



HAL
open science

Etude pharmacochimique du système 26RFa/QRFP: synthèse d'analogues peptidiques, activité biologique in vitro et in vivo et interactions moléculaires

Karima Alim

► **To cite this version:**

Karima Alim. Etude pharmacochimique du système 26RFa/QRFP: synthèse d'analogues peptidiques, activité biologique in vitro et in vivo et interactions moléculaires. Endocrinologie et métabolisme. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR073 . tel-01975980

HAL Id: tel-01975980

<https://theses.hal.science/tel-01975980>

Submitted on 9 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*A mon cher Papa et ma chère Maman,
A mes sœurs, Ghania, Dalila et Kaïssa,
A mes frères Smaïl et Khaled,
A ma tante Marie-Jo et mon oncle Mohand,
Qui me sont chers...*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Inserm 1239, dirigé par le Docteur Youssef Anouar sous la direction du Docteur Jérôme Leprince.

Je tiens à remercier la Région Normandie pour l'aide financière qui m'a été octroyée durant la préparation de ma thèse de doctorat, ce qui m'a permis de l'effectuer dans les meilleures conditions.

Ce travail n'aurait pas pu être conduit à son terme sans l'aide généreuse de plusieurs organismes :

- *L'institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)*
- *L'Université de Rouen-Normandie*
- *L'Institut de Recherche et de l'Innovation Biomédicale (IRIB)*
- *La Plate-Forme Régionale de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie (PRIMACEN)*

*Monsieur le Dr **Frédéric Bihel**, Chargé de Recherche CNRS, me fait l'honneur d'être Rapporteur de ce travail. Mesurant pleinement la faveur qu'il m'accorde, je tiens à lui témoigner l'expression de mon profond respect.*

*Monsieur le Dr **Xavier Iturrioz**, Chargé de Recherche INSERM, a accepté la charge d'être Rapporteur de ce mémoire. Je tiens à le remercier très sincèrement de l'intérêt qu'il témoigne ainsi à nos recherches.*

*Monsieur le Dr **Nicolas Chartrel**, Directeur de Recherche INSERM, a accepté de participer à ce jury. Je le remercie très sincèrement de l'intérêt qu'il manifeste pour ces travaux.*

*Madame le Dr **Agnès Delmas**, Directeur de Recherche CNRS, me fait l'honneur de siéger dans ce jury en dépit de ses nombreuses responsabilités. Conscient de la faveur qu'elle m'accorde, je lui sais gré d'avoir bien voulu examiner les travaux présentés dans ce mémoire.*

*Madame le Pr **Jana Sopkova-de Oliveira Santos**, Professeur au CERMN à Caen, a volontiers accepté d'examiner ce mémoire. Je la remercie vivement de sa présence aujourd'hui.*

*J'aimerais en tout premier lieu remercier mon directeur de thèse, le Docteur **Jérôme Leprince**, Chargé de Recherche INSERM, pour m'avoir appris à être autonome tout au long de ce travail de recherche. Je lui sais gré de m'avoir fait partager ses connaissances en chimie et de m'avoir encouragée tout au long de cette thèse. Je le remercie aussi pour sa patience et sa gentillesse à mon égard, ainsi que pour la relecture finale méticuleuse de chacun des chapitres de ma thèse, ce qui sans aucun doute permis de préciser mon propos. Aussi, je souhaite lui témoigner ma profonde reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur **Hubert Vaudry**, Directeur de Recherche INSERM, pour sa disponibilité et les conseils avisés qu'il m'a donnés tout au long de cette thèse. Il n'a pas cessé, par ses compétences, sa rigueur et ses encouragements, de stimuler ce travail de recherche. Qu'il me soit permis ici de lui témoigner ma sincère admiration.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Docteur **David Vaudry** pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir fournie tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Son insistance à vouloir présenter mes travaux de recherche s'avère très utile pour moi aujourd'hui.*

*Je tiens également à manifester ma reconnaissance au Docteur **Youssef Anouar** pour l'accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes et sa bienveillance à mon égard.*

*J'adresse aussi mes remerciements à **Benjamin Lefranc**, pour tout le travail de synthèse peptidique, ses explications précieuses en chimie, sa gentillesse, ses encouragements, et pour m'avoir supportée dans notre bureau toutes ces années ponctuées de fous rires fréquents. Merci, **Benjamin**, pour tous les mouchoirs que tu m'as fournis quand je pleurais (il faut bien remplir les stocks). C'était un vrai plaisir que d'avoir travaillé au côté d'une personne comme toi et d'avoir partagé mon bureau avec toi! Ça y est, tu peux prendre mon bureau maintenant et t'arranger ton grand bureau, tant attendu.*

*Je remercie chaleureusement le Docteur **Christophe Dubessy**, pour m'avoir initiée à l'utilisation de la flexstation, pour ses nombreux conseils si précieux, ses encouragements tout au long de ma thèse, sa gentillesse, et ses qualités pédagogiques qui m'ont permis de mieux appréhender la biologie cellulaire, en particulier à mon arrivée au laboratoire.*

Ce travail doit beaucoup à toute l'équipe 2, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Un grand merci à **Magalie Basille**, **Malika Skiba**, **Julien Chuquet**, **Olivier Wurtz** le « Marseillais », **Marjorie Gras** et **Delphine Burel**.

Je tiens à remercier également les Docteurs **Nicolas Chartrel**, **Marie Picot** et **Gaëtan Prévost** et à leur témoigner ma sincère reconnaissance pour leur aide précieuse, leur savoir-faire, leur disponibilité et les heures passées à discuter autour du 26Rfa. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Huguette L.**, **Catherine B.**, **Magalie B.**, **Laurence D.**, pour leur gentillesse, leur disponibilité, et pour tous les services qu'elles m'ont rendus au cours des années passées dans l'Unité. Merci à ses adorables mamans du laboratoire.

J'ai apprécié l'aide régulière que m'ont apportée, **Sabrina M.**, **Laurence M.** et **Catherine B.** Une attention particulière pour toi **Catherine** ; sans toi, je ne serais jamais arrivée à destination lors des congrès. Merci pour ta gentillesse et ton sourire qui te caractérisent.

Les résultats présentés dans ce mémoire doivent également à la contribution de plusieurs personnes : les Professeurs **Ronan Bureau**, **Jana Sopkova-de Oliveira Santos** du CERMN à Caen, le Docteur **Laure Guilhaudis** et le professeur **Isabelle Ségalas-Milazzo** de l'IRCOF à Rouen et le Professeur **Olivier Lesouhaitier** du LMSM à Evreux,

Je tiens à exprimer mon amitié à tous les doctorants du laboratoire, les anciens et les nouveaux, et en particulier, ma wjeh eleft préférée, **Rhita**, pour tous les fous rires au bureau, pour son amitié, sa gentillesse et sa disponibilité. Je remercie aussi mon duo d'IUFM préféré, **Aurélien** et **Roxane**, pour leur gentillesse, leur aide, et toutes les heures passées devant mon ordinateur pour trouver une solution à mes nombreux problèmes durant ma rédaction, et pour tous les repas partagés quasi quotidiennement pendant 3 ans et demie. Les rapports humains dont j'ai profités à leur côté ont fait naître de réels liens d'amitié qui à mes yeux n'ont pas de prix. Je remercie également **zézette (Auriane)** pour tous ces moments partagés au laboratoire, pour son sourire et son humour décapant (tu étais aussi mon rayon de soleil). Je joins à mes remerciements **Ophélita** pour sa gentillesse et pour ses plaisanteries qui m'ont toujours fait rire même dans les moments les plus difficiles. Tu es une personne géniale, j'ai beaucoup de chance d'avoir une amie comme toi.

*Je ne peux remercier les doctorants du laboratoire sans évoquer **Benjamin P.**, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et ses chocolats.... Pstt : jamais je n'oublierai la façon dont tu m'as accueillie ! Merci aussi à notre adorable **Paulo**, pour sa bonne humeur et sa gentillesse, à notre stagiaire **Michaël**, qui est arrivé plus récemment au laboratoire et qui est une personne entière et sincère qui gagne à être connue; merci pour ta folie et tous les moments de fous rires passés au laboratoire, j'espère que tu auras ta thèse au laboratoire, tu le mérites amplement.*

*Mes pensées amicales vont également vers, **Julita (ma miss blonde)**, **Alexandre N.**, **Julien W.**, **Jane**, **Pierre-Michael**, **Matthieu**, **Vadim**, **Alexis**, **Abdallah**, **Hugo**, **Sarah**, **Alexandre M.**, **Lisa**, et **Fanny**. Je remercie également nos post-doc **Damien**, **Maria Del Mar**, **Lina**, **Tareq**, **Audrey** et **Kasia** et les stagiaires, en particulier **Liza** et **Fayrouz** pour leur disponibilité, leur sympathie et tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.*

*Je remercie tout particulièrement, mon ami **Mahmoud**, mon ours préféré (très gourmand). Qu'auraient été mes journées au labo sans toi ? Je ne me le demande même pas. Merci pour l'amitié qui nous a unis au laboratoire et en dehors, pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta présence, et pour m'avoir accompagnée au laboratoire très tard le soir, je ne pourrai jamais te remercier autant que tu le mérites. J'ai beaucoup de chance de t'avoir comme ami.*

*A ma grande sœur, **Mouna** ; merci pour ton soutien, pour le bon temps qu'on a partagé et pour nos longues discussions sur le 26RFa. Merci à **Fatima**, **Seyma**, **Ilhem** et **Ifat** mes copines exceptionnelles ; sans elles cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Merci à ma chère copine **Amira Doudou**, à **Meriem Atlaoui**, à **Mimi Bel**, et **Imen ABBas** à mon cher **Sahoul Karr** et à mon ami l'unique, **Ahmad Ali Ahmad**, **Karim**, et **Salah**. Merci à toutes ces personnes que j'ai croisées sur mon chemin dès mon arrivée en France, vous étiez là malgré les milliers de kilomètres qui nous séparaient, vous n'avez pas cessé de m'encourager et de me soutenir. A **Maria Isabelle Roth**, mon amie exceptionnelle, merci pour ta capacité à me rendre le sourire dans toutes les situations, par des petits riens qui font tellement tout et pour tous les bons moments partagés avec toi.*

*La liste étant trop longue pour être nominale, je voudrais également remercier tous les autres membres de laboratoire, anciens et nouveaux, pour leur bienveillance à mon égard, et en particulier mes collègues, **David A.**, **Luca**, **Dorthé**, **Maité**, **Loubna**, **Estelle**, **Céline**, **Isabelle**,*

Sylvie, Michaël, Hélène, Pierrick, Marine D., Christine, Isabelle, Martine, Marie-Christine, Fabrice, Estelle et ma compatriote Algérienne, l'adorable Saloua pour sa gentillesse.

Je ne saurais oublier Lotfi Mansour. Même si aujourd'hui la vie nous a séparés, je tiens à le remercier pour sa patience, son soutien tout le long de ces années de thèse, et m'excuser pour le nombre de week-ends passés au labo, alors qu'il faisait un temps magnifique à partager avec lui. Je te remercie du plus profond de mon cœur. Je te souhaite tout le bonheur du monde.

A mon cher Papa, sans toi je n'en serai jamais là aujourd'hui, je suis fière d'avoir un père comme toi, à ma Mère, à mes sœurs Ghania (ma deuxième maman), Kaïssa (ma sœur de cœur) et son adorable conjoint Sidali, ma chère Dalila (ma grande folle) et ses petites merveilles Alicya, Emma et Sofia, à mes frères Khaled et Smaïl et son petit ange Aylane, merci pour votre confiance, votre amour, votre soutien ; je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. A mon oncle Mohand et à ma chère tante Marie-Jo pour leur présence, leurs encouragements et leur amour : sans eux je n'aurais pas supporté d'être loin de ma famille autant d'années. : Qu'ils trouvent ici l'expression de mon amour et de mon respect.

A toute ma famille ALIM et Saïbi

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive et je remercie toutes celles et ceux qui me connaissent et qui me permettent de me sentir existée... La thèse n'est pas une période facile, mais vous l'avez rendue belle... Merci à toutes et à tous.

Sommaire

Sommaire.....	1
Liste des articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale.....	5
Résumé.....	7
Summary.....	11
Liste des abréviations.....	15
Liste des Figures et des Tableaux	19
Introduction.....	21
Chapitre 1 : Précurseurs de neuropeptides	25
1.1 Classification et biosynthèse	25
1.2 Modifications post-traductionnelles	30
1.2.1 Formations de ponts disulfure.....	30
1.2.2 Acylation des chaînes latérales.....	32
1.2.3 Phosphorylation	32
1.2.4 Sulfatation.....	33
1.2.5 Protéolyse	33
1.2.6 Amidation.....	36
1.2.7 Pyroglutamisation	40
1.2.8 Acétylation de la fonction N-terminale.....	41
Chapitre 2 : Les peptides RFamide	43
2.1 Les peptides RFamide chez les invertébrés	43
2.2 Les peptides RFamide chez les vertébrés	45
2.2.1 Le NPFF et le NPAF	46
2.2.2 Le PrRP	53
2.2.3 Le RFRP-1, le RFRP-3 et la GnIH	57
2.2.4 Les Kisspeptines	61
Chapitre 3 : Le26RFa et le QRFPR.....	71
3.1 Le 26RFa.....	71
3.1.1 Caractérisation du 26RFa	71

3.1.2	Le prépro-26RFa.....	74
3.1.3	Distributions centrale et périphérique du 26RFa.....	76
3.2	Le récepteur du 26RFa, le QRFPR	79
3.2.1	Caractérisation du récepteur du 26RFa	79
3.2.2	Modèle tridimensionnel du QRFPR et docking du peptide.....	81
3.2.3	Mécanismes de signalisation cellulaire.....	83
3.2.4	Distribution tissulaire du QRFPR	83
3.3	Activités biologiques du 26RFa.....	85
3.3.1	Rôle du 26RFa dans le contrôle de la prise alimentaire.....	85
3.3.2	Rôle du 26RFa dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.....	87
3.3.3	Rôle du 26RFa sur le développement osseux	89
3.3.4	Rôle du 26RFa sur l'axe gonadotrope	90
3.3.5	Rôle du 26RFa sur la glande surrénale.....	91
3.3.6	Rôle nociceptif du 26RFa	92
3.3.7	Rôle du 26RFa sur l'activité locomotrice.....	92
3.3.8	Rôle du 26RFa sur le comportement anxieux.....	92
3.3.9	Rôle du 26RFa sur la tumorigenèse	93
3.4	Etudes des relations structure-activité.....	93
Chapitre 4 : Objectifs de la thèse		101
Matériels et Méthodes		103
1.	Culture cellulaire des lignées stables.....	105
2.	Etude de la fonctionnalité du 26RFa et de ses analogues par mesure de la variation de la $[Ca^{2+}]_i$.....	105
3.	Etude des effets <i>in vivo</i> du 26RFa et de quelques analogues.....	106
3.1.	Prise alimentaire	106
3.2.	Test de tolérance à l'insuline (ITT)	106
4.	Etudes structurales de l'ECL2 du hQRFPR	107
4.1.	Prédiction de l'hélicité par AGADIR	107
4.2.	Dichroïsme circulaire	107
5.	Etude des interactions hélice-hélice entre le 26RFa et l'ECL2 du QRFPR par thermophorèse à l'échelle microscopique.....	108

Résultats	109
1. Article	111
2. Etude <i>in vivo</i> de quelques analogues remarquables du 26RFa	177
2.1. Effet d'analogues peptidiques et pseudopeptidiques du 26RFa ₍₂₀₋₂₆₎ sur la prise alimentaire	177
2.2. Effet d'une injection périphérique de 26RFa et ses analogues au cours d'un test de tolérance à l'insuline (ITT)	179
3. Etude moléculaire de l'interaction entre le 26RFa et la boucle extracellulaire 2 (ECL2) du QRFPR	181
3.1. Prédiction de l'hélicité par AGADIR	181
3.2. Vérification expérimentale de la structure de l'ECL2 par dichroïsme circulaire.....	183
3.3. Etude préliminaire de l'interaction hélice-hélice entre le 26RFa et L'ECL2 de QRFPR par thermophorèse à l'échelle microscopique.....	184
Discussion	185
1. Synthèse et évaluation fonctionnelle d'analogues du 26RFa ₍₂₀₋₂₆₎ contenant une fonction guanidine mono-, di- ou trisubstituée en position 25	188
2. Etude <i>in vivo</i> de quelques analogues remarquables du 26RFa	192
3. Etude des interactions 26RFa/QRFPR.....	195
Conclusion et perspectives	199
Références bibliographiques	207

Liste des articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale

Publication

Alim K., Lefranc B., Dubessy C., Boutin J.A., Vaudry H., Chartrel N., Vaudry H., Chuquet J., and Jérôme Leprince. Design, Synthesis and Functional Evaluation of a Novel Series of 26RFa Peptide Analogues Containing a Mono- or Polyalkyl Guanidino Arginine Derivative. *J Med Chem* (en révision).

Communications orales dans des congrès

Alim K., Lefranc B., Dubessy C., Bureau R., Sopkova-de Oliveira Santos J., Chartrel N., Vaudry D., Chuquet J., et Leprince J. Evaluation fonctionnelle d'analogues peptidiques du 26RFa modifiés au niveau de l'arginine 25. Le 20ème congrès du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP). 26-30 mars 2017. Arcachon, France.

Communications affichées dans des congrès

Alim K., Guilhaudis L., Vaudry D., Ségalas-Milazzo I., Chuquet J., Chartrel N., Bureau B., Sopkova-de Oliveira Santos J. and Leprince J. Structural study of the extracellular loop 2 of GPR103 by circular dichroism spectroscopy. 18èmes Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement. 26-27 mars 2015. Mont-Saint-Aignan, France.

Alim K., Guilhaudis L., Ségalas-Milazzo I., Vaudry D., Chuquet J., Chartrel N., Bureau R., Vaudry H., Sopkova-de Oliveira Santos J., and Leprince J. Demonstration of the occurrence of an α -helix in the extracellular loop 2 of GPR103. 19ème Congrès du Groupe Français des Peptides et des Protéines. 17-22 mai 2015. Portbail, France.

Alim K., Guilhaudis L., Ségalas-Milazzo I., Vaudry D., Chuquet J., Chartrel N., Bureau B., Vaudry H., Sopkova-de Oliveira Santos J. and Leprince J. Prediction of secondary structure and determination of helical propensity of the extracellular loop 2 of GPR103. 4ème journée de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB). 4 juin 2015. Rouen, France.

Alim K., Guilhaudis L., Ségalas-Milazzo I., Lefranc B., Vaudry D., Chuquet J., Chartrel N., Bureau R., Sopkova-de Oliveira Santos J., and Leprince J. Structural characterization of the extracellular loop 2 of GPR103 using circular dichroism spectroscopy. 19èmes Journées de l'Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative-Santé-Environnement. 10-11 mars 2016. Caen, France.

Alim K., Guilhaudis L., Ségalas-Milazzo I., Lefranc B., Vaudry D., Chuquet J., Chartrel N., Bureau R., Sopkova-de Oliveira Santos J., and Leprince J. Secondary structure of the synthetic extracellular loop2 of GPR103 using circular dichroism spectroscopy. International Regulatory Peptide Society RegPep, 12-14 juillet 2016. Rouen, France.

Alim K., Picot M., Lefranc B, Prévost G., Chuquet J., Vaudry D., Vaudry H., Chartrel N., Leprince J. Role of QRFPR ligands in the regulation of glucose homeostasis in mice. 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium. 4-9 septembre 2016, Leipzig, Allemagne.

Alim K., Picot M., Lefranc B, Prévost G., Chuquet J., Vaudry D., Vaudry H., Chartrel N., Leprince J. Role of QRFPR ligands in the regulation of glucose homeostasis in mice. Journée Normande de Recherche Biomédicale - JNRB 2016. 16 septembre 2016, Rouen, France.

Alim K., Guilhaudis L., Ségalas-Milazzo I., Lefranc B., Vaudry D., Chuquet J., Chartrel N., Bureau R., Sopkova-de Oliveira Santos J., and J. Leprince. Structure characterisation and determination of helical propensity of the extracellular loop 2 of GPR103. G Protein-coupled Receptors Meeting, GDR 2016, 21-24 novembre 2016, Tours, France.

Alim K., Picot M., Lefranc B, Prévost G., Chuquet J., Vaudry D., Vaudry H, Chartrel N, and Leprince J. Effect of the human QRFPR ligands in the regulation of energy homeostasis. 20èmes Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement, NBISE 497, 16-17 mars, 2016, Le Havre, France.

Résumé

Le 26RFa est un neuropeptide de la famille des RFamide initialement isolé à partir d'un extrait de cerveaux de grenouille par notre laboratoire grâce à des anticorps dirigés contre le motif Arg-Phe-NH₂ du NPF de bœuf. Simultanément, deux laboratoires pharmaceutiques ont identifié le GPR103, un récepteur couplé aux protéines G jusque là orphelin, comme étant le récepteur de ce neuropeptide. Depuis, le GPR103 a été renommé QRFPR pour *Pyroglutamylated RFamide peptide receptor*. L'ADNc du pro-26RFa a été cloné chez différentes espèces, de l'amphioxus *Branchiostoma floridae* jusqu'à l'homme, ce qui a permis d'identifier dans le précurseur plusieurs sites de clivage potentiels par les *prohormone convertases* susceptibles de générer, outre le 26RFa, une forme allongée en N-terminal, le 43RFa aussi dénommé QRFP, et un peptide situé à l'extrémité C-terminale des 26RFa et 43RFa, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, dont la séquence (GGFSFRF-NH₂) est hautement conservée des amphibiens aux mammifères. Des expériences menées *in vivo* ou *ex vivo* chez le rongeur ont montré que le 26RFa et/ou le QRFP augmentent de façon dose-dépendante la consommation de nourriture, stimulent la sécrétion de gonadotropines et d'aldostérone et modulent la libération d'insuline induite par le glucose. Par ailleurs, l'inactivation du gène codant le QRFPR chez la souris provoque une ostéoporose sévère. L'ensemble de ces données indique que le 26RFa pourrait exercer diverses activités biologiques chez les vertébrés telles que le contrôle de la prise alimentaire, de l'insulinémie, de la reproduction, de l'homéostasie hydrominérale et de l'ostéogenèse. Enfin, il avait été montré précédemment que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ mime les effets orexigéniques, insulino-statiques et hypophysiotropes du peptide de référence.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes fixés comme objectifs de répondre aux questions suivantes (1) quel est l'impact de la variation de la longueur de la chaîne et de l'alkylation de la fonction guanidinium de l'Arg²⁵ du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sur l'activation du QRFPR ? (2) quel est l'effet d'analogues remarquables du 26RFa humain sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique chez la souris ? et (3) la boucle extracellulaire reliant les domaines transmembranaires 4 et 5 (ECL2) du QRFPR présente-t-elle réellement une hélice- α dans le récepteur *in cellulo* et est-elle capable d'interagir avec l'hélice- α du 26RFa ?

Dans un premier volet de notre travail, nous avons étudié les répercussions des variations de longueur de chaîne, de nature et de nombre de substituants alkyles portés par la fonction guanidinium de l'Arg²⁵ du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sur l'activation du QRFPR humain en déterminant la

capacité des analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ générés à augmenter la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans une lignée cellulaire CHO exprimant le QRFPR humain et la sous-unité α_{16} de la protéine G.

L'homologation de la chaîne latérale de l'Arg (homoarginine, Har) n'impacte pas significativement la puissance de l'héptapeptide C-terminal du 26RFa, alors que son raccourcissement d'un méthylène (norarginine, Nar) conduit à un analogue inactif. De plus, la majorité des analogues incorporant une Har ou une Nar *N*-alkylée ne sont ni des agonistes ni des antagonistes du QRFPR, soulignant que la longueur de la chaîne latérale de l'arginine est optimale au sein de la poche d'interaction. Nous avons également mis en lumière que le [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) est 25 fois plus puissant que sa forme non méthylée et seulement 1,5 fois moins puissant que le 26RFa et constitue à ce titre une molécule de référence. Les équivalents *N*^ω-éthyl, *N*^ω-propyl et *N*^ω-isobutyl du LV-2186 présentent des activités agonistes similaires à celle du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎. Enfin, les composés [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵] (LV-2185) et [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279) bien qu'antagonisant l'effet du 26RFa sur la mobilisation du calcium intracellulaire, se comportent plus vraisemblablement comme des agonistes partiels du QRFPR. L'ensemble de ces données montre que la longueur de la chaîne latérale de l'arginine est ajustée au site d'interaction et que la monométhylation de sa guanidine s'y accommode parfaitement. Ces résultats valident ainsi le modèle 3D du QRFPR humain et renforcent l'importance de l'Arg²⁵ dans les interactions moléculaires établies entre le 26RFa et son récepteur, le QRFPR.

Dans le deuxième volet de ce travail, nous avons déterminé l'activité *in vivo* des analogues peptidique LV-2185, LV-2186 et/ou pseudopeptidique [Cmpi²¹,aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₁₋₂₆₎ (LV-2172) sur le comportement alimentaire de souris pré-affamées et la tolérance des souris à l'insuline. Dans un premier temps, nous avons confirmé l'effet orexigène et pro-hypoglycémiant du 26RFa. Par la suite et de façon inédite, nous avons établi que le LV-2186 décrit précédemment comme un agoniste puissant *in vitro* du récepteur humain, reproduit avec une latence de plusieurs minutes l'effet potentialisateur du 26RFa sur l'action hypoglycémique de l'insuline. De plus, l'antagoniste du *h*QRFPR, le LV-2185, co-administré avec une dose effective de 26RFa bloque l'effet orexigène de ce dernier durant la première heure ainsi que son effet pro-hypoglycémiant. Par ailleurs, nous n'avons pas été en mesure de reproduire l'effet orexigène du LV-2172 probablement en raison d'un biais méthodologique, et de mettre en évidence son éventuel effet 26RFa-like sur l'hypoglycémie provoquée par la co-administration d'insuline. Ce dernier résultat soutiendrait que l'effet du 26RFa sur l'homéostasie glucidique

serait relayé via un autre récepteur que l'orthologue murin du QRFPR, soit le GPR103B ou le NPPF-2. Finalement, cette étude *in vivo* souligne la complexité d'action du 26RFa sur l'homéostasie glucidique de la souris et suggère que les composés LV-2185 et LV-2186 pourraient être moins spécifiques du GPR103A que ne le serait le LV-2172.

Dans le troisième et dernier volet de ce travail, nous nous sommes focalisés sur une étude des interactions entre le 26RFa et son récepteur grâce au modèle 3D du *h*QRFPR construit par notre équipe. La présence d'une courte hélice- α non-transmembranaire (I¹⁸⁸-E¹⁹⁷) dans l'ECL2 (Q¹⁸⁴-Q²¹¹) du modèle de QRFPR, combinée à une position de *docking* du 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ qui implique que l'hélice- α du 26RFa reste en surface du récepteur nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une interaction entre ces deux hélices potentiellement à l'origine de la reconnaissance moléculaire ligand/récepteur. J'ai donc entrepris de vérifier cette hypothèse en étudiant tout d'abord les prédictions structurales *in silico* de différents fragments du QRFPR délimitant sa partie ECL2 (Leu¹⁶⁶-Phe²²³; Trp¹⁷⁰- Ile²¹³; Leu¹⁷¹-Lys²¹²; Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ et Met¹⁸⁰-Lys²¹²) en utilisant le logiciel AGADIR. Une tendance à se structurer en hélice, d'une intensité modérée à forte en fonction de la longueur de la chaîne peptidique, a été détectée pour tous les fragments entre les résidus Pro¹⁷⁹ et Glu¹⁹⁷. Compte tenu de la bonne corrélation entre la position de l'hélice de la partie ECL2 dans le modèle du QRFPR (I¹⁸⁸-E¹⁹⁷) et celle prédite par AGADIR, nous avons sélectionné les segments Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHI; LV-2252) et [Ser^{200,201}]Met¹⁸⁰-Lys²¹² (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHISSLEEWTSPPVHQQ ; LV-2262) du QRFPR pour une vérification expérimentale de leur structure par une étude en dichroïsme circulaire (CD) dans différents milieux aqueux, organiques et micellaire. Les spectres de CD obtenus dans le tampon phosphate se caractérisent par la présence d'une bande négative autour de 195 nm et un faible signal positif pour une longueur d'onde d'environ 218 nm, indiquant que les LV-2252 et le LV-2262 évoluent dynamiquement en milieu aqueux sous une forme essentiellement non ordonnée et donc non stabilisée. En revanche, les spectres enregistrés pour les deux peptides en présence de TFE présentent des caractéristiques d'un mélange d'hélice- α et de conformation aléatoire avec une bande positive à 190 nm et des bandes négatives à 205 et 218 nm qui évoluent vers une stabilisation de l'hélice quand le pourcentage de TFE augmente. Bien que peu solubles dans la DPC, les fragments de l'ECL2 adoptent une structure hélicoïdale similaire à celles enregistrées dans le TFE. En complément, des résultats préliminaires issus d'expériences de MST montrent des différences thermophorétiques qui traduisent l'établissement d'une interaction entre les deux partenaires. Néanmoins, la dispersion des valeurs ne nous a pas permis d'accéder à la détermination d'une constante de dissociation.

L'ensemble de ces résultats confirme cependant la présence d'une structure secondaire de type hélice- α au niveau de l'ECL2 du QRFPR capable d'interagir physiquement avec celle du 26RFa.

En conclusion, ces données apportent de nouvelles informations concernant les relations structure-activité du 26RFa et les interactions moléculaires régissant le système 26RFa/QRFPR, ce qui devrait contribuer au développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique ciblant le QRFPR notamment dans le traitement des troubles de l'homéostasie énergétique.

Summary

26RFa is a neuropeptide of the RFamide family, originally isolated from a frog brain extract by using antibodies raised against the Arg-Phe-NH₂ motif. Concomitantly, two pharmaceutical companies have shown that 26RFa is the endogenous ligand of the former orphan G protein-coupled receptor GPR103 now renamed QRFPR. Analysis of the human 26RFa precursor indicates that pre-pro26RFa may generate several additional peptides including an N-terminally extended form (43RFa) and a truncated peptide 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (GGFSFRF-NH₂) which is strictly conserved in mammals. In rodents, 26RFa and 43RFa induce a dose dependent increase in food intake, stimulate secretion of gonadotropins and aldosterone, as well as modulating glucose-induced insulin release. Furthermore, QRFPR-knockout mice suffer from osteopenia and exhibit the characteristic kyphotic hump of osteoporotic patients. Altogether these data indicate that 26RFa may exert diverse biological activities in vertebrates such as food intake control, reproduction and osteogenesis. It is important to note that the C-terminal heptapeptide, 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, mimics the orexigenic and gonadotropic effects of 26RFa.

The purpose of the present study was (1) to determine the impact of Arg²⁵-modified 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ analogues on the activation of the QRFPR (2) to evaluate the effect of remarkable analogues of hQRFPR, *in vivo* in a food intake and glucose homeostasis paradigm (3) to evaluate if the second extracellular loop (ECL2) of the QRFPR really presents a short α -helix and is able to interact with 26RFa α -helix?

In the first part of our work we have studied the impact of variations in the length of the chain, the nature and the number of alkyl substituents around the guanidine function of Arg²⁵ on the activation of the human QRFPR by assessing the ability of the 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ analogues to increase intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) in human QRFPR transfected CHO cells. Homologation of the Arg side chain (homoarginine, Har) does not significantly affect the potency of the C-terminal heptapeptide of 26RFa, whereas a methylene (norarginine, Nar) shortening leads to the inactivate compound. Subsequently, the majority of analogues incorporating an *N*-alkylated Har or Nar are neither agonists nor QRFPR antagonists, indicating that the length of the side chain of arginine is optimal within the binding pocket. We also found that [(Me)^oArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) is 25 times more potent than its unmethylated form and only 1.5 times less potent than 26RFa thus constituting a reference molecule. The *N*^o-ethyl, *N*^o-propyl and *N*^o-isobutyl counterparts of LV-2186 exhibit agonist like activities similar to

that of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎. Finally, the compounds [(Me, Me)^{ω,ω}Arg²⁵] (LV-2185) and [(Me, Me, Me)^{ω, ω, ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279) although antagonizing the effect of 26RFa on intracellular calcium mobilization, are more likely partial agonists of QRFPR. These data show that the length of the side chain of arginine is adjusted to the site of interaction and that the monomethylation of its guanidine function fits perfectly. These results validate the 3D model of human QRFPR and reinforce the importance of Arg²⁵ in the molecular interactions established between 26RFa and its receptor, the QRFPR.

In the second part of our work, we have determined the *in vivo* activity of the peptide analogues LV-2185, LV-2186 and/or the pseudopeptide [Cmpi²¹, aza-β³-Hht²³] 26RFa₍₂₁₋₂₆₎ (LV-2172) on the feeding behavior and tolerance to insulin of mice. At first, we have confirmed the orexigenic and pro-hypoglycemic effect of 26RFa. Subsequently, we have established that LV-2186 which was previously described as a potent *in vitro* agonist of the human receptor, reproduces the hypoglycemic effect of 26RFa with delay. In addition, the *h*QRFPR antagonist, LV-2185, co-administered with an effective dose of 26RFa blocks the orexigenic effect of the latter during the first hour as well as its pro-hypoglycemic effect. Unfortunately, we were not able to reproduce the LV-2172 orexigenic effect, probably due to a methodological bias. Alternatively, this last result would argue that the effect of 26RFa on the glucose homeostasis paradigm would be relayed via another receptor than the QRFPR murine orthologue; either GPR103B or NPFF-2. Finally, this *in vivo* study highlights the complex action of 26RFa on glucose homeostasis in mice and suggests that the compounds LV-2185 and LV-2186 might be less specific for GPR103A as compared to LV-2172.

