bien le principe de sélectivité fonctionnelle des modulateurs allostériques.

La nouvelle vision de l'allostérisme reconnaît que les états natifs sont en fait des ensembles de populations de conformères préexistants sous différentes conformations. Ces conformères se replient et se déplient continuellement de façon localisées ce qui résulte en un nombre important de conformations qui diffèrent légèrement. La liaison d'un effecteur allostérique mènera à un déplacement de l'équilibre de certains états conformationnels (41). Cette nouvelle compréhension stipule que la modulation allostérique ne comporte pas nécessairement de changements de conformations détectables (42). De récentes études démontrent aussi que même si il n'y a pas de changement visible de la structure tridimensionnelle du squelette de carbone au site de liaison après la liaison d'un modulateur allostérique, il pourrait y avoir tout de même un changement allostérique de l'activité de la protéine (35, 43).

Récemment, un nouveau concept a émergé en signalisation des récepteurs : le concept de ligand biaisé ou « biased ligand ». Ce concept a été introduit par Terry Kenakin en 1995 et a maintenant été démontré pour plusieurs récepteurs (397-401) (Figure 26).

Dans son état actif le récepteur induit des cascades de signalisation. Le concept de ligand biaisé sous-tend plutôt que le récepteur peut adopter plusieurs conformations

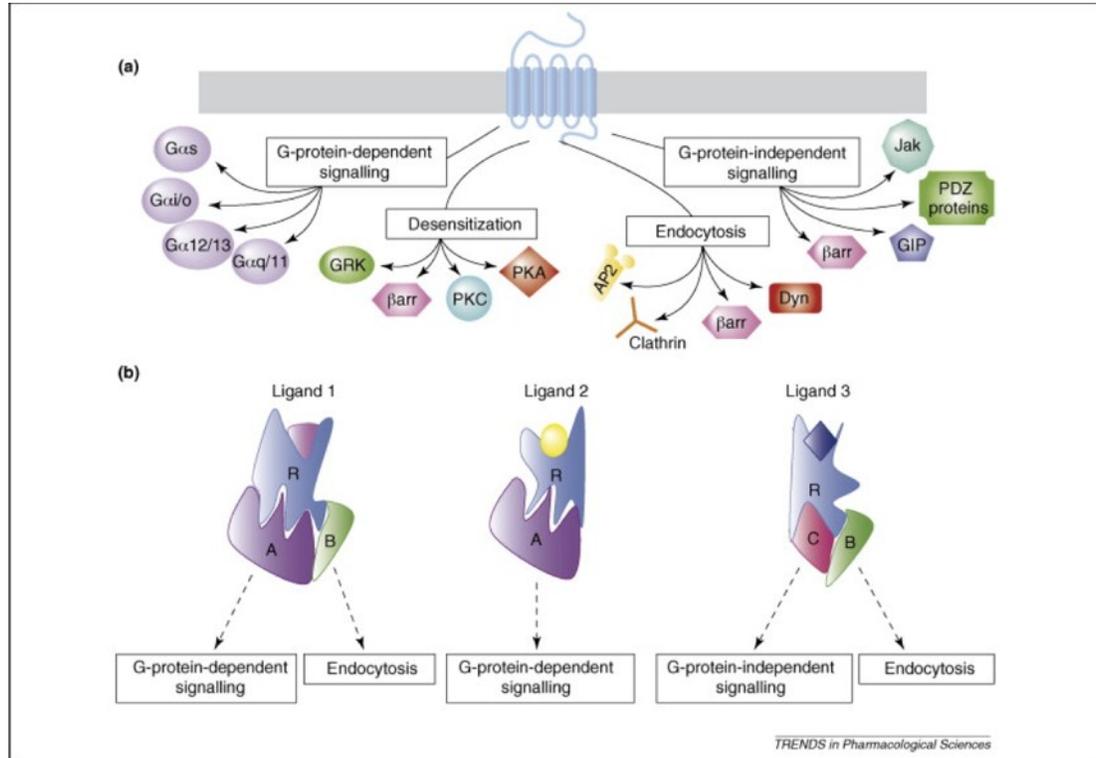
(ensemble conformationnel) et que chacune de ces conformations interagit avec différents ligands et induit sélectivement différentes voies de signalisation. Ce concept lie fondamentalement les principes de modulation allostérique, d'ensemble conformationnel et de sélectivité fonctionnelle de ce type de modulateur.

La présence de complexes de signalisation particuliers dans un système cellulaire donné pourrait favoriser la liaison à un ligand plutôt qu'à un autre en stabilisant une certaine conformation du récepteur (Figure 20). De même, un ligand allostérique pourrait favoriser la formation d'un complexe plutôt qu'un autre.

Le concept de permissivité dans les effets fonctionnels des allostériques s'applique aussi à 101.10 (228, 266, 312) qui inhibe partiellement la production de PGE<sub>2</sub>, mais complètement la prolifération de thymocytes. De plus, les différents peptides provenant de plusieurs régions de la protéine accessoire inhibent différemment les effets biologiques de IL-1. Par exemple, 103, 106 et 108 affectent différemment la production de PGE<sub>2</sub>. De plus, 103 augmente la phosphorylation de p38 tandis que 101.10 l'inhibe totalement. Cette sélectivité fonctionnelle est rendue possible par des modulateurs qui se lient de façon à affecter la dynamique conformationnelle du récepteur ce qui se répercute soit au site de liaison du ligand et/ou au site de liaison du complexe signalétique intracellulaire ((13, 61, 321). De ce fait, ces modulateurs vont affecter différemment la signalisation d'où la sélectivité et les effets secondaires réduits (402) comparativement aux inhibiteurs compétitifs qui vont inhiber la totalité des fonctions du récepteur. Ces caractéristiques semblent s'appliquer à 101.10 et ont déjà été démontrées pour d'autres inhibiteurs allostériques (324-326, 403). Il y va de même pour VRQ397 qui n'inhibe pas la voie de signalisation classique des GPCR couplés à la protéine Gs, c'est-à-dire qu'il n'inhibe pas la formation d'AMPc et le recrutement de  $\beta$ -arrestine mais plutôt la formation de prostacycline.

Il est maintenant reconnu que les GPCR existent à la membrane sous divers états conformationnels actifs et inactifs (ensemble conformationnel). La liaison du ligand permettrait le déplacement de l'équilibre conformationnel en faveur de la fraction active (404). Des évidences ont de plus démontré que les GPCR pourraient exister

sous plus d'une forme active. Différents agonistes pour un même récepteur pourraient induire alors différents signaux (13, 311).



**Galandrin et Bouvier, 2007**

**Figure 26. Signalisation biaisée chez les GPCR (358)**

Durant les 20 dernières années, plusieurs travaux ont démontré que les récepteurs ne sont pas des structures statiques et que plusieurs conformations actives peuvent exister simultanément (36, 37). La nouvelle vision de différentes conformations favorisées au niveau énergétique (paysage énergétique) sert bien le concept de sélectivité fonctionnelle qui caractérise les modulateurs allostériques.

Auparavant, l'efficacité d'un ligand à générer un effet biologique était considéré linéaire et uniforme. Donc, un agoniste lié au récepteur générerait toute la gamme de signaux associés à un récepteur particulier. Par contre, la signalisation était généralement que partiellement connue et on ne regardait souvent que les voies classiques.

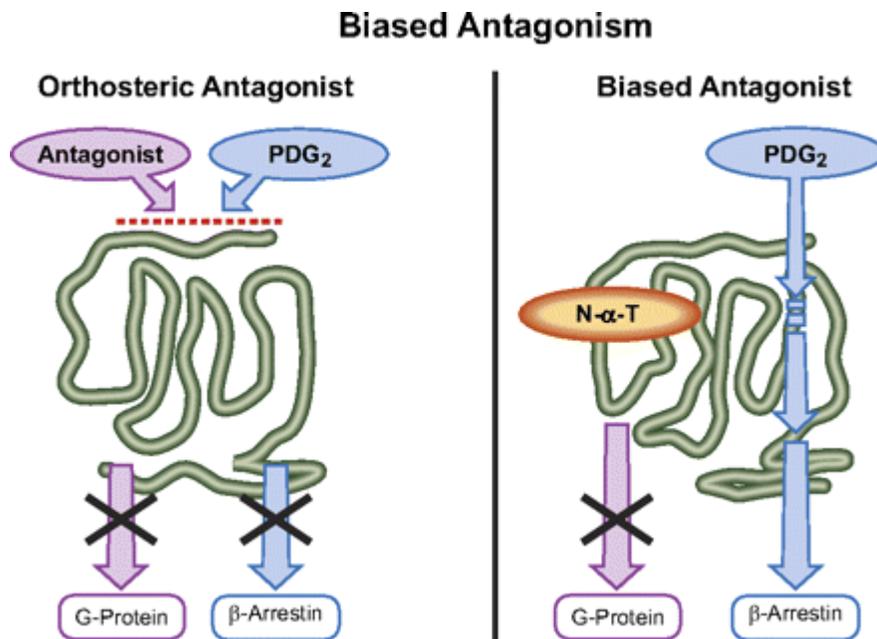
Le tableau 10 décrit les différentes activités de plusieurs ligands liant deux isoformes de la famille des récepteurs adrénergiques. Il s'est avéré que la phosphorylation de Erk1/2 induite par le Carvedilol est dépendante de la  $\beta$ -arrestine mais sans activation de la protéine G ce qui confère à cet agoniste un effet cardioprotecteur et en fait l'agoniste le plus sécuritaire et le meilleur composé thérapeutique contre l'insuffisance cardiaque. Cet exemple illustre bien les avantages de développer des modulateurs allostériques et la spécificité de leurs effets (60).