In the third and final part of our work, we have studied the interactions between 26RFa and its receptor using an *h*QRFPR 3D model built in the team. The presence of a short non-transmembrane α-helix (I¹⁸⁸-E¹⁹⁷) in the ECL2 (Q¹⁸⁴-Q²¹¹) of the QRFPR model, combined with the docking position of 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ which in turn implies that the α-helix of 26RFa remains on the surface of the receptor, led us to hypothesize an interaction between these two helices potentially at the origin of the molecular ligand/receptor recognition. In order to verify this hypothesis, I have established *in silico* structural predictions of different QRFPR fragments delining the ECL2 region (Leu¹⁶⁶-Phe²²³, Trp¹⁷⁰-Ile²¹³, Leu¹⁷¹-Lys²¹², Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ and Met¹⁸⁰-Lys²¹²) using the AGADIR software. A tendency to form a helical structure, of moderate to strong intensity in function of the length of the peptide chain, was detected for all the fragments between the residues Pro¹⁷⁹ and Glu¹⁹⁷. Considering the good correlation between the helix

position of the ECL2 in the QRFPR model (I¹⁸⁸-E¹⁹⁷) and that predicted by AGADIR, we have selected the Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHI; LV-2252) and [Ser^{200,201}] Met¹⁸⁰-Lys²¹² (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHISSLEEWTSPVHVK; LV-2262) of the QRFPR for an experimental verification of their structure by circular dichroism (CD) in different aqueous, organic and micellar media. The CD spectra obtained in the phosphate buffer are characterized by the presence of a negative band around 195 nm and a weak positive signal for the 218 nm wavelength, indicating that the LV-2252 and the LV- 2262 evolve dynamically in an aqueous medium in a form essentially unordered and therefore unstabilized. On the other hand, the spectra recorded for the two peptides in presence of TFE showed characteristics of a mixture of α -helix and of a random conformation with a positive band at 190 nm and negative bands at 205 and 218 nm which evolve towards the stabilization of the helix when the percentage of TFE increases. In spite of a poor solubility in DPC, the fragments of the ECL2 adopt a helical structure similar to those recorded in TFE. In addition, preliminary results from MST experiments show thermophoretic differences which reflect the establishment of an interaction between the two partners. Nevertheless, the dispersion of the values did not allow us to determine a dissociation constant. Taken together, these results confirm the presence of a α -helix structure in the ECL2 of QRFPR which can interact with that of 26RFa.

In conclusion, these data provide detailed information on structure-activity relationships and the interactions of 26RFa with its receptor which may contribute to the development of selective ligands of QRFPR that could prove useful in the treatment of feeding disorders.



Liste des abréviations

aa	Acide aminé
AC	Adenylyl cyclase
ACTH	<i>Adrenocorticotropin hormone</i> , hormone corticotrope
AKt	<i>Protein kinase B</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
AVPV	Noyau périvericulaire antéroventral
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
[Ca ²⁺] _i	Concentration intracellulaire de calcium
CCK	Cholécystokinine
CD	<i>Circular dichroism</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
C-PON	<i>C-terminal flanking peptide of NPY</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DβM	<i>Dopamine β-monooxygenase</i>
DBI	<i>Diazepam-binding inhibitor</i>
Dilps	<i>Drosophila insulin-like peptides</i>
DPC	Dodécylphosphocholine
ECL2	<i>Extracellular loop 2</i>
Eq	<i>Equivalent</i>
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
Ero1p	<i>Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1p</i>
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
FAD	Flavine adénosine dinucléotide
<i>Flp</i>	<i>FMRFamide-like peptides</i>
FSH	Hormone folliculostimulante
GABA _A	Récepteur ionotropique du GABA
GAP	<i>GnRH-associated peptide</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GH	<i>Growth hormone</i> , hormone de croissance
GnIH	<i>Gonadotropin-inhibitory hormone</i>
GnIH-RP-1	<i>GnIH-related peptide 1</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GOAT	<i>Ghrelin O-acyltransferase</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPR10 ^{-/-}	Invalidation du gène codant le GPR10
HEK293	<i>Human embryonic kidney 293</i>
HEPES	<i>N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]</i>
HHI	Hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique
HSL	<i>hormone-sensitive lipase</i>
ICL2	Intracellular loop 2
i.c.v.	Intracérébroventriculaire
i.t.	Intrathécale
i.v.	Intraveineuse
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
Leu-enk	Leucine-enképhaline

LH	Hormone lutéinisante
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MBOAT	<i>Membrane-bound O-acyltransferases</i>
Met-enk	Méthionine-enképhaline
MST	Microscale thermophoresis
NARC	<i>Neural apoptosis-regulated convertase</i>
NPAF	Neuropeptide AF
NPFF	Neuropeptide FF
NPF(s)	Neuropeptide(s) F
NPY	Neuropeptide Y
ODN	Octadécaneuropeptide
OXR	<i>Orexin receptor</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PAM	<i>Peptidylglycine α-amidating monooxygenase</i>
PAL	<i>Peptidyl-α-hydroxyglycine α-amidating lyase</i>
PAPS	3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PC(s)	<i>Prohormone convertase(s)</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin-kexin isozyme 9</i>
PDE3B	<i>Phosphodiesterase 3B</i>
PDI	<i>Protein disulfide isomerase</i>
PHM	<i>Peptidylglycine α-hydroxylating monooxygenase</i>
PHM-27	Peptide histidine méthionine 27
PKC	protéine kinase C
POMC	Pro-opiomélanocortine
PrRP	<i>Prolacin-releasing peptide</i>
PS	Peptide signal
PTX	Toxine pertussique
RCPG(s)	Récepteur(s) couplé(s) aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RFRP(s)	<i>RFamide-related peptide(s)</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R-RFa	<i>Rana</i> -RFamide
RSA	Relations structure-activité
S1P	<i>Site-1 protease</i>
SCTR	Récepteur de la sécrétine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SK(S)	Sulfakinine (s)
SKI-1	<i>Subtilisin-kexin-isozyme</i>
SNC	Système nerveux central
sNPF(s)	<i>Short neuropeptide(s) F</i>
SPC(s)	<i>Subtilisin-like proprotein convertase(s)</i>
SRC	<i>Sarcoma kinase</i>
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
SST-A	<i>Somatostatine A</i>
STT	<i>Somatostatine</i>
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
TM	Domaine transmembranaire
TPST	<i>Tyrosylprotein sulfotransferase</i>
TRAM	<i>Translocating chain-associated membrane</i>
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
UII	Urotensine II

VIP *Vasoactive intestinal polypeptide*



Liste des Figures et des Tableaux

• Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique des 3 catégories de précurseurs de neuropeptides	26
Figure 2 : Représentation schématique de la translocation des précurseurs des neuropeptides dans le réticulum endoplasmique.....	28
Figure 3 : Schéma récapitulatif de la biosynthèse des neuropeptides	29
Figure 4 : Mécanisme de la formation de ponts disulfure.	31
Figure 5 : Mécanisme réactionnel de la sulfatation.	34
Figure 6 : Représentation schématique de la maturation post-traductionnelle tissu-spécifique de la POMC, dans le lobe antérieur et le lobe intermédiaire de l'hypophyse	37
Figure 7 : Représentation schématique (A) de la structure de l'ARNm de la PAM et de la prépro-PAM humaine et (B) du mécanisme réactionnel de l'amidation	38
Figure 8 : Représentation schématique (A) du précurseur humain du NPFF et NPAF et (B) alignement de séquences des peptides RFamide produits à partir du précurseur du NPFF et NPAF chez l'homme et quelques mammifères.....	47
Figure 9 : Structure de quelques ligands peptidiques des récepteurs NPFF-1 et NPFF-2.....	50
Figure 10 : Structure de quelques ligands peptidiques des récepteurs NPFF-1 et NPFF-2.....	49
Figure 11 : Structure de quelques ligands non-peptidiques des récepteurs NPFF-1 et NPFF-2..	53
Figure 12 : Représentation schématique (A) du précurseur humain du PrRP et (B) alignement de séquences du PrRP..	54
Figure 13 : Représentation schématique du couplage du GPR10, récepteur du PrRP.	55
Figure 14 : Alignement de séquences du précurseur du RFPR-1/3 et de la GnIH chez l'homme et quelques vertébrés.....	58
Figure 15 : Schéma récapitulatif du rôle des RFRP-1/3 et de la GnIH sur l'axe hypothalamo-hypophysogonadotrope.	60
Figure 16 : Représentation schématique (A) du précurseur humain du KISS-1 et (B) alignement de séquences des métastines.....	62
Figure 17 : Représentation schématique du couplage du GPR54, récepteur du kisspeptine.....	64
Figure 18 : Représentation schématique des mutations du GPR54 décrites chez des patients.	65
Figure 19 : Schéma récapitulatif du rôle des KPs sur l'axe hypothalamo-hypophysogonadotrope.....	66

Figure 20 : Structure de quelques ligands peptidiques et non-peptidiques du récepteur de la métastine.	68
Figure 21 : Représentation schématique du précurseur humain du 26RFa.	75
Figure 22 : Structure secondaire du 26RFa humain obtenue par modélisation moléculaire sous contraintes RMN dans le méthanol.	77
Figure 23 : Localisation neuroanatomique et hypophysaire du 26RFa et des deux sous-types du GPR103 chez le rat.	78
Figure 24 : Représentation schématique du QRFPR humain.	80
Figure 25 : Représentation tridimensionnelle (A) du récepteur β_2 adrénergique et (B) du modèle 3D de QRFPR.	82
Figure 26 : Représentation schématique du couplage du QRFPR dans différentes cellules, après son activation par le 26RFa et/ou 43RFa.	84
Figure 27 : Représentation schématique du mécanisme d'action du 26RFa dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire.	89
Figure 28 : Structure chimique des trois ligands peptidiques et pseudopeptidique du QRFPR.	96
Figure 29 : Structure chimique de quelques ligands non-peptidiques de première génération du QRFPR.	98
Figure 30 : Structure chimique de quelques ligands non-peptidiques de seconde génération du QRFPR.	98
Figure 31 : Structure chimique d'un antagoniste non-peptidique du QRFPR développés par Banyu Pharmaceutical basé sur un squelette 2-aryl-imidazoline.	99
Figure 32 : Structure chimique de deux antagonistes non-peptidiques du QRFPR d'AstraZeneca basé sur un squelette Pyrrolo[2,3-c]pyridine.	99
Figure 33 : Effet des analogues peptidiques et pseudopeptidique du 26RFa ₍₂₀₋₂₆₎ sur la prise alimentaire.	178
Figure 34 : Effet d'une administration i.p. de quelques analogues peptidiques du 26RFa au cours d'un test de tolérance à l'insuline (ITT).	180
Figure 35 : Prédiction de l'hélicité par AGADIR.	182
Figure 36 : Spectres de dichroïsme circulaire du (A) fragment <i>h</i> QRFPR ₍₁₈₀₋₁₉₉₎ et (B) [Ser ^{200,201}] <i>h</i> QRFPR ₍₁₈₀₋₂₁₂₎ dans différents solvants.	183
Figure 37 : Analyse de l'interaction entre le 26RFa et l'ECL2 du <i>h</i> QRFPR par MST.	184
Figure 38 : Les modifications chimiques apportées sur la chaîne latérale de l'Arg ²⁵ du 26RFa ₍₂₀₋₂₆₎ . n = 2 ; Nar-Arg, n = 3 ; Arg, n = 4 ; homo-Arg.	201
Figure 39 : Représentation des activités agoniste et antagoniste des 32 analogues du 26RFa synthétisés dans cette étude en fonction de leur masse moléculaire.	203

• Liste des Tableaux

Tableau 1 : Gènes et séquences des peptides RFamide connus chez l'homme	46
Tableau 2 : Séquence du 26RFa chez l'homme, quelques vertébrés et un céphalochordé amphioxus	72
Tableau 3 : Pourcentage d'identité de séquence du 26RFa entre quelques vertébrés et d'un céphalochordé amphioxus.	73



Introduction



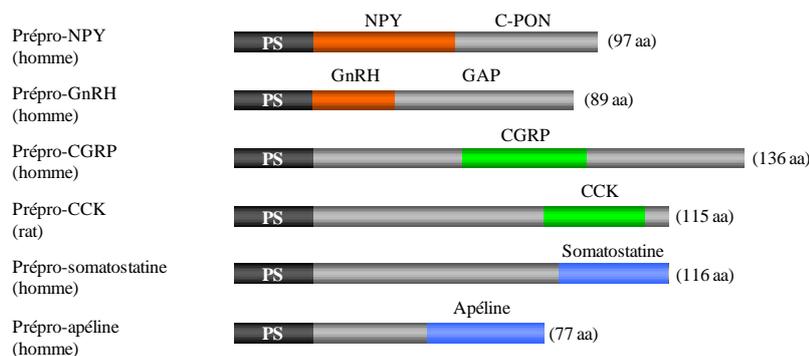
Chapitre 1 : Précurseurs de neuropeptides

1.1 Classification et biosynthèse

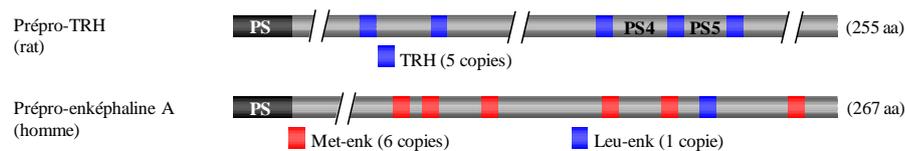
A ce jour, il existe une centaine de neuropeptides biologiquement actifs identifiés, de taille variable allant de 3 acides aminés (aa) pour la *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) à une cinquantaine selon les espèces pour la métastine. Tous les neuropeptides sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs de haut poids moléculaire au niveau du réticulum endoplasmique (RE). En fonction de leur organisation structurale, les précurseurs ou prépro-neuropeptides peuvent être classés en trois catégories (Douglass et al., 1984; Itoh et al., 1983). La première est constituée des précurseurs mono-fonctionnels possédant une seule séquence biologiquement active flanquée d'un ou deux fragment(s) peptidique(s), appelé(s) peptide(s) cryptique(s) ou encore séquence(s) de connexion, plus ou moins longs, dont le rôle est généralement inconnu. Au sein de ces précurseurs, le peptide bioactif peut être localisé soit à l'extrémité N-terminale comme dans le cas du prépro-neuropeptide Y (NPY) (Minth et al., 1984), ou de la prépro-*gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) (Seeburg and Adelman, 1984), précédant respectivement les séquences cryptiques *C-terminal flanking peptide of NPY* (C-PON) et *GnRH-associated peptide* (GAP); soit en position intermédiaire comme dans le prépro-*calcitonin gene-related peptide* (CGRP) (Amara et al., 1982) ou la prépro-cholécystokinine (CCK) (Deschenes et al., 1984); soit enfin à l'extrémité C-terminale comme dans le précurseur de la somatostatine (SST) (Shen et al., 1982) ou de l'apéline (Tatemoto et al., 1998) (Figure 1A). La seconde catégorie comprend les précurseurs mono-fonctionnels qui présentent plusieurs copies du même peptide ou de peptides de structure très similaire. A titre d'exemple, on peut citer le précurseur de la TRH qui, chez le rat, possède cinq répliqués du motif QHPG (Lechan et al., 1986) ou encore celui de l'enképhaline A, dans lequel on ne dénombre pas moins de sept peptides étroitement apparentés, à savoir quatre copies de méthionine-enképhaline (Met-enk), un motif de leucine-enképhaline (Leu-enk) et deux séquences de Met-enk étendues de deux ou trois résidus (Gubler et al., 1982) (Figure 1B). Cette répétition de peptides suggère que les gènes ancestraux de cette famille de précurseurs auraient subi plusieurs duplications intragéniques. Cette organisation structurale particulière conduit à une amplification du signal, une seule molécule de précurseur donne naissance à plusieurs copies du peptide actif, conférant ainsi un avantage sélectif à ces précurseurs (Sossin et al., 1989). Les régions intercalaires sont généralement riches en résidus acides, équilibrant de ce fait la nature basique des nombreux

sites de maturation (cf chapitre 1, § 1.2.5.). Le faible degré d'identité de séquence de ces éléments cryptiques plaide en faveur d'une absence d'activité biologique. Cependant, les résidus acides de ces séquences peuvent être nécessaires à la formation et au bon repliement de la protéine, comme rapporté pour le peptide de connexion du précurseur de l'insuline appelé peptide C (Landreh et al., 2014), ou au routage intracellulaire des hormones. Enfin, la troisième catégorie regroupe les précurseurs multifonctionnels susceptibles de générer plusieurs peptides aux activités biologiques distinctes. Le représentant de cette catégorie le mieux caractérisé est la pro-opiomélanocortine (POMC) dont la maturation peut produire, en fonction du tissu d'expression, différents peptides régulateurs dont les hormones corticotrope (ACTH) et mélanotropes (α -, β - et γ -MSH), ainsi que la β -endorphine (Nakanishi et al., 1979) (Figure 1C). Cette classification présente toutefois des limites. Tout d'abord, la classification des précurseurs dans l'une ou l'autre de ces catégories n'est pas toujours univoque. Par exemple, le pro-

A Précurseurs mono-fonctionnels



B Précurseurs mono-fonctionnels à plusieurs copies



C Précurseurs multifonctionnels

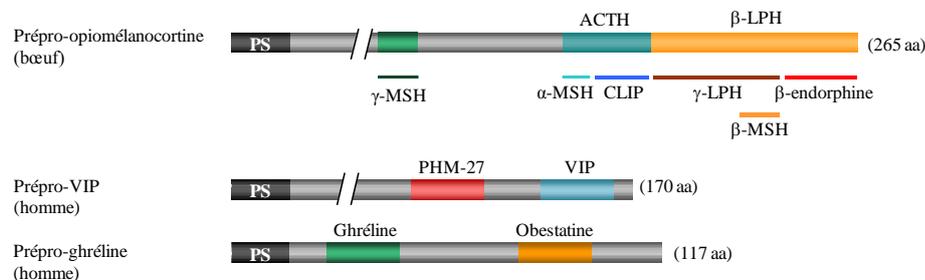


Figure 1 : Représentation schématique des 3 catégories de précurseurs de neuropeptides. CLIP, *corticotrophin-like intermediate lobe peptide*; LPH, *lipotropic hormone*; PHM-27, peptide histidine méthionine; PS, peptide signal; VIP, *vasoactive intestinal polypeptide*.

vasoactive intestinal polypeptide (VIP), qui est parfois classé parmi les précurseurs multifonctionnels, peut aussi être considéré comme un précurseur du second groupe étant donné que les deux peptides qui en sont issus, le VIP et le peptide histidine méthionine (PHM-27), sont fortement apparentés en termes de séquence, de type d'activité et de sites de liaison (Bodner et al., 1985; Itoh et al., 1983). De plus, il n'est pas rare qu'une séquence cryptique d'un précurseur initialement considéré comme mono-fonctionnel s'avère ultérieurement posséder une activité biologique. C'est le cas du peptide de connexion du précurseur de la neuroméline U, le *neuropeptide U precursor-related peptide*, qui stimule l'activité locomotrice (Ensho et al., 2017) et de deux peptides cryptiques de la prépro-TRH, le PS4 qui potentialise l'activité de la TRH sur la libération de l'hormone thyroïdienne (Bulant et al., 1990; Roussel et al., 1991) et sur la sécrétion d'acide gastrique (Yang and Taché, 1994), et le PS5 qui inhibe l'action de la TRH sur la sécrétion de l'ACTH (Redei et al., 1995a, 1995b) et d'hormone de croissance (GH) (Harvey and Cogburn, 1996). De même, il a été montré que le précurseur de la ghréline (Kojima et al., 1999) génère un deuxième peptide nommé obéstatine en raison de ses effets opposés à ceux de la ghréline sur la prise alimentaire (Zhang et al., 2005). Même si l'effet anorexigène de l'obéstatine est aujourd'hui contesté (Chartrel et al., 2007; Zhang et al., 2008), il semblerait que ce peptide soit capable d'inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose *in vivo* et *in vitro* sur des îlots de Langerhans en culture chez le rat (Ren et al., 2008). On peut également citer le GAP, situé dans la région C-terminale du précurseur de la GnRH (Seeburg and Adelman, 1984), qui stimulerait la sécrétion de gonadotropines (Yu et al., 1988, 1989) et inhiberait la sécrétion de prolactine (Nikolics et al., 1985; Vacher et al., 1991; Yu et al., 1988, 1989), effets qui restent néanmoins controversés (Blake et al., 1993; Thomas et al., 1988).

L'analyse de la structure des précurseurs polypeptidiques montre que ces derniers possèdent plusieurs caractéristiques structurales communes. Les prépro-neuropeptides présentent à leur extrémité N-terminale un peptide signal (PS), séquence hydrophobe composée d'environ une vingtaine d'aa (von Heijne, 1986), qui permet la translocation du polypeptide naissant vers la lumière du RE rugueux (RER) (Blobel and Dobberstein, 1975) (Figure 2). Il semble que cette séquence soit suffisante pour acheminer une protéine au RE. En effet, des mutations du PS bloquent le transport des protéines sécrétées vers la lumière du RE (Allison and Young, 1989; Ibrahimi and Gentz, 1987). Lors de la traduction de l'ARNm du précurseur, le PS constitue une séquence d'adressage reconnue par la *signal recognition particle* (SRP), qui est une ribonucléoprotéine cytosolique formée de 6 chaînes polypeptidiques et d'une molécule d'ARN, l'ARN 7S. La SRP s'unit à la séquence signal du polypeptide naissant, alors constituée d'une

soixantaine d'aa, et interagit avec le ribosome, produisant un arrêt de l'élongation (Walter et al., 1984) (Figure 2, étape 1). Le complexe ternaire SRP-peptide-ribosome se fixe ensuite au récepteur de la SRP, qui est ancré dans la membrane du réticulum, permettant l'interaction du ribosome avec un canal, le translocon, formé de protéines membranaires, telles que la Sec61 et la protéine *translocating chain-associated membrane* (TRAM) (Gilmore, 1993; Simon and Blobel, 1991; Walter and Lingappa, 1986) (Figure 2, étape 2). La libération de la SRP permet la reprise de la synthèse du précurseur et sa translocation dans la lumière du RE (Figure 2, étape 3). Une fois passé du côté luminal, le PS est immédiatement clivé par une *signal peptidase* avant même la fin de l'élongation (Walter et al., 1984) (Figure 2, étape 4).

Les pro-neuropeptides ainsi formés vont subir diverses modifications post-traductionnelles qui vont se dérouler séquentiellement pendant leur transfert du RE au Golgi puis dans les vésicules de sécrétion, pour donner naissance aux peptides biologiquement actifs (Figure 3).

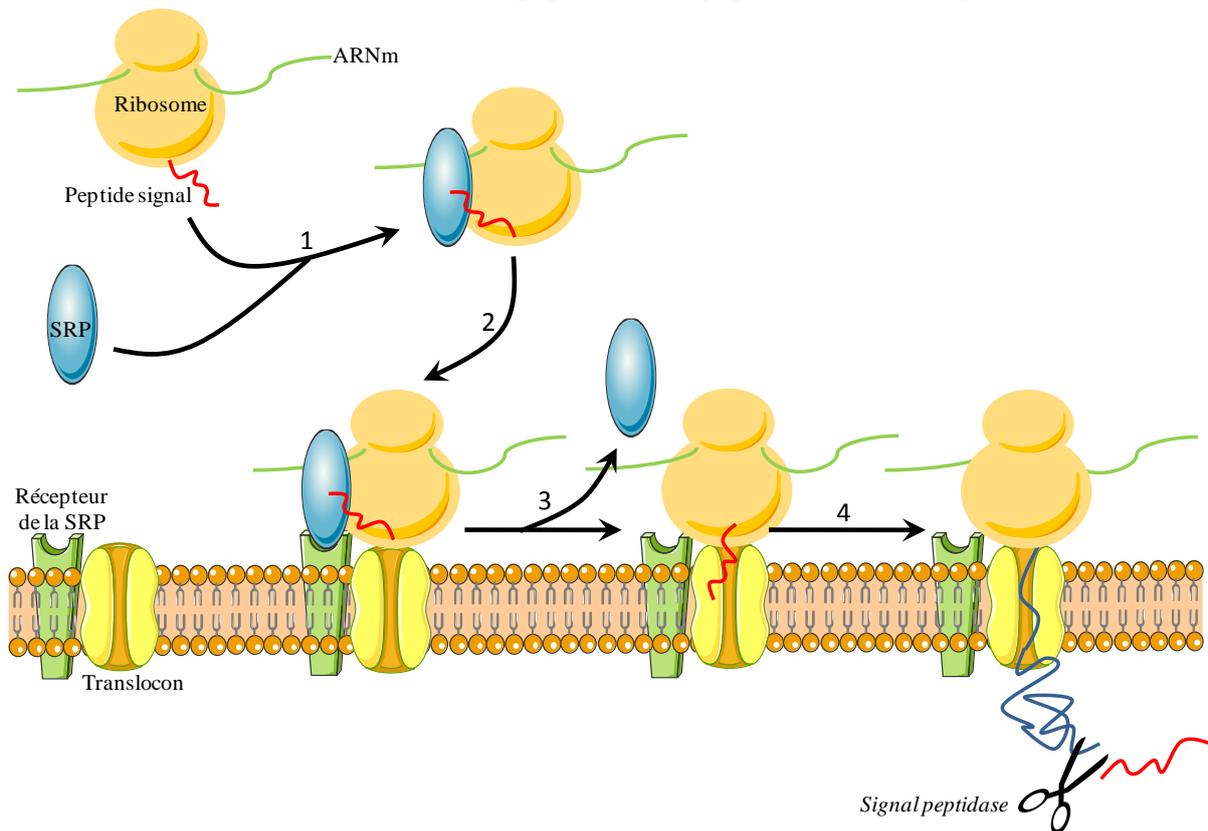


Figure 2 : Représentation schématique de la translocation des précurseurs des neuropeptides dans le réticulum endoplasmique. (1) Reconnaissance du peptide signal (en rouge) par la SRP et formation du complexe ternaire SRP-peptide signal-ribosome. (2) Interaction du complexe avec le récepteur de la SRP et du ribosome avec le translocon. (3) Libération de la SRP et translocation du polypeptide au travers du translocon dans la lumière du RE. (4) Clivage du peptide signal par une *signal peptidase*.

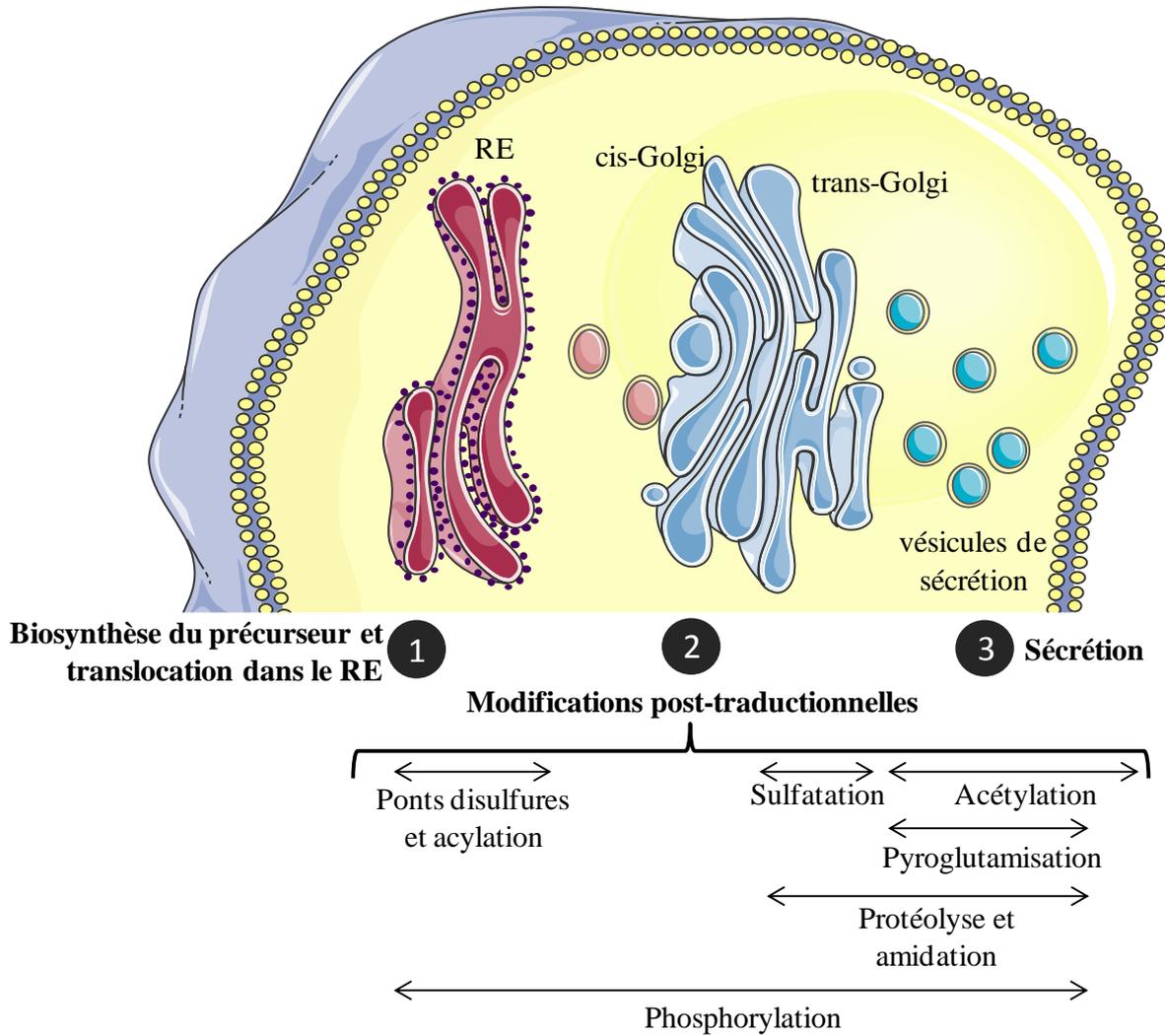


Figure 3: Schéma récapitulatif de la biosynthèse des neuropeptides. (1) Le prépro-neuropeptide produit par les ribosomes est transloqué dans le réticulum endoplasmique (RE). (2) Il subit alors des modifications post-traductionnelles : la formation de ponts disulfure et l'acylation dans le RE; la sulfatation dans le trans-Golgi; la protéolyse et l'amidation dans le trans-Golgi et les vésicules de sécrétion; la pyroglutamisation dans les vésicules de sécrétion; l'acétylation dans les granules de sécrétion ou lors de la libération du peptide; et la phosphorylation qui peut se dérouler dans tous les compartiments, du RE aux vésicules de sécrétion. (3) Le peptide biologiquement actif peut alors être sécrété.

1.2 Modifications post-traductionnelles

1.2.1 Formations de ponts disulfure

La formation des ponts disulfure est un phénomène précoce qui se déroule dans la lumière du RE (Figure 3). Elle nécessite la présence d'une enzyme, la *protein disulfide isomerase* (PDI) qui est capable non seulement de catalyser cette réaction (Lyles and Gilbert, 1991) mais également d'isomériser les ponts néo-formés (Wilkinson and Gilbert, 2004). La PDI, qui appartient à la famille des thiorédoxines, présente quatre domaines fonctionnels *i.e.* deux sites actifs de type Cys-aa-aa-Cys oxydés, impliqués dans la réaction d'échange thiol-disulfure, homologues des domaines oxydo-réducteurs de la thiorédoxine, et deux domaines impliqués dans la liaison avec le précurseur (Darby et al., 1996, 1998; Ferrari and Söling, 1999; Hillson et al., 1984). La PDI est l'une des protéines les plus abondantes du RE (environ 0,4% des protéines totales) de par son extraordinaire flexibilité, elle interagit avec une très large variété de substrats (Freedman et al., 2017). Elle est localisée dans la lumière du RE à l'intérieur duquel elle est maintenue par le signal de rétention à son extrémité C-terminale Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) (Freedman et al., 1994; Klappa et al., 1995; Munro and Pelham, 1987).

Une flavoenzyme membranaire indispensable à l'oxydation des pro-neuropeptides, l'*endoplasmic reticulum oxidoreductin 1p* (Ero1p) a été ensuite identifiée chez les eucaryotes (Frand and Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998). L'inactivation du gène codant Ero1p réduit le pouvoir oxydant des cellules et augmente la sensibilité des protéines aux agents réducteurs (Pollard et al., 1998). Ainsi, dans le mutant Ero1-1, la PDI normalement présente sous forme oxydée est produite sous sa forme réduite (Frand and Kaiser, 1999). De même, les protéines normalement sécrétées sous forme oxydée sont maintenues dans le RE à l'état réduit (Frand and Kaiser, 1998, 1999). La mise en évidence d'un complexe Ero1p-PDI ainsi que l'incapacité de Ero1p à réaliser seule l'oxydation des précurseurs (Frand and Kaiser, 1999) suggèrent que ces deux protéines agissent en synergie. Ero1p, présente sur la face luminale du RE, va subir une attaque nucléophile d'un thiolate d'une cystéine du site actif de la PDI pour former un disulfure mixte qui subit alors une attaque nucléophile intramoléculaire de la part du second thiolate du site actif de la PDI (Frand et al., 2000) (Figure 4A). La PDI, alors à l'état oxydé, va permettre l'appariement des cystéines au précurseur transloqué dans le RE en cystine (Figure 4B). Le mécanisme de ré-oxydation de Ero1p nécessite le cofacteur flavine adénosine dinucléotide (FAD) et une molécule de dioxygène (produisant du peroxyde d'hydrogène). Ero1 est constituée en réalité de 2 paires de cystéines, la première appelée « *shuttle* » cystéines qui

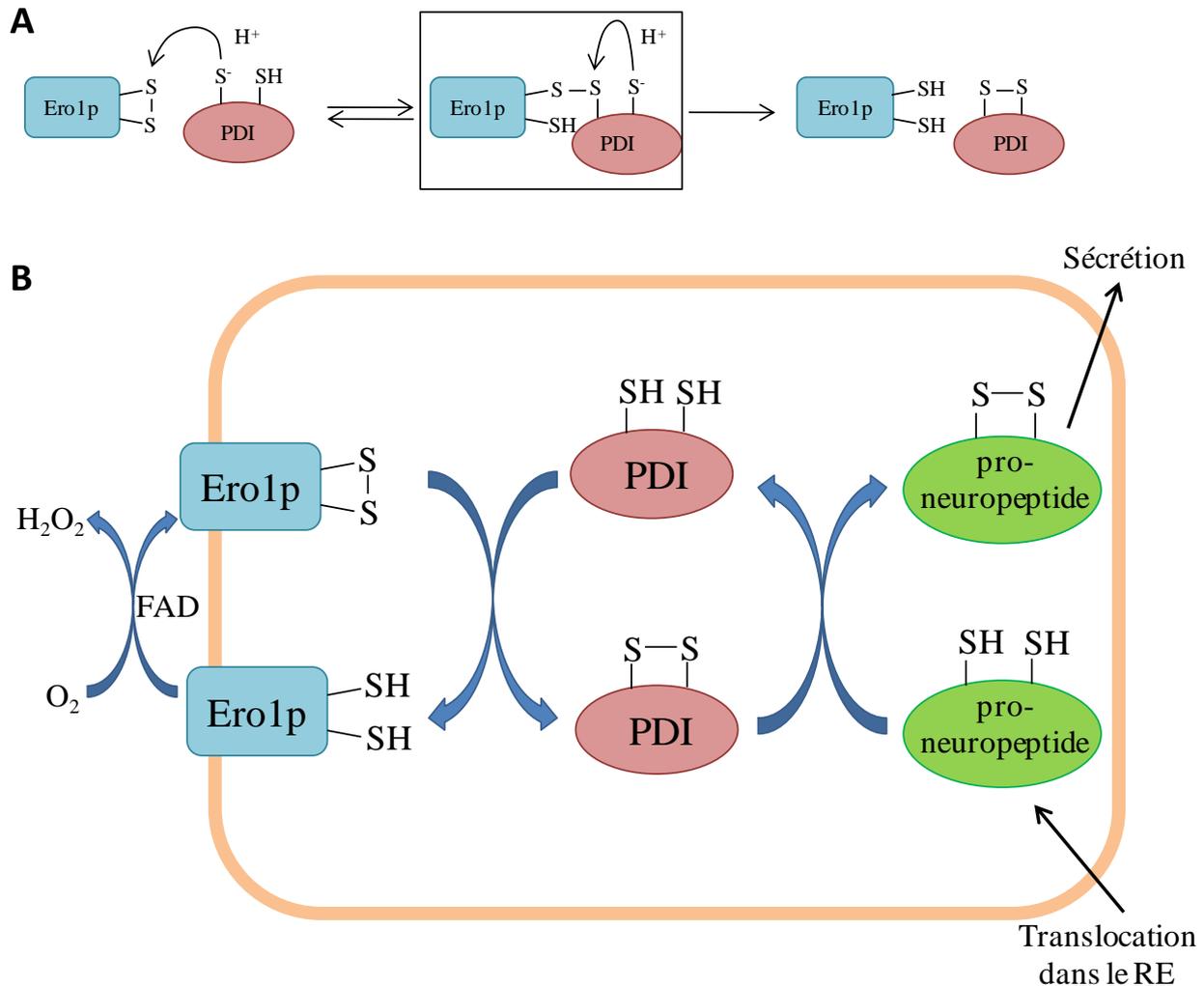


Figure 4: Mécanisme de la formation de ponts disulfure. (A) Réaction d'échange thiol-disulfure entre Ero1p et PDI, permettant l'oxydation de PDI. (B) Oxydation des pro-neuropeptides au travers d'une série d'échanges directs thiol-disulfure dans le RE entre Ero1p et PDI, puis entre PDI et le précurseur. La réoxydation de Ero1p nécessite du FAD et du dioxygène. Adapté de Frand et al., 2000.

est impliquée directement dans l'oxydation de PDI et la deuxième nommée cystéines du site actif qui ré-oxyde les *shuttle* cystéines réduites au travers d'un échange interne thiol-disulfure. Les cystéines du site actif sont ensuite ré-oxydées par le FAD et l' O_2 (Sevier and Kaiser, 2008). Lorsque l'appariement initial entre les différentes cystéines d'une protéine est inapproprié, l'isomérisation du substrat permet de rétablir les ponts disulfure corrects. Cette réaction se déroule en deux temps avec d'abord la réduction des ponts disulfure néo-formés puis leur réoxydation par la PDI avec l'appariement adéquat (Frand et al., 2000; Schwaller et al., 2003). Ce cycle réduction-réoxydation ferait intervenir soit le glutathion soit une deuxième molécule de PDI associée à la membrane du RE (Frand et al., 2000).

Les ponts disulfures, qui jouent un rôle crucial dans la conformation des neuropeptides matures, sont le plus souvent essentiels à leur activité biologique. Ainsi, la rupture du pont disulfure de

l'arginine-vasopressine (Schally et al., 1964), de la SST-14 (Rivier et al., 1975), de l'*atrial natriuretic peptide* (ANP) (Misono et al., 1984) ou de l'urotensine II (UII) (Labarrère et al., 2003) conduit à des peptides totalement inactifs. Par ailleurs, dans les granules de sécrétion, la forme réduite de SST-14 présente des auto-assemblages fibrillaires de plus grande résistance à la dénaturation que ceux formés par sa forme cyclique suggérant un impact significatif du pont disulfure sur le stockage et la libération de monomères de SST-14 (Anoop et al., 2014).

1.2.2 Acylation des chaînes latérales

L'acylation est une modification post-traductionnelle relativement fréquente au niveau des protéines membranaires et des protéines sécrétées mais qui ne concerne que de manière exceptionnelle les neuropeptides (Sachon et al., 2007). Un exemple bien connu à ce jour est celui de la ghréline qui est octanoylée au niveau de l'hydroxyle du résidu Ser³ (Kojima et al., 1999). L'enzyme responsable de cette octanoylation, la *ghrelin O-acyltransferase* (GOAT) appartient à la famille des *membrane-bound O-acyltransferases* (MBOAT) (Gutierrez et al., 2008) localisées dans le RE (Yang et al., 2008b). La forme octanoylée de la ghréline est la forme active majoritaire, et l'acylation semble nécessaire à la liaison et l'activation du récepteur GHS-R1a (Matsumoto et al., 2001). Il a cependant été montré que d'autres formes de ghréline sont générées *in vivo*, et notamment la forme des-acyl ghréline qui est présente dans le plasma et le tractus gastro-intestinal chez l'homme (Bang et al., 2007; Hosoda et al., 2003). La des-acyl ghréline mime certains effets de la ghréline notamment sur la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH), la prolifération cellulaire, la production d'ostéoblaste, mais exerce parfois des actions opposées en particulier sur le métabolisme du glucose et la sécrétion de la GH (Kojima and Kangawa, 2005; Soares and Leite-Moreira, 2008), ce qui laisse penser qu'elle pourrait agir *via* un ou des récepteur(s) encore non caractérisé(s) (Soares and Leite-Moreira, 2008).

1.2.3 Phosphorylation

La phosphorylation des précurseurs sur un résidu sérine et/ou thréonine au niveau de séquences consensus de type Ser/Thr-aa-Asp/Glu est une modification post-traductionnelle dont les conséquences physiologiques restent énigmatiques (Pinna et al., 1980). Néanmoins, il a été montré que la phosphorylation de la Ser⁹⁶ limite le clivage de la pro-gastrine au niveau du doublet basique Arg^{94/95} en peptides biologiquement actifs (Bishop et al., 1998; Varro et al., 1988). Plus récemment, il a été montré que dans certaines cellules gliales de la rétine, le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) est sécrété sous une forme phosphorylée laquelle présente

une affinité plus importante pour le récepteur ionotropique de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_A) que la forme non-phosphorylée (Qian et al., 2008). A l'inverse, la bisphosphorylation de fragment 33-50 du DBI réduit la puissance de son effet anorexigène (Gach et al., 2015). Enfin, on ignore toujours dans quel compartiment endoplasmique s'effectue la phosphorylation, étant donné que les protéines kinases qui la catalysent ont été mises en évidence à la fois dans le RE, l'appareil de Golgi et les granules de sécrétion (Perone and Castro, 1997) (Figure 3).

1.2.4 Sulfatation

La sulfatation de résidus tyrosine s'effectue par le transfert d'un groupement sulfate, à partir du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) au groupement phénolique de la tyrosine situé à proximité de résidu acide, en présence d'une *tyrosylprotein sulfotransferase* (TPST) (Bundgaard et al., 1997; Huttner, 1988; Niehrs and Huttner, 1990) (Figure 5). La TPST est une enzyme membranaire localisée dans la lumière du trans-Golgi (Baeuerle and Huttner, 1987; Rosa et al., 1992). Pour la majorité des protéines de la voie régulée, la signification fonctionnelle de la sulfatation n'est pas encore établie. Cependant, tout comme la phosphorylation, il a été montré que la sulfatation a un rôle régulateur dans le processus de maturation des peptides, comme dans le cas des précurseurs de la gastrine et de la CCK, dont la sulfatation facilite la maturation et la sécrétion des peptides (Beinfeld, 1994; Bundgaard et al., 1995). En effet, l'analyse chromatographique d'extraits corticaux de porc révèle que 96,4% de la CCK est *O*-sulfatée (Agersnap et al., 2016). Cette modification post-traductionnelle est nécessaire à l'activité biologique de la CCK-8 et augmente l'interaction du peptide à son récepteur (Gigoux et al., 1998, 1999; Jensen et al., 1982).

1.2.5 Protéolyse

Dans les derniers compartiments du trans-Golgi et dans les granules de sécrétion, tous les pro-neuropeptides sont sélectivement clivés par des endoprotéases désignées sous le terme de *prohormone convertases* (PCs), également appelées *subtilisin-like proprotein convertases* (SPCs) en raison de leur homologie avec la famille des subtilisines, sérines-protéases bactériennes, et les kexines de levure (Siezen and Leunissen, 1997). Au sein du précurseur, les séquences des peptides biologiquement actifs sont généralement flanquées par des aa basiques, le plus souvent présents sous forme de doublets, qui constituent des sites de clivage pour la plupart des PCs. Sept PCs ont été identifiées chez les mammifères : la PC1/PC3 (ou SPC3) (Seidah et al., 1990, 1991; Smeekens et al., 1991), la PC2 (ou SPC2) (Seidah et al., 1990; Smeekens and Steiner, 1990), la furine (ou PACE) (van den Ouweland et al., 1990; Roebroek

et al., 1986; van de Ven et al., 1990), la PACE4 (Kiefer et al., 1991; Seidah et al., 1991), la PC4 (Nakayama et al., 1992; Seidah et al., 1992), la PC5/PC6 (Lusson et al., 1993) et la PC7 (Seidah et al., 1996; Tsuji et al., 1994). Deux autres PCs découvertes plus récemment ne requièrent pas de résidus basiques au niveau du site de clivage : la *subtilisin-kexin-isozyme* (SKI-1) (Seidah et al., 1999), appelée également *site-1 protease* (S1P), et la *neural apoptosis-regulated convertase* (NARC-1) (Seidah et al., 2003), aussi nommée *proprotein convertase subtilisin-kexin isozyme* (PCSK9).

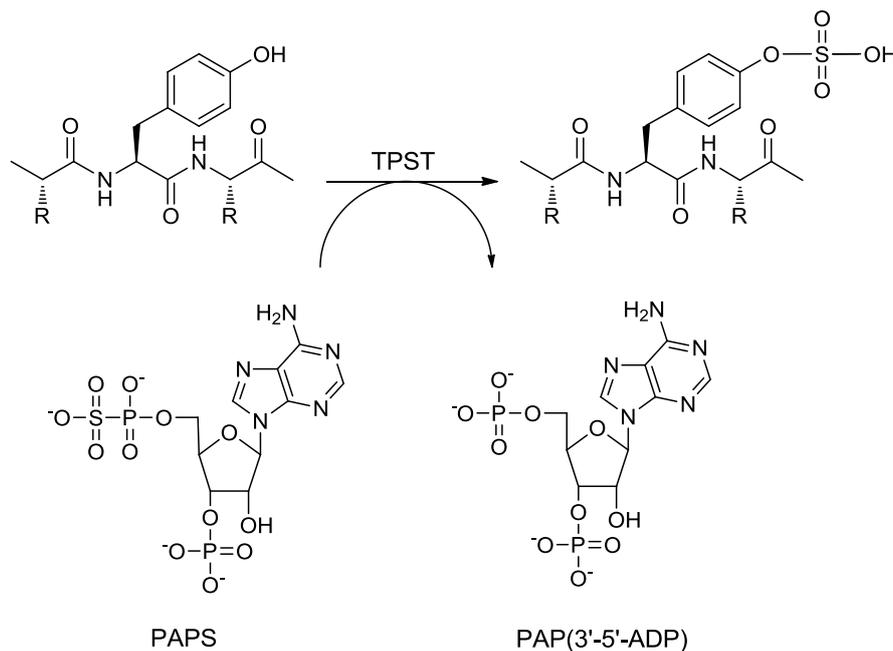


Figure 5 : Mécanisme réactionnel de la sulfatation. Cette réaction fait intervenir la *tyrosylprotein sulfotransferase* (TPST) qui catalyse le transfert d'un SO₃ sur le groupement phénolique d'une tyrosine à partir de 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS). Adapté de Seibert et al., 2007.

La comparaison des séquences des précurseurs au niveau des sites de protéolyse a permis de définir quelques règles relatives à la spécificité de clivage de ces enzymes (Bloomquist et al., 1991; Furuta et al., 1997; Seidah et al., 2008; Vishnuvardhan and Beinfeld, 2000). Dans la grande majorité des cas, les sept premières PCs clivent les précurseurs peptidiques à l'extrémité C-terminale du motif (Arg/Lys)-(aa)_n-(Lys/Arg)-Arg, où n = 0, 2, 4 ou 6, et où aa peut être un résidu quelconque excepté une cystéine et dans de rares cas une proline (Seidah and Chrétien, 1999; Seidah et al., 2008). Outre les clivages au niveau de doublets basiques, les PCs peuvent également réaliser des coupures en position C-terminale d'une arginine isolée, comme dans le cas de la pro-SST (Galanopoulou et al., 1995a, 1995b), ou plus exceptionnellement au niveau d'une lysine seule pour la pro-CCK (Rehfeld, 2006). La convertase SKI-1/S1P clive ses

substrats, notamment le précurseur du *pro-brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), après la séquence consensus (Arg/Lys)-aa-(aa hydrophobe)-(Leu/Thr) (Elagoz et al., 2002).

Les PC1/3 et PC2, principalement présentes dans les granules de sécrétion de la voie régulée dans les cellules neuronales et endocrines, sont impliquées dans le processus de maturation de nombreuses prohormones (Seidah, 2011). A l'inverse, la PC4, localisée uniquement dans les cellules germinales, est spécifique des protéines impliquées dans la fonction reproductrice. La furine et la PC7, exprimées de façon ubiquiste, assurent le clivage de nombreux précurseurs sécrétés par voie constitutive tels que les facteurs de croissance, les récepteurs, les protéases et les molécules d'adhésion. Les convertases PC5 et PACE4 sont impliquées dans de nombreux processus, notamment, par leur adhésion à la membrane plasmique *via* leur domaine C-terminal riche en Cys, dans le clivage de protéines de la matrice extracellulaire et de molécules d'adhésion. SKI-1 est responsable des premières étapes d'activation de certains facteurs de transcription, comme ceux qui régulent la synthèse des lipides, la réponse au stress et le repliement des protéines de la matrice extracellulaire du cartilage (Seidah, 2011). Les convertases sont initialement synthétisées sous forme de zymogène inactif qui subit une autocatalyse dans le RE (pour toutes les PCs excepté la PC2) ou dans les granules de sécrétion immatures (dans le cas de la PC2), donnant par un second clivage des enzymes actives (Seidah et al., 2008). La PCSK9 s'autocatalyse après la séquence Val-Phe-Ala-Gln¹⁵² située dans son prosegment. Cependant, la PCSK9 reste étroitement liée au prosegment, qui empêche le second clivage, et donc est sécrétée sous la forme d'un hétérodimère inactif. A ce jour, le récepteur au *low density lipoproteins* (LDL) est la seule cible connue de PCSK9 qui induit une augmentation de la dégradation de ce récepteur, augmentant ainsi les taux plasmatiques de LDL circulant. Des mutations naturelles du gène de PCSK9 ont été retrouvées dans des cas d'hypercholestérolémie familiale (Benjannet et al., 2004; Seidah, 2009, 2016).

Tous les sites potentiels de clivage d'un précurseur donné ne sont pas utilisés et seul un nombre limité d'entre-eux sera effectivement reconnu par les PCs dans un contexte cellulaire donné. L'exemple de la POMC, qui contient 8 sites potentiels de clivage, illustre bien ce processus de protéolyse différentielle (Bicknell, 2008) (Figure 6). Ainsi, dans les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse, qui expriment uniquement PC1, seuls 4 parmi les 8 sites sont utilisés, aboutissant essentiellement à la formation de l'ACTH et de la β -LPH. Dans les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire, qui expriment PC1 et PC2, la maturation est complète : l'ACTH donne naissance à l' α -MSH ainsi qu'au CLIP ; la β -LPH est hydrolysée en γ -LPH et en β -endorphine ; et enfin le fragment N-terminal conduit à la γ -MSH.

Suite à l'action des PCs, les peptides néo-formés présentent des aa basiques (Arg ou Lys) à leur extrémité C-terminale. Deux carboxypeptidases peuvent exciser les résidus basiques C-terminaux des hormones et des neuropeptides : la carboxypeptidase E, aussi appelée carboxypeptidase H ou *enkephalin-convertase* (Fricker and Snyder, 1982) , et la carboxypeptidase D (Song and Fricker, 1995), deux métalloprotéases localisées respectivement dans les granules de sécrétion (Fricker, 1988) et dans le réseau trans-Golgien ou les granules de sécrétion immatures (Song and Fricker, 1996). A notre connaissance, seuls deux neuropeptides murins, l'octadécaneuropeptide (ODN) (Ferrero et al., 1986) et la cortistatine (de Lecea et al., 1996), présentent la particularité de conserver un résidu basique en position C-terminale, lysine en l'occurrence. La maturation de ces derniers peptides pourrait nécessiter l'intervention d'une endopeptidase de type trypsine, comme celle purifiée à partir de synaptosomes de rat qui clive la liaison Lys-Leu de la dynorphine (Sato et al., 1988), ou d'une enzyme spécifique comme celle responsable de l'hydrolyse de la liaison Lys-Asn de la CCK et de son fragment 1-21 (Vioreck and Beinfeld, 1992). Une fois la protéolyse achevée, certains neuropeptides doivent subir d'autres modifications post-traductionnelles pour acquérir leur pleine activité biologique (Figure 3).

1.2.6 Amidation

L'amidation est une étape de maturation tardive qui concerne plus de la moitié des neuropeptides (Ozawa et al., 2007). Elle s'amorce dans le trans-Golgi et se poursuit jusque dans les granules de sécrétion (Schnabel et al., 1989). L'amidation est réalisée par une enzyme bifonctionnelle, la *peptidylglycine α -amidating monooxygenase* (PAM). Celle-ci possède deux domaines catalytiques, la *peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase* (PHM) et la *peptidyl- α -hydroxyglycine α -amidating lyase* (PAL), qui agissent de façon séquentielle pour produire un peptide α -amidé à partir d'une glycine en position C-terminale du précurseur ou d'un peptide déjà mûr (Bradbury et al., 1982; Eipper and Mains, 1988; Eipper et al., 1991, 1992a; Perkins et al., 1990). La PAM est caractérisée par son large éventail de substrats puisque chacun des 20 aa naturels, y compris la Gly, est représenté en C-terminal des différents peptides α -amidés connus, avec cependant une prédominance des résidus Phe et Tyr (Bradbury and Smyth, 1983; De et al., 2006). Chez les vertébrés, la PHM et la PAL sont produites à partir d'un seul et même gène, sujet à des épissages alternatifs tissu-spécifiques, aboutissant à sept isoformes chez le rat (Eipper et al., 1992b) et quatre isoformes chez l'homme (Vos et al., 1995) (Figure 7A).

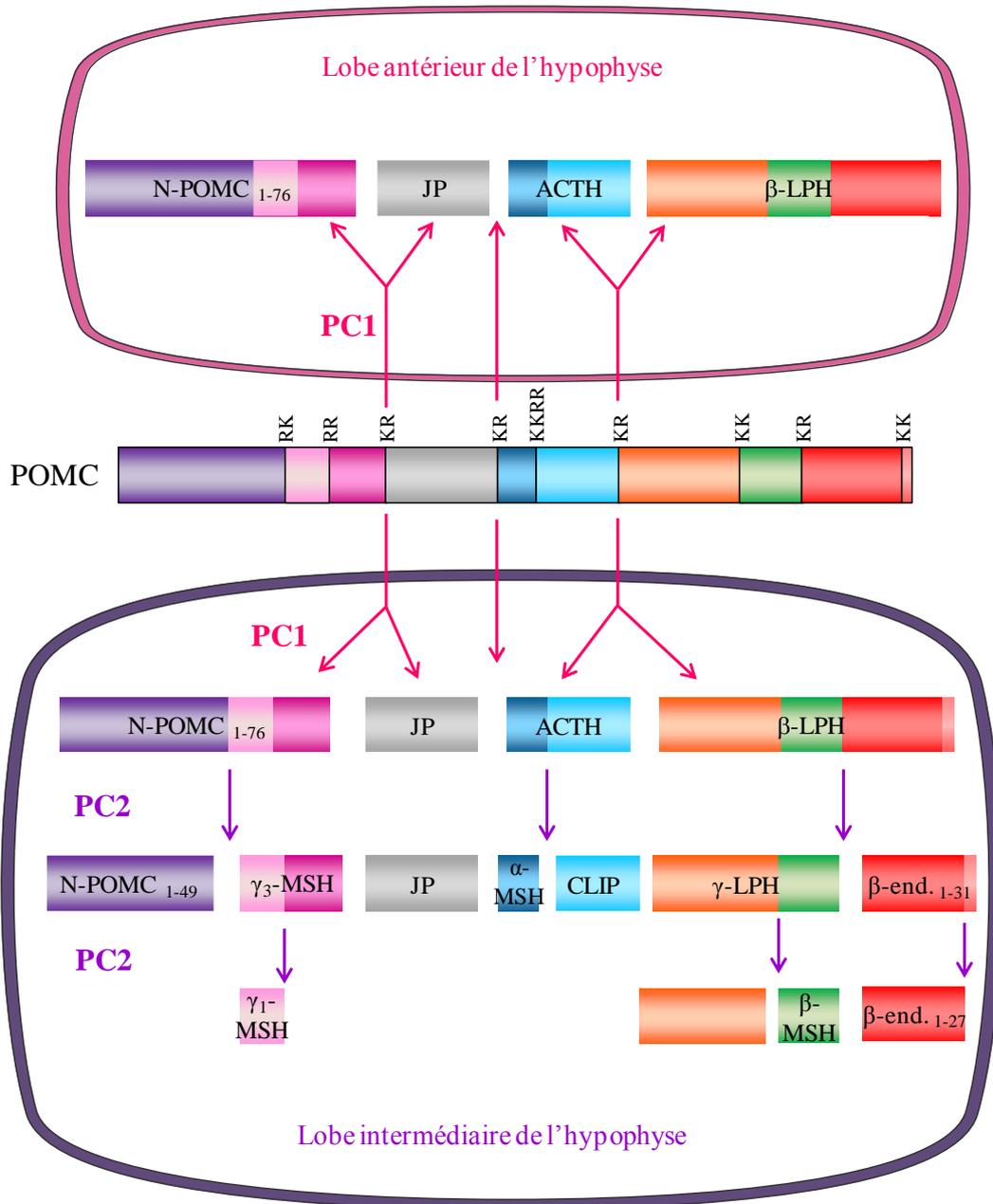


Figure 6: Représentation schématique de la maturation post-traductionnelle tissu-spécifique de la POMC, dans le lobe antérieur et le lobe intermédiaire de l'hypophyse. Seuls les aa basiques impliqués dans le clivage de la POMC sont représentés. Les flèches représentent le clivage par les *prohormone convertases* PC1 et PC2. CLIP, *corticotrophin-like intermediate lobe peptide*; JP, *joining peptide*; LPH, *lipotropic hormone*; N-POMC, *N-terminal peptide of POMC*; β-end, β-endorphine. Modifié d'après Bicknell, 2008.

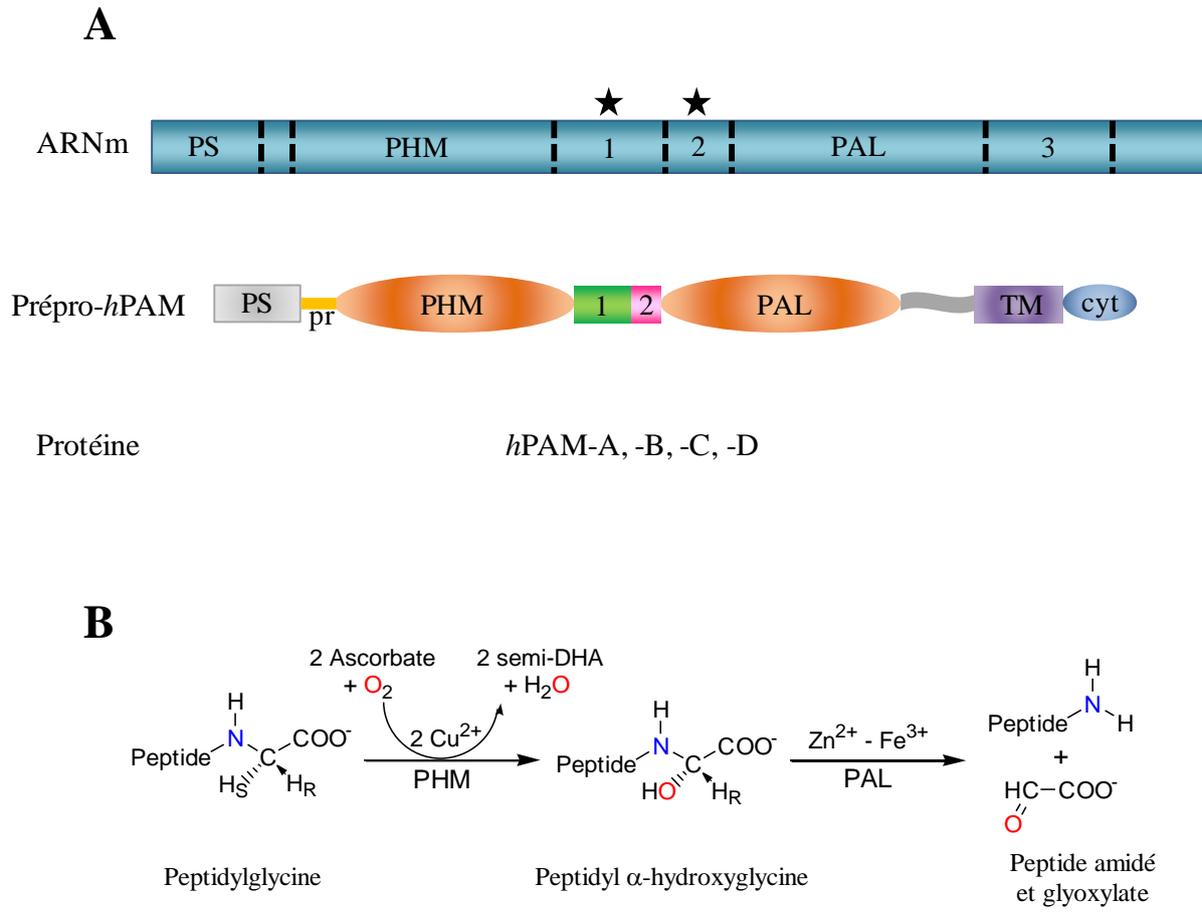


Figure 7: Représentation schématique (A) de la structure de l'ARNm de la PAM et de la prépro-PAM humaine et (B) du mécanisme réactionnel de l'amidation. (A) Les étoiles correspondent aux sites d'épissage alternatif de l'exon 1, permettant de générer les 2 isoformes de la PAM humaine A et B, et de l'exon 2, à l'origine des PAM-C et -D. PS, peptide signal; pr, pro-segment; TM, domaine transmembranaire et cyt., domaine cytosolique. (B) L'amidation fait intervenir de façon séquentielle les deux sous-unités catalytiques de la PAM, la PHM et la PAL. DHA, déhydroascorbate. Adapté de Eipper et al., 1993 et Prigge et al., 1997.

La réaction d'amidation se déroule en deux étapes (Figure 7B). Premièrement, le domaine PHM de la PAM catalyse une substitution stéréospécifique de l'hydrogène pro-(S) du carbone α du peptidyl-glycine par le radical hydroxyle grâce à une source d'O₂. Cette réaction aboutit à la formation d'un intermédiaire, un peptidyl α -hydroxyglycine, et nécessite deux molécules d'ascorbate. La structure 3D de la PHM, caractérisée par cristallographie aux rayons X, montre que le domaine catalytique est constitué de deux atomes de cuivre non-équivalents liés par covalence et portant chacun un des deux électrons nécessaires à la réaction (Prigge et al., 1997). Deuxièmement, la déalkylation de l'intermédiaire carbinol fait intervenir le domaine PAL de la PAM et génère le peptide α -amidé ainsi qu'une molécule de glyoxylate. Le domaine catalytique PAL est constitué de quatre cystéines formant deux ponts disulfure, d'un atome de Zn²⁺ lié par

des résidus conservés Asp et His (Kolhekar et al., 2002) et d'un atome de Fe³⁺ lié par la Tyr⁶⁵⁴ (De et al., 2006).

Il est intéressant de noter que la *dopamine β-monooxygenase* (DβM), enzyme impliquée dans un schéma réactionnel similaire, nécessite les mêmes co-facteurs que la PHM (ascorbate et cuivre) (Stewart and Klinman, 1991). De plus, les domaines catalytiques de ces deux enzymes partagent 32% d'identité de séquence ce qui suggère qu'elles seraient issues d'un précurseur ancestral commun (Southan and Kruse, 1989).

La présence d'une fonction amide C-terminale a été exploitée de façon astucieuse par l'équipe de Tatemoto et Mutt pour isoler, à l'époque, cinq nouveaux peptides biologiquement actifs, le peptide YY, le peptide histidine isoleucine (PHI-27) (Tatemoto and Mutt, 1981), le NPY (Tatemoto et al., 1982), la galanine (Tatemoto et al., 1983) et le neuropeptide K (Tatemoto et al., 1985). Plus récemment, la recherche du motif consensus Arg-Phe-Gly-Lys/Arg-Lys/Arg par criblage bio-informatique du génome humain a conduit à l'identification de deux peptides amidés biologiquement actifs dénommés RFRP-1 et -3 (Hinuma et al., 2000). De même, un autre peptide amidé de la famille des RFamide, le 26RFa, a été découvert notamment par deux approches *in silico* (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). Ce peptide et son récepteur feront l'objet du chapitre 3.

Le lien étroit existant entre les niveaux d'activité de la PAM et la production de peptides biologiquement actifs indique que la réaction d'amidation pourrait être l'étape limitante dans le processus global de synthèse des peptides α-amidés. De fait, son activité est régulée de manière tissu-spécifique et souvent de façon parallèle à la production de son substrat propeptidique (Eipper et al., 1993). Une des fonctions de l'amidation est la prévention de l'ionisation de l'extrémité C-terminale, rendant le peptide plus hydrophobe et plus résistant à l'action des carboxypeptidases (Eipper et al., 1993). De fait, l'analogue synthétique amidé de l'apéline-13 est plus stable métaboliquement que le peptide parent tout en conservant les propriétés insulinothropes de l'apéline native non-amidée (Hogg et al., 2014). De plus, il a récemment été démontré par des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) que l'absence du groupement amide C-terminal de l'astressine, un puissant antagoniste des récepteurs de la *corticotropin-releasing hormone* (CRH), déstabilise fortement la structure hélicoïdale du peptide entraînant ainsi une réduction d'un facteur 100 de son affinité pour les récepteurs de la CRH (Grace et al., 2007). De la même façon, les spectres de dichroïsme circulaire (CD) de la bicarinaline, un peptide antibactérien isolé à partir du venin de la fourmi

Tetramorium bicarinatum par une équipe du laboratoire, et de sa forme des-amide confirment le rôle stabilisant de la fonction amide sur la structure hélicoïdale du peptide natif (Rifflet et al., 2012). L'amidation pourrait donc jouer, dans certains cas, un rôle essentiel dans la stabilisation de la conformation bioactive de la molécule nécessaire à sa reconnaissance par la cible. Etant donné la grande diversité des processus biologiques dans lesquels sont impliqués les substrats de la PAM, il est difficile d'associer une pathologie spécifique à la modification de l'activité de cette enzyme. Néanmoins, l'inactivation conditionnelle du gène de la PAM a été réalisée chez la souris. Les mutants homozygotes présentent des déficits cardiovasculaires provoquant d'importants œdèmes au stade embryonnaire et meurent au stade 15,5 *in utero*, suggérant que la PAM est impliquée dans le développement fœtal. Les mutants hétérozygotes présentent des problèmes métaboliques à l'âge adulte tels qu'une augmentation de l'adiposité et une légère intolérance au glucose (Czyzyk et al., 2005). De même, une réduction de l'expression de la PAM chez des souris entraîne des altérations des fonctions thyroïdiennes et surrénaliennes connues pour être régulées par des neuropeptides amidés, conduisant à des problèmes de régulation thermique et de comportement (anxiété, sensibilité...) (Bousquet-Moore et al., 2010).