**Tableau 10. Activité des agonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques**

<b><math>\beta_1</math>-adrénergique</b>		
<b>Agoniste</b>	<b>cAMP (Gs)</b>	<b>MAPK (Erk1/2 ph.)</b>
Isoproterenol	Complet	Src dépendant; Gi ou Protéine G indépendant
Bucindolol	Partiel	Protéine G indépendant; $\beta$ arrestine dépendant
Propranolol	Inverse	Protéine G indépendant; Arrestine dépendant
Alprenolol	Inverse (ou pas d'activ.)	Via EGFR transactivation
Carvedilol	Pas d'activité significative	Protéine G indépendant; ( $\beta$ arrestine dép).
<b><math>\beta_2</math>-adrénergique</b>		
Isoproterenol	Complet	Complet
Propranolol	Inverse	Partiel
Carvedilol	Pas d'activité	Complet

Un deuxième exemple intéressant concerne deux composés se liant au récepteur de l'angiotensine (405). L'analogue de l'angiotensine, le SII angiotensine ne peut activer la protéine Gq mais active l'internalisation du récepteur via les  $\beta$ -arrestines. Il induit aussi la phosphorylation de Erk 1/2 ce qui lui confère des effets cardioprotecteurs sans les effets hypertensifs de l'angiotensine.

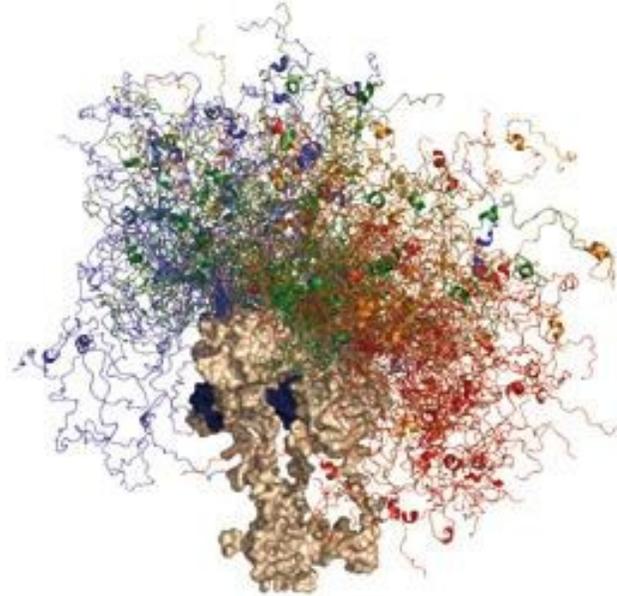
Les modulateurs allostériques vont démontrer de la sélectivité fonctionnelle en: 1) stabilisant une conformation particulière liée au ligand mais favorisant et/ou défavorisant une voie en particulier; 2) en se liant à une conformation particulière ayant une affinité particulière pour le ligand naturel et signalant de façon sélective (62) (Figure 27).



**Figure 27: Antagonisme biaisé.** (62)

Un autre concept a émergé ces dernières années afin de tenter de comprendre la flexibilité et la capacité de certaines protéines à interagir avec plusieurs partenaires signalitiques au sein de la cellule. Contrairement au dogme qui soutient que la structure est absolument nécessaire à la fonction, vision surtout supportée par des

années d'accumulation de données cristallographiques, les protéines contiendraient au moins une région de désordre intrinsèque à celles-ci (transitoire ou permanente) qui interagirait avec d'autres protéines ou molécules. Dunker et Uversky ont développé, en 2010, un algorithme permettant de prédire ces régions et ont découvert que 40% de toutes les protéines humaines contenaient au moins une région de 30 acides aminés ne possédant pas de structure (406, 407). Les protéines comme CREB (cAMP response element binding protein), Sic-1 (protéine du cycle cellulaire de levure) et p53 (suppresseur de tumeur) impliquées dans plusieurs voies de signalisation élaborées possèdent de larges régions désordonnées structurellement possédant le potentiel d'interagir avec plusieurs partenaires moléculaires (Figure 28). Ces protéines commenceraient à se lier par une première interaction moléculaire et la conformation nécessaire serait induite au fur et à mesure (un peu comme un "induce fit") et selon les besoins. Ces nouveaux concepts ouvrent plusieurs horizons par rapport à la conception de médicaments sensé interagir sur des voies de signalisation et viennent supporter l'aspect dynamique et allostérique des interactions protéines-protéines.



**Figure 28. La protéine p53 possède une région structurée qui lie l'ADN et une large région non structurée pouvant lier plusieurs partenaires (408)**

**Partie E : Conclusion :**

La recherche en développement de médicaments a surtout mis l'accent ces dernières années sur des inhibiteurs orthostériques qui compétitionnent par définition avec les ligands orthostériques et ainsi peuvent bloquer certaines voies de signalisation qui auraient intérêt à demeurer actives. Au contraire, les ligands allostériques démontrent une sélectivité fonctionnelle permettant de contourner ces effets délétères et préserver les voies de signalisation bénéfiques. Module X permettra de développer une nouvelle classe d'agents thérapeutiques comportant de nombreux avantages : 1) moins d'effets secondaires dûs aux propriétés de sélectivité fonctionnelle et de saturation de la réponse des modulateurs allostériques; 2) De par leur nature peptidique (et leurs acides aminés de stéréochimie D), ces composés pourront être administrés oralement et de fait vont faciliter la prise de médicaments particulièrement dans le cas de maladies inflammatoires chroniques; 3) De plus, le moindre coût de fabrication (comparativement aux agents biologiques comme les anticorps) rendra les traitements plus accessibles et réduira le coût social que les maladies inflammatoires génèrent.

## Partie F: Bibliographie:

1. Clark AJ. 1933. *The mode of action of drugs on cells*. London: E. Arnold & Co. vii, 298 p. pp.
2. Clark AJ. 1937. *Applied pharmacology*. London: J. & A. Churchill. ix, 678 p. pp.
3. Ariens EJ. 1964. [Molecular Basis of Drug Action.]. *Med Arh* 18: 21-38
4. Ariens EJ, De Groot WM. 1954. Affinity and intrinsic-activity in the theory of competitive inhibition. III. Homologous decamethonium-derivatives and succinyl-choline-esters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 99: 193-205
5. Black JW, Leff P. 1983. Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 220: 141-62
6. Del Castillo J, Katz B. 1957. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 146: 369-81
7. Hall DA. 2000. Modeling the functional effects of allosteric modulators at pharmacological receptors: an extension of the two-state model of receptor activation. *Mol Pharmacol* 58: 1412-23
8. Karlin A. 1967. On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *J Theor Biol* 16: 306-20
9. Thron CD. 1973. On the analysis of pharmacological experiments in terms of an allosteric receptor model. *Mol Pharmacol* 9: 1-9
10. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255: 7108-17
11. Limbird LE, Lefkowitz RJ. 1978. Agonist-induced increase in apparent beta-adrenergic receptor size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 228-32
12. Ross EM, Maguire ME, Sturgill TW, Biltonen RL, Gilman AG. 1977. Relationship between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *J Biol Chem* 252: 5761-75
13. Christopoulos A, Kenakin T. 2002. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54: 323-74
14. Rousseau F, Schymkowitz J. 2005. A systems biology perspective on protein structural dynamics and signal transduction. *Curr Opin Struct Biol* 15: 23-30
15. Costa T, Herz A. 1989. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7321-5
16. Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P. 1997. A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem* 272: 22330-9

17. Brown GP, Pasternak GW. 1998. 3H-naloxone benzoylhydrazone binding in MOR-1-transfected Chinese hamster ovary cells: evidence for G-protein-dependent antagonist binding. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 376-81
18. Monod J, Changeux JP, Jacob F. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 6: 306-29
19. Perutz MF, Mazzarella L. 1963. A Preliminary X-Ray Analysis of Haemoglobin H. *Nature* 199: 639
20. Perutz MF, Bolton W, Diamond R, Muirhead H, Watson HC. 1964. Structure of Haemoglobin. An X-Ray Examination of Reduced Horse Haemoglobin. *Nature* 203: 687-90
21. Perutz MF. 1973. Haemoglobin as a model of an allosteric protein. *Symp Soc Exp Biol* 27: 1-3
22. Hill AV. 1910. A new mathematical treatment of changes of ionic concentration in muscle and nerve under the action of electric currents, with a theory as to their mode of excitation. *J Physiol* 40: 190-224
23. Monod J, Jacob F. 1961. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 26: 389-401
24. Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12: 88-118
25. Koshland DE, Jr., Nemethy G, Filmer D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5: 365-85
26. Ehlert FJ. 1985. The relationship between muscarinic receptor occupancy and adenylate cyclase inhibition in the rabbit myocardium. *Mol Pharmacol* 28: 410-21
27. Ehlert FJ. 1988. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* 33: 187-94
28. Ehlert FJ. 1988. Means of clarifying mechanisms of desensitization. Energetics of conformational changes in receptors. *Trends Pharmacol Sci* 9: 393-4
29. Ehlert FJ. 2005. Analysis of allosterism in functional assays. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 740-54
30. Goodey NM, Benkovic SJ. 2008. Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat Chem Biol* 4: 474-82
31. Hilser VJ, Thompson EB. 2007. Intrinsic disorder as a mechanism to optimize allosteric coupling in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8311-5
32. Luque I, Freire E. 2000. Structural stability of binding sites: consequences for binding affinity and allosteric effects. *Proteins Suppl* 4: 63-71
33. Luque I, Freire E. 2002. Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. *Proteins* 49: 181-90
34. Luque I, Leavitt SA, Freire E. 2002. The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31: 235-56
35. Daily MD, Gray JJ. 2007. Local motions in a benchmark of allosteric proteins. *Proteins* 67: 385-99