1.2.7 Pyroglutamisation

La formation d'un résidu pyroglutaminyl à l'extrémité N-terminale d'un peptide résulte de la cyclisation d'une glutamine sous l'action de la glutaminyl-cyclase avec libération concomitante d'ammoniaque (Busby et al., 1987; Fischer and Spiess, 1987). La pyroglutamisation, qui est l'une des dernières étapes de la maturation des neuropeptides, s'effectue dans les granules de sécrétion (Figure 3). Elle conditionne l'activité biologique de certains peptides comme la TRH et la GnRH (Vale and Rivier, 1975) mais elle est sans effet dans le cas de la neurotensine (Kitabgi et al., 1980), de la CRH (Vale et al., 1981) et de l'apéline (Parthasarathy et al., 2017), ou peut même diminuer l'activité du peptide comme dans le cas de l'ODN (Leprince et al., 1998). La pyroglutamisation peut augmenter l'affinité de certains peptides pour leurs récepteurs et/ou les protéger de la dégradation par les exopeptidases (Hinke et al., 2000; Van Coillie et al., 1998). La glutaminyl-cyclase humaine a été clonée et caractérisée à partir d'une librairie d'ADNc d'hypophyse humaine (Song et al., 1994) et sa structure 3D a été caractérisée par cristallographie aux rayons X (Huang et al., 2005a). Le site actif de la glutaminyl-cyclase humaine est constitué d'un atome de zinc ainsi que d'un réseau de liaisons hydrogène impliquant trois résidus particulièrement conservés (Glu²⁰¹, Asp²⁴⁸ et Asp³⁰⁵) (Huang et al., 2005b, 2008).

1.2.8 Acétylation de la fonction N-terminale

L'acétylation est une modification tardive catalysée par une N-acétyl-transférase qui assure le transfert du groupement acétyl de l'acétyl-coenzyme A sur l'extrémité N-terminale des peptides. A ce jour, il existe peu d'exemples de peptides acétylés mis à part la β -endorphine, acétylée sur la Tyr¹ (Smyth et al., 1979), l' α -MSH, sur la Ser¹ (O'Donohue et al., 1981), et éventuellement l'ocytocine et la vasopressine (Liu et al., 1988; de Wied et al., 1993). L' α -MSH peut également subir une O-acétylation de la sérine N-terminale (Rudman et al., 1979). L'acétylation confère aux peptides une certaine protection vis-à-vis des aminopeptidases, prolongeant ainsi leur demi-vie dans les fluides biologiques (Praisman et al., 1982). Par ailleurs, elle peut moduler l'activité biologique intrinsèque des peptides. Ainsi, l'acétylation est nécessaire à l'activité biologique de l' α -MSH (O'Donohue et al., 1982). A l'inverse, elle atténue fortement l'activité morphinomimétique de la β -endorphine (Deakin et al., 1980).

Chapitre 2 : Les peptides RFamide

Le terme de peptides RFamide ou *RFamide-related peptides* (RFRPs) désigne une famille de peptides biologiquement actifs dont les membres possèdent tous le motif structural Arg-Phe-NH₂ à leur extrémité C-terminale. Cette famille est largement représentée dans tout le règne animal.

2.1 Les peptides RFamide chez les invertébrés

Chez les invertébrés, les peptides RFamide représentent une des plus grandes familles de peptides régulateurs. Historiquement, le premier peptide de cette famille à avoir été identifié est le peptide FMRFamide (H-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), isolé à partir de ganglions nerveux du mollusque bivalve *Macrocallista nimbosa*, sur la base de son activité cardioexcitatrice (Price and Greenberg, 1977). Par la suite, de nombreux RFRPs ont été identifiés chez différentes classes d'invertébrés terrestres et marins (Krajniak, 2013; Walker et al., 2009), comme les cnidaires (Krajniak, 2013; Moosler et al., 1996, 1997), les nématodes (Peymen et al., 2014), les annélides (Evans et al., 1991; Salzet et al., 1994), les mollusques (Hoek et al., 2005; Tensen et al., 1998) et les arthropodes (Ma et al., 2009b). La liste ne cesse de s'agrandir comme l'indique la caractérisation chez la seiche *Sepia officinalis* d'un nouveau RFRP de 6 aa, nommé SepFRF1, appartenant à la sous-famille des neuropeptides LFRFamide (Zatylny-Gaudin et al., 2010), et l'analyse transcriptomique plus récemment réalisée chez la limace grise *Deroceras reculatum* (Ahn et al., 2017). Les RFRPs ont été particulièrement bien étudiés chez deux invertébrés modèles, le ver *Caenorhabditis elegans* et la mouche *Drosophila melanogaster*, espèces dont les génomes sont entièrement séquencés et bien annotés.

Chez *C. elegans*, l'analyse bioinformatique du génome a permis l'identification de 31 gènes, nommés FMRFamide-like peptides (*flp*) 1 à *flp28*, *flp32*, *flp33* et *flp34*, susceptibles de coder des RFRPs (Peymen et al., 2014; Walker et al., 2009). Parmi les 70 RFRPs différents recensés chez *C. elegans*, 49 ont été d'ores et déjà caractérisés biochimiquement. Ce nombre continue d'augmenter avec la caractérisation en 2009 de l'unique RFRP codé par le gène *flp-27*, appartenant à la sous-famille des neuropeptides F (NPFs) (Clynen et al., 2009). L'expression des gènes *flp* a pu être étudiée grâce à un système de gène rapporteur *green fluorescent protein* (GFP) chez des animaux transgéniques. Il a ainsi été montré que plus de 50% des neurones de *C. elegans* expriment au moins un de ces gènes. Néanmoins, la plupart des gènes sont exprimés dans des populations distinctes de neurones. Certains de ces gènes sont également exprimés dans les

cellules non-neuronales telles que les cellules musculaires au niveau de la tête, du pharynx, les cellules de l'utérus et de la vulve (Peymen et al., 2014). A ce jour, peu de récepteurs de RFRPs ont été caractérisés chez *C. elegans*. Les RFRPs codés par les gènes *flp-18* et *flp-21* sont les ligands endogènes d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), le NPR-1, qui présente deux isoformes, 215F et 215V, impliquées respectivement dans le comportement social et solitaire de la prise de nourriture (Rogers et al., 2003). Les peptides codés par les gènes *flp-2* et *flp-18* activent respectivement les récepteurs FLP-2 et FLP-18 R1, couplés à des protéines G_q/G_s (Kubiak et al., 2008; Mertens et al., 2005). Le récepteur FLP15R, localisé dans de nombreux motoneurons, relaie quant à lui, les effets locomoteurs des deux peptides codés par le gène *flp-15* (Keating et al., 2003). Plus récemment, le récepteur FRPR-4 a été impliqué dans le comportement de quiescence de *C. elegans* induit par les RFRPs codés par le gène *flp-13* (Nelson et al., 2014, 2015). Enfin, il est intéressant de noter que la délétion du gène *flp-1* provoque d'importants déficits sensoriels et moteurs tels qu'une perte de la sensibilité osmotique, une hyperactivité, ainsi qu'une diminution du nombre de pontes (Nelson et al., 1998).

Chez la drosophile, il n'existe que 5 gènes à l'origine de 5 groupes de RFRPs : les *FMRFamide-containing peptides*, la myosuppressine, les sulfakinines (SKs), les NPFs et les *short* NPFs (sNPFs) (Krajniak, 2013; Nässel, 2002). Le précurseur des *FMRFamide-containing peptides* génère 5 peptides différents, issus d'un gène unique nommé *dFMRFamide*, produits de façon tissu-spécifique (Nichols, 2003). Les *FMRFamide-containing peptides* présentent tous le motif FMRF-NH₂ à leur extrémité C-terminale et possèdent une région N-terminale variable tant en longueur qu'en structure. Ces peptides sont localisés dans les lobes cérébraux, le tractus gastro-intestinal et le système reproducteur (Nichols, 2003). Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, tels que la régulation de l'activité synaptique, de la fréquence cardiaque et de la motilité gastrique (Johnson et al., 2000; Kaminski et al., 2002; Krajniak, 2013; Nichols, 2003; Nichols et al., 1999). La myosuppressine, originellement identifiée chez la blatte *Leucophaea maderae*, a été caractérisée chez de nombreux insectes et présente le motif XDVXHXFLRFamide (Holman et al., 1986; Nichols, 2003). Chez la drosophile, la myosuppressine réduit la fréquence des contractions des muscles cardiaques, intestinaux et de l'oviducte (Kaminski et al., 2002; Krajniak, 2013; Merte and Nichols, 2002). Les SKs présentent la particularité de contenir une tyrosine sulfatée et possèdent des homologies de séquence avec les peptides de la famille gastrine/CCK des vertébrés. Le précurseur peut générer deux SKs, nommées SK I et II, isolées dans un premier temps chez la blatte puis chez d'autres espèces d'insectes (Nachman et al., 1986a, 1986b). Les SKs ont une séquence commune de type

E/DDYGHMRFamide où Y est la tyrosine sulfatée. Les SKs sont les ligands endogènes d'un RCPG, nommé DSK-R1, cloné chez la drosophile, qui présente une forte homologie avec les récepteurs CCK-A et CCK-B des vertébrés (Kubiak et al., 2002). Comme de nombreux autres RFRPs, les SKs modulent l'activité musculaire au niveau du cœur et de l'intestin (Nachman et al., 1986b; Predel et al., 2001). Les SKs exercent par ailleurs un effet inhibiteur sur la prise alimentaire, similaire à celui de la CCK, et il a été montré que la sulfatation de la tyrosine est indispensable à leur activité tout comme pour la CCK (Maestro et al., 2001). Le NPF, originellement isolé à partir du ténia *Moniezia expansa*, présente une identité de séquence d'environ 30% avec les membres de la famille du NPY chez les vertébrés (Maule et al., 1992). Néanmoins la séquence C-terminale du NPF de drosophile (RVRF-NH₂) diffère de celle du NPY (RQRY-NH₂) hautement conservée chez les vertébrés. Les NPFs, peptides de 36 à 40 aa, et les sNPFs, de 6 à 11 aa (Spittaels et al., 1996), sont produits par des gènes distincts : le premier générant un précurseur à l'origine d'un seul NPF et le second un précurseur à l'origine de deux sNPFs chez la drosophile (Clynen et al., 2009). De plus, les NPFs et sNPFs exercent leurs effets *via* des RCPGs différents, respectivement le Drm-NPFR et le Drm-NPFR76F, qui présentent des similarités structurales avec le récepteur Y2 des vertébrés (Feng et al., 2003; Garczynski et al., 2002; Mertens et al., 2002). Les deux récepteurs sont exprimés dans le système nerveux central (SNC) et l'intestin de la drosophile mais seul le Drm-NPFR est présent dans les ovaires et les tubes de Malpighi. Le NPF est impliqué dans plusieurs activités biologiques chez la drosophile, telles que le contrôle du comportement alimentaire (Wu et al., 2003) et de la reproduction (Cerstiaens et al., 1999). L'expression des NPFs est régulée par des facteurs circadiens comme les produits des gènes *timeless*, *clock* et *cycle*, et par des facteurs impliqués dans le dimorphisme sexuel tels que ceux issus des gènes *transformer* et *fruitless* (Lee et al., 2006). Les sNPFs contrôlent la croissance et le métabolisme et en particulier l'expression des *drosophila insulin-like peptides* (Dilps) selon un mécanisme faisant intervenir l'*extracellular signal-related kinase* (ERK) (Lee et al., 2004, 2008).

2.2 Les peptides RFamide chez les vertébrés

Le nombre de peptides RFamide identifiés chez les vertébrés et notamment chez les mammifères est beaucoup plus restreint que chez les invertébrés. A ce jour, sans tenir compte des orthologues, seulement 5 gènes (*farf-1* à *-5*) codant 7 peptides RFamide ont été identifiés pour l'ensemble des mammifères (Findeisen et al., 2011; Fukusumi et al., 2006; Parhar et al., 2012) (Tableau 1). Ces peptides sont classés en cinq groupes retrouvés chez tous les vertébrés : les neuropeptides FF

(NPFF) et AF (NPAF); le *prolactin-releasing peptide* (PrRP); les RFRP-1, -3 ou *gonadotropin-inhibitory hormone* (GnIH); la métastine/kisspeptine; et le 26RFa/QRFP. Ce dernier fera l'objet du chapitre 3.

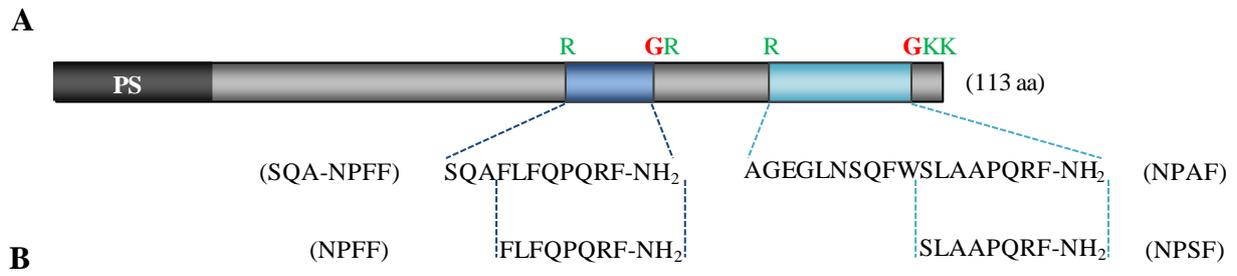
Tableau 1 : Gènes et séquences des peptides RFamide connus chez l'homme

Gène	Peptides	Séquences
<i>farp-1</i>	NPFF NPAF	FLFQPQRF-NH ₂ AGEGLNSQFWSLAAPQRF-NH ₂
<i>farp-2</i>	PrRP ₂₀ PrRP ₃₁	TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH ₂ SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH ₂
<i>farp-3</i>	RFRP-1 RFRP-3/GnIH	MPHSFANLPLRF-NH ₂ VPNLPQRF-NH ₂
<i>farp-4</i>	métastine/ kisspeptine	GTSLSPPESSGSPQQPLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRF-NH ₂
<i>farp-5</i>	26RFa 43RFa/QRFP	TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂ DEGSEATGFLPAAGEKTSGLPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂

Le motif RF-NH₂ conservé est indiqué en rouge.

2.2.1 Le NPFF et le NPAF

Les NPFF et NPAF ont été les premiers RFRPs à avoir été caractérisés chez les mammifères (Yang et al., 1985). Ces deux peptides ont été isolés à partir d'extraits de cerveau de bœuf à l'aide d'un anticorps dirigé contre le térapeptide FMRFamide de mollusque. La structure du précurseur du NPFF, déduite de la séquence de l'ADNc humain, de bœuf, de rat et de souris, a révélé que le NPFF et le NPAF sont issus d'un même précurseur dont la maturation met en jeu une arginine isolée pour le NPAF et une alanine atypique pour le NPFF (Perry et al., 1997; Vilim et al., 1999) (Figure 8A). Dans la moelle épinière de rat et de souris, les formes majoritaires de NPFF sont des peptides allongés de trois résidus en position N-terminale, le NPA-NPFF et le SPA-NPFF, respectivement (Figure 8B), (Bonnard et al., 2001, 2003). La présence d'un site de clivage canonique pour les PCs en amont du tripeptide N-terminal indique que ces peptides allongés correspondent aux formes natives du NPFF (Bonnard et al., 2001, 2003). Les mêmes auteurs ont isolé un second RFRP, le NPSF, à partir d'extraits de moelle épinière de rat et de souris. Il semble toutefois que ce peptide ne soit qu'un fragment de dégradation du NPAF. De la même façon, le NPSF caractérisé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) humain serait un produit de dégradation du NPAF (Burllet-Schiltz et al., 2002).



Peptide	Espèce	Séquence	Référence
NPFF	Homme	FLFQPQRF-NH ₂	(Sundblom et al., 1997)
	Bœuf	FLFQPQRF-NH ₂	(Yang et al., 1985)
	Rat	FLFQPQRF-NH ₂	(Bonnard et al., 2001)
	souris	FLFQPQRF-NH ₂	(Bonnard et al., 2001)
SQA-NPFF	Homme ¹	SQAFLFQPQRF-NH ₂	(Perry et al., 1997)
NPA-NPFF	Rat	NPAFLFQPQRF-NH ₂	(Bonnard et al., 2001)
SPA-NPFF	Souris	SPAFLFQPQRF-NH ₂	(Bonnard et al., 2003)
NPAF	Homme	AGEGLNSQFWSLAAPQRF-NH ₂	(Burlet-Schiltz et al., 2002)
	Bœuf	AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH ₂	(Yang et al., 1985)
	Rat ¹	EFWSLAAPQRF-NH ₂	(Burlet-Schiltz et al., 2002)
	Souris	QFWSLAAPQRF-NH ₂	(Bonnard et al., 2003)
NPSF	Homme	SLAAPQRF-NH ₂	(Burlet-Schiltz et al., 2002)
	Rat	SLAAPQRF-NH ₂	(Burlet-Schiltz et al., 2002)
	Souris	SLAAPQRF-NH ₂	(Bonnard et al., 2001)

Figure 8: Représentation schématique du précurseur humain du NPF et NPAF (A) et alignement de séquences des peptides RFamides produits à partir du précurseur du NPF et NPAF chez l'homme et quelques mammifères (B). (A) Les aa basiques impliqués dans le clivage sont représentés en vert. La glycine servant à l'amidation est indiquée en rouge. (B) ¹Peptide prédit à partir de la séquence du précurseur. Les aa conservés par rapport aux séquences des peptides humains sont indiqués en rouge.

La distribution des peptides issus du prépro-NPFF a été étudiée chez le rat par immunohistochimie et hybridation *in situ*. L'ARNm du NPFF et le peptide NPFF sont localisés dans de nombreuses régions du SNC (Panula et al., 1996, 1999), notamment dans l'hypothalamus, et plus particulièrement dans l'aire préoptique médiane, le noyau suprachiasmatique, entre les noyaux dorsomédian et ventromédian, et les noyaux hypothalamiques paraventriculaire et supraoptique, ainsi que dans le noyau du tractus solitaire, dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans le lobe nerveux de l'hypophyse postérieure. Les transcrits sont retrouvés en moindre abondance dans le noyau accumbens et le noyau de la strie terminale. Au niveau périphérique, le NPFF est exprimé dans le cortex et la médullo-surrénale ainsi que la rate (Labrousche et al., 1998; Nieminen et al., 2000).

L'ensemble des peptides issus du précurseur du NPPF, excepté le NPSF, présentent des affinités nanomolaires pour deux récepteurs à sept domaines transmembranaires orphelins, nommés NPPF-1 (ou OT7T022) et NPPF-2 (ou HLWAR77), avec une préférence pour le NPPF-2 (Bonini et al., 2000; Elshourbagy et al., 2000; Mollereau et al., 2002). Les récepteurs humains, *hNPPF-1* et *hNPPF-2*, partagent 59% d'identité de séquence entre-eux et présentent des homologies de séquence (31 à 37%) avec les récepteurs A et B des orexines, Y1, Y2 et Y4 du NPY, ainsi que ceux de la CCK (Bonini et al., 2000; Gouardères et al., 2007). La co-expression des récepteurs *hNPPF-1* et *hNPPF-2* avec des protéines G chimériques dans différentes lignées cellulaires a permis de révéler un couplage de type G_s ou $G_{i/o}$ conduisant à une inhibition de la voie de l'adénylyl cyclase (Bonini et al., 2000; Elshourbagy et al., 2000; Gouardères et al., 2007; Kotani et al., 2001a). Les ARNm du *hNPPF-1* sont exprimés essentiellement dans la moelle épinière, l'hippocampe et l'amygdale, et dans une moindre mesure dans le thalamus et l'hypothalamus. Les transcrits du NPPF-2 sont majoritairement retrouvés dans l'amygdale, le gyrus cingulaire, le noyau accumbens, le placenta, l'hypophyse, le tissu adipeux et le testicule (Bonini et al., 2000; Elshourbagy et al., 2000; Kotani et al., 2001a).

La présence de transcrits des NPPF et NPAF dans la moelle épinière laisse entrevoir un rôle de ces peptides dans la modulation de la nociception (Ayachi and Simonin, 2014). De fait, au niveau supra-spinal, l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) de NPPF atténue l'analgésie induite par la morphine (Roumy and Zajac, 1998; Wu et al., 2010; Yang et al., 1985, 2008a). La co-administration de RF9, antagoniste des récepteurs NPPF-1 et NPPF-2, supprime cet effet anti-opioïde (Fang et al., 2008). Au niveau spinal, l'injection intrathécale (i.t.) de NPPF, contrairement à l'injection i.c.v., potentialise les effets opioïdes de la morphine (Elhabazi et al., 2012; Roumy and Zajac, 1998; Simonin et al., 2006; Yang et al., 2008a). Ces effets opposés anti- et pro-opioïdes du NPPF sont encore mal compris. Ils pourraient s'expliquer par le fait que le NPPF agirait plutôt comme un modulateur des fonctions opioïdes endogènes que comme un authentique anti-opioïde. En effet, le NPPF est incapable d'interagir directement avec les récepteurs μ et δ des opiacés de la moelle épinière (Gouardères et al., 1996). Cependant, l'analgésie provoquée par le NPPF est bloquée, comme celle de la morphine, par des antagonistes opioïdes, ce qui suggère que cette analgésie passe par la stimulation du système opioïde. L'ensemble de ces données indique que le NPPF utilise plutôt qu'il ne compense le système opioïde pour produire ses effets. C'est aussi en modulant le même système que le NPPF modifie la prise alimentaire. Ainsi, l'injection de faibles doses de NPPF dans le noyau parabrachial inhibe l'effet orexigène induit par le DAMGO, un agoniste du récepteur μ des opioïdes. A l'inverse, à

forte dose, le NPPF stimule la prise alimentaire et son action est bloquée par la naloxone, un antagoniste des récepteurs opioïdes (Nicklous and Simansky, 2003). En réalité, il a été montré que le NPPF stimule la libération de neuropeptides, tels que le NPY et la β -endorphine, lesquels moduleraient l'activité des récepteurs aux opioïdes μ et κ (Cline and Mathews, 2008). La présence de sites de liaison du NPPF dans le cœur et le noyau du tractus solitaire suggère que ce peptide pourrait exercer des effets sur le système cardiovasculaire. De fait, l'injection intraveineuse (i.v.) ou i.t. de NPPF augmente la pression artérielle et le rythme cardiaque chez le rat (Fang et al., 2010). Les effets hypertenseurs sont partiellement inhibés par un antagoniste des récepteurs adrénergiques α_1 alors que les effets sur la fréquence cardiaque passent par les récepteurs muscariniques et β adrénergiques (Fang et al., 2010; Laguzzi et al., 1996). Enfin, le NPPF et le NPAF semblent exercer des effets neuroendocrines, puisque le NPPF inhibe la sécrétion d'aldostérone (Labrousse et al., 1998) et le NPAF stimule les sécrétions d'ACTH et de corticostérone (Jászberényi et al., 2009). Récemment, un modèle de souris invalidées pour le gène du NPPF-1 a été généré. Cette délétion n'impacte ni le déclenchement de la puberté ni la fertilité des animaux. En revanche, les auteurs ont rapporté une augmentation de la sensibilité à l'obésité et à l'hypogonadisme chez les jeunes souris soumises respectivement à un régime gras et à un stress (León et al., 2014).

De nombreuses études de relations structure-activité (RSA) du NPPF ont été réalisées afin de développer des agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs NPPF-1 et -2. Les résultats montrent que l'intégrité des quatre aa C-terminaux PQRF et la présence du radical amide sont nécessaires à la liaison et à l'activation des deux récepteurs (Mollereau et al., 2002; Payza et al., 1993). A l'inverse, le remplacement des quatre aa N-terminaux par différents résidus ne modifie que très légèrement l'affinité et l'activité du peptide (Mazarguil et al., 2001; Payza et al., 1993). Ces études ont conduit au développement d'un analogue peptidique particulièrement intéressant du NPPF, le 1DMe ([D-Tyr¹,NMePhe³]NPPF) (Figure 9A). Tout aussi puissant que le NPPF, cet agoniste est très souvent utilisé dans les études *in vivo* en raison de sa forte résistance à la dégradation enzymatique (Gicquel et al., 1992; Roumy and Zajac, 1998). Par ailleurs, un brevet a été déposé sur un autre analogue peptidique NPPF, le daY8Ra (desaminoTyr-[desPhe⁸]NPPF ; Figure 9B), qui atténue les effets addictifs aux opioïdes et les syndromes de sevrage (Payza and Malin, 1993). La modélisation moléculaire sous contraintes RMN du NPAF humain a montré qu'en milieu aqueux la partie centrale, Asn⁶ à Ala¹⁴ (Figure 8B), forme une hélice α et que, dans un milieu mimant les membranes biologiques, les quatre résidus C-terminaux se structurent en un coude β de type I qui joue un rôle crucial pour la reconnaissance du récepteur (Miskolzie and

Kotovych, 2003). L'homologie de séquence des récepteurs NPFF-1 et NPFF-2 avec les récepteurs du NPY a conduit deux équipes à étudier l'affinité et l'activité des ligands sélectifs de ces derniers sur les récepteurs du NPFF.

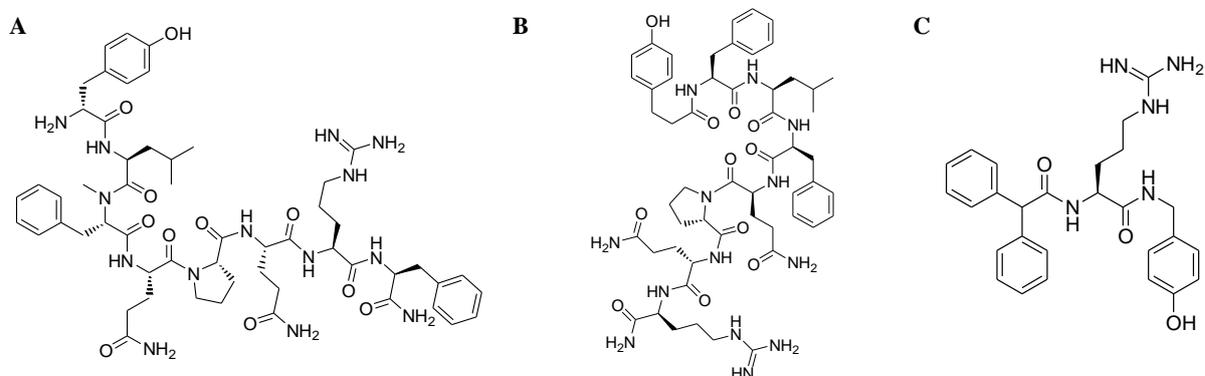


Figure 9: Structure de quelques ligands peptidiques des récepteurs NPFF-1 et NPFF-2. (A) 1DMe, (Gicquel et al., 1992). (B) daY8Ra, (Payza and Malin, 1993). (C) BIBP 3226, (Rudolf et al., 1994).

Bien que le NPY soit incapable de se lier aux NPFF-1 et -2, un antagoniste sélectif du récepteur Y1, le BIBP 3226 (Figure 9C), déplace la liaison du NPFF radio-iodé avec une assez forte affinité et bloque même l'effet du NPFF sur la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par une lignée cellulaire CHO exprimant l'un des récepteurs *hNPFF-1* ou *hNPFF-2* (Bonini et al., 2000; Mollereau et al., 2002). *In vivo*, l'injection i.c.v. de BIBP 3226 réduit significativement les effets hypothermisants et anti-opioïdes induits par le NPFF (Fang et al., 2006). Par la suite, de nombreux analogues du BIBP 3226 ont été synthétisés dans le but de développer des antagonistes sélectifs de l'un des récepteurs du NPFF. Malheureusement, les antagonistes synthétisés à l'époque, même les plus sélectifs vis-à-vis du NPFF-1 présentent toujours une bonne affinité pour le récepteur Y1 du NPY (Vyas et al., 2006). Neuf ans plus tard, Kim et ses collaborateurs ont finalement réussi à synthétiser un antagoniste sélectif des récepteurs du NPFF en se basant sur la structure du BIBP 3226, le GJ14. *In vivo*, l'infusion i.c.v de GJ14 chez la souris annihile complètement les effets anxiolytique et stimulateur de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien induits par un agoniste du NPFF-1 (Kim et al., 2015). Par ailleurs, un antagoniste non sélectif des récepteurs du NPFF, le RF9 (*N*-adamentanoyl-Arg-Phe-NH₂; Figure 10A), a été développé à partir du dipeptide H-Arg-Phe-NH₂. Le RF9 se lie aux récepteurs NPFF-1 et NPFF-2 avec une affinité de 58 nM et 75 nM, respectivement, et ne reconnaît pas les récepteurs du NPY ni ceux d'autres peptides RFamide comme les GPR10, GPR54 et GPR103 (Simonin et al., 2006). *In vivo*, le RF9 bloque les effets cardiovasculaires, hypothermisants et

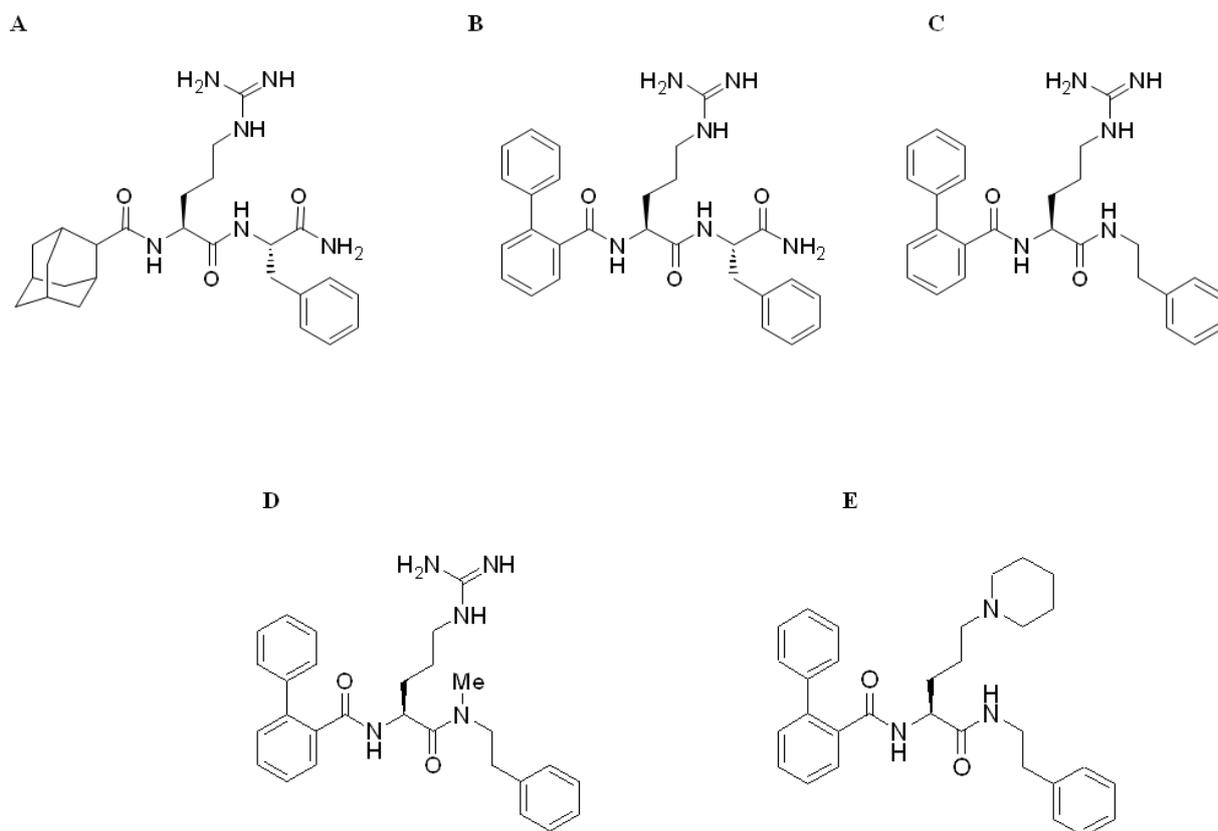


Figure 10 : Structure de quelques ligands peptidiques des récepteurs NPPF-1 et NPPF-2. (A) RF9, N-adamantanoyl-Arg-Phe-NH₂. (B) RF213, 2-phénylbenzoyle-Arg-Phe-NH₂. (C) RF272, (D) RF344, (E) RF313.

anti-opioïdes du NPPF (Fang et al., 2008, 2008; Simonin et al., 2006; Wang et al., 2008). Cependant, d'autres études, menées *in vitro*, ont montré que cet antagoniste présente également une activité agoniste non négligeable vis-à-vis du récepteur NPPF-1 et une activité agoniste partielle sur le récepteur NPPF-2 en stimulant la production d'AMPC (Findeisen et al., 2012; Kim et al., 2015; Talmont et al., 2010). De plus, le RF9 stimule *in vivo* la libération de gonadotrophine chez plusieurs espèces de mammifères en mettant en jeu probablement les récepteurs des kisspeptines (Pineda et al., 2010a; Rizwan et al., 2012). Ces résultats ont soulevé de nombreuses questions sur la fiabilité du RF9 comme outil pharmacologique pour bloquer les effets du NPPF mais ont, néanmoins, favorisé le développement de nouvelles molécules. Ainsi, la modulation de la partie N-terminale du RF9 a conduit à l'identification du RF213 comportant un motif 2-phénylbenzoyle (Figure 10B). Le RF213 montre une affinité subnanomolaire ($K_i = 0,32$ nM) pour le NPPF-1 et une sélectivité largement en défaveur du NPPF-2 ($K_i = 590$ nM). Administré par voie sous-cutanée, il prolonge l'analgésie du fentanyl et atténue son action hyperalgique paradoxale à plus long terme (Gealageas et al., 2012). Les auteurs se sont ensuite focalisés sur le

résidu C-terminal du dipeptide 2-phenylbenzoyl-Arg-Phe-NH₂. Ainsi, la suppression de la fonction carboxamide (RF272, Figure 10C) réduit d'environ 100 fois l'affinité vis-à-vis du NPFF-1 (K_i = 58 nM) tout en améliorant d'un facteur deux celle concernant le NPFF-2 (K_i = 250 nM), suggérant par là même qu'une certaine sélectivité pourrait être obtenue en permettant ou non l'établissement de liaisons hydrogène entre la fonction carboxamide de l'analogue et, respectivement, certains résidus du NPFF-1 et du NPFF-2 (Bihel et al., 2015). Toutefois, la N-méthylation du RF272 qui conduit au RF344 (Figure 10D) rétablit des affinités proches (NPFF-1; K_i = 11 nM; NPFF-2, K_i = 25 nM) de celles du RF9 sans aucune sélectivité apparente (Bihel et al., 2015). Il semble donc que les poches d'interactions du NPFF-1 et du NPFF-2 pour les dipeptides de type RF9 possèdent plutôt une zone hydrophobe qu'une tendance à engager des liaisons hydrogène avec les ligands. En dépit de bonnes affinités, la co-administration de RF344, en sous-cutanée, n'inhibe pas la phase secondaire d'hyperalgie induite par le fentanyl à l'inverse du RF9 (Bihel et al., 2015). L'optimisation pas à pas du dipeptide RF272 (2-phenylbenzoyl-Arg-N-penthylamine) s'est ensuite poursuivie par la modulation de la basicité de la chaîne latérale portée par le résidu arginine. L'analogue N-piperidine-ornithine, RF313 (Figure 10E), présente des affinités plus faibles (NPFF-1, K_i = 172 nM; NPFF-2, K_i = 563 nM) par rapport au RF272 dont il dérive directement. Néanmoins, de façon très intéressante, l'administration orale de ce composé prolonge l'analgésie du fentanyl et atténue la phase d'hyperalgie paradoxale de manière dose-dépendante à l'instar des effets du RF213 obtenus par la voie sous-cutanée (Bihel et al., 2015).

Deux groupes pharmaceutiques ont déposé des brevets autour de petites molécules non-peptidiques dérivées de quinolino-, quinazolino- et thiazole-guanidine substituées (Figure 11A et B) pour le traitement de la douleur et de l'incontinence (Synaptic Pharmaceutical corp., 2003; Actelion Pharmaceuticals Ltd, 2004; Vyaset al., 2006). Il a été montré que, dans la série des dérivés quinolino- et quinazolino-guanidines (Figure 11A), la substitution en R₃ par un groupement encombrant hydrophobe favorise une activité agoniste vis-à-vis des deux récepteurs NPFF-1 et NPFF-2 alors que le remplacement par un groupement moins lipophile conduit à des composés ayant une activité antagoniste vis-à-vis de NPFF-1 et agoniste de NPFF-2. Dans la série des dérivés thiazole-guanidine (Figure 11B), les substitutions en R principalement par un groupement alkyl conduisent à des composés antagonistes sélectifs du récepteur NPFF-1 (Vyaset al., 2006).

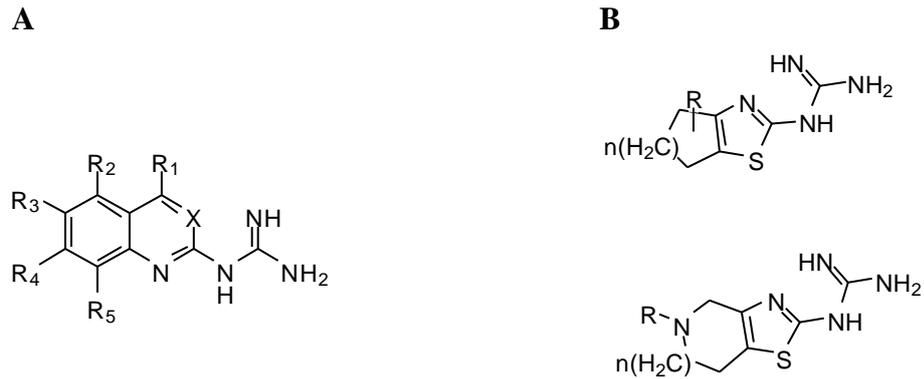


Figure 11: Structure de quelques ligands non-peptidiques des récepteurs NPF1 et NPF2.(A) Composés quinolino- (X = CH) et quinazolino-guanidine (X = N), Synaptic Pharm. (B) Dérivés bicycliques du thiazole, Actelion. Adapté de Vyas et al., 2006.

2.2.2 Le PrRP

Le PrRP a été purifié à partir d'hypothalamus de bœuf par une stratégie de pharmacologie inverse en tant que le ligand endogène du récepteur humain orphelin hGR3/GPR10 (Hinuma et al., 1998). Codé par le gène *farf-2*, le prépro-peptide de 83 à 98 aa chez l'homme, le bœuf et le rat, est constitué d'un peptide signal et d'une séquence Arg-Phe-Gly en position 52-53-54 chez l'homme, à l'origine du motif RFamide, suivie d'un triplet basique Arg-Arg-Arg dont le clivage permet de générer une forme moléculaire de 31 aa, désignée PrRP₃₁ (Dockray, 2004; Hinuma et al., 1998). La présence d'un site de clivage monobasique Arg au sein du PrRP₃₁ (Arg¹¹) conduit à une forme tronquée de 20 résidus ou PrRP₂₀ (Hinuma et al., 1998) (Figure 12A). La séquence du PrRP₃₁ est bien conservée chez les mammifères avec seulement trois aa différents entre l'homme et le bœuf et deux aa entre le rat et le bœuf (Figure 12B). Un orthologue du PrRP, nommé C-RFa, a été identifié chez la carpe ; ce peptide présente une forte homologie de séquence avec un peptide RFamide de mollusque désigné ACEP-1 (Fujimoto et al., 1998).

L'expression du gène codant le PrRP a été étudiée chez le rat par PCR quantitative et hybridation *in situ*. Les transcrits sont présents dans des régions très restreintes du cerveau : la partie caudale du noyau dorsomédian de l'hypothalamus, le noyau du tractus solitaire, les noyaux ventrolatéral et réticulaire du bulbe rachidien et à un moindre niveau dans la moelle épinière (Fujii et al., 1999; Hinuma et al., 1998; Lee et al., 2000; Minami et al., 1999). Au niveau périphérique, les transcrits du PrRP sont exprimés dans l'hypophyse antérieure, le pancréas, l'intestin, la surrénale, le testicule et l'épididyme (Fujii et al., 1999; Nieminen et al., 2000; Roland et al., 1999).

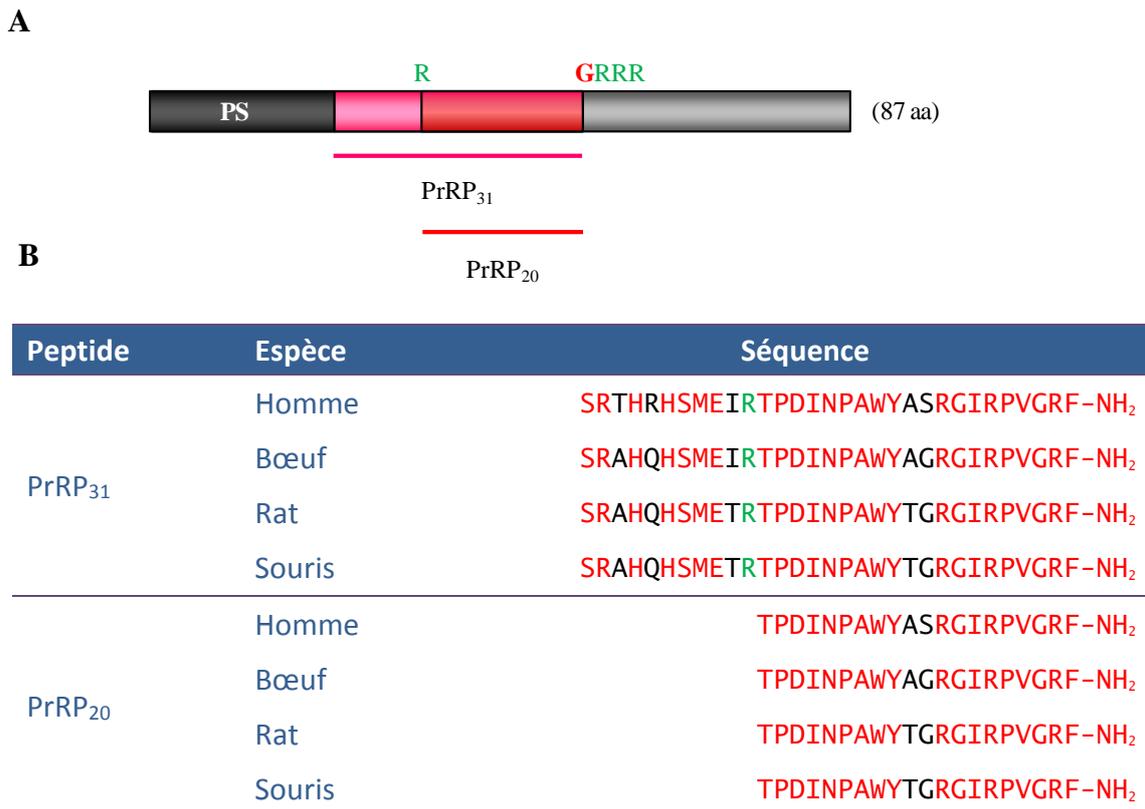


Figure 12: Représentation schématique du précurseur humain du PrRP (A) et alignement de séquences du PrRP (B). (A) Les aa basiques impliqués dans le clivage sont représentés en vert. La glycine servant à l'amidation est indiquée en rouge. (B) Séquence des PrRP₃₁ et PrRP₂₀ chez l'homme et quelques mammifères. Les aa conservés sont indiqués en rouge.

Le récepteur humain du PrRP, nommé hGR3 ou GPR10, est un RCPG qui possède 89% d'identité de séquence avec son orthologue UHR-1 chez le rat. Il présente des homologies de séquence modérées (29 à 31%) avec les récepteurs Y1 du NPY, des tachykinines (substance P et substance K), SSTR3 et SSTR5 de la somatostatine, et μ , δ et κ des opioïdes (Welch et al., 1995). Le GPR10 est couplé à une protéine de type G_q ou G_{i/o} qui permet d'une part une activation de la phospholipase A2 entraînant une augmentation de la production d'acide arachidonique (Hinuma et al., 1998) et d'autre part la phosphorylation des protéines kinases ERK et JNK, en partie *via* la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC), stimulant ainsi des facteurs de transcription de type Ets (Kimura et al., 2000) (Figure 13). Chez le rat, le récepteur UHR-1 est exprimé dans de nombreuses régions du SNC, telles que le noyau réticulé du thalamus, les noyaux hypothalamiques paraventriculaire, périventriculaire et dorsomédian, ainsi que dans le noyau du tractus solitaire (Fujii et al., 1999; Roland et al., 1999). Au niveau périphérique, UHR-1 est retrouvé essentiellement dans l'hypophyse antérieure, la surrénale, le testicule et l'épididyme (Nieminen et al., 2000).

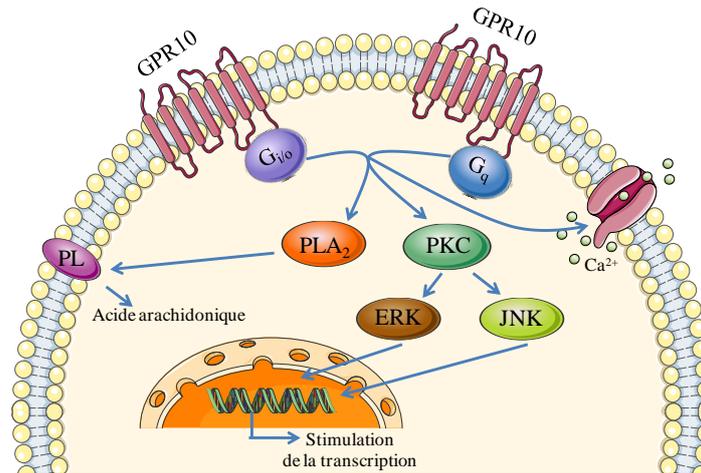


Figure 13: Représentation schématique du couplage du GPR10, récepteur du PrRP. ERK1 extracellular signal-related kinase; JNK, c-Jun N-terminal protein kinase; PKC, protéine kinase C; PL phospholipides; PLA2, phospholipase A2.

Le PrRP a été initialement identifié comme un facteur stimulant la sécrétion de prolactine *in vitro* sur une lignée de cellules hypophysaires de rat et des explants hypophysaires (Hinuma et al., 1998). Cependant, cet effet n'a pas été systématiquement retrouvé *in vivo* (Curlewis et al., 2002; Jarry et al., 2000; Sun et al., 2005; Takahashi et al., 2000). L'expression des ARNm du PrRP diminue dans des situations où la balance énergétique devient négative telles que le jeûne ou la lactation (Lawrence et al., 2000). L'injection i.c.v. de PrRP induit un effet anorexigène chez le rat. De plus, les souris dont le gène codant le GPR10 a été invalidé ($GPR10^{-/-}$) sont hyperphagiques et obèses, et présentent des taux plasmatiques de triglycérides, de leptine et d'insuline élevés, une augmentation de la masse grasseuse et une diminution de la tolérance au glucose (Bjursell et al., 2007; Gu et al., 2004). L'effet anorexigène du PrRP serait relayé en partie par les neurones à CRH (Lawrence et al., 2004). En effet, le PrRP induit une augmentation de l'activité des neurones à CRH dans le noyau paraventriculaire, visualisée par l'expression de la protéine *c-fos*, alors que l'astressine, antagoniste du récepteur de la CRH, bloque la diminution de la prise alimentaire induite par le PrRP (Bechtold and Luckman, 2006; Lawrence et al., 2004). L'injection i.c.v. de PrRP₃₁ chez le rat augmente indirectement le niveau plasmatique d'ACTH par stimulation de la sécrétion de CRH (Seal et al., 2002). Par ailleurs, la CCK, un peptide impliqué dans la satiété, active les neurones à PrRP (Dodd and Luckman, 2013; Lawrence et al., 2002) et chez les souris $GPR10^{-/-}$, contrairement aux souris sauvages, l'injection intrapéritonéale (i.p.) de CCK n'induit pas de diminution de la prise alimentaire (Bechtold and Luckman, 2006), suggérant que le système PrRP/GPR10 est un relai de la CCK sur son effet satiétogène. Le PrRP stimule également la libération d'ocytocine et l'administration d'un antagoniste du récepteur de

l'ocytocine atténue les effets anorexigènes du PrRP et de la CCK (Bechtold and Luckman, 2006; Maruyama et al., 1999; Onaka et al., 2010). Comme beaucoup de peptides RFamide, le PrRP régule les fonctions cardiovasculaires. Ainsi, l'injection i.c.v. de PrRP₂₀ ou de PrRP₃₁ induit une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Samson et al., 2000). Les effets du PrRP sur l'activité cardiovasculaire sont inhibés par le RF9, antagoniste des récepteurs du NPPF (Engström et al., 2003; Ma et al., 2009a). Enfin, l'injection i.c.v. de PrRP induit une hyperalgésie et inhibe l'effet analgésique de la morphine chez des souris sauvages alors qu'elle ne provoque pas d'action chez les souris GPR10^{-/-}, indiquant que le peptide agit indirectement sur les systèmes opioïdiques *via* le GPR10 (Laurent et al., 2005).

Une étude de modélisation sous contraintes RMN a montré qu'au contact de micelles de dodécylsulfate de sodium (SDS), les dix résidus C-terminaux du PrRP₂₀ forment une hélice α tandis que les aa N-terminaux ont tendance à se structurer en un coude β autour du résidu proline en position 2 (Deluca et al., 2013; D'Ursi et al., 2002). L'étude des RSA du PrRP indique que l'heptapeptide C-terminal (PrRP₍₂₅₋₃₁₎) est la séquence minimale requise pour activer le récepteur (Roland et al., 1999). La substitution de chaque aa du PrRP₍₂₅₋₃₁₎ par une alanine conduit à des analogues moins affins, voire incapables de se lier au récepteur (Roland et al., 1999). L'activité et l'affinité d'une série d'analogues du PrRP₍₁₉₋₃₁₎ (WYASRGIRPVGRF-NH₂) ont été déterminées par mesure de leur capacité à mobiliser le calcium cytosolique ($[Ca^{2+}]_i$) dans une lignée cellulaire sur-exprimant le GPR10 et à déplacer la liaison du PrRP radio-iodé (Boyle et al., 2005). Il ressort de cette étude que 1) la Phe³¹ peut être remplacée par différents résidus avec des groupements encombrants hydrophobes sans perte d'activité; 2) les analogues modifiés au niveau des aa Ala²¹, Ser²², Gly²⁴, Ile²⁵ et Val²⁸ par différents résidus présentent des activités similaires à celle du PrRP₍₁₉₋₃₁₎, et 3) l'Arg³⁰ ne peut être modifiée sans perdre d'affinité ou d'activité, suggérant que ce résidu est nécessaire à la liaison et/ou l'activation du récepteur. L'effet de l'octapeptide C-terminal PrRP₈, ou PrRP₍₂₄₋₃₁₎ (GIRPVGRF-NH₂), sur l'activité cardiovasculaire et sur la modulation de la douleur a fait l'objet d'un brevet (OY Juvantia Pharma Ltd, 2001). Brièvement, la microinjection de PrRP₈ dans le noyau du tractus solitaire n'induit pas d'augmentation du seuil douloureux à l'inverse du PrRP₂₀, alors que l'injection i.v. de PrRP₈ provoque une élévation de la pression artérielle identique à celle du PrRP₂₀. Ces résultats suggèrent que les effets du PrRP seraient relayés par au moins deux récepteurs distincts : le GPR10 qui serait impliqué dans la réponse nociceptive et dont l'activation ne nécessite que l'extrémité N-terminale du peptide, et le NPPF-2 qui requiert l'extrémité C-terminale du PrRP pour agir sur la fonction cardiovasculaire. Une étude plus récente montre que le remplacement

de la Phe³¹ de PrRP₂₀ par une naphtylalanine ou une tyrosine, conduit à des composés aux propriétés intéressantes. En effet, *in vivo*, l'injection centrale de ces analogues chez des souris affamées, génère une anorexie plus durable que le PrRP₂₀ (Maletínská et al., 2011). Cet effet peut être reproduit par l'administration i.v. des dérivés palmitoylé et myristoylé du PrRP₃₀ dont les propriétés pharmacochimiques leurs permettent de franchir la barrière hématoencéphalique (Maletínská et al., 2015). A notre connaissance, aucun ligand non-peptidique du GPR10 n'a été décrit à ce jour.

2.2.3 Le RFRP-1, le RFRP-3 et la GnIH

La recherche bioinformatique de nouveaux membres de la famille des peptides RFamide à partir de banques d'*expressed sequence tags* (ESTs) humaines a conduit à l'identification de deux peptides RFamide, le RFRP-1 et le RFRP-3, codés par le même gène *farp-3* (Dockray, 2004; Hinuma et al., 2000). L'ADNc, cloné chez l'homme, le rat, la souris et le bœuf, est à l'origine d'un précurseur de 188 à 203 aa, constitué d'un peptide signal de 21 résidus, de deux peptides RFamide en position centrale, RFRP-1 et RFRP-3, et d'un troisième peptide avec le motif C-terminal atypique Arg-Ser-NH₂, nommé RFRP-2, qui n'existe pas dans les précurseurs murins (Hinuma et al., 2000) (Figure 14). Les séquences des RFRP-1 et RFRP-3 sont hautement conservées chez les mammifères avec seulement un ou deux aa différents. Il est intéressant de noter que les quatre aa C-terminaux du RFRP-3 sont identiques à ceux du NPF₁ et du NPAF₁, suggérant que ces peptides pourraient provenir d'un ancêtre commun. Le RFRP-1 et le RFRP-3 ont été purifiés à partir d'extraits hypothalamiques de bœuf et sont constitués respectivement de 35 et 28 aa, et non de 12 et 9 aa comme l'avait prédit l'analyse du précurseur, indiquant que les sites basiques lysine et arginine, en amont du motif RFGR, ne sont pas utilisés dans la maturation du précurseur (Fukusumi et al., 2001; Yoshida et al., 2003). Chez le rat, le RFRP-3, isolé à partir d'un extrait d'hypothalamus, est beaucoup plus court que les formes humaine et bovine puisqu'il ne comporte que 18 aa (Ukena et al., 2002). Un orthologue du RFRP-3 a été purifié chez la caille et nommé GnIH en raison de son effet inhibiteur sur la sécrétion de gonadotropines (Tsutsui et al., 2000, 2012). Son gène code en réalité un précurseur à l'origine de deux autres peptides RFamide, le *GnIH-related peptide 1* (GnIH-RP-1), orthologue du RFRP-1, et le GnIH-RP-2 (Satake et al., 2001) (Figure 14). Très récemment, ce même gène a été caractérisé chez l'anguille et le précurseur codé pourrait générer trois GnIH-RP (Dufour et al., communication personnelle).

Séquence et Peptides	
Espèce	
Beuf	MEIISLKRFPILLMLATSSLLTNSNIFCTDESRPNLYSKK-NYDKYSEPRGDLGWEKERSLTFEEVKDWAPK--IKMKNKPVVNKMPFSAANLPLRFGRNMEEE----- RFRP-1
Homme	MEIISSKLFILLTLATSSLLTNSNIFCADELVISNLHSKE-NYDKYSEPRGYP--KGERSLNFEELKDWGPKNVIKMSITFAVNKMPHSFANLPLRFGRNVQEE-----
Rat	MEIISSKRFILLTLATSSFLTNSNTLCSDELMPHFHSKE-GYKYYQLRGLPKGVKERSVTFQELKDWGAKKDIKMSPPAPANVPHSAANLPLRFGRNIEDR-----
Souris	MEIISLKRFPILLTVATSSFLTNSNTFCTDEFMMPHFHSKE-GDGKYSQLRGLPKGKERSVSVFQELKDWGAKNVIKMSPPAPANVPHSAANLPLRFGRRTIDEK-----
	GnIH-RP-1
Caille	MEIISTQKFPILLTLATVAFLTPHGACLDLMLKSSLESREDDDDKYYETKDSILEEKQSLNFEEMKDWGSKNFMKVNTFTVNKVPNSVANLPLRFGRSNFEE-----
Moineau	MKVILLTQKFIILFALAAVLLTNSMCLNEPMKPRLOSREDNDDKYYEIKDNILEEKQSLNFEEMKDWGSKDIKMNPFVSKMPNSVANLPLRFGRNYPFEE-----
Anguille	MCTKILLFWTFVNSFPQAMQE-----SERARSEMDDFKVQEVFDDTMGSTPIILKLYPPTVAKFALLHANLPLRFGRRSSPRAAT
	GnIH-RP-1
Séquence et Peptides	
Espèce	
Bœuf	RSTRMAHLPLRLGKNREDSLRWPNLPQRFGRITTAKSITKTLNLLQQSMHSPSTNGLLYSMACQPOEIQNPGQNLRRRFGQKIDDAELKQEK-----
Homme	RSAGATANLPLRSGRNMEVSLRVVNPPLPQRFGRITTAKSIVCRMLSDLCQSGSMHSPCANDLFYSMTCQHQEIQNPDQSRRLFKKIDDAELKQEK-----
	RFRP-3
Rat	RSP-----RARANMEAGTMSHFPSLPQRFGR-TTARRITKTLAGLPQKSLHSLASSELLYAMTRHQEIQSPGQPRKRVTETDDAERKQEKIGNLQPVLOGAMKL
Souris	RSP-----AARVNMEAGTRSHFPSLPQRFGR-TTAR-SEKTPADLPQKPLHSLGSELLEYVMICQHIEIQSPGGKTRRGAFFVETDDAERKPEK-----
	GnIH
Caille	RSIKPSAYLPLRFGRAFGESLSRRAPNLSNRSGRSPPLARSSIQSLLNLQRFGRKSVPIIS-----LSQGVQSESEPGM-----
Moineau	RSIKPFANLPLRFGRAFGENIPNHPKVLHRLGRSPLKGGSSQLLNLQRFGRKSLVFN-----LPQDIQSESEPGI-----
	GnIH-RP-2
Anguille	RMLQFPLSLTRRFGRSPETDSPI-AL--CHQCAR-MGGVA-SPS-ATLQRFGRTRNFRDSRPARTLAMFARGIAA--QLQRRSQARGLSFVDDVREE-----
	GnIH-RP-3

Figure 14: Alignement de séquences du précurseur du RFPR-1/3 et de la GnIH chez l'homme et quelques vertébrés. Les aa basiques pouvant être impliqués dans le clivage sont représentés en vert. Le motif conservé Arg-Phe est indiqué en bleu et la glycine servant à l'amidation en rouge. Les séquences grisées représentent le peptide signal. D'après van Aerle et al., 2008 et Dufour et al., communication personnelle.

La distribution des RFRP-1, -3/GnIH a été étudiée par PCR quantitative et immunohistochimie chez le rat. Les ARNm sont retrouvés en grande quantité dans l'hypothalamus et plus particulièrement dans les noyaux ventromédian, dorsomédian et périventriculaire et dans l'aire latérale, ainsi que dans l'œil (Hinuma et al., 2000; Yano et al., 2003). Les ARNm des RFRP-1 et -3 sont également présents dans le thalamus et l'hypophyse (Fukusumi et al., 2001; Yoshida et al., 2003). Chez les oiseaux, les transcrits de la GnIH sont principalement exprimés dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, l'éminence médiane et l'aire préoptique (Tsutsui et al., 2000; Ukena et al., 2010).

Le RFRP-1 et le RFRP-3 lient avec une haute affinité le récepteur NPFF-1 (GPR147) et dans une moindre mesure le récepteur NPFF-2 (Hinuma et al., 2000; Yoshida et al., 2003). L'activation de ces récepteurs par les RFRP-1 et -3 provoque, *via* un couplage à une protéine de type $G_{i/o}$, une inhibition de la production d'AMPC induite par la forskoline sans engendrer d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ ni celle d'acide arachidonique (Fukusumi et al., 2001; Hinuma et al., 2000).

Les peptides issus du précurseur du NPFF, nommé pro-NPFF_A, et du précurseur des RFRP-1/3, appelé pro-NPFF_B, possèdent une forte homologie de séquence au niveau de leur extrémité C-terminale et agissent sur les mêmes récepteurs. Seuls les ARNm du NPFF sont retrouvés dans le noyau supraoptique de l'hypothalamus et le noyau du tractus solitaire alors que seuls ceux des RFRP-1/3 sont présents dans les noyaux ventromédian et périventriculaire (Yano et al., 2003). Cette divergence d'expression suggère des fonctions biologiques différentes pour ces peptides. Les RFRP-1 et -3 exercent principalement un rôle dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope (Figure 15). Ainsi, chez de nombreuses espèces, des terminaisons de neurones à RFRP-1/3 ou à GnIH ont été observées à proximité immédiate des corps cellulaires à GnRH (Bentley et al., 2003; Johnson et al., 2000; Kriegsfeld et al., 2006). L'infusion i.c.v. de RFRP-3 chez le rat inhibe l'activité des neurones à GnRH, visualisée par l'expression de *c-fos*, au niveau du noyau périventriculaire (Anderson et al., 2009). De plus, l'administration centrale de RFRP-3 diminue l'expression des sous-unités β de la LH et de l'hormone folliculostimulante (FSH). L'injection i.v. ou i.c.v. de RFRP-3/GnIH provoque une diminution de la sécrétion de LH, et dans une moindre mesure, de la FSH induite par la GnRH chez le rat, la brebis et la caille (Tsutsui et al., 2012). L'injection i.v. de RFRP-3 diminue l'amplitude des pulses de LH chez la brebis (Clarke et al., 2008) mais est sans effet chez le rat. L'injection i.c.v. de RFRP-3 réprime l'activité sexuelle chez le rat mâle, objectivée par une diminution du nombre de chevauchements et d'intromissions (Johnson et al., 2007). De même, la GnIH inhibe l'expression de la GnRH et

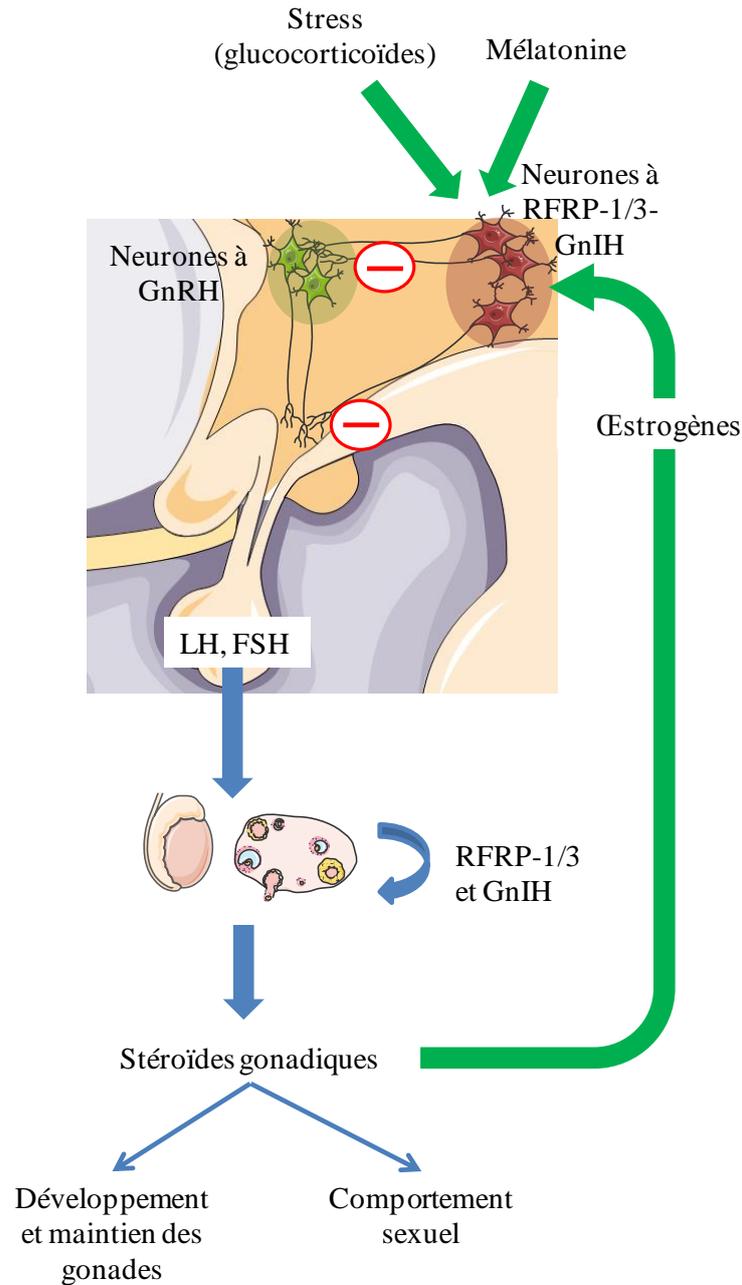


Figure 15: Schéma récapitulatif du rôle des RFRP-1/3 et de la GnIH sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

de la LH, ainsi que la croissance testiculaire chez la souris mâle adulte (Anjum et al., 2012, 2014; Ubuka et al., 2006). Il a été montré que l'expression du RFRP-3/GnIH est régulée par la mélatonine et les œstrogènes (Kriegsfeld et al., 2006; Ubuka et al., 2006). Le RFRP-3/GnIH pourrait donc être impliqué dans le rétro-contrôle négatif des stéroïdes gonadiques au niveau hypothalamique et hypophysaire. En outre, le RFRP-1 peut également inhiber la folliculogénèse

ovarienne chez la souris (Dave et al., 2017). D'autre part, lors d'un stress, la corticostérone active les récepteurs aux glucocorticoïdes présents à la surface des neurones à RFRP-3, provoquant une régulation positive de l'expression de RFRP-3 qui est abolie par une surrénalectomie (Kirby et al., 2009) (Figure 15). Chez les oiseaux, la GnIH est exprimée dans les gonades et les organes reproducteurs accessoires suggérant un rôle autocrine ou paracrine sur la stéroïdogénèse ou la spermatogénèse (Bentley et al., 2008). Chez le hamster, le RFRP-3 et le GPR147 sont également présents dans le testicule, notamment dans les spermatoocytes et spermatoïdes (Zhao et al., 2010). De plus, l'injection i.c.v. de RFRP-3 provoque un effet orexigène chez le rat (Johnson et al., 2007) et les gerboises adultes (Talbi et al., 2016). Le RFRP-1 a aussi un effet stimulateur à forte dose sur la sécrétion de prolactine et de GH (Hinuma et al., 2000; Johnson et al., 2007; Samson et al., 2003). Enfin, le RFRP-1 exerce un rôle dans la modulation de la douleur, l'injection i.c.v. de ce peptide bloquant l'action analgésique de la morphine (Liu et al., 2001).