36. Swaminath G, Deupi X, Lee TW, Zhu W, Thian FS, Kobilka TS, Kobilka B. 2005. Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J Biol Chem* 280: 22165-71
37. Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem* 267: 1430-3
38. Peleg G, Ghanouni P, Kobilka BK, Zare RN. 2001. Single-molecule spectroscopy of the beta(2) adrenergic receptor: observation of conformational substates in a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8469-74
39. Klein-Seetharaman J, Yanamala NV, Javeed F, Reeves PJ, Getmanova EV, Loewen MC, Schwalbe H, Khorana HG. 2004. Differential dynamics in the G protein-coupled receptor rhodopsin revealed by solution NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3409-13
40. Lohse MJ, Nikolaev VO, Hein P, Hoffmann C, Vilardaga JP, Bunemann M. 2008. Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 29: 159-65
41. Gunasekaran K, Ma B, Nussinov R. 2004. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins* 57: 433-43
42. Tsai CJ, del Sol A, Nussinov R. 2008. Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play. *J Mol Biol* 378: 1-11
43. Popovych N, Sun S, Ebright RH, Kalodimos CG. 2006. Dynamically driven protein allostery. *Nat Struct Mol Biol* 13: 831-8
44. Koshland DE, Jr. 1998. Conformational changes: how small is big enough? *Nat Med* 4: 1112-4
45. Volkman BF, Lipson D, Wemmer DE, Kern D. 2001. Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science* 291: 2429-33
46. Ikeguchi M, Ueno J, Sato M, Kidera A. 2005. Protein structural change upon ligand binding: linear response theory. *Phys Rev Lett* 94: 078102
47. Bahar I, Chennubhotla C, Tobi D. 2007. Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation. *Curr Opin Struct Biol* 17: 633-40
48. Liu F, Zhang G, Hornby G, Vasylyev D, Bowlby M, Park K, Gilbert A, Marquis K, Andree TH. 2006. The effect of mGlu5 receptor positive allosteric modulators on signaling molecules in brain slices. *Eur J Pharmacol* 536: 262-8
49. Kenakin T, Miller LJ. 2010. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* 62: 265-304
50. Lockless SW, Ranganathan R. 1999. Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science* 286: 295-9
51. Liu J, Yang L, Li Y, Pan D, Hopfinger AJ. 2006. Constructing plasma protein binding model based on a combination of cluster analysis and 4D-fingerprint molecular similarity analyses. *Bioorg Med Chem* 14: 611-21

52. Kenakin T. 2010. G protein coupled receptors as allosteric proteins and the role of allosteric modulators. *J Recept Signal Transduct Res* 30: 313-21
53. Mailman RB, Nichols DE. 1998. Dopamine D1 receptor agonists as antiparkinson drugs. *Trends Pharmacol Sci* 19: 255-6
54. Roth BL, Chuang DM. 1987. Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sci* 41: 1051-64
55. Quiniou C, Sapieha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, Leduc M, Rihakova L, Joyal JS, Nadeau S, Heveker N, Lubell W, Sennlaub F, Gobeil F, Jr., Miller G, Pshezhetsky AV, Chemtob S. 2008. Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol* 180: 6977-87
56. Langmuir I. 1917. The Condensation and Evaporation of Gas Molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 3: 141-7
57. Kenakin T. 2009. Quantifying Biological Activity in Chemical Terms: A Pharmacology Primer to Describe Drug Effect. *ACS Chem Biol*
58. Kenakin TP, Scott DL. 1987. A method to assess concomitant cardiac phosphodiesterase inhibition and positive inotropy. *J Cardiovasc Pharmacol* 10: 658-66
59. Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, Pineyro G. 2003. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11406-11
60. Galandrin S, Bouvier M. 2006. Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* 70: 1575-84
61. Kenakin T. 2005. New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* 4: 919-27
62. Kenakin TP. 2010. Ligand detection in the allosteric world. *J Biomol Screen* 15: 119-30
63. Meini S, Patacchini R, Giuliani S, Lazzeri M, Turini D, Maggi CA, Lecci A. 2000. Characterization of bradykinin B(2) receptor antagonists in human and rat urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 388: 177-82
64. Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J, Bouvier M. 2005. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* 10: 463-75
65. Olson KR, Eglen RM. 2007. Beta galactosidase complementation: a cell-based luminescent assay platform for drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* 5: 137-44
66. Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. 2008. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 64-9
67. Fang Y, Li G, Ferrie AM. 2007. Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 55: 314-22

68. Verdonk E, Johnson K, McGuinness R, Leung G, Chen YW, Tang HR, Michelotti JM, Liu VF. 2006. Cellular dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay Drug Dev Technol* 4: 609-19
69. Shi J, Blundell TL, Mizuguchi K. 2001. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J Mol Biol* 310: 243-57
70. Bhaskaran R, Ponnuswamy PK. 1984. Dynamics of amino acid residues in globular proteins. *Int J Pept Protein Res* 24: 180-91
71. Rost B, Liu J. 2003. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 31: 3300-4
72. Hulo N, Sigrist CJ, Le Saux V, Langendijk-Genevaux PS, Bordoli L, Gattiker A, De Castro E, Bucher P, Bairoch A. 2004. Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 32: D134-7
73. Sonnhammer EL, Durbin R. 1994. A workbench for large-scale sequence homology analysis. *Comput Appl Biosci* 10: 301-7
74. Sonnhammer EL, Kahn D. 1994. Modular arrangement of proteins as inferred from analysis of homology. *Protein Sci* 3: 482-92
75. Sonnhammer EL, Durbin R. 1994. An expert system for processing sequence homology data. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2: 363-8
76. Rost B, Fariselli P, Casadio R. 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* 5: 1704-18
77. Peri KG, Quiniou C, Hou X, Abran D, Varma DR, Lubell WD, Chemtob S. 2002. THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* 26: 389-97
78. Khurana S, Kennedy M, King LR, Golding H. 2005. Identification of a linear peptide recognized by monoclonal antibody 2D7 capable of generating CCR5-specific antibodies with human immunodeficiency virus-neutralizing activity. *J Virol* 79: 6791-800
79. Gaudreau P, Brazeau P, Richer M, Cormier J, Langlois D, Langelier Y. 1992. Structure-function studies of peptides inhibiting the ribonucleotide reductase activity of herpes simplex virus type I. *J Med Chem* 35: 346-50
80. Nossner E, Goldberg JE, Naftzger C, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. 1996. HLA-derived peptides which inhibit T cell function bind to members of the heat-shock protein 70 family. *J Exp Med* 183: 339-48
81. McDonnell JM, Beavil AJ, Mackay GA, Jameson BA, Korngold R, Gould HJ, Sutton BJ. 1996. Structure based design and characterization of peptides that inhibit IgE binding to its high-affinity receptor. *Nat Struct Biol* 3: 419-26
82. Tibbetts SA, Seetharama Jois D, Siahaan TJ, Benedict SH, Chan MA. 2000. Linear and cyclic LFA-1 and ICAM-1 peptides inhibit T cell adhesion and function. *Peptides* 21: 1161-7
83. Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, Sarazin P, Stea D, Lacombe D, Tremblay P, Gervais F. 2003. Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem* 278: 34874-81

84. George SR, Ng GY, Lee SP, Fan T, Varghese G, Wang C, Deber CM, Seeman P, O'Dowd BF. 2003. Blockade of G protein-coupled receptors and the dopamine transporter by a transmembrane domain peptide: novel strategy for functional inhibition of membrane proteins in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 481-9
85. Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. 1996. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271: 16384-92
86. Huynh NT, French RA, Boadle RA, Manolios N. 2003. Transmembrane T-cell receptor peptides inhibit B- and natural killer-cell function. *Immunology* 108: 458-64
87. Bennisroune A, Fickova M, Gardin A, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Cremel G, Hubert P. 2004. Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. *Mol Biol Cell* 15: 3464-74
88. Bennisroune A, Gardin A, Auzan C, Clauser E, Dirrig-Grosch S, Meira M, Appert-Collin A, Aunis D, Cremel G, Hubert P. 2005. Inhibition by transmembrane peptides of chimeric insulin receptors. *Cell Mol Life Sci* 62: 2124-31
89. He L, Shobnam N, Hristova K. 2010. Specific inhibition of a pathogenic receptor tyrosine kinase by its transmembrane domain. *Biochim Biophys Acta*
90. Dinarello CA. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519-50
91. Mulero JJ, Pace AM, Nelken ST, Loeb DB, Correa TR, Drmanac R, Ford JE. 1999. IL1HY1: A novel interleukin-1 receptor antagonist gene. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 702-6
92. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 7907-11
93. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, et al. 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315: 641-7
94. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. 2007. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 13: 851-6
95. Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN. 2004. The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2434-9
96. Lonnemann G, Engler-Blum G, Muller GA, Koch KM, Dinarello CA. 1995. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. II. Intrinsic interleukin (IL)-1 synthesis and IL-1-dependent production of IL-6 and IL-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int* 47: 845-54