A l'inverse du NPPF, les études de RSA des peptides RFRP-1 et -3 ont été peu explorées. Il a simplement été montré que la forme moléculaire de 12 aa du RFRP-1 humain est 5 fois plus puissante que celle de 35 aa pour inhiber la production d'AMPc induite par la forskoline (Fukusumi et al., 2001). Les antagonistes, identifiés dans la cadre des études réalisées sur le NPPF, principalement le RF9, ont été utilisés pour rechercher le rôle des RFRP1/3 endogènes notamment sur la reproduction (Pineda et al., 2010a, 2010b). Même si le RF9 s'oppose à l'effet inhibiteur du RFRP-3 ou de ses analogues sur la libération de gonadotropine (Pineda et al., 2010a), le RF9 induit une augmentation de la sécrétion de LH et dans une moindre mesure de FSH (Pineda et al., 2010b).

2.2.4 Les Kisspeptines

La recherche par pharmacologie inverse du ligand endogène du récepteur GPR54 (ou OT7T175 ou AXOR12) a conduit à l'identification d'un peptide RFamide de 54 aa nommé KISS-54, KP-54 ou encore métastine en raison de son effet inhibiteur sur le développement de métastases (Kirby et al., 2010; Kotani et al., 2001a; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001; Pinilla et al., 2012). Le KP-54 a été isolé à partir d'un extrait de placenta humain avec deux de ses fragments C-terminaux de 14 et 13 aa, les KP-14 et KP-13, tous deux biologiquement actifs (Kotani et al., 2001b). Le précurseur, produit du gène *KISS-1*, est constitué chez l'homme de 145 aa comprenant un peptide signal, plusieurs sites de clivage potentiels et une glycine impliquée dans l'amidation (Figure 16A). L'ensemble des peptides qui dérivent du KP-54 sont désignés sous le terme générique de kisspeptines (KPs), incluant le fragment C-terminal de 10 aa nommé KP-10. Le

KP-10, considéré à l'origine comme peptide artificiel, présente une activité biologique similaire à celle du KP-54 sur la $[Ca^{2+}]_i$ dans une lignée CHO transfectée par le GPR54. Toutefois, le KP-10 a été isolé par la suite à partir de milieux de culture de trophoblastes humains (Bilban et al., 2004; Kotani et al., 2001b; Ohtaki et al., 2001). La séquence du KP-54 est peu conservée des poissons à l'homme à l'exception des 10 aa C-terminaux qui portent l'activité biologique (van Aerle et al., 2008; Elizur, 2009) (Figure 16B). Chez les mammifères, hormis l'homme et les primates, la région N-terminale des KPs possède de 2 cystéines engagées dans un pont disulfure.

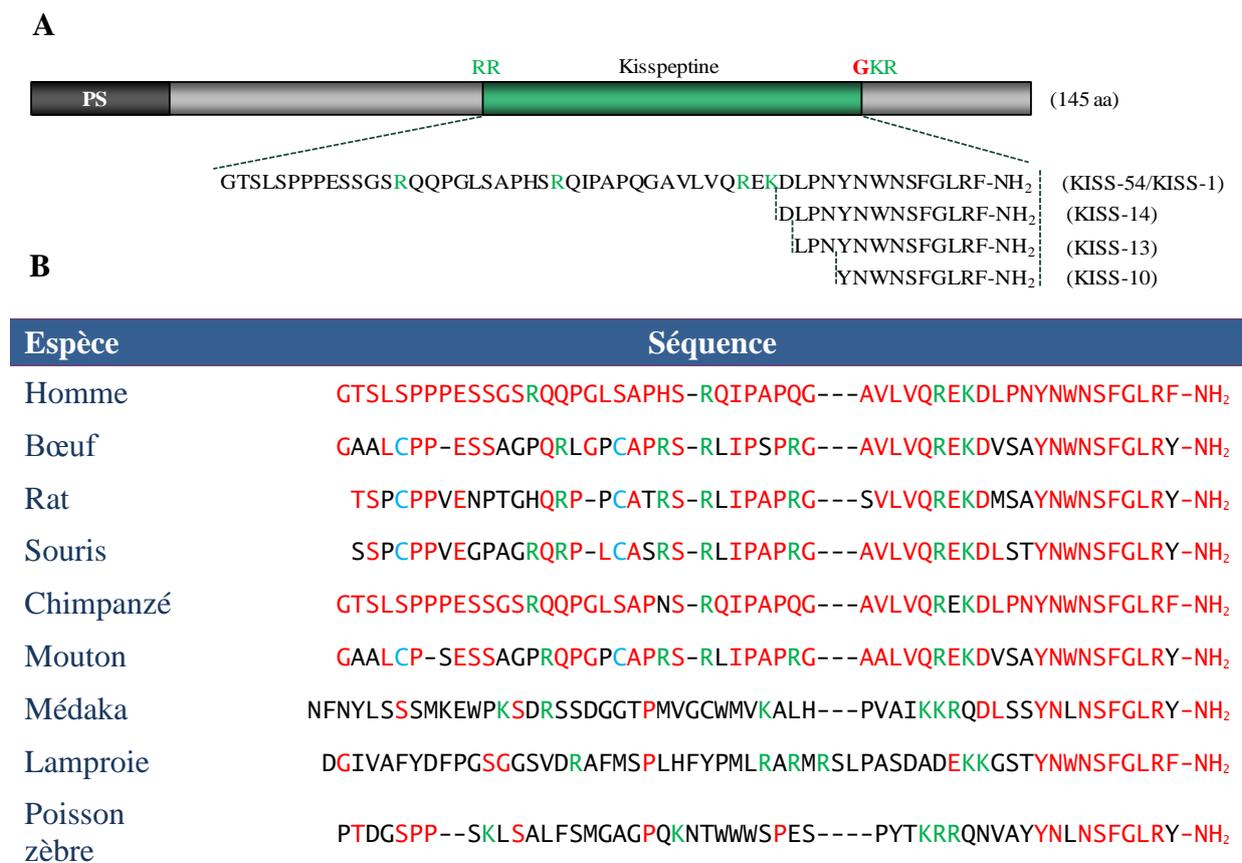


Figure 16: Représentation schématique du précurseur humain du KISS-1 (A) et alignement de séquences des métastines (B). (A) Les aa basiques impliqués dans le clivage sont représentés en vert. La glycine servant à l'amidation est indiquée en rouge. (B) Séquence de la métastine chez l'homme et quelques vertébrés. Les cystéines impliquées dans la formation du pont disulfure sont représentées en bleu. Les aa conservés par rapport à la séquence du peptide humain sont indiqués en rouge.

Par rapport aux autres peptides RFamide, les KPs ont un motif Arg-Phe-NH₂ qui n'est pas strictement conservé chez toutes les espèces de vertébrés, certaines formes présentant la signature Arg-Tyr-NH₂ à leur extrémité C-terminale. De manière surprenante, les oiseaux n'ont pas de gène codant pour les KPs (Um et al., 2010). A l'inverse, les poissons et les amphibiens possèdent

deux gènes codant pour deux isoformes distinctes de KPs, le KISS-1 et le KISS-2 (Felip et al., 2009; Lee et al., 2009).

L'expression du gène *KISS-1* a été étudiée chez les mammifères par PCR quantitative et hybridation *in situ*. Les transcrits sont présents principalement dans le placenta et plus faiblement dans le cerveau, l'hypophyse, le pancréas, le foie, l'intestin grêle, l'ovaire et le testicule (Gaytán et al., 2009; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001; Richard et al., 2008). Au niveau du SNC, les ARNm du *KISS-1* sont exprimés dans le noyau accumbens, l'hypothalamus, l'hippocampe et les ganglions de la base (Muir et al., 2001). Dans l'hypothalamus, les ARNm du *KISS-1* sont retrouvés essentiellement dans le noyau arqué et le noyau périventriculaire antéroventral (AVPV) chez tous les mammifères (Kirby et al., 2010; Mikkelsen and Simonneaux, 2009). Une immunoréactivité de type métastine est observée dans le noyau préoptique périventriculaire, le noyau arqué et l'AVPV chez de nombreux mammifères (Clarkson et al., 2009; Lehman et al., 2010; Mikkelsen and Simonneaux, 2009). La spécificité des anticorps utilisés, vis-à-vis des autres peptides RFamide, alimente encore actuellement des débats sur la localisation immunohistochimique de la métastine et de ses formes matures (Mikkelsen and Simonneaux, 2009).

Les KPs sont les ligands endogènes du GPR54, lequel présente 45% d'identité de séquence avec les récepteurs de la galanine (Kotani et al., 2001a; Lee et al., 1999; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). Les ARNm du GPR54 sont exprimés dans le SNC, principalement dans le noyau accumbens, le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale, l'hippocampe, le tronc cérébral et la moelle épinière (Kotani et al., 2001a; Lee et al., 1999; Muir et al., 2001). Au niveau périphérique, les transcrits du GPR54 sont présents dans le placenta, l'hypophyse, le pancréas et plus faiblement dans le foie, la rate, l'intestin et le testicule (Kotani et al., 2001a; Lee et al., 1999; Muir et al., 2001). Il a été montré que l'activation du GPR54 par les KPs provoque une mobilisation calcique, une libération d'acide arachidonique et une augmentation du *turn-over* des polyphosphoinositides, mais est sans effet sur l'augmentation de l'AMPC induite par la forskoline et insensible à la toxine pertussique (PTX), suggérant que le GPR54 est couplé à une protéine de type G_q (Castaño et al., 2009; Kotani et al., 2001b; Muir et al., 2001) (Figure 17). Les KPs stimulent également la phosphorylation des *mitogen-activated protein* (MAP) kinases p38 et ERK 1 et 2 (Kotani et al., 2001b).

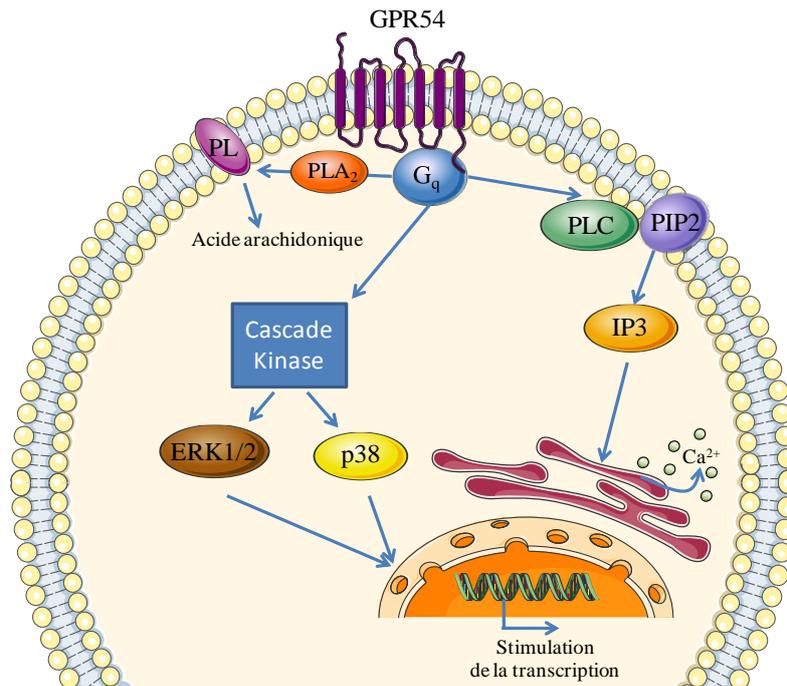


Figure 17: Représentation schématique du couplage du GPR54, récepteur du kisspeptine. ERK, *extracellular signal-related kinase*; IP3, inositol (1,4,5)-triphosphate; PIP2, phosphatidylinositol diphosphate; PL, phospholipides; PLA₂, phospholipase A₂; PLC, phospholipase C. Adapté de Castaño et al., 2009.

La méstastine a été initialement identifiée sur la base de son effet antimétastatique sur des mélanomes humains (Lee et al., 1996). Elle inhibe le chimiotactisme et l'invasion cellulaire de mélanomes murins exprimant le GPR54 (Ohtaki et al., 2001). Il a été montré qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de *KISS-1* et le grade histopathologique des tumeurs : une forte expression est observée dans les tumeurs bénignes alors que les niveaux sont plus faibles dans des stades cliniques avancés (Ikeguchi et al., 2003; Jiang et al., 2005; Sanchez-Carbayo et al., 2003). En 2003, deux études chez des patients atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique (HHI), caractérisé par une absence de maturation sexuelle et des taux faibles d'hormones gonadotropes circulantes, ont révélé l'existence de mutations du GPR54 chez certains de ces patients suggérant un rôle du système KISS/GPR54 dans le développement pubertaire (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Par la suite, d'autres mutations « perte de fonctions » du GPR54 ont été décrites chez des sujets atteints d'HHI (Lanfranco et al., 2005; Teles et al., 2010; Tenenbaum-Rakover et al., 2007) (Figure 18).

A l'inverse, la mutation Arg386Pro, conduisant à une activation prolongée du GPR54, entraîne une puberté précoce (Teles et al., 2008). L'inactivation des gènes codant le GPR54 et le précurseur de la méstastine provoque chez les souris une absence de développement des organes

sexuels et une réduction des taux plasmatiques d'hormones gonadotropes et de stéroïdes sexuels (Funes et al., 2003; Lapatto et al., 2007; Seminara et al., 2003; d'Anglemont de Tassigny et al., 2007).

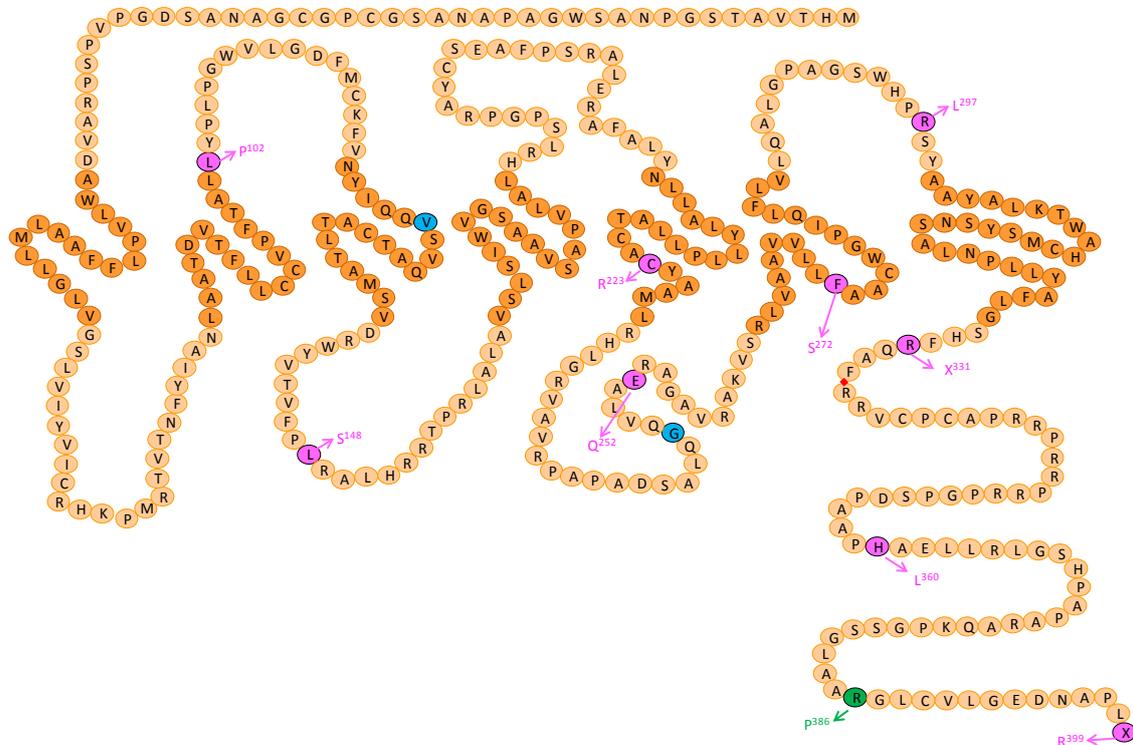


Figure 18: Représentation schématique des mutations du GPR54 décrites chez des patients. Les sept domaines transmembranaires sont représentés par des disques orange foncé et les domaines extra- et intracellulaires par des disques orange clair. Les aa en rose correspondent aux mutations « perte de fonction » du récepteur, en bleu aux mutations conduisant à des protéines tronquées et en vert à une mutation « gain de fonction ». X, codon stop. Adapté de Cerrato et al., 2007.

De plus, l'administration i.c.v., i.v. ou même i.p. de KP-54 ou KP-10 stimule la sécrétion de LH et FSH chez l'homme, la souris, le rat, le singe et le mouton (Caraty et al., 2007; Chan et al., 2011; Dhillon et al., 2005; George et al., 2011; Gottsch et al., 2004; Jayasena et al., 2013, 2014; Kirby et al., 2010; Messenger et al., 2005; Navarro et al., 2004, 2005a, 2005b; Plant et al., 2006). Les antagonistes des récepteurs de la GnRH bloquent la sécrétion de gonadotropines induite par les KPs (Gottsch et al., 2004; Navarro et al., 2004). Sur le plan neuroanatomique, les neurones à GnRH expriment le GPR54 (Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005) (Figure 19).

Par ailleurs, l'injection i.c.v. de KP accroît l'immunoréactivité *c-fos* dans les neurones à GnRH et augmente les taux de GnRH dans le LCR. L'expression du *KISS-1* et du GPR54 dans l'hypophyse suggère que les KPs pourraient également agir au niveau hypophysaire de façon autocrine ou paracrine (Kotani et al., 2001b; Muir et al., 2001; Richard et al., 2008), mais cette action reste néanmoins controversée (Richard et al., 2009). Il a été montré que l'expression de *KISS-1* est régulée par les stéroïdes sexuels chez de nombreuses espèces (Kirby et al., 2010) (Figure 19). Au niveau du noyau arqué et de l'aire préoptique, des neurones immunoréactifs pour le KP expriment le récepteur α de l'œstradiol (Franceschini et al., 2006). Il ressort de ces études que la méstastine est un régulateur majeur de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope. Cependant, une étude a montré que la suppression des neurones à KPs ou des neurones exprimant le GPR54, par un système de recombinaison homologue, provoquait une diminution de la masse des ovaires sans perte de la fertilité et sans réduction de la sécrétion de LH ni retard pubertaire

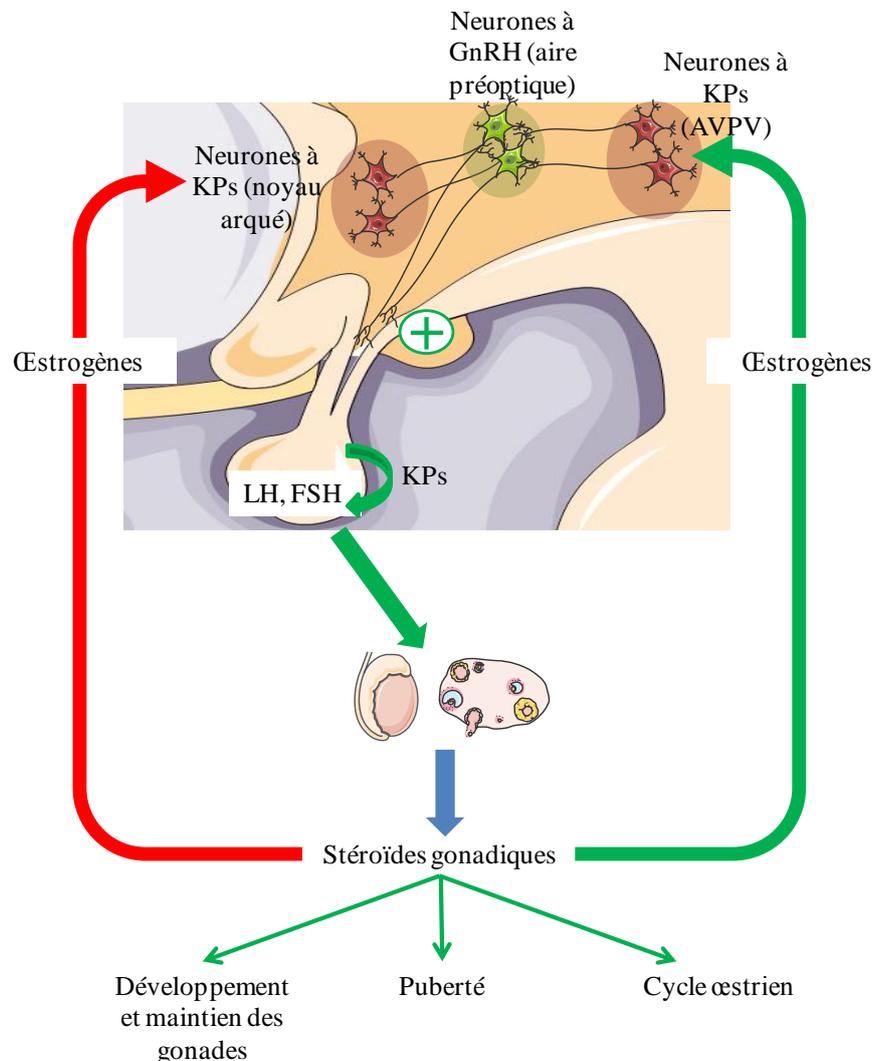


Figure 19: Schéma récapitulatif du rôle des KPs sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope. Les flèches vertes représentent des effets stimulateurs ou facilitateurs et les flèches rouges des effets inhibiteurs. AVPV, noyau périventriculaire antéroventral.

(Mayer and Boehm, 2011). Néanmoins, la suppression de ces mêmes neurones à P20 conduit à des souris stériles et sans cycle ovarien. Ces résultats suggèrent que le système KPs/GPR54 n'est pas essentiel à la mise en place de la puberté et à la maturation sexuelle, et qu'avant P20 un système de compensation doit permettre le développement des gonades et la maturation de la fonction reproductrice. Les KPs exercent aussi un rôle dans le processus de placentation et d'invasion du trophoblaste; cependant leur mécanisme d'action dans ce processus est encore méconnu. Les KPs pourraient, toutefois, être impliqués dans les phénomènes de pré-éclampsie (Farina et al., 2006; Qiao et al., 2005). En outre, des études récentes ont montré que les KPs sont capables de déclencher la maturation des oocytes et l'implantation embryonnaire durant la fertilisation *in vitro* (Abbara et al., 2015; Jayasena et al., 2014). Enfin, les transcrits des gènes *KISS-1* et *GPR54* sont exprimés dans le pancréas où la métastine stimule la libération d'insuline induite par le glucose (Hauge-Evans et al., 2006).

Une étude de modélisation sous contraintes RMN a montré qu'au contact de micelles de SDS, les 6 résidus C-terminaux du KP-13 forment une hélice α (Orsini et al., 2007). Des études de RSA, réalisées en partie au laboratoire, ont montré que la nature et l'orientation des chaînes latérales des 5 aa C-terminaux, et principalement celles des deux résidus Phe, sont importantes pour la liaison et l'activation du récepteur alors que les aa N-terminaux tolèrent des substitutions par leur énantiomère ou une alanine (Gutiérrez-Pascual et al., 2009; Niida et al., 2006; Orsini et al., 2007). Le remplacement des Phe⁶ et Phe¹⁰ du KP-10 de rat par une alanine conduit à une perte d'activité du peptide due à une déstabilisation de l'hélice (Gutiérrez-Pascual et al., 2009).

Deux séries d'analogues du pentapeptide C-terminal de la métastine ont été développées afin d'augmenter la puissance, l'affinité et la stabilité du peptide. Ces études ont mis en évidence plusieurs composés, dont le BisPy-Amb-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂, le Gmb-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂ et le H-Amb-Nal(2)-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂ (Figure 20A, B et C), qui présentent des activités et des affinités similaires au KP-10, ainsi que deux pseudopeptides dérivés du 4-fluorobenzoyl-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂ (Figure 20D et E) aussi affins, puissants et plus résistants à l'action des MMP-9 et des protéases sériques que le KP-10 (Tomita et al., 2006, 2008). D'autres modifications ont été apportées au KP-10 pour améliorer sa stabilité *in vivo*. L'analogue [dY]1KP-10, présentant une D-Tyr en position 1, conserve une activité similaire au KP-10. En particulier, cet analogue a la capacité d'augmenter *in vivo* les niveaux de LH et de testostérone chez la souris (Curtis et al., 2010). Par ailleurs, la N^o-méthylation de l'Arg⁹, le remplacement de la Gly⁷ par une azaglycine, et/ou la substitution du Trp³ par une Ser, une Thr,

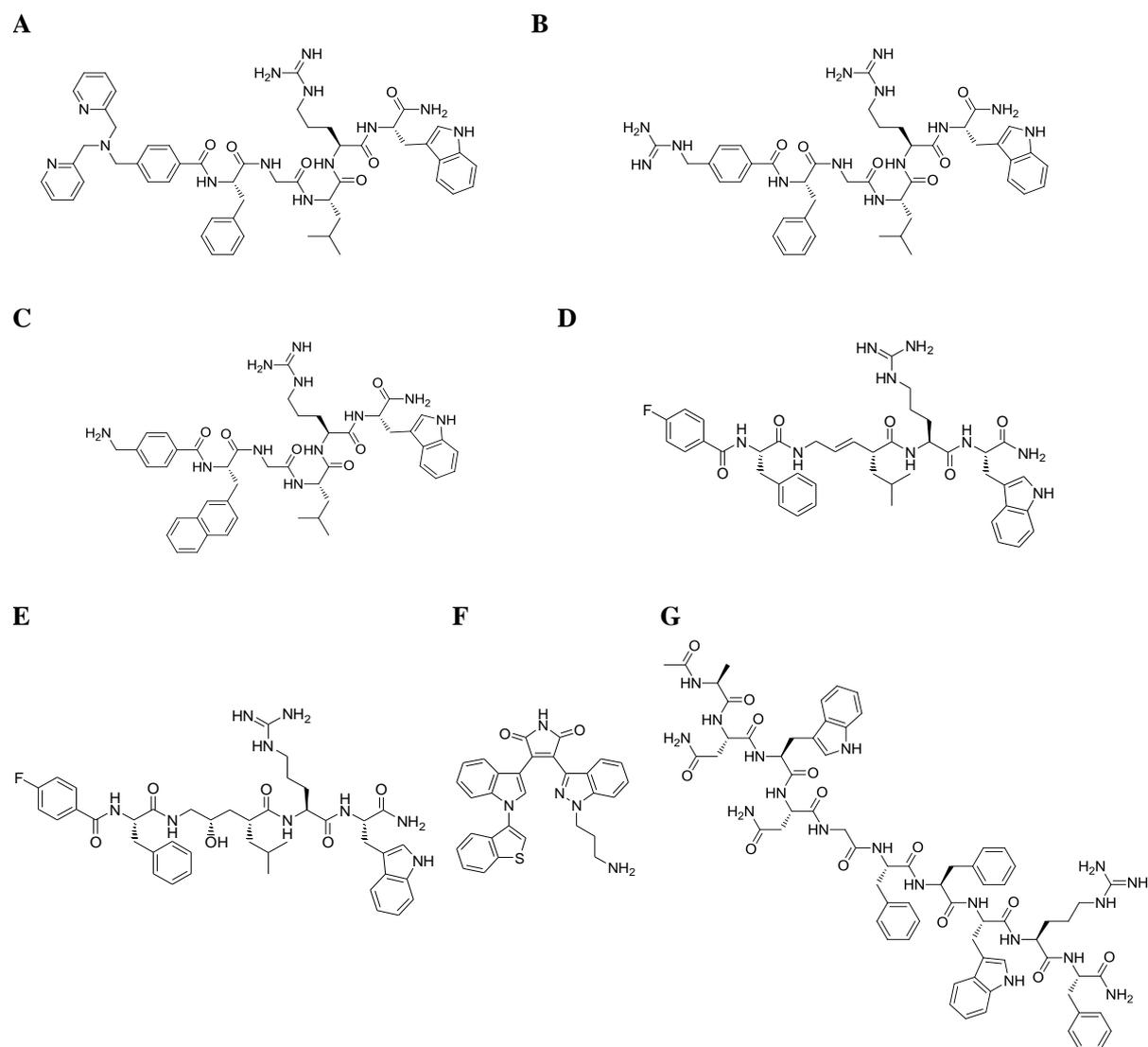


Figure 20: Structure de quelques ligands peptidiques et non-peptidiques du récepteur de la métastine.(A) BisPy-Amb-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂. BisPy, bis[(2-pyridinyl)méthyl]; Amb, acide 4-aminométhylbenzoïque, (Tomita et al., 2006). (B) Gmb-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂. Gmb, acide 4-guanidinométhylbenzoïque, (Tomita et al., 2006). (C) H-Amb-(2-Nal)-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂, (Tomita et al., 2006). (D) 4-fluorobenzoyl-Phe-GlyΨLeu-Arg-Trp-NH₂ où Ψ est une liaison (*E*)-éthylénique, (E) 4-fluorobenzoyl-Phe-GlyΨLeu-Arg-Trp-NH₂ où Ψ est une liaison hydroxyéthylène, (Tomita et al., 2008). (F) JNJ-8706646, (Orsini et al., 2007). (G) Peptide 234, Ac-(D-Ala)-Asn-Trp-Asn-Gly-Phe-Phe-(D-Trp)-Arg-Phe-NH₂, (Millar and Roseweir, 2009; Roseweir et al., 2009).

une β -(3-pyridyl)alanine ou par une D-Tyr, conduisent à des analogues de KP-10 qui présentent d'excellentes activités agonistes et une grande stabilité dans le sérum de souris (Asami et al., 2012a, 2012b). Toutes ces modifications ont contribué au développement des composés, TAK-448 et TAK-683 (Asami et al., 2013, 2014; Matsui et al., 2012), dont l'administration par voie sous-cutanée chez des volontaires sains et des patients atteints d'un cancer de la prostate, est bien tolérée et induit une diminution de la sécrétion de testostérone (MacLean et al., 2014; Scott et al., 2013). Plus récemment, une série d'analogues pseudopeptidiques du KP-10 a été développée en introduisant des modifications favorisant la résistance à la protéolyse, de type 1,2,3-triazole. Certains de ces analogues présentent une forte activité agoniste, et augmentent les concentrations plasmatiques de LH et FSH chez la brebis avec un système reproducteur quiescent (Beltramo et al., 2015). Une autre série d'analogues du KP-13 a été évaluée pour sa capacité à mobiliser le calcium intracellulaire dans une lignée cellulaire transfectée par le GPR54 et à déplacer la liaison de la métastine radio-iodée (Orsini et al., 2007). Il résulte de cette étude que 1) la substitution de la Leu¹¹ et l'Arg¹² par une Ile et une Lys, respectivement, ne modifie pas l'activité du peptide, et 2) les Phe⁹ et Phe¹³ du KP-13 peuvent être remplacées sans perte d'activité par des résidus à chaînes latérales cycliques hydrophobes plus ou moins encombrants tels qu'un Trp, une Tyr, une cyclohexylalanine (Cha) ou une 3-pyridinylalanine (3-Pal) (Orsini et al., 2007).

Les données de RMN et de RSA du KP-13 ont permis de définir des pharmacophores utilisés pour identifier par criblage virtuel des *hits* à partir de la chimiothèque de Johnson & Johnson (Orsini et al., 2007). Le composé JNJ-8706646 (Figure 20F), a ainsi été sélectionné et évalué pour sa capacité à déplacer la liaison de la métastine radio-iodée. Cette molécule, qui présente une affinité d'environ 700 nM, est le premier agoniste non-peptidique qui lie, même modestement, le GPR54. Par la suite, la compagnie Takeda Pharmaceutical a décrit les premiers antagonistes non-peptidiques du récepteur des kisspeptines après le criblage de leur chimiothèque interne. Basée sur des squelettes de 2-acylamino-3-cyano-4,6-diphénylpyridines, une première optimisations de substituants sur les deux cycles phényl couplée à la présence d'un groupement 2-thiénylcarboxamide a conduit à un composé, le 9I, présentant une affinité de 19 nM pour le GPR54 capable d'inhiber la mobilisation du calcium intracellulaire induit *in vitro* par le KP-10 (Kobayashi et al., 2010a). Parallèlement, une seconde série de 2-acyl-3-cyano-4,6-diphénylpyridines a été préparée et a mis en exergue le composé 15A présentant, entre autre une pipérazine comme substituant du cycle phényl en position 4 (Kobayashi et al., 2010b). Ce composé montre une affinité de 3 nM pour le GPR54 ainsi qu'une activité antagoniste *in vitro*. *In vivo*, le dérivé 15A réduit significativement le taux plasmatique de LH chez le rat castré suite

à son administration i.v. (Kobayashi et al., 2010b). Par ailleurs, un brevet a été déposé sur un antagoniste peptidique de la métastine, nommé peptide 234, qui a été développé à partir du KP-10 (Millar and Roseweir, 2009; Roseweir et al., 2009) (Figure 20G). Ce peptide déplace la métastine radio-iodée avec une IC_{50} de 2,7 nM et inhibe à 93% la libération d'inositol phosphate induite par le KP-10 à partir d'une lignée cellulaire exprimant le GPR54. *In vivo*, le peptide 234 inhibe la stimulation des neurones à GnRH par le KP-10, les libérations de GnRH et de LH induites par le KP-10 chez le rat et la souris mâles castrés, ainsi que chez la brebis (Millar and Roseweir, 2009; Roseweir et al., 2009). De même, les effets proathérosclérotiques du KP-10 sont complètement bloqués par l'infusion du peptide 234 chez la souris (Sato et al., 2017).

Chapitre 3 : Le26RFa et le QRFPR

3.1 Le 26RFa

3.1.1 Caractérisation du 26RFa

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé mes travaux de thèse a développé une stratégie basée sur une approche comparative pour identifier de nouveaux neuropeptides, ligands endogènes de RCPGs orphelins. Ce projet a notamment abouti à la découverte de trois neuropeptides majeurs, à savoir l'UII (Conlon et al., 1992; Coulouarn et al., 1998), la cortistatine (de Lecea et al., 1996; Tostivint et al., 1996; Vaudry et al., 1992) et le 26RFa (Chartrel et al., 2003), qui ont ensuite été appariés à trois récepteurs orphelins, *i.e.* le GPR14 pour l'UII (Ames et al., 1999), le MrgX2 pour la cortistatine (Allia et al., 2005; Robas et al., 2003) et le GPR103 pour le 26RFa (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). L'approche utilisée consiste, dans un premier temps, à isoler de nouveaux neuropeptides à partir du cerveau de la grenouille verte européenne, *Rana ridibunda*, rebaptisée ultérieurement *Rana esculenta* (Conlon et al., 2009). En effet, le cerveau des amphibiens est particulièrement bien adapté pour la purification de neuropeptides dans la mesure où la concentration de ces peptides y est beaucoup plus élevée (10 à 200 fois) que dans le cerveau des mammifères (Chartrel et al., 1998), ce qui facilite grandement les étapes de purification. Dans un deuxième temps, des séquences orthologues de ces nouveaux neuropeptides d'amphibiens sont recherchées chez les mammifères par une analyse bioinformatique couplée au clonage moléculaire. Là encore, le cerveau de grenouille s'avère être un modèle très approprié car l'expérience montre que la structure primaire des neuropeptides d'amphibiens est très proche, voire identique, à celle des neuropeptides humains. A titre d'exemple, la TRH, la GnRH, la somatostatine ou encore la neurokinine B ont exactement la même séquence chez la grenouille et chez l'homme (Bulant et al., 1992; Chartrel et al., 1998; Conlon et al., 1993; Tostivint et al., 1996). D'autres neuropeptides majeurs comme le NPY ou le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) ne diffèrent que par la substitution d'un seul aa souvent de même nature physicochimique (Chartrel et al., 1991a, 1991b).

Le criblage de fractions issues d'un extrait de cerveaux de grenouilles avec des anticorps dirigés contre le NPPF de bœuf a abouti à la purification de deux peptides possédant la signature RFamide à leur extrémité C-terminale. Le premier peptide RFamide identifié, qui possède 12 aa, a été nommé *Rana*-RFamide (R-RFa) (Chartrel et al., 2002). L'analyse structurale a révélé

Tableau 2 : Séquence du 26RFa chez l'homme, quelques vertébrés et un céphalochordé amphioxus

Espèce	Séquence
Homme	TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Chimpanzé ¹	TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Singe Rhésus ¹	ASGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Macaque ¹	ASGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Orang-outan ¹	ASGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Gibbon ¹	ASGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Ouistiti ¹	ASGPLRNLAEEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Eléphant ¹	TSGPLGSLAEELTGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Cheval ¹	ESGPLETLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Chien ¹	AHGPLGTLAEELSSYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Bœuf	VGGLLGTLAEEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Mouton ¹	VGGPLGTLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Porc ¹	ASGLLGTLAEEELHGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Panda ¹	ASGPLGTLAEELSTYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Rat	ASGPLGTLAEELSSYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Souris	ASGPLGTLAEELSSYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Cochon d'inde ¹	TS-PLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Hamster ¹	ASRPLGTLAEELSSYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Opossum ¹	QNSLLGSLAEELSGYIRKKGGFSFRF-NH ₂
Ornithorynque ¹	SGLLGNLAEELNGYRKKGGFSFRF-NH ₂
Poulet	GGGGTLGDLAEELNGYGRKKGGFAFRF-NH ₂
Caille	GGGGTLGDLAEELNGYSRKKGGFAFRF-NH ₂
Mandarin	SGTLGNLAEELINGYNRRKGGFTFRF-NH ₂
Grenouille verte	VG TALGSLAEELNGYNRKKGGFSFRF-NH ₂
Lézard ¹	AGGLEGLAEELHGYSRKKGGFSFRF-NH ₂
Poisson zèbre ¹	NEALTSIAGGLQAFNRQKGGFGFRF-NH ₂
Poisson rouge	QNEALTSIAGGLQAFNRQKGGFGFRF-NH ₂
Fugu ¹	NEALTSIAGELQAVSREKGGFGFRF-NH ₂
Epinoche ¹	NEALTSIAGGLQAVGREKGGIAFRF-NH ₂
Médaka ¹	NDALTSIAGGLQAVSREKGGFGFRF-NH ₂
Amphioxus ¹	RSAMLQQLAQLKNRPREKGGFTFRF-NH ₂

¹Peptide prédit à partir de la séquence génomique. Les aa conservés par rapport à la séquence du peptide humain sont indiqués en rouge. Les aa basiques qui pourraient potentiellement être impliqués dans le clivage sont représentés en vert.

par la suite que le R-RFa est l'orthologue de la GnIH des oiseaux et du RFRP-1 mammalien (cf chapitre 2, § 2.2.3) qui tous deux exercent des activités hypophysiotropes. De fait, il a été montré que, chez les amphibiens, le R-RFa stimule notamment la libération de GH (Koda et al., 2002). Le second peptide, qui contient 26 aa, a été désigné 26RFa (Chartrel et al., 2003).

Tableau 3 : Pourcentage d'identité de séquence du 26RFa entre quelques vertébrés et d'un céphalochordé amphioxus.

	homme	chimpanzé	singe Rhésus	macaque	orang-outan	gibbon	ouistiti	éléphant	cheval	chien	bœuf	mouton	porc	panda	rat	souris	cochon d'inde	hamster	opossum	ornithorynque	poulet	caillie	mandarin	grenouille	lézard	poisson zèbre	poisson rouge	fugu	épineche	médaka	amphioxus
homme	100	100	96	96	96	96	92	88	80	84	84	88	84	84	80	80	92	76	73	88	73	76	76	76	73	42	42	50	38	46	50
chimpanzé	100	100	96	96	96	96	92	88	80	84	84	88	84	84	80	80	92	76	73	88	73	76	76	76	73	42	42	50	38	46	50
singe Rhésus	96	96	100	100	100	100	96	88	84	88	88	88	88	88	84	84	88	80	73	88	76	80	80	76	42	42	50	38	46	50	
macaque	96	96	100	100	100	100	96	88	84	88	88	88	88	88	84	84	88	80	73	88	76	80	80	76	42	42	50	38	46	50	
orang-outan	96	96	100	100	100	100	96	88	84	88	88	88	88	88	84	84	88	80	73	88	76	80	80	76	42	42	50	38	46	50	
gibbon	96	96	100	100	100	100	96	88	84	88	88	88	88	88	84	84	88	80	73	88	76	80	80	76	42	42	50	38	46	50	
ouistiti	92	92	96	96	96	96	100	84	80	84	84	84	84	84	80	80	84	76	69	84	73	76	73	73	42	42	50	38	46	50	
éléphant	92	92	88	88	88	88	84	100	84	80	80	84	84	84	80	80	84	76	69	84	73	76	69	76	46	46	53	42	50	50	
cheval	88	88	88	88	88	88	84	100	84	80	84	88	84	84	80	80	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	50	
chien	80	80	84	84	84	84	80	80	100	84	88	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	46	
bœuf	84	84	84	84	84	84	80	80	84	88	88	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	46	
mouton	88	88	88	88	88	88	84	84	88	84	84	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	46	
porc	84	84	88	88	88	88	84	84	84	84	88	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	50	
panda	84	84	88	88	88	88	84	84	84	88	84	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	50	
rat	80	80	84	84	84	84	80	80	84	88	84	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	50	
souris	80	80	84	84	84	84	80	80	84	88	84	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	50	
cochon d'inde	92	92	88	88	88	88	84	84	80	84	84	84	84	84	84	84	84	76	69	84	73	76	69	73	42	42	50	38	46	50	
hamster	76	76	80	80	80	80	76	76	76	88	73	76	80	88	96	96	80	100	69	69	61	65	65	65	42	42	50	38	46	50	
opossum	73	73	73	73	73	73	69	69	69	73	73	73	76	73	69	69	69	69	100	76	69	69	61	76	42	42	50	53	46	50	
ornithorynque	88	88	88	88	88	88	84	80	80	73	84	80	84	76	73	73	80	69	76	100	76	76	80	76	42	42	50	42	42	50	
poulet	76	76	76	76	76	76	73	73	73	69	80	80	73	69	65	65	69	61	69	76	100	96	73	80	42	42	46	42	42	46	
caillie	80	80	80	80	80	80	76	76	76	73	84	84	76	73	69	69	69	65	69	76	96	100	73	76	42	42	50	38	46	46	
mandarin	76	76	76	76	76	76	69	69	69	61	69	69	69	65	69	69	76	65	61	80	73	73	100	65	42	42	42	42	42	50	
grenouille	76	76	76	76	76	76	73	73	73	69	84	84	73	69	65	65	73	65	76	76	80	73	65	100	53	53	53	46	50	46	
lézard	73	73	73	73	73	73	73	73	73	69	73	73	76	73	73	73	73	69	65	73	69	65	69	65	46	42	50	42	50	46	
poisson zèbre	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	100	96	100	84	80	84	42	
poisson rouge	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	96	100	80	80	80	80	42	
fugu	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	84	80	100	84	92	46	46	
épineche	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	80	80	80	80	80	88	42	
médaka	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	84	80	80	80	80	88	42	
amphioxus	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	46	42	42	42	42	42	46	100

100%, 75-99%, 51-74% et ≤50% d'identité de séquence.

Une recherche bioinformatique a permis d'identifier des séquences orthologues au 26RFa de grenouille chez plusieurs espèces de mammifères dont l'homme, le bœuf, le rat et la souris (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). La comparaison de la structure primaire du 26RFa humain avec celles des autres peptides RFamide de vertébrés indique que ce neuropeptide n'appartient à aucun des groupes de peptides RFamide connus à l'époque. En particulier, le 26RFa présente à son extrémité C-terminale le motif FRF-NH₂ qui n'est observé dans aucun autre peptide RFamide. Ces données montrent que le 26RFa est le premier représentant d'une nouvelle sous-famille de peptides RFamide (Chartrel et al., 2011). Le 26RFa a été ultérieurement caractérisé chez de nombreuses espèces de vertébrés (Tableau 2). L'analyse de la structure primaire du 26RFa chez ces différentes espèces montre que la séquence du neuropeptide a été fortement conservée de la grenouille à l'homme avec 65 à 100% d'identité de séquence (Tableaux 2 et 3). En particulier, l'heptapeptide C-terminal du 26RFa, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, a été totalement préservé chez les tétrapodes au cours de l'évolution, à l'exception des oiseaux, ainsi que le motif LAEEL dans la région centrale du neuropeptide, à l'exception du mandarin, suggérant que ces deux régions sont importantes pour l'activité biologique du peptide (Chartrel et al., 2011). En revanche, la séquence de la région N-terminale du 26RFa est plus variable entre les différentes espèces (Tableau 2).

3.1.2 Le prépro-26RFa

L'ADNc codant le précurseur du 26RFa a été cloné chez plusieurs espèces de vertébrés : l'homme, le bœuf, le rat, la souris, la caille, le poulet, le mandarin, le poisson rouge, le mérrou et le fugu (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003; Liu et al., 2009; Tobari et al., 2011; Ukena et al., 2010, 2014). Le gène codant le 26RFa est également retrouvé chez l'amphioxus *Branchiostoma Floridae*, seul invertébré chez lequel le peptide a été identifié (Elphick and Mirabeau, 2014; Xu et al., 2015). La séquence du prépro-26RFa comprend de 73 aa chez le plongeon à gorge rouge, ou plongeon catmarin, (*Gavia stellata*) à 552 aa chez le rat-taupe de Damara (*Fukomys damarensis*), dont un peptide signal de 15 à 39 aa et présente en position C-terminale un résidu glycine nécessaire à l'amidation (Chartrel et al., 2011; Leprince, 2017; Petersen et al., 2011). Dans tous les précurseurs, la séquence du 26RFa, qui est localisée à l'extrémité C-terminale du polypeptide, est précédée d'un résidu Lys hormis chez le toupaye (*Tupaia chinensis*), la petite chauve-souris brune (*Myotis lucifugus*), la musaraigne (*Sorex araneus*) et l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) parmi les mammifères (Figure 21).

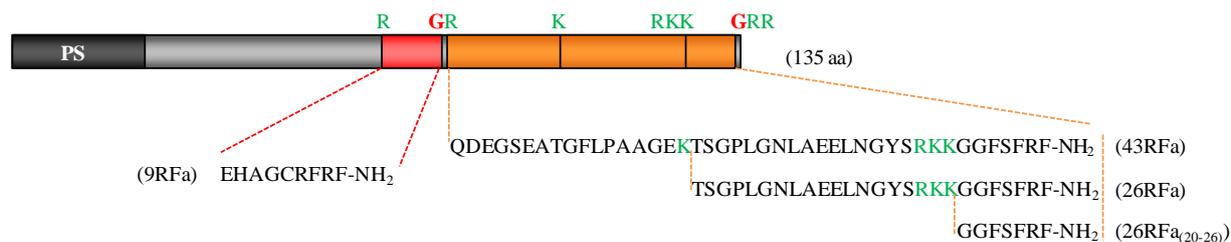


Figure 21: Représentation schématique du précurseur humain du 26RFa. Les aa basiques susceptibles d'être impliqués dans le clivage sont représentés en vert. La glycine servant à l'amidation est indiquée en rouge.

Un résidu Lys non-accompagné d'un autre aa basique au sein d'une séquence peptidique ne constitue pas un site de clivage canonique pour les PCs (cf chapitre 1, § 1.2.5.), mais il existe quelques exemples de peptides bioactifs générés par clivage du précurseur au niveau d'une lysine isolée comme la CCK-8 ou la GnIH (Rourke et al., 1997; Satake et al., 2001), suggérant que, chez les mammifères, le 26RFa pourrait être un produit final de maturation, à l'instar de ce qui a été montré chez la grenouille et la caille. De façon intéressante, le prépro-26RFa présente, en amont du 26RFa, une arginine seule (Figure 21) qui est conservée chez tous les mammifères et pourrait constituer un site de clivage reconnu par les PCs (Dupuy et al., 1994; Galanopoulou et al., 1995a, 1995b). De fait, plusieurs peptides RFamide comme le PrRP₂₀ (Hinuma et al., 1998), le NPAF (Vilim et al., 1999) ou les RFRP-1 et -3 (Fukusumi et al., 2001; Yoshida et al., 2003) sont issus du clivage au niveau d'un résidu Arg. Le clivage du précurseur du 26RFa au niveau de cette Arg peut générer une forme allongée de 43 aa, pyroglutamylée en N-terminal, qui a été nommée 43RFa ou QRFP (Figure 21). Cette forme est effectivement produite *in vitro* après transfection du prépro-26RFa humain dans des cellules CHO et a été purifiée à partir d'extraits de cerveau de rat (Fukusumi et al., 2003; Takayasu et al., 2006). De plus, la présence d'un site de clivage tribasique (Arg-Lys-Arg/Lys) au sein même de la séquence du 26RFa suggère que l'heptapeptide C-terminal GGFSFRF-NH₂, nommé 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, dont la séquence est hautement conservée chez tous les tétrapodes, pourrait lui aussi être produit à partir du précurseur (Figure 21). Enfin, le précurseur humain possède une autre séquence RFamide de 9 aa, nommée 9RFa, flanquée de deux résidus Arg (Chartrel et al., 2003), suggérant que ce second peptide RFamide pourrait aussi constituer un produit de maturation (Figure 21). Cependant, à l'heure actuelle, on ne sait toujours pas si le 9RFa est réellement généré chez l'homme. Les formes moléculaires issues de la maturation du précurseur du 26RFa ont été étudiées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) combinée à une quantification radioimmunologique à partir de fractions pré-purifiées d'hypothalamus et de

moelle épinière d'homme (Bruzzone et al., 2006). Deux pics immunoréactifs qui présentent un temps de rétention similaire à ceux du 26RFa et du 43RFa ont ainsi été isolés avec un ratio 26RFa:43RFa de 3:1 dans l'hypothalamus et de 1,2:1,0 dans la moelle épinière. En revanche, à ce jour, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ n'a été mis en évidence chez aucune espèce.

Afin de déterminer la structure tridimensionnelle du 26RFa, une étude par CD et par modélisation moléculaire sous contraintes RMN a été réalisée dans différents milieux (Thuau et al., 2005). Il apparaît que, dans le méthanol, une hélice α se forme dans la région centrale du peptide entre les résidus Pro⁴ et Arg¹⁷, alors que les domaines N- et C-terminaux ne semblent pas structurés (Figure 22). De fait, les spectres de CD du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ enregistrés dans les milieux aqueux ou partiellement organiques (H₂O/trifluoroéthanol) montrent une structure aléatoire (Neveu et al., 2012). De même, l'étude en RMN confirme une grande flexibilité conformationnelle de cet heptapeptide dans l'eau contenant 10% de diméthylsulfoxyde avec, néanmoins, une légère tendance à l'établissement d'un feuillet β dans lequel les chaînes latérales hydrophobes (Phe²², Phe²⁴ et Phe²⁶) sont regroupées d'un même côté de la molécule et les résidus hydrophiles (Ser²³ et Arg²⁵) de l'autre côté (Georgsson et al., 2014). En revanche, dans un milieu contenant du dodécylphosphocholine (DPC), une structure coudée se stabilise nettement au sein du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ qui pourrait refléter la structure de l'extrémité C-terminale du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ en interaction avec son récepteur (Thuau et al., 2005). La forte conservation, des amphibiens jusqu'aux mammifères, des aa responsables du caractère amphipatique de l'hélice α et du domaine flexible C-terminal suggère que ces deux régions pourraient jouer un rôle important dans l'interaction du 26RFa avec son récepteur et/ou dans son activation (Thuau et al., 2005).

3.1.3 Distributions centrale et périphérique du 26RFa

L'expression du gène codant le 26RFa a été étudiée chez le rat, la souris et l'homme par PCR quantitative et hybridation *in situ*. Chez ces trois espèces, les niveaux les plus élevés de transcrits du 26RFa ont été détectés dans le cerveau (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003; Kampe et al., 2006; Takayasu et al., 2006). Le 26RFa est exprimé dans l'hypothalamus, notamment dans le noyau ventromédian, l'aire hypothalamique latérale, la partie latérale et dorsale du noyau arqué et l'aire rétrochiasmatisque, ainsi que dans la corne dorsale de la moelle épinière (Bruzzone et al., 2006; Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Kampe et al., 2006; Takayasu et al., 2006) (Figure 23). Au niveau périphérique, les ARNm du 26RFa sont détectés dans la trachée, la glande mammaire, les glandes surrénales et le testicule (Fukusumi et al.,

2003; Ramanjaneya et al., 2013; Takayasu et al., 2006). Les ARNm du 26RFa ont été également retrouvés dans les lignées cellulaires murines INS-1E (Granata et al., 2014) et les cellules MIN6 pancréatiques (Prévost et al., 2015).

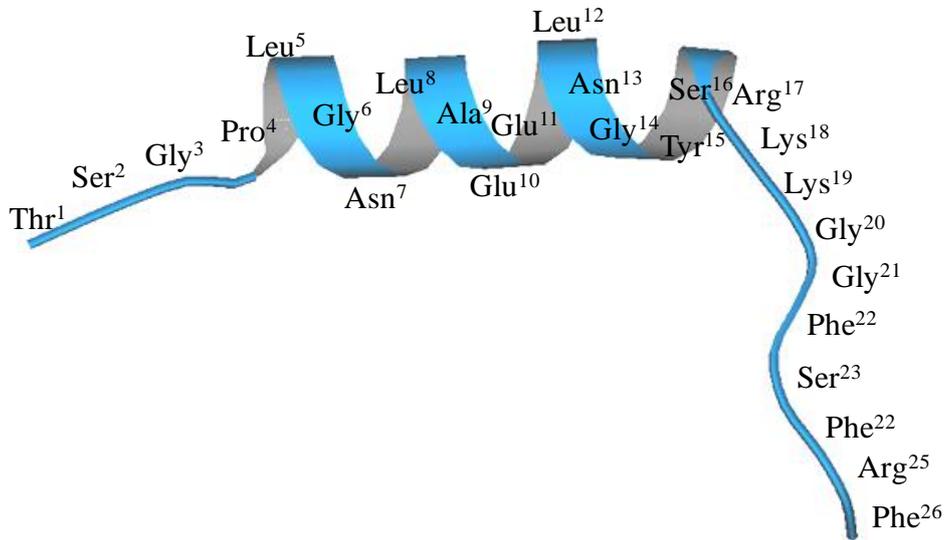


Figure 22 : Structure secondaire du 26RFa humain obtenue par modélisation moléculaire sous contraintes RMN dans le méthanol. Le peptide se structure en une hélice α , qui s'étend des résidus Pro⁴ jusqu'à Arg¹⁷, flanquée de deux régions non-structurées. D'après Thuau et al., 2005.

Chez l'homme, la distribution des ARNm du 26RFa est différente de celle observée chez les rongeurs puisque le gène du 26RFa est fortement exprimé dans le cervelet, le bulbe rachidien, les noyaux vestibulaires et, dans une moindre mesure, dans l'hypothalamus (Jiang et al., 2003). Au niveau périphérique, le 26RFa est exprimé dans diverses glandes endocrines dont l'hypophyse, la thyroïde, la glande surrénale, les îlots pancréatiques humains et le testicule, mais aussi dans le système cardiovasculaire, l'intestin, la prostate et la vessie (Jiang et al., 2003; Prévost et al., 2015; Ramanjaneya et al., 2013). Au niveau de la prostate, une expression intense du 26RFa a été observée, le niveau d'expression de l'ARNm étant plus haut dans la prostate que l'hypothalamus (Jiang et al., 2003). Notons que l'expression tumorale prostatique du 26RFa est positivement corrélée à la sévérité de la tumeur (Alonzeau et al., 2013). Les transcrits du 26RFa sont également exprimés par la lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain, suggérant que le 26RFa pourrait constituer un potentiel biomarqueur pour le diagnostic de différents types de cancers (Ramanjaneya et al., 2013). Ces observations révèlent l'existence

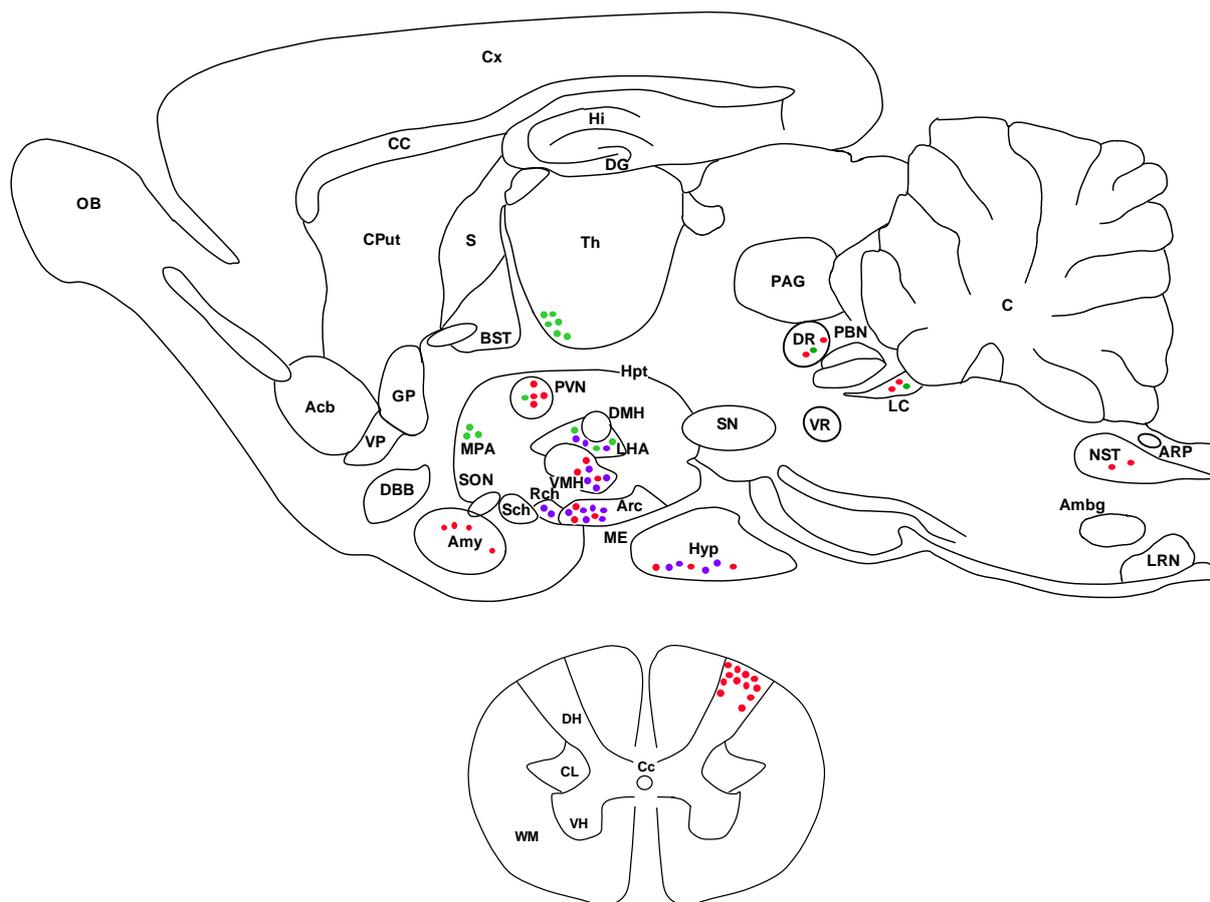


Figure 23: Localisation neuroanatomique et hypophysaire du 26RFa et des deux sous-types du GPR103 chez le rat. (A) Représentation schématique de la distribution des neurones exprimant le 26RFa (●), le QRFP-r1 (●) et le QRFP-r2 (●) sur une section parasagittale de cerveau de rat. Acb, noyau accumbens; Ambg, noyau ambigu; Amy, amygdale; Arc, noyau arqué de l'hypothalamus; ARP, aera postrema ; BST, noyau du lit de la strie terminale; C, cervelet; CC, corps calleux; CPut, putamen; Cx, cortex cérébral; DBB, bande diagonale de Broca; DG, gyrus denté; DMH, noyau dorsomédian de l'hypothalamus; DR, noyau du raphé dorsal; GP, globus pallidus; Hi, hippocampe; Hpt, hypothalamus; Hyp, hypophyse ; LC, locus cœruleus; LHA, aire hypothalamique latérale; LRN, noyau réticulaire latéral; ME, éminence médiane; MPA, aire préoptique médiane; NST, noyau du tractus solitaire; OB, bulbe olfactif; PAG, substance grise péri-épendymaire; PBN, noyau parabrachial; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus; Rch, aire rétrochiasmatique; S, septum; Sch, noyau suprachiasmatique; SN, substance noire ;SON, noyau supraoptique; Th, thalamus; VMH, noyau ventromédian de l'hypothalamus; VP, globus pallidus ventral; VR, noyau du raphé ventral. (B) Représentation schématique de la distribution des ARNm du 26RFa (●), du QRFP-r1 (●) et du QRFP-r2 (●) au niveau d'une coupe coronale de moelle épinière de rat. Cc, canal central; CL, corne latérale; DH, corne dorsale; VH, corne ventrale; WM, substance blanche. D'après Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Bruzzone et al., 2007; Kampe et al., 2006; Takayasu et al., 2006.

de fortes variations de l'expression du gène du 26RFa dans le SNC et les tissus périphériques d'une espèce à l'autre.

Chez l'homme, les marquages par immunohistochimie et hybridation *in situ* ont montré que, dans l'hypothalamus, les neurones à 26RFa sont essentiellement localisés en bordure du 3^{ème} ventricule dans les noyaux paraventriculaire et ventromédian (Bruzzone et al., 2006). Des neurones exprimant le 26RFa et des fibres 26RFa-immunoréactives sont également observés dans les cornes dorsale et latérale de la moelle épinière (Bruzzone et al., 2006).

3.2 Le récepteur du 26RFa, le QRFPR

3.2.1 Caractérisation du récepteur du 26RFa

Comme tous les autres peptides RFamide préalablement découverts chez les mammifères, le 26RFa a été identifié comme étant le ligand d'un RCPG, jusqu'alors orphelin (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). Le récepteur du 26RFa, nommé initialement GPR103 (ou AQ27 ou encore SP9155), et plus récemment rebaptisé *QRFPR receptor* (QRFPR) (Bonner et al., 2016), présente une homologie de séquence de 35 à 52% avec les récepteurs NPFF-1 et -2, Y2 du NPY, Gal-R1 de la galanine ainsi qu'avec les récepteurs des orexines et de la CCK (Jiang et al., 2003; Lee et al., 2001). Le QRFPR appartient à la famille des RCPGs de classe A. En plus de posséder les caractéristiques communes à tous les RCPGs, les membres de cette famille présentent certaines particularités telles que la présence 1) d'un résidu aspartate au niveau du domaine transmembranaire 2 (TM2), important pour le couplage aux protéines G; 2) d'une séquence conservée de deux résidus Asp/Glu-Arg dans la partie N-terminale de l'*intracellular loop 2* (ICL2); 3) de deux cystéines formant un pont disulfure entre l'*extracellular loop 1* et 2 (ECL1 et ECL2); et 4) de quatre aa Phe, Pro, Asn et Arg localisés dans les domaines TM6 et TM7 importants pour l'activation du récepteur (Kristiansen, 2004) (Figure 24). Les premières études pharmacologiques ont montré que le 26RFa humain lie le QRFPR avec une haute affinité ($IC_{50} = 3,2$ nM) (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). Le 26RFa induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ ainsi qu'une diminution dose-dépendante de la production d'AMPC dans des cellules CHO et HEK293 transfectées avec le QRFPR (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). La capacité du 26RFa à mobiliser le calcium intracellulaire *via* le QRFPR n'est pas compromise par l'addition de PTX (Jiang et al., 2003). Ces données suggèrent donc que le QRFPR est couplé à une protéine $G_{i/o}$ et/ou à une protéine G_q (Fukusumi et al., 2003). De plus, il a été montré que le 43RFa présente une efficacité similaire à celle du 26RFa sur l'inhibition

de l'AMPc, mais lie le QRFPR avec une affinité plus grande que le 26RFa ($IC_{50} = 0,52$ nM) (Fukusumi et al., 2003). En revanche, l'affinité du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ pour le QRFPR est beaucoup plus faible, indiquant que la séquence complète du 26RFa est nécessaire pour une interaction maximale du ligand avec le QRFPR (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). Parallèlement, il a aussi été montré que le QRFPR n'est pas activé par le PrRP et les RFRP-1 et -3 (Fukusumi et al., 2003), suggérant que ce récepteur reconnaît spécifiquement le 26RFa et sa forme allongée, mais pas les autres membres de la famille RFamide.