97. Lonnemann G, Shapiro L, Engler-Blum G, Muller GA, Koch KM, Dinarello CA. 1995. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. *Kidney Int* 47: 837-44
98. Hurgin V, Novick D, Werman A, Dinarello CA, Rubinstein M. 2007. Antiviral and immunoregulatory activities of IFN-gamma depend on constitutively expressed IL-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5044-9
99. Maier JA, Statuto M, Ragnotti G. 1994. Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 14: 1845-51
100. Kawaguchi Y, Nishimagi E, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Soejima M, Kanno T, Kamatani N, Hara M. 2006. Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14501-6
101. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y. 1998. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 187: 1463-75
102. Hammerberg C, Arend WP, Fisher GJ, Chan LS, Berger AE, Haskill JS, Voorhees JJ, Cooper KD. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist in normal and psoriatic epidermis. *J Clin Invest* 90: 571-83
103. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. 1985. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 1204-8
104. Kurt-Jones EA, Kiely JM, Unanue ER. 1985. Conditions required for expression of membrane IL 1 on B cells. *J Immunol* 135: 1548-50
105. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, Dinarello CA. 1994. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* 84: 4242-8
106. Kamari Y, Werman-Venkert R, Shaish A, Werman A, Harari A, Gonen A, Voronov E, Grosskopf I, Sharabi Y, Grossman E, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN, Harats D. 2007. Differential role and tissue specificity of interleukin-1alpha gene expression in atherogenesis and lipid metabolism. *Atherosclerosis* 195: 31-8
107. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267: 2000-3
108. Unlu S, Kumar A, Waterman WR, Tsukada J, Wang KZ, Galson DL, Auron PE. 2007. Phosphorylation of IRF8 in a pre-associated complex with Spi-1/PU.1 and non-phosphorylated Stat1 is critical for LPS induction of the IL1B gene. *Mol Immunol* 44: 3364-79
109. Jaras M, Johnels P, Hansen N, Agerstam H, Tsapogas P, Rissler M, Lassen C, Olofsson T, Bjerrum OW, Richter J, Fioretos T. 2010. Isolation and killing of

- candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16280-5
110. Dinarello CA. 1987. Interleukin-1: multiple biological properties and mechanisms of action. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B: 900-4
  111. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, Kim HJ, Brewer C, Zalewski C, Wiggs E, Hill S, Turner ML, Karp BI, Aksentijevich I, Pucino F, Penzak SR, Haverkamp MH, Stein L, Adams BS, Moore TL, Fuhlbrigge RC, Shaham B, Jarvis JN, O'Neil K, Vehe RK, Beitz LO, Gardner G, Hannan WP, Warren RW, Horn W, Cole JL, Paul SM, Hawkins PN, Pham TH, Snyder C, Wesley RA, Hoffmann SC, Holland SM, Butman JA, Kastner DL. 2006. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med* 355: 581-92
  112. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, Goktuna SI, Neuenhahn M, Fierer J, Paxian S, Van Rooijen N, Xu Y, O'Cain T, Jaffee BB, Busch DH, Duyster J, Schmid RM, Eckmann L, Karin M. 2007. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 130: 918-31
  113. Bianda TL, Glatz Y, Boeni-Schnetzler M, Froesch ER, Schmid C. 1997. Effects of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I on serum leptin in GH-deficient adults. *Diabetologia* 40: 363-4
  114. Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. 1990. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 265: 10232-7
  115. Kaspar RL, Gehrke L. 1994. Peripheral blood mononuclear cells stimulated with C5a or lipopolysaccharide to synthesize equivalent levels of IL-1 beta mRNA show unequal IL-1 beta protein accumulation but similar polyribosome profiles. *J Immunol* 153: 277-86
  116. Bufler P, Gamboni-Robertson F, Azam T, Kim SH, Dinarello CA. 2004. Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. *Biochem J* 381: 503-10
  117. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29: 301-5
  118. Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, Stein L, Russo R, Goldsmith D, Dent P, Rosenberg HF, Austin F, Remmers EF, Balow JE, Jr., Rosenzweig S, Komarow H, Shoham NG, Wood G, Jones J, Mangra N, Carrero H, Adams BS, Moore TL, Schikler K, Hoffman H, Lovell DJ, Lipnick R, Barron K, O'Shea JJ, Kastner DL, Goldbach-Mansky R. 2002. De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum* 46: 3340-8

119. Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, Lachmann HJ, Bybee A, Gaudet R, Woo P, Feighery C, Cotter FE, Thome M, Hitman GA, Tschopp J, McDermott MF. 2002. Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* 46: 2445-52
120. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20: 319-25
121. Martinon F, Tschopp J. 2007. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14: 10-22
122. Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A. 2004. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9745-50
123. Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 179: 1913-25
124. Dinarello CA. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 201: 1355-9
125. Church LD, Cook GP, McDermott MF. 2008. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 34-42
126. Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Sipe JD, Kuida K, Flavell RA, Dinarello CA. 1997. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme- deficient mice. *J Immunol* 158: 1818-24
127. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, Leimer AH, Cheronis J. 1999. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6261-6
128. Zheng H, Fletcher D, Kozak W, Jiang M, Hofmann KJ, Conn CA, Soszynski D, Grabiec C, Trumbauer ME, Shaw A, et al. 1995. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity* 3: 9-19
129. Fantuzzi G, Sacco S, Ghezzi P, Dinarello CA. 1997. Physiological and cytokine responses in IL-1 beta-deficient mice after zymosan-induced inflammation. *Am J Physiol* 273: R400-6
130. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, et al. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378: 88-91
131. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S, et al. 1995. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun* 63: 3966-72

132. Nakamura S, Otani T, Ijiri Y, Motoda R, Kurimoto M, Orita K. 2000. IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. *J Immunol* 164: 3330-6
133. Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, Matsui K, Kashiwamura S, Hada T, Akira S, Yagita H, Okamura H, Nakanishi K. 1999. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* 11: 359-67
134. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. 1999. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 10: 127-36
135. Novick D, Schwartsburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Sthoeger Z, Keane WF, Chvatchko Y, Kim SH, Fantuzzi G, Dinarello CA, Rubinstein M. 2001. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine* 14: 334-42
136. Costelloe C, Watson M, Murphy A, McQuillan K, Loscher C, Armstrong ME, Garlanda C, Mantovani A, O'Neill LA, Mills KH, Lynch MA. 2008. IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J Neurochem* 105: 1960-9
137. Debets R, Timans JC, Homey B, Zurawski S, Sana TR, Lo S, Wagner J, Edwards G, Clifford T, Menon S, Bazan JF, Kastelein RA. 2001. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol* 167: 1440-6
138. Busfield SJ, Comrack CA, Yu G, Chickering TW, Smutko JS, Zhou H, Leiby KR, Holmgren LM, Gearing DP, Pan Y. 2000. Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics* 66: 213-6
139. Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, Rieman DJ, Lehr R, Khandekar S, Kirkpatrick RB, Scott GF, Lee JC, Lynch FJ, Gao W, Gambotto A, Lotze MT. 2002. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine* 18: 61-71
140. Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, Kim SH. 2002. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13723-8
141. Sharma S, Kulk N, Nold MF, Graf R, Kim SH, Reinhardt D, Dinarello CA, Bufler P. 2008. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol* 180: 5477-82
142. Gao W, Kumar S, Lotze MT, Hanning C, Robbins PD, Gambotto A. 2003. Innate immunity mediated by the cytokine IL-1 homologue 4 (IL-1H4/IL-1F7) induces IL-12-dependent adaptive and profound antitumor immunity. *J Immunol* 170: 107-13
143. Magne D, Palmer G, Barton JL, Mezin F, Talabot-Ayer D, Bas S, Duffy T, Noger M, Guerne PA, Nicklin MJ, Gabay C. 2006. The new IL-1 family

- member IL-1F8 stimulates production of inflammatory mediators by synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 8: R80
144. Towne JE, Garka KE, Renshaw BR, Virca GD, Sims JE. 2004. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J Biol Chem* 279: 13677-88
  145. Lin H, Ho AS, Haley-Vicente D, Zhang J, Bernal-Fussell J, Pace AM, Hansen D, Schweighofer K, Mize NK, Ford JE. 2001. Cloning and characterization of IL-1HY2, a novel interleukin-1 family member. *J Biol Chem* 276: 20597-602
  146. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479-90
  147. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. 1994. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J* 13: 1176-88
  148. Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. 2007. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18660-5
  149. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. 2007. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179: 2551-5
  150. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 282-7
  151. Reznikov LL, Waksman J, Azam T, Kim SH, Bufler P, Niwa T, Werman A, Zhang X, Pischetsrieder M, Shaldon S, Dinarello CA. 2004. Effect of advanced glycation end products on endotoxin-induced TNF-alpha, IL-1beta and IL-8 in human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Nephrol* 61: 324-36
  152. Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH. 1997. The N-terminal propiece of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 508-13
  153. Mok MY, Huang FP, Ip WK, Lo Y, Wong FY, Chan EY, Lam KF, Xu D. 2010. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 49: 520-7
  154. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. 2008. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 205: 339-46
  155. Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P, Brandhuber BJ. 1997. Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature* 386: 190-4
  156. Dinarello CA. 2004. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 4: 378-85

157. Fitzgerald AA, Leclercq SA, Yan A, Homik JE, Dinarello CA. 2005. Rapid responses to anakinra in patients with refractory adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum* 52: 1794-803
158. Botsios C, Sfriso P, Furlan A, Punzi L, Dinarello CA. 2008. Resistant Behcet disease responsive to anakinra. *Ann Intern Med* 149: 284-6
159. Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M. 1986. Cytotoxicity of human pI 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 232: 1545-7
160. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY. 2007. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356: 1517-26
161. Donath MY, Storling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. 2008. Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr Rev* 29: 334-50
162. Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D. 1996. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11008-13
163. Boraschi D, Tagliabue A. 2006. The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm* 74: 229-54
164. Parnet P, Garka KE, Bonnert TP, Dower SK, Sims JE. 1996. IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. *J Biol Chem* 271: 3967-70
165. Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE. 1998. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* 273: 29445-50
166. Carrie A, Jun L, Bienvenu T, Vinet MC, McDonell N, Couvert P, Zemni R, Cardona A, Van Buggenhout G, Frints S, Hamel B, Moraine C, Ropers HH, Strom T, Howell GR, Whittaker A, Ross MT, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Marynen P, Chelly J. 1999. A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat Genet* 23: 25-31
167. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK. 1989. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8946-50
168. Wang D, Zhang S, Li L, Liu X, Mei K, Wang X. 2010. Structural insights into the assembly and activation of IL-1beta with its receptors. *Nat Immunol* 11: 905-11
169. Casadio R, Frigimelica E, Bossu P, Neumann D, Martin MU, Tagliabue A, Boraschi D. 2001. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett* 499: 65-8
170. Wang D, Chen K, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y, Yang SG, Bayard F, Zhu D, Han ZC. 2010. CD14+ monocytes promote the immunosuppressive effect of human umbilical cord matrix stem cells. *Exp Cell Res* 316: 2414-23
171. Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Orencole SF, Callahan MV, Cannon JG, Lynch EA, Ye K, Poutsika DD, Vannier E, et al. 1993. Hematologic and