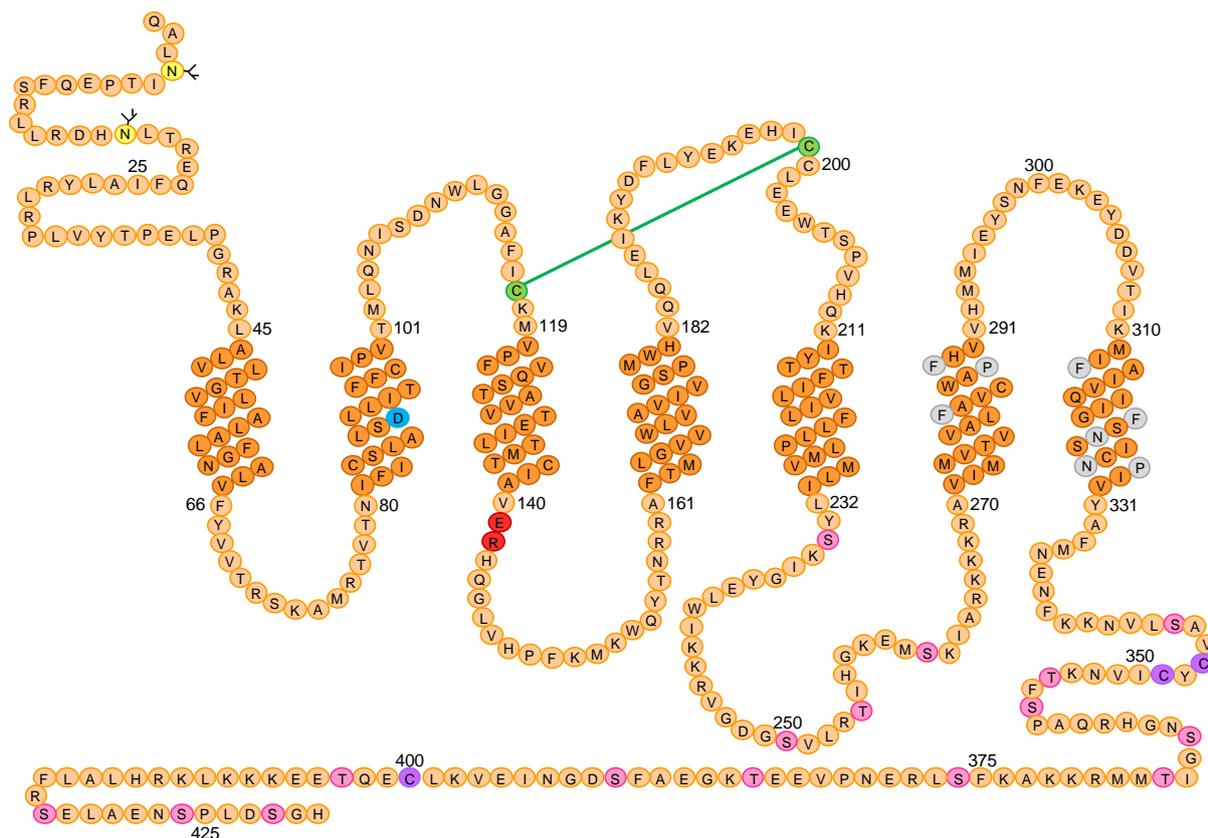


Figure 24: Représentation schématique du QRFPR humain. Les sept domaines transmembranaires sont représentés par des disques orange foncé et les domaines extra- et intracellulaires par des disques orange clair. Les sites de glycosylation, phosphorylation, palmitoylation potentiels sont respectivement indiqués en jaune, rose et violet. Les cystéines potentiellement impliquées dans la formation d'un pont disulfure sont signalées en vert. Le motif E/DR et l'Asp conservés sont figurés en rouge et bleu, respectivement. Les résidus Phe, Pro, Asn et Arg en gris correspondent aux aa importants pour l'activation du récepteur.

Une recherche bioinformatique menée dans le génome de la souris a permis d'identifier deux récepteurs putatifs du 26RFa, homologues du GPR103 humain, qui ont été nommés GPR103A et GPR103B (Takayasu et al., 2006). Par la suite, ces récepteurs ont été clonés à partir du cerveau de souris révélant que le QRFPR humain partage 85% d'identité de séquence avec le GPR103A et 79% avec le GPR103B alors que les deux sous-types murins présentent 75%

d'identité entre-eux (Takayasuet al., 2006). Les deux récepteurs lient le 26RFa avec la même affinité mais sont distribués de manière différentielle dans le cerveau de la souris (Takayasu et al., 2006). De façon similaire, deux sous-types du QRFPR ont été caractérisés chez le rat et nommés QRFPR-r1 et QRFPR-r2 (Kampe *et al.*, 2006). Le QRFPR-r1 et le QRFPR-r2 partagent 84% et 82% d'identité, respectivement, avec le QRFPR humain et présentent 78% d'identité entre-eux (Kampe *et al.*, 2006). Le 26RFa montre une efficacité similaire pour les deux récepteurs transfectés dans des cellules COS-7 sur la formation d'inositol triphosphate, suggérant que le second récepteur pourrait être lui aussi couplé à une protéine G_q (Kampe et al., 2006). Deux sous-types de QRFPR ont été identifiés chez d'autres rongeurs comme le hamster de Chine (*Cricetulus griseus*), le hamster doré (*Mesocricetus auratus*), le campagnol (*Microtus ochrogaster*) et la souris sylvestre (*Peromyscus maniculatus*) (Ukena et al., 2014). L'existence de deux formes de QRFPR semble être une spécificité des rongeurs car jusqu'à présent, un second gène codant le QRFPR n'a été identifié dans le génome d'aucune autre espèce de vertébrés.

3.2.2 Modèle tridimensionnel du QRFPR et docking du peptide

La rhodopsine est restée pendant longtemps le seul représentant de la famille de protéines transmembranaires de type RCPG à avoir été cristallisée et structurellement caractérisée. Les avancées technologiques les plus récentes ont rendu plus abordable la détermination des structures de RCPG et à l'heure actuelle, près de 100 structures cristallisées de RCPG ont été déterminées (Shonberg et al., 2015). Toutefois les modèles tridimensionnels basés sur l'homologie de séquence reste une approche très utilisée (Costanzi and Wang, 2014; Morales et al., 2017). Ainsi, Neveu et ses collaborateurs ont construit un modèle 3D du *h*QRFPR à partir des données cristallographiques de la forme inactive du récepteur β 2 adrénergique avec lequel, il présentait, à l'époque, la plus forte homologie de séquence (26%) (*Protein Data Bank*, 2RH1) (Neveu et al., 2014). Outre les 7 domaines TM, le modèle présente tout comme le récepteur β 2 adrénergique, une courte hélice- α non-transmembranaire dans la partie ECL2 qui s'étend entre les résidus Ile¹⁸⁸ et Lys¹⁹⁶, et une seconde entre les résidus Glu³³⁷ et Val³⁴⁷ de la partie C-terminale intracellulaire, nommée hélice 8 (Figure 25), qui pourraient être impliquées respectivement dans la première étape de la reconnaissance moléculaire ligand/récepteur et les mécanismes de signalisation (Dror et al., 2011; González et al., 2011; Kruse et al., 2012). Dans ce modèle, le *h*QRFPR expose à sa surface externe une poche de liaison profonde et assez étroite susceptible d'accueillir le 26RFa (Neveu et al., 2014). Le fragment biologiquement actif,

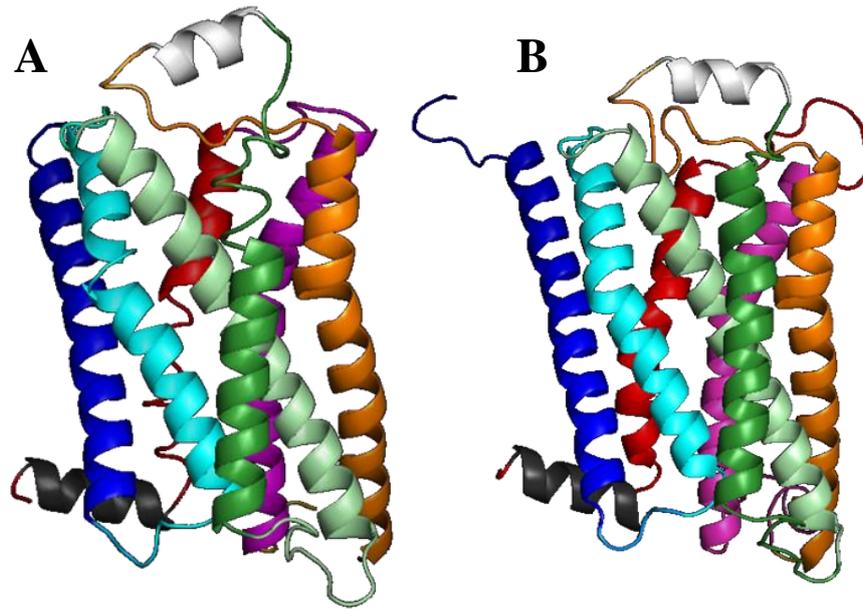


Figure 25: Représentation tridimensionnelle du récepteur $\beta 2$ adrénergique (A) et de modèle 3D de QRFPR (B). Les hélices TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7 sont représentées respectivement en bleu foncé, bleu clair, vert clair, vert foncé, orange, fushia et rouge. L'hélice de l'ECL2 est représentée en gris clair et l'hélice 8 située au sein de l'extrémité C-terminale en gris foncé. Par souci de clarté, l'insert T4-lysozyme qui remplace la boucle intracellulaire ICL3 du récepteur $\beta 2$ a été volontairement supprimé.

26RFa₍₁₉₋₂₆₎, a été «docké» dans le modèle tridimensionnel. Au sein du complexe le plus stable, le 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ se positionne entre les hélices TM3, TM5 et TM6. La triade Phe-Arg-Phe-NH₂ du peptide se loge en profondeur dans la cavité du récepteur, alors que la Lys¹⁹ N-terminale du peptide est orientée vers l'extérieur de la poche d'interaction, suggérant que l'hélice amphiphile en amont de cette position reste à la surface de la cellule (Neveu et al., 2014). Parmi le répertoire d'interactions entre le 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ et le hQRFPR recueillies, les interactions les plus fortes s'établissent entre la chaîne latérale de l'arginine 25 du 26RFa et celles de la glutamine 125 et de l'acide glutamique 132 localisés au niveau supérieur de l'hélice du TM3 (Neveu et al., 2014), connue pour jouer un rôle prépondérant dans la structure et la fonction des RCPG de classe A (Venkatakrisnan et al., 2013). De façon intéressante, le même type d'interaction ligand-récepteurs a été rapporté pour deux RFamide d'insectes, la SK et la dromyosuppressine et leur récepteurs respectifs (Bass et al., 2014; Rasmussen et al., 2015).

3.2.3 Mécanismes de signalisation cellulaire

Une étude pionnière menée sur les cellules hypophysaires de rat a montré que le 26RFa provoque une augmentation de la production d'AMPc, en présence de forskoline, *via* un couplage à une protéine de type $G\alpha_s$, (Chartrel et al., 2003) (Figure 26). L'implication de l'adénylyl cyclase dans la signalisation du QRFPRa, par la suite, été confirmée dans les îlots pancréatiques humains et dans la lignée d'insulinome de rat INS-1E (Granata et al., 2014) (Figure 26). Il est intéressant de noter, que sur ces deux types cellulaires, le 26RFa présente un effet insulino-statique lié au recrutement d'une protéine $G\alpha_{i/o}$ alors que le 43RFa, conduit à un effet insulino-tropique dépendant d'une protéine $G\alpha_s$, suggérant la possibilité du QRFPR à basculer entre une signalisation $G\alpha_{i/o}$ et $G\alpha_s$, comme décrit pour le récepteur V2 de la vasopressine et celui de la GnRH (Granata et al., 2014; Krsmanovic et al., 2003; Ren et al., 2005). *In vivo*, la perfusion du 26RFa au niveau du pancréas réduit la sécrétion d'insuline *via* un couplage $G\alpha_i$ (Egido et al., 2007). De la même façon, l'activation du QRFPR dans les cellules de la lignée adrénocorticale H295R, conduit à une réduction de la production d'AMPc induite par la forskoline (Ramanjaneya et al., 2013). Le QRFPR est également couplé à une protéine $G\alpha_{q/11}$, impliquant la signalisation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). En particulier, dans les cellules H295R, le 43RFa provoque un influx d'ions calcium au travers de canaux calciques voltage dépendant de type T, conduisant une activation de la PKC puis à la phosphorylation d'ERK 1/2 (Ramanjaneya et al., 2013) (Figure 26). L'activation du QRFPR par le 43RFa conduit également à la phosphorylation d'ERK 1/2 dans la lignée INS-1E (Granata et al., 2014) mais aussi, dans le cas d'une hétérodimerisation du QRFPR avec le récepteur des orexines (Davies et al., 2015). Le 26RFa augmente la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules HEK293 transfectées par le QRFPR humain ou de poulet (Ukena et al., 2010; Takayasu et al., 2006). Ces études indiquent que différentes protéines G sont capables de coupler le QRFPR, comme la majorité des RCPG, à des voies de signalisation intracellulaires multiples, fournissant au système 26RFa/QRFPR une grande diversité sur le plan fonctionnel. A ce jour aucune étude n'a été effectuée sur les voies de signalisation potentiellement altérées dans les pathologies liées au complexe 26RFa/QRFPR.

3.2.4 Distribution tissulaire du QRFPR

La distribution du gène codant le QRFPR a été étudiée chez le rat, la souris et l'homme dans le SNC ainsi que dans de nombreux tissus périphériques. Chez le rat, les taux les plus élevés

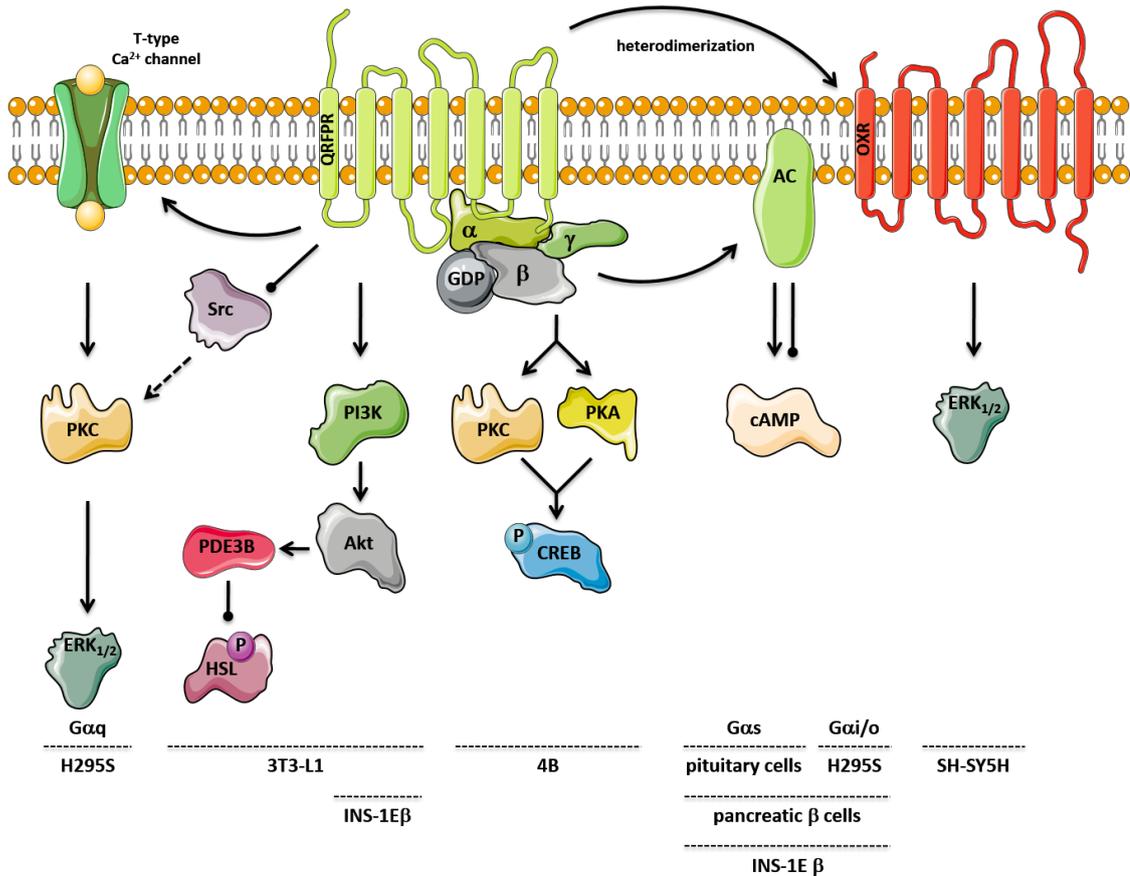


Figure 26: Représentation schématisée du couplage du QRFP dans différentes cellules, après son activation par le 26RFa et/ou 43RFa. Akt, *protein kinase*; CREB, *cAMP response element-binding*; HSL, *hormone-sensitive lipase*; OXR, *orexin receptor*; P, phosphorylation; PDE3B, *phosphodiesterase 3B*; SRC, *sarcoma kinase*.

d'ARNm du QRFP-r1 sont présents dans le cerveau, et plus particulièrement dans les noyaux arqué, ventromédian et paraventriculaire de l'hypothalamus (Figure 23), mais aussi dans les cellules β INS-1E pancréatique et la zone glomérulée de la glande surrénale, alors que des niveaux modérés ont été observés dans le cortex cérébral, le bulbe rachidien, l'œil et le testicule (Bruzzone et al., 2007; Fukusumi et al., 2003; Granata et al., 2014; Kampe et al., 2006). Une forte expression du variant QRFP-r2 est observée dans plusieurs noyaux du thalamus, tels que les noyaux réunis et parafasciculaire, ainsi que dans l'hypothalamus, notamment dans les aires préoptique et hypothalamique latérale, et dans certains noyaux du tronc cérébral comme le noyau dorsal du raphé ou le locus cœruleus (Kampe et al., 2006) (Figure 23). Dans le SNC du rat, les sites de liaison du 26RFa sont largement distribués et sont présents en forte densité dans la couche des cellules granulaires du bulbe olfactif, dans le cortex piriforme, la formation

hippocampale, le complexe amygdaloïde, les noyaux réunis et parafasciculaire du thalamus, de nombreux noyaux de l'hypothalamus tels que les noyaux ventrolatéral, ventromédian, paraventriculaire, arqué et les aires hypothalamiques antérieure et dorsomédiane, ainsi que dans le colliculus inférieur, le noyau du raphé dorsal, les noyaux abducens accessoire, ambigu et Roller du bulbe rachidien et la corne dorsale de la moelle épinière (Bruzzone et al., 2007). Dans le SNC de la souris, le transcrite du GPR103A est aussi fortement exprimé dans l'hypothalamus, le cortex cérébral et la moelle épinière (Jiang et al., 2003). Au niveau périphérique, les tissus montrant les taux les plus élevés d'ARNm du GPR103A sont l'œil et les os, les analyses par RT-PCR montrent que l'ARNm du QRFPR est exprimé également dans les cellules MIN6 pancréatique (Baribault et al., 2006; Prévost et al., 2015). Une étude neuroanatomique plus précise, par hybridation *in situ*, a montré que les deux sous-types du récepteur du 26RFa sont distribués de manière différentielle dans plusieurs régions du cerveau de souris. Ainsi, une forte expression des ARNm du GPR103A a été détectée dans le bulbe olfactif et le noyau du tractus solitaire, alors que les transcrits du GPR103B sont majoritairement exprimés dans le noyau hypothalamique paraventriculaire et le noyau magnocellulaire de l'hypothalamus latéral, ainsi que dans les noyaux supramammillaire médian et réticulaire (Takayasu et al., 2006).

Chez le poulet, les ARNm du QRFPR sont principalement détectés dans le diencéphale et le mésencéphale (Ukena et al., 2010).

Chez l'homme, des taux élevés d'ARNm du QRFPR sont observés dans le cortex cérébral, l'hypothalamus et les noyaux vestibulaires (Jiang et al., 2003). A la périphérie, le gène du QRFPR est exprimé dans la rétine, l'hypophyse, les îlots pancréatiques humains en culture, le cœur, le rein, le testicule et l'os (Baribault et al., 2006; Granata et al., 2014; Jiang et al., 2003; Lee et al., 2001; Prévost et al., 2015).

3.3 Activités biologiques du 26RFa

3.3.1 Rôle du 26RFa dans le contrôle de la prise alimentaire

L'expression restreinte des ARNm du prépro-26RFa dans certaines aires hypothalamiques, en particulier dans le noyau ventromédian, l'aire latérale et le noyau arqué (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003), trois régions impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique, suggère que le 26RFa pourrait jouer un rôle dans le contrôle du comportement alimentaire. De fait, il a été montré que des injections i.c.v. de 26RFa provoquent une augmentation dose-dépendante de la consommation de nourriture chez la souris (Chartrel et al., 2003). L'administration centrale de 43RFa de même que celle de 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ exercent un effet similaire

à celui du 26RFa sur la prise alimentaire (do Rego et al., 2006). En revanche, le 26RFa₍₁₋₁₆₎ et le 26RFa₍₈₋₁₆₎ sont sans effet sur la prise alimentaire (do Rego et al., 2006). L'ensemble de ces observations indique que l'activité orexigène du 26RFa est portée par l'octapeptide C-terminal, dont la séquence a été hautement conservée au cours de l'évolution des tétrapodes à l'exception des oiseaux (Tableau 2).

Par la suite, d'autres études ont montré que le 43RFa joue un rôle important dans l'homéostasie énergétique en régulant l'appétit et la dépense énergétique (Moriya et al., 2006). Ainsi, l'administration chronique de 43RFa par voie centrale provoque une augmentation dose-dépendante de la prise alimentaire chez la souris, accompagnée d'une augmentation de la masse corporelle et de la masse grasse (Moriya et al., 2006). L'infusion prolongée de 43RFa provoque également une élévation des taux plasmatiques d'insuline, de leptine, de cholestérol ainsi qu'une réduction significative de la température rectale et de l'expression de la *uncoupling protein 1* (UCP-1) dans le tissu adipeux brun (Moriya et al., 2006). L'UCP-1 est responsable de l'oxydation des graisses nécessaires à la production de chaleur (Ricquier, 1998) et la diminution de son expression, corrélée à une baisse de la température corporelle, met en évidence un ralentissement de la thermogenèse chez les souris. En complément, une étude récente montre que les souris invalidées pour le 26RFa sont hypophagiques, ce qui soutient fortement l'effet orexigène du 26RFa (Okamoto et al., 2016). De plus, il a été rapporté que l'expression du gène codant le précurseur du 43RFa/26RFa est fortement augmentée chez des souris soumises à un jeûne (Takayasu et al., 2006). L'ensemble de ces données indique que le 43RFa est impliqué dans le comportement alimentaire à court terme et dans le maintien de l'homéostasie énergétique à plus long terme. L'effet orexigène du 43RFa n'est pas diminué chez les souris dont le gène codant les orexines a été invalidé mais il est atténué par un antagoniste Y1 (BIBP 3226), suggérant que le 43RFa exerce son activité orexigène en partie *via* les neurones à NPY (Takayasu et al., 2006). Néanmoins, aucune variation de poids n'est observée chez les souris dont le gène codant pour le GPR103A est invalidé comparativement aux animaux sauvages (Baribault et al., 2006). Cette absence d'effet peut s'expliquer par la redondance des systèmes neuropeptidergiques intervenant dans le contrôle du comportement alimentaire, laquelle permet de compenser le dysfonctionnement d'une de ces composantes (Beck, 2001).

Dans la plupart des études, les effets stimulateurs du 26RFa ou du 43RFa sur la prise alimentaire observés chez la souris ne le sont pas chez le rat (Kampe et al., 2006; Patel et al., 2008; Primeaux et al., 2008). Kampe et ses collaborateurs (2006) n'ont observé qu'un léger effet orexigène du 26RFa durant les deux premières heures post-injection chez le rat soumis à un régime calorique

normal. Cette même équipe rapporte également que le 26RFa n'a aucune influence sur la dépense énergétique chez le rat, contrairement à ce qui avait précédemment été montré chez la souris (Moriya et al., 2006). De même, Patel et ses collaborateurs (2008) n'ont observé aucun effet orexigène du 43RFa chez le rat que ce soit 1 h ou 24 h après l'administration centrale du neuropeptide. En revanche, l'injection i.c.v. de 43RFa ou de 26RFa stimule la prise alimentaire de façon dose-dépendante lorsque les rats sont préalablement soumis à un régime hypercalorique (Primeaux, 2011; Primeaux et al., 2008). De plus, l'expression du gène codant le 26RFa est augmentée dans les noyaux ventromédian et arqué des rats dont l'alimentation est riche en calories (Primeaux et al., 2008, 2013) comme cela avait précédemment été observé chez les souris *ob/ob* et *db/db* (Takayasu et al., 2006), suggérant que le 26RFa pourrait jouer un rôle important dans le développement de l'obésité de ces animaux. Toutefois, l'effet orexigène du 43RFa et du 26RFa ainsi que l'augmentation des taux d'ARNm du 26RFa n'ont pas été retrouvés chez les rats recevant une alimentation pauvre en lipides (Primeaux et al., 2008, 2013). Quel que soit le régime alimentaire, aucune variation de l'expression du QRFPR n'a été observée dans les noyaux ventromédian et arqué chez le rat (Primeaux et al., 2008). Dans le noyau arqué, les populations de neurones à NPY et POMC intègrent les stimuli extérieurs et régulent *in fine* l'homéostasie énergétique : le NPY stimule l'appétit en interagissant avec les récepteurs Y1 et Y5 présents sur les neurones à POMC tandis que l' α -MSH, dérivée de la POMC, exerce son activité anorexigène par le biais des récepteurs MC3R et MC4R (Lin et al., 2004; Marsh et al., 1998; Millington, 2007) (Figure 27). Chez le rat, l'administration i.c.v. de 26RFa provoque une surexpression des ARNm du NPY ainsi qu'une augmentation de libération de NPY dans l'hypothalamus basal. Le 26RFa induit également une diminution de l'expression des ARNm codant la POMC associée à une chute de la libération d' α -MSH (Lectez et al., 2009). Les auteurs montrent également que le GPR103, présent sur une certaine population de neurones à NPY, est absent de la surface des neurones à POMC, et que l'injection i.c.v. préalable d'antagonistes des récepteurs Y1 et Y5 abolit les effets orexigènes du 26RFa. Par ailleurs, le 26RFa antagonise les effets de la leptine sur l'expression et la libération de NPY, sur l'expression du gène codant l'ARNm de la POMC, sur la libération d' α -MSH et sur la prise alimentaire (Lectez et al., 2009). Cette étude est la seule à montrer que le 26RFa exerce un effet orexigène significatif chez le rat, et que cet effet est lié à l'augmentation de la libération de NPY dans le noyau arqué, laquelle inhibe l'activité des neurones à POMC (Lectez et al., 2009) (Figure 27).

3.3.2 Rôle du 26RFa dans le contrôle de l'homéostasie glucidique

Des expériences menées sur des pancréas de rat isolés ont révélé que l'infusion de 26RFa inhibe la sécrétion pancréatique d'insuline induite par le glucose et l'arginine, suggérant que le 26RFa pourrait également moduler la libération d'hormones agissant sur le contrôle central de la prise alimentaire (Egido et al., 2007). En accord avec ces travaux, une autre équipe a montré que le 26RFa inhibe la sécrétion d'insuline basale et stimulée par le glucose dans les cellules INS-1E de rat et les îlots pancréatiques humains (Granata et al., 2014). Cependant, l'effet insulino-statique du 26RFa n'est pas abolit par l'inactivation du QRFPR par des siRNA suggérant l'implication d'un autre récepteur, qui pourrait être le NPPF-2 (Gesmundo et al., 2017; Granata et al., 2014). Contrairement au 26RFa, le 43RFa favorise la sécrétion d'insuline basale et stimule dans les cellules β pancréatiques humaines l'absorption du glucose (Gesmundo et al., 2017; Granata et al., 2014). Par ailleurs, le 43RFa améliore, alors que le 26RFa atténue, l'effet insulino-tropique de l'exendin-4, un analogue du GLP-1, dans les cellules β et les îlots pancréatiques humains (Granata et al., 2014). Malgré leurs effets opposés sur la sécrétion d'insuline, le 26RFa et 43RFa sont capables de promouvoir la survie, la prolifération et de réduire l'apoptose des cellules β et INS-1E cultivées dans un sérum contenant des stimulants diabétogéniques, tels que les cytokines inflammatoires (Gesmundo et al., 2017; Granata et al., 2014). Le 43RFa induit son effet protecteur *via* l'activation des voies de signalisation de survie et prolifération cellulaires PI3K/Akt et ERK1/2, alors que le 26RFa active la phosphorylation d'ERK1/2 mais pas celle de PI3K/Akt. Globalement, ces résultats soulignent un rôle protecteur commun du 26RFa et 43RFa sur les cellules β et les îlots pancréatiques humains, mais des effets opposés sur la sécrétion d'insuline, probablement liés à des mécanismes d'activations différents. De façon contradictoire, une étude récente menée au laboratoire indique que le 26RFa agit comme une incrétine (Prévoist et al., 2015). En effet, le 26RFa est massivement libéré par le système gastro-intestinal en réponse à une charge orale de glucose afin d'atténuer l'hyperglycémie générée en potentialisant la sensibilité de l'organisme à l'insuline et/ou en augmentant la concentration plasmatique d'insuline (Prévoist et al., 2015). Les études menées sur les cellules de la lignée MIN6 suggèrent l'implication du QRFPR dans l'effet insulino-tropique du 26RFa (Prévoist et al., 2015). Les mécanismes qui sous-tendent l'hypersensibilité à l'insuline due au 26RFa ont conduit à examiner l'expression du QRFPR dans les tissus cibles de l'insuline. Le QRFPR est, de fait, colocalisé avec le récepteur de l'insuline et le transporteur GLUT4 du glucose dans les muscles, le foie et le tissu adipeux (Prévoist et al., 2015). En accord avec ces données, le 26RFa promeut le stockage des triglycérides dans les adipocytes (Malumba et al., 2010). De même, la co-incubation d'insuline et de 26RFa en présence de myotubes L6 en culture augmente l'insulino-sensibilité des cellules musculaires en favorisant la captation du glucose et la synthèse de glycogène (Allerton and Primeaux, 2015). Par

L'invalidation du gène codant le QRFPR représente une étape indispensable dans l'investigation de la fonction biologique du système 26RFa/QRFPR. Les souris GPR103A^{-/-} ne montrent pas de troubles du comportement alimentaire mais souffrent d'une ostéopénie sévère accompagnée d'une diminution de la densité osseuse plus prononcées chez les femelles que chez les mâles (Baribault et al., 2006). De plus, les souris invalidées pour le GPR103A présentent une importante cyphose, qui rappelle la déformation du rachis observée chez les patients atteints d'ostéoporose (Baribault et al., 2006). Les analyses histologiques ont révélé que la diminution de la densité osseuse chez les souris GPR103A^{-/-} résulte d'une réduction du nombre d'ostéoclastes et d'une détérioration de la plaque ostéochondrale. Il apparaît donc que l'activation du GPR103A par le 26RFa intervient dans la formation osseuse par une action directe au niveau de la plaque ostéochondrale. Cependant, il est également envisageable que les effets du 26RFa passent par le QRFPR présent dans le noyau ventromédian, puisque ce noyau hypothalamique est connu pour participer au développement osseux (Ducy et al., 2000; Elefteriou et al., 2004). Des recherches de *single-nucleotide polymorphisms* dans la séquence ADN du 26RFa ont été effectuées chez la souche de souris ostéopéniques SAMP6. La substitution d'une thymine par une cytosine a été identifiée en position -1773 du promoteur du gène codant le 26RFa (Zhang et al., 2007). Ce polymorphisme donne lieu à la formation d'un site de liaison pour un facteur de transcription répresseur putatif qui pourrait être à l'origine d'une réduction de l'expression du 26RFa. De fait, il a été montré que le taux d'ARNm codant le 26RFa est nettement réduit dans le cerveau, notamment dans l'hypothalamus, chez les souris SAMP6 par rapport aux souris sauvages (Zhang et al., 2007). Compte-tenu de l'ostéopénie observée chez les souris invalidées pour le GPR103A, ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle le 26RFa jouerait un rôle important dans le contrôle de la formation osseuse.

3.3.4 Rôle du 26RFa sur l'axe gonadotrope

Il est maintenant bien établi que les mécanismes de contrôle du métabolisme énergétique et des fonctions de reproduction sont étroitement liés. C'est pourquoi l'implication du système 26RFa/QRFPR dans la régulation de l'axe gonadotrope a été explorée (Navarro et al., 2006). Il a ainsi été montré que l'administration centrale de 43RFa, 26RFa ou de 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ induit une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et FSH chez le rat, et que le cetrorelix, antagoniste du récepteur de la GnRH, bloque l'augmentation de LH plasmatique induite par l'injection i.c.v. de 43RFa (Navarro et al., 2006; Patel et al., 2008). En revanche, seule l'injection i.p. de 26RFa provoque une augmentation des niveaux de LH (Navarro et al., 2006; Patel et al., 2008). Les aires préoptique et antérieure de l'hypothalamus, qui contiennent les principales

populations de neurones à GnRH, présentent une forte expression du QRFPR-r2 (Kampe et al., 2006). De plus, les souris dont le gène codant pour le GPR103A est invalidé se reproduisent normalement (Baribault et al., 2006). Ces résultats suggèrent que le 26RFa/43RFa stimule l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope en activant les neurones à GnRH de l'aire préoptique, sélectivement *via* le QRFPR-r2/GPR103B. Par ailleurs, dans un modèle d'explants hypophysaires de rat, le 43RFa, le 26RFa et le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ stimulent les sécrétions de LH basales ou induites par la GnRH, suggérant que ces peptides pourraient agir directement au niveau hypophysaire *via* un mécanisme autocrine/paracrine (Navarro et al., 2006). Cette hypothèse est renforcée par la présence des ARNm du 26RFa et du QRFPR au niveau hypophysaire (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003; Navarro et al., 2006), ainsi que par la capacité du 26RFa à activer des cellules adénohypophysaires de rat, en stimulant la production d'AMPc (Chartrel et al., 2003). Chez le singe rhésus *Macaca mullata*, l'administration i.v. du 26RFa et 43RFa augmente les taux plasmatiques de la prolactine, mais est sans effet sur le niveau de testostérone (Wahab et al., 2012a). Il est important de noter que chez la même espèce, l'injection i.v. du 26RFa stimule, alors que le 43RFa inhibe la sécrétion de l'hormone de croissance (Qaiser et al., 2012). De plus, chez le poulet *Gallus domesticus*, l'administration du 26RFa réduit le taux plasmatique de testostérone, effet