- immunomodulatory effects of an interleukin-1 receptor antagonist coinfusion during low-dose endotoxemia in healthy humans. *Blood* 82: 2985-90
172. Ye K, Dinarello CA, Clark BD. 1993. Identification of the promoter region of human interleukin 1 type I receptor gene: multiple initiation sites, high G+C content, and constitutive expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2295-9
  173. Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, Chizzonite RA, Labow MA. 1998. IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J Immunol* 161: 5614-20
  174. Arend WP, Joslin FG, Massoni RJ. 1985. Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *J Immunol* 134: 3868-75
  175. Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. 1990. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 85: 1694-7
  176. Arend WP, Palmer G, Gabay C. 2008. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 223: 20-38
  177. Neumann D, Kollwe C, Martin MU, Boraschi D. 2000. The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function. *J Immunol* 165: 3350-7
  178. Malinowsky D, Lundkvist J, Laye S, Bartfai T. 1998. Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor. *FEBS Lett* 429: 299-302
  179. Drevlow BE, Lovis R, Haag MA, Sinacore JM, Jacobs C, Blosche C, Landay A, Moreland LW, Pope RM. 1996. Recombinant human interleukin-1 receptor type I in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 257-65
  180. Jensen LE, Muzio M, Mantovani A, Whitehead AS. 2000. IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein. *J Immunol* 164: 5277-86
  181. Smith DE, Hanna R, Della F, Moore H, Chen H, Farese AM, MacVittie TJ, Virca GD, Sims JE. 2003. The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of soluble type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action. *Immunity* 18: 87-96
  182. Smeets RL, van de Loo FA, Joosten LA, Arntz OJ, Bennink MB, Loesberg WA, Dmitriev IP, Curiel DT, Martin MU, van den Berg WB. 2003. Effectiveness of the soluble form of the interleukin-1 receptor accessory protein as an inhibitor of interleukin-1 in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2949-58
  183. Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T. 2004. Cytokines and fever. *Front Biosci* 9: 1433-49
  184. Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, Turek VF. 2005. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci* 10: 2193-216

185. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203: 1685-91
186. Matsuki T, Nakae S, Sudo K, Horai R, Iwakura Y. 2006. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol* 18: 399-407
187. Dinarello CA. 2007. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin Nephrol* 27: 98-114
188. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. 2005. Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116: 851-8
189. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. 2003. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5986-90
190. McInnes IB, Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7: 429-42
191. Klippel JH. 2008. *Primer on the rheumatic diseases*. New York, N.Y.: Springer. xix, 721 p. pp.
192. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445: 866-73
193. Hauser C. 1992. The interaction between Langerhans cells and CD4+ T cells. *J Dermatol* 19: 722-5
194. Fiocchi C. 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205
195. Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. 2009. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics* 3: 77-97
196. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307: 734-8
197. Mandell BF. 2008. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. *Cleve Clin J Med* 75 Suppl 5: S5-8
198. Terkeltaub R. 2010. Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nat Rev Rheumatol* 6: 30-8
199. Geyer M, Muller-Ladner U. 2010. Actual status of antiinterleukin-1 therapies in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 22: 246-51
200. Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, Rordorf C, Leslie K, Madhoo S, Wittkowski H, Bek S, Hartmann N, Bosset S, Hawkins PN, Jung T. 2009. In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J Exp Med* 206: 1029-36
201. Hoffman HM, Wolfe F, Belomestnov P, Mellis SJ. 2008. Cryopyrin-associated periodic syndromes: development of a patient-reported outcomes instrument to assess the pattern and severity of clinical disease activity. *Curr Med Res Opin* 24: 2531-43

202. Mizuguchi K, Deane CM, Blundell TL, Overington JP. 1998. HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. *Protein Sci* 7: 2469-71
203. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA. 2003. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4903-8
204. Lefkowitz RJ, Caron MG. 1986. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. *Curr Top Cell Regul* 28: 209-31
205. Kristiansen K. 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103: 21-80
206. Grigorieff N, Ceska TA, Downing KH, Baldwin JM, Henderson R. 1996. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* 259: 393-421
207. Kimura Y, Vassilyev DG, Miyazawa A, Kidera A, Matsushima M, Mitsuoka K, Murata K, Hirai T, Fujiyoshi Y. 1997. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* 389: 206-11
208. Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP, Landau EM. 1997. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277: 1676-81
209. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-45
210. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450: 383-7
211. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318: 1258-65
212. Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC, Kobilka BK. 2007. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318: 1266-73
213. Attwood TK, Findlay JB. 1994. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 7: 195-203
214. Kolakowski LF, Jr. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2: 1-7
215. Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ. 2005. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 57: 279-88

216. Luttrell LM. 2008. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39: 239-64
217. Hanson MA, Stevens RC. 2009. Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure* 17: 8-14
218. Kim JH, Ro YB. 1996. Role of muscarinic receptors in ganglionic transmission in rabbits. *J Auton Nerv Syst* 56: 201-6
219. Gether U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21: 90-113
220. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245-82
221. Hoare SR, Sullivan SK, Pahuja A, Ling N, Crowe PD, Grigoriadis DE. 2003. Conformational states of the corticotropin releasing factor 1 (CRF1) receptor: detection, and pharmacological evaluation by peptide ligands. *Peptides* 24: 1881-97
222. Hay DL, Poyner DR, Sexton PM. 2006. GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 109: 173-97
223. Pin JP, Kniazeff J, Liu J, Binet V, Goudet C, Rondard P, Prezeau L. 2005. Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *FEBS J* 272: 2947-55
224. Lagerstrom MC, Schiöth HB. 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7: 339-57
225. Dupre DJ, Robitaille M, Rebois RV, Hebert TE. 2009. The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 31-56
226. Guillet-Deniau I, Burnol AF, Girard J. 1997. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* 272: 14825-9
227. Ali MS, Sayeski PP, Bernstein KE. 2000. Jak2 acts as both a STAT1 kinase and as a molecular bridge linking STAT1 to the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 275: 15586-93
228. May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. 2007. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 1-51
229. Leppik RA, Miller RC, Eck M, Paquet JL. 1994. Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 45: 983-90
230. Matsui H, Lazareno S, Birdsall NJ. 1995. Probing of the location of the allosteric site on m<sub>1</sub> muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* 47: 88-98
231. Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. 2001. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem* 276: 14153-60
232. Hatse S, Princen K, Gerlach LO, Bridger G, Henson G, De Clercq E, Schwartz TW, Schols D. 2001. Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency

- virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Mol Pharmacol* 60: 164-73
233. Maeda K, Das D, Ogata-Aoki H, Nakata H, Miyakawa T, Tojo Y, Norman R, Takaoka Y, Ding J, Arnold GF, Arnold E, Mitsuya H. 2006. Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem* 281: 12688-98
234. Malherbe P, Kratochwil N, Knoflach F, Zenner MT, Kew JN, Kratzeisen C, Maerki HP, Adam G, Mutel V. 2003. Mutational analysis and molecular modeling of the allosteric binding site of a novel, selective, noncompetitive antagonist of the metabotropic glutamate 1 receptor. *J Biol Chem* 278: 8340-7
235. Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BC, Van Wagenen BC, DelMar EG, Balandrin MF. 1998. Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4040-5
236. Nemeth EF, Delmar EG, Heaton WL, Miller MA, Lambert LD, Conklin RL, Gowen M, Gleason JG, Bhatnagar PK, Fox J. 2001. Calcilytic compounds: potent and selective Ca<sup>2+</sup> receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 323-31
237. Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M. 2004. Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* 279: 33390-7
238. Terrillon S, Cheng LL, Stoev S, Mouillac B, Barberis C, Manning M, Durroux T. 2002. Synthesis and characterization of fluorescent antagonists and agonists for human oxytocin and vasopressin V(1)(a) receptors. *J Med Chem* 45: 2579-88
239. Matsui H, Aou S, Ma J, Hori T. 1995. Central actions of parathyroid hormone on blood calcium and hypothalamic neuronal activity in the rat. *Am J Physiol* 268: R21-7
240. Dong M, Cox RF, Miller LJ. 2009. Juxtamembranous region of the amino terminus of the family B G protein-coupled calcitonin receptor plays a critical role in small-molecule agonist action. *J Biol Chem* 284: 21839-47
241. Kai H, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Lyons PR, Akers M, Griendling KK. 1998. G-Protein binding domains of the angiotensin II AT1A receptors mapped with synthetic peptides selected from the receptor sequence. *Biochem J* 332 ( Pt 3): 781-7
242. Oliver G, Schafer EA. 1895. The Physiological Effects of Extracts of the Suprarenal Capsules. *J Physiol* 18: 230-76
243. Favory R, Salgado DR, Vincent JL. 2009. Investigational vasopressin receptor modulators in the pipeline. *Expert Opin Investig Drugs* 18: 1119-31
244. Frokiaer J, Christensen BM, Marples D, Djurhuus JC, Jensen UB, Knepper MA, Nielsen S. 1997. Downregulation of aquaporin-2 parallels changes in renal water excretion in unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol* 273: F213-23
245. Knepper MA, Inoue T. 1997. Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Curr Opin Cell Biol* 9: 560-4

246. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. 2004. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84: 169-208
247. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. 1999. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104: R19-23
248. Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. 2003. The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278: 6258-67
249. Charest PG, Bouvier M. 2003. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 278: 41541-51
250. Oakley RH, Webster JC, Sar M, Parker CR, Jr., Cidlowski JA. 1997. Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 138: 5028-38
251. Lee B, Yang C, Chen TH, al-Azawi N, Hsu WH. 1995. Effect of AVP and oxytocin on insulin release: involvement of V1b receptors. *Am J Physiol* 269: E1095-100
252. Lange M, Van Aken H, Westphal M, Morelli A. 2008. Role of vasopressinergic V1 receptor agonists in the treatment of perioperative catecholamine-refractory arterial hypotension. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 22: 369-81
253. Franchini M. 2007. The use of desmopressin as a hemostatic agent: a concise review. *Am J Hematol* 82: 731-5
254. Czaplewski C, Kazmierkiewicz R, Ciarkowski J. 1998. Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex. *J Comput Aided Mol Des* 12: 275-87
255. Erlenbach I, Wess J. 1998. Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. *J Biol Chem* 273: 26549-58
256. Bellot G, Granier S, Bourguet W, Seyer R, Rahmeh R, Mouillac B, Pascal R, Mendre C, Demene H. 2009. Structure of the third intracellular loop of the vasopressin V2 receptor and conformational changes upon binding to gC1qR. *J Mol Biol* 388: 491-507
257. Cain SA, Woodruff TM, Taylor SM, Fairlie DP, Sanderson SD, Monk PN. 2001. Modulation of ligand selectivity by mutation of the first extracellular loop of the human C5a receptor. *Biochem Pharmacol* 61: 1571-9
258. Petry R, Craik D, Haaima G, Fromme B, Klump H, Kiefer W, Palm D, Millar R. 2002. Secondary structure of the third extracellular loop responsible for ligand selectivity of a mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Med Chem* 45: 1026-34
259. Hibert M, Hoflack J, Trumpp-Kallmeyer S, Mouillac B, Chini B, Mahe E, Cotte N, Jard S, Manning M, Barberis C. 1999. Functional architecture of vasopressin/oxytocin receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 19: 589-96
260. McCulloch CA, Downey GP, El-Gabalawy H. 2006. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 5: 864-76

261. Kavanaugh A. 2006. Anakinra (interleukin-1 receptor antagonist) has positive effects on function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *Adv Ther* 23: 208-17
262. Mee JB, Cork MJ, di Giovine FS, Duff GW, Groves RW. 2006. Interleukin-1: a key inflammatory mediator in psoriasis? *Cytokine* 33: 72-8
263. Dower SK, Sims JE, Stanton TH, Slack J, McMahan CJ, Valentine MA, Bomsztyk K. 1990. Molecular heterogeneity of interleukin-1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* 594: 231-9
264. Dinarello CA, Gatti S, Bartfai T. 1999. Fever: links with an ancient receptor. *Curr Biol* 9: R147-50
265. Arend WP. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 54: 167-227
266. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB. 2007. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 1-13
267. Zhou N, Luo Z, Luo J, Fan X, Cayabyab M, Hiraoka M, Liu D, Han X, Pesavento J, Dong CZ, Wang Y, An J, Kaji H, Sodroski JG, Huang Z. 2002. Exploring the stereochemistry of CXCR4-peptide recognition and inhibiting HIV-1 entry with D-peptides derived from chemokines. *J Biol Chem* 277: 17476-85
268. Zhang TT, Cui B, Dai DZ, Tang XY. 2005. Pharmacological efficacy of CPU 86017 on hypoxic pulmonary hypertension in rats: mediated by direct inhibition of calcium channels and antioxidant action, but indirect effects on the ET-1 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 46: 727-34
269. Gusic RJ, Petko M, Myung R, William Gaynor J, Gooch KJ. 2005. Mechanical properties of native and ex vivo remodeled porcine saphenous veins. *J Biomech* 38: 1770-9
270. Slingsby C, Bateman OA, Simpson A. 1993. Motifs involved in protein-protein interactions. *Mol Biol Rep* 17: 185-95
271. Tan DC, Kini RM, Jois SD, Lim DK, Xin L, Ge R. 2001. A small peptide derived from Flt-1 (VEGFR-1) functions as an angiogenic inhibitor. *FEBS Lett* 494: 150-6
272. Presland J. 2005. Identifying novel modulators of G protein-coupled receptors via interaction at allosteric sites. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8: 567-76
273. Lazareno S. 2004. Determination of allosteric interactions using radioligand-binding techniques. *Methods Mol Biol* 259: 29-46
274. Murali R, Cheng X, Berezov A, Du X, Schon A, Freire E, Xu X, Chen YH, Greene MI. 2005. Disabling TNF receptor signaling by induced conformational perturbation of tryptophan-107. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10970-5
275. Anderson ME, Tejo BA, Yakovleva T, Siahaan TJ. 2006. Characterization of binding properties of ICAM-1 peptides to LFA-1: inhibitors of T-cell adhesion. *Chem Biol Drug Des* 68: 20-8
276. Smeets RL, Joosten LA, Arntz OJ, Bennink MB, Takahashi N, Carlsen H, Martin MU, van den Berg WB, van de Loo FA. 2005. Soluble interleukin-1 receptor accessory protein ameliorates collagen-induced arthritis by a different

- mode of action from that of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 52: 2202-11
277. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, Bartfai T, Solorzano C, Moldawer LL, Chizzonite R, McIntyre KW. 1997. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* 159: 2452-61
278. Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M. 2003. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* 31: 365-70
279. Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-32
280. Isbil-Buyukcoskun N, Gulec G, Ozluk K, Ulus IH. 2001. Central injection of captopril inhibits the blood pressure response to intracerebroventricular choline. *Braz J Med Biol Res* 34: 815-20
281. Brault S, Martinez-Bermudez AK, Marrache AM, Gobeil F, Jr., Hou X, Beauchamp M, Quiniou C, Almazan G, Lachance C, Roberts J, 2nd, Varma DR, Chemtob S. 2003. Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Iso-prostaglandin F2alpha: possible role in ischemic brain injury. *Stroke* 34: 776-82
282. Peterson TC, Cleary CE, Shaw AM, Malatjalian DA, Veldhuyzen van Zanten SJ. 2000. Therapeutic role for bismuth compounds in TNBS-induced colitis in the rat. *Dig Dis Sci* 45: 466-73
283. Strober W. 1985. Animal models of inflammatory bowel disease--an overview. *Dig Dis Sci* 30: 3S-10S
284. Stein J, Ries J, Barrett KE. 1998. Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: possible role of mast cells. *Am J Physiol* 274: G203-9
285. Sandberg JO, Eizirik DL, Sandler S. 1997. IL-1 receptor antagonist inhibits recurrence of disease after syngeneic pancreatic islet transplantation to spontaneously diabetic non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 108: 314-7
286. Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U, Dunstan C, Kollias G, Steiner G, Smolen J, Schett G. 2004. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 50: 277-90
287. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87: 1344-50
288. Nadeau S, Rivest S. 2002. Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14. *J Immunol* 169: 3370-81

289. Tomonari K. 1988. A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28: 455-8
290. Rauschmayr T, Groves RW, Kupper TS. 1997. Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5814-9
291. Wamberg S, Sandgaard NC, Bie P. 2002. Simultaneous determination of total body water and plasma volume in conscious dogs by the indicator dilution principle. *J Nutr* 132: 1711S-3S
292. Dombrowicz D, Flamand V, Miyajima I, Ravetch JV, Galli SJ, Kinet JP. 1997. Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* 99: 915-25
293. Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, Heveker N, Bkaily G, Chemtob S, Barbaz D. 2006. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 287-97
294. Fan L, Yotov WV, Zhu T, Esmailzadeh L, Joyal JS, Sennlaub F, Heveker N, Chemtob S, Rivard GE. 2005. Tissue factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties. *J Thromb Haemost* 3: 1056-63
295. Li DY, Hardy P, Abran D, Martinez-Bermudez AK, Guerguerian AM, Bhattacharya M, Almazan G, Menezes R, Peri KG, Varma DR, Chemtob S. 1997. Key role for cyclooxygenase-2 in PGE2 and PGF2alpha receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am J Physiol* 273: R1283-90
296. Banks WA. 1999. Characterization of interleukin-1alpha binding to mouse brain endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 665-70
297. Marrache AM, Gobeil F, Jr., Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, Bkaily G, Bourdeau A, Sirois MG, Vazquez-Tello A, Fan L, Joyal JS, Filep JG, Varma DR, Ribeiro-Da-Silva A, Chemtob S. 2002. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* 169: 6474-81
298. Takeuchi M, Nagai S, Nakada H, Aung H, Satake N, Kaneshima H, Izumi T. 1992. Characterization of IL-1 inhibitory factor released from human alveolar macrophages as IL-1 receptor antagonist. *Clin Exp Immunol* 88: 181-7
299. Howe RC, Lowenthal JW, MacDonald HR. 1986. Role of interleukin 1 in early T cell development: Lyt-2-L3T4- thymocytes bind and respond in vitro to recombinant IL 1. *J Immunol* 137: 3195-200
300. Cox GW, Mathieson BJ, Giardina SL, Varesio L. 1990. Characterization of IL-2 receptor expression and function on murine macrophages. *J Immunol* 145: 1719-26
301. Gao ZG, Kim SK, Ijzerman AP, Jacobson KA. 2005. Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. *Mini Rev Med Chem* 5: 545-53

302. Lazarus M. 2006. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol Nutr Food Res* 50: 451-5
303. Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschafer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, Abramovitz M. 1997. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 340: 227-41
304. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Woolley J, Bennett T. 1998. The influence of antibodies to TNF-alpha and IL-1beta on haemodynamic responses to the cytokines, and to lipopolysaccharide, in conscious rats. *Br J Pharmacol* 125: 1543-50
305. Rogler G, Andus T. 1998. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 22: 382-9
306. Corsini E, Galli CL. 1998. Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett* 102-103: 277-82
307. Galvez J, Garrido M, Rodriguez-Cabezas ME, Ramis I, de Medina FS, Merlos M, Zarzuelo A. 2003. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. *Inflamm Bowel Dis* 9: 363-71
308. Ha HY, Kim Y, Ryoo ZY, Kim TY. 2006. Inhibition of the TPA-induced cutaneous inflammation and hyperplasia by EC-SOD. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 450-8
309. Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, McEwan RN, et al. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344: 633-8
310. Kenakin T, Onaran O. 2002. The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference? *Trends Pharmacol Sci* 23: 275-80
311. Kenakin T. 2004. Allosteric modulators: the new generation of receptor antagonist. *Mol Interv* 4: 222-9
312. Kenakin T. 2004. G-protein coupled receptors as allosteric machines. *Receptors Channels* 10: 51-60
313. Kenakin T. 2004. Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25: 186-92
314. Kenakin T. 2004. Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* 65: 2-11
315. Gonzalez-Ruiz D, Gohlke H. 2006. Targeting protein-protein interactions with small molecules: challenges and perspectives for computational binding epitope detection and ligand finding. *Curr Med Chem* 13: 2607-25
316. Miedlich SU, Gama L, Seuwen K, Wolf RM, Breitwieser GE. 2004. Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site. *J Biol Chem* 279: 7254-63
317. Kenakin T, Jenkinson S, Watson C. 2006. Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 710-23

318. Lukong KE, Elsliger MA, Mort JS, Potier M, Pshezhetsky AV. 1999. Identification of UDP-N-acetylglucosamine-phosphotransferase-binding sites on the lysosomal proteases, cathepsins A, B, and D. *Biochemistry* 38: 73-80
319. Xie Y, Massa SM, Ensslen-Craig SE, Major DL, Yang T, Tisi MA, Derevyanny VD, Runge WO, Mehta BP, Moore LA, Brady-Kalnay SM, Longo FM. 2006. Protein-tyrosine phosphatase (PTP) wedge domain peptides: a novel approach for inhibition of PTP function and augmentation of protein-tyrosine kinase function. *J Biol Chem* 281: 16482-92
320. Christopoulos A. 2002. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1: 198-210
321. Christopoulos A, May LT, Avlani VA, Sexton PM. 2004. G-protein-coupled receptor allosterism: the promise and the problem(s). *Biochem Soc Trans* 32: 873-7
322. Hemstapat K, Smith MT, Monteith GR. 2004. Measurement of intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured rat embryonic hippocampal neurons using a fluorescence microplate reader: potential application to biomolecular screening. *J Pharmacol Toxicol Methods* 49: 81-7
323. Maillet EL, Pellegrini N, Valant C, Bucher B, Hibert M, Bourguignon JJ, Galzi JL. 2007. A novel, conformation-specific allosteric inhibitor of the tachykinin NK2 receptor (NK2R) with functionally selective properties. *Faseb J*
324. Rodriguez AL, Nong Y, Sekaran NK, Alagille D, Tamagnan GD, Conn PJ. 2005. A close structural analog of 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine acts as a neutral allosteric site ligand on metabotropic glutamate receptor subtype 5 and blocks the effects of multiple allosteric modulators. *Mol Pharmacol* 68: 1793-802
325. Lysikova M, Havlas Z, Tucek S. 2001. Interactions between allosteric modulators and 4-DAMP and other antagonists at muscarinic receptors: potential significance of the distance between the N and carboxyl C atoms in the molecules of antagonists. *Neurochem Res* 26: 383-94
326. Litschig S, Gasparini F, Rueegg D, Stoehr N, Flor PJ, Vranesic I, Prezeau L, Pin JP, Thomsen C, Kuhn R. 1999. CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol Pharmacol* 55: 453-61
327. Neurath MF. 2000. Immunotherapy of inflammatory bowel diseases: current concepts and future perspectives. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48: 81-4
328. Kim HS, Berstad A. 1992. Experimental colitis in animal models. *Scand J Gastroenterol* 27: 529-37
329. Hauser C, Saurat JH, Schmitt A, Jaunin F, Dayer JM. 1986. Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J Immunol* 136: 3317-23
330. Kondo S, Barna BP, Morimura T, Takeuchi J, Yuan J, Akbasak A, Barnett GH. 1995. Interleukin-1 beta-converting enzyme mediates cisplatin-induced apoptosis in malignant glioma cells. *Cancer Res* 55: 6166-71
331. Kondo S, Pastore S, Fujisawa H, Shivji GM, McKenzie RC, Dinarello CA, Sauder DN. 1995. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 105: 334-8

332. Zhu F, Qian J, Pan G, Quan S. 1998. [The effect of interleukin-1 beta interleukin-8 in the pathogenesis of experimental colitis and evaluation of interleukin-1 receptor antagonist therapy]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 20: 388-94
333. Ricci S, Macchia G, Ruggiero P, Maggi T, Bossu P, Xu L, Medaglini D, Tagliabue A, Hammarstrom L, Pozzi G, Boraschi D. 2003. In vivo mucosal delivery of bioactive human interleukin 1 receptor antagonist produced by *Streptococcus gordonii*. *BMC Biotechnol* 3: 15
334. Ali F, Guglin M, Vaitkevicius P, Ghali JK. 2007. Therapeutic potential of vasopressin receptor antagonists. *Drugs* 67: 847-58
335. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. 2004. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care* 8: 15-23
336. Mutlu GM, Factor P. 2004. Role of vasopressin in the management of septic shock. *Intensive Care Med* 30: 1276-91
337. Naitoh M, Suzuki H, Murakami M, Matsumoto A, Ichihara A, Nakamoto H, Yamamura Y, Saruta T. 1993. Arginine vasopressin produces renal vasodilation via V2 receptors in conscious dogs. *Am J Physiol* 265: R934-42
338. Barrow SE, Dollery CT, Heavey DJ, Hickling NE, Ritter JM, Vial J. 1986. Effect of vasoactive peptides on prostacyclin synthesis in man. *Br J Pharmacol* 87: 243-7
339. Martinez MC, Vila JM, Aldasoro M, Medina P, Flor B, Lluch S. 1994. Relaxation of human isolated mesenteric arteries by vasopressin and desmopressin. *Br J Pharmacol* 113: 419-24
340. Martinez MC, Aldasoro M, Vila JM, Medina P, Lluch S. 1994. Responses to vasopressin and desmopressin of human cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 622-7
341. Okamura T, Toda M, Ayajiki K, Toda N. 1997. Receptor subtypes involved in relaxation and contraction by arginine vasopressin in canine isolated short posterior ciliary arteries. *J Vasc Res* 34: 464-72
342. Sun K, Lin BC, Wang CH, Zhu HN. 1991. Comparison of selective arginine vasopressin V1 and V2 receptor antagonists on burn shock in the rat. *Cardiovasc Res* 25: 265-9
343. Verbalis JG. 2006. AVP receptor antagonists as aquaretics: review and assessment of clinical data. *Cleve Clin J Med* 73 Suppl 3: S24-33
344. Sica DA. 2006. Hyponatremia and heart failure--treatment considerations. *Congest Heart Fail* 12: 55-60
345. Vargas-Poussou R, Forestier L, Dautzenberg MD, Niaudet P, Dechaux M, Antignac C. 1997. Mutations in the vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 genes in 12 families with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 8: 1855-62
346. Bichet DG. 2008. Vasopressin receptor mutations in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28: 245-51
347. Feldman BJ, Rosenthal SM, Vargas GA, Fenwick RG, Huang EA, Matsuda-Abedini M, Lustig RH, Mathias RS, Portale AA, Miller WL, Gitelman SE.

2005. Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med* 352: 1884-90
348. Rangasetty UC, Gheorghide M, Uretsky BF, Orlandi C, Barbagelata A. 2006. Tolvaptan: a selective vasopressin type 2 receptor antagonist in congestive heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* 15: 533-40
349. Robertson GL. 2006. Regulation of arginine vasopressin in the syndrome of inappropriate antidiuresis. *Am J Med* 119: S36-42
350. Yamamura Y, Ogawa H, Yamashita H, Chihara T, Miyamoto H, Nakamura S, Onogawa T, Yamashita T, Hosokawa T, Mori T, et al. 1992. Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 105: 787-91
351. Macion-Dazard R, Callahan N, Xu Z, Wu N, Thibonnier M, Shoham M. 2006. Mapping the binding site of six nonpeptide antagonists to the human V2-renal vasopressin receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 564-71
352. Samoilova M, Wentlandt K, Adamchik Y, Velumian AA, Carlen PL. 2008. Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 210: 762-75
353. Samson M, LaRosa G, Libert F, Painsavoine P, Dethoux M, Vassart G, Parmentier M. 1997. The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol Chem* 272: 24934-41
354. Klco JM, Nikiforovich GV, Baranski TJ. 2006. Genetic analysis of the first and third extracellular loops of the C5a receptor reveals an essential WXFG motif in the first loop. *J Biol Chem* 281: 12010-9
355. Kubo S, Ishiki T, Doe I, Sekiguchi F, Nishikawa H, Kawai K, Matsui H, Kawabata A. 2006. Distinct activity of peptide mimetic intracellular ligands (pepducins) for proteinase-activated receptor-1 in multiple cells/tissues. *Ann N Y Acad Sci* 1091: 445-59
356. Granier S, Terrillon S, Pascal R, Demene H, Bouvier M, Guillon G, Mendre C. 2004. A cyclic peptide mimicking the third intracellular loop of the V2 vasopressin receptor inhibits signaling through its interaction with receptor dimer and G protein. *J Biol Chem* 279: 50904-14
357. Kenakin T. 1995. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16: 232-8
358. Galandrin S, Oligny-Longpre G, Bouvier M. 2007. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 28: 423-30
359. Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. 2007. Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 28: 382-9
360. Kenakin T. 2007. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 407-15
361. Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M. 2000. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 105: 887-95

362. Hardy P, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. 1996. Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res* 79: 504-11
363. Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Valette G, Garcia G, Pascal M, Maffrand JP, Le Fur G. 2002. Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. *Prog Brain Res* 139: 197-210
364. Lacour C, Galindo G, Canals F, Segondy D, Cazaubon C, Serradeil-Le Gal C, Roccon A, Nisato D. 2000. Aquaretic and hormonal effects of a vasopressin V(2) receptor antagonist after acute and long-term treatment in rats. *Eur J Pharmacol* 394: 131-8
365. Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. 2001. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* 1: 13
366. Lippe C, Ardizzone C. 1991. Actions of vasopressin and isoprenaline on the ionic transport across the isolated frog skin in the presence and the absence of adenylyl cyclase inhibitors MDL12330A and SQ22536. *Comp Biochem Physiol C* 99: 209-11
367. Kooli A, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Bossolasco M, Hou X, Honore JC, Dennery PA, Sapieha P, Varma D, Lachapelle P, Zhu T, Tremblay S, Hardy P, Jain K, Balazy M, Chemtob S. 2008. trans-Arachidonic acids induce a heme oxygenase-dependent vasorelaxation of cerebral microvasculature. *Free Radic Biol Med* 44: 815-25
368. Bailey GS. 1994. Labeling of peptides and proteins by radioiodination. *Methods Mol Biol* 32: 441-8
369. Derick S, Cheng LL, Voirol MJ, Stoev S, Giacomini M, Wo NC, Szeto HH, Ben Mimoun M, Andres M, Gaillard RC, Guillon G, Manning M. 2002. [1-deamino-4-cyclohexylalanine] arginine vasopressin: a potent and specific agonist for vasopressin V1b receptors. *Endocrinology* 143: 4655-64
370. Guyton AC, Hall JE. 1996. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia ; Montreal: W.B. Saunders. xliii, 1148 pp.
371. Phalipou S, Cotte N, Carnazzi E, Seyer R, Mahe E, Jard S, Barberis C, Mouillac B. 1997. Mapping peptide-binding domains of the human V1a vasopressin receptor with a photoactivatable linear peptide antagonist. *J Biol Chem* 272: 26536-44
372. Di Scala-Guenot D, Strosser MT. 1992. Oxytocin receptors on cultured astroglial cells. Regulation by a guanine-nucleotide-binding protein and effect of Mg<sup>2+</sup>. *Biochem J* 284 ( Pt 2): 499-505
373. Krautwurst D, Degtiar VE, Schultz G, Hescheler J. 1994. The isoquinoline derivative LOE 908 selectively blocks vasopressin-activated nonselective cation currents in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 349: 301-7

374. An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. 1997. Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 619-22
375. Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81: 629-83
376. Melin P, Trojnar J, Johansson B, Vilhardt H, Akerlund M. 1986. Synthetic antagonists of the myometrial response to vasopressin and oxytocin. *J Endocrinol* 111: 125-31
377. Medina P, Segarra G, Vila JM, Chuan P, Domenech C, Lluch S. 1999. V2-receptor-mediated relaxation of human renal arteries in response to desmopressin. *Am J Hypertens* 12: 188-93
378. Hasunuma K, Yamada K, Tamura Y, Yoshida S. 1991. Cardiovascular and renin responses to desmopressin in humans: role of prostacyclin and beta-adrenergic systems. *Am J Physiol* 260: H1031-6
379. Belch JJ, Small M, McKenzie F, Hill PA, Lowe GD, McIntyre DE, Forbes CD, Prentice CR. 1982. DDAVP stimulates prostacyclin production. *Thromb Haemost* 47: 122-3
380. Barrett LK, Singer M, Clapp LH. 2007. Vasopressin: mechanisms of action on the vasculature in health and in septic shock. *Crit Care Med* 35: 33-40
381. Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. 2001. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1343-60
382. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. 2003. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* 17: 677-91
383. Deen PM, van Balkom BW, Kamsteeg EJ. 2000. Routing of the aquaporin-2 water channel in health and disease. *Eur J Cell Biol* 79: 523-30
384. Buemi M, Di Pasquale G, Ruello A, Floccari F, Aloisi C, Latassa G, Corsonello A, Sturiale A, Corica F, Frisina N. 2002. Effect of a prostacyclin analogue, iloprost, on urinary aquaporin-2 excretion in humans. *Nephron* 91: 197-202
385. Klco JM, Wiegand CB, Narzinski K, Baranski TJ. 2005. Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat Struct Mol Biol* 12: 320-6
386. Avlani VA, Gregory KJ, Morton CJ, Parker MW, Sexton PM, Christopoulos A. 2007. Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem* 282: 25677-86
387. Rees S, Morrow D, Kenakin T. 2002. GPCR drug discovery through the exploitation of allosteric drug binding sites. *Receptors Channels* 8: 261-8
388. Matthews JC. 1993. *Fundamentals of receptor, enzyme, and transport kinetics*. Boca Raton: CRC Press. 167 pp.
389. Zhou N, Moradei O, Raeppl S, Leit S, Frechette S, Gaudette F, Paquin I, Bernstein N, Bouchain G, Vaisburg A, Jin Z, Gillespie J, Wang J, Fournel M,

- Yan PT, Trachy-Bourget MC, Kalita A, Lu A, Rahil J, MacLeod AR, Li Z, Besterman JM, Delorme D. 2008. Discovery of N-(2-aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103), an orally active histone deacetylase inhibitor. *J Med Chem* 51: 4072-5
390. Lazareno S, Dolezal V, Popham A, Birdsall NJ. 2004. Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol Pharmacol* 65: 257-66
391. Kenakin TP. 2005. New eyes to see texture in ligand efficacy. *Nat Methods* 2: 163-4
392. Kondo S. 1999. The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4: 177-83
393. Zhu FG, Gomi K, Marshall JS. 1998. Short-term and long-term cytokine release by mouse bone marrow mast cells and the differentiated KU-812 cell line are inhibited by brefeldin A. *J Immunol* 161: 2541-51
394. Singh D, Huston KK. 2009. IL-1 inhibition with anakinra in a patient with refractory gout. *J Clin Rheumatol* 15: 366
395. Travis S, Yap LM, Hawkey C, Warren B, Lazarov M, Fong T, Tesi RJ. 2005. RDP58 is a novel and potentially effective oral therapy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 11: 713-9
396. Goupil E, Tassy D, Bourguet C, Quiniou C, Wisehart V, Petrin D, Le Gouill C, Devost D, Zingg HH, Bouvier M, Saragovi HU, Chemtob S, Lubell WD, Claing A, Hebert TE, Laporte SA. A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway. *J Biol Chem* 285: 25624-36
397. Leduc M, Breton B, Gales C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S, Heveker N. 2009. Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 297-307
398. Cussac D, Boutet-Robinet E, Ailhaud MC, Newman-Tancredi A, Martel JC, Danty N, Raully-Lestienne I. 2008. Agonist-directed trafficking of signalling at serotonin 5-HT2A, 5-HT2B and 5-HT2C-VSV receptors mediated Gq/11 activation and calcium mobilisation in CHO cells. *Eur J Pharmacol* 594: 32-8
399. Woo AY, Wang TB, Zeng X, Zhu W, Abernethy DR, Wainer IW, Xiao RP. 2009. Stereochemistry of an agonist determines coupling preference of beta2-adrenoceptor to different G proteins in cardiomyocytes. *Mol Pharmacol* 75: 158-65
400. Jongasma M, van Unen J, van Loenen PB, Michel MC, Peters SL, Alewijnse AE. 2009. Different response patterns of several ligands at the sphingosine-1-phosphate receptor subtype 3 (S1P(3)). *Br J Pharmacol* 156: 1305-11
401. Georgieva T, Devanathan S, Stropova D, Park CK, Salamon Z, Tollin G, Hruba VJ, Roeske WR, Yamamura HI, Varga E. 2008. Unique agonist-bound cannabinoid CB1 receptor conformations indicate agonist specificity in signaling. *Eur J Pharmacol* 581: 19-29
402. Murali R, Delprado W. 2005. CD10 immunohistochemical staining in urothelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 124: 371-9

403. Maillet EL, Pellegrini N, Valant C, Bucher B, Hibert M, Bourguignon JJ, Galzi JL. 2007. A novel, conformation-specific allosteric inhibitor of the tachykinin NK2 receptor (NK2R) with functionally selective properties. *FASEB J* 21: 2124-34
404. Rubenstein LA, Zauhar RJ, Lanzara RG. 2006. Molecular dynamics of a biophysical model for beta2-adrenergic and G protein-coupled receptor activation. *J Mol Graph Model* 25: 396-409
405. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 572-9
406. Uversky VN, Dunker AK. Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1231-64
407. Chouard T. Structural biology: Breaking the protein rules. *Nature* 471: 151-3
408. Cortese MS, Uversky VN, Dunker AK. 2008. Intrinsic disorder in scaffold proteins: getting more from less. *Prog Biophys Mol Biol* 98: 85-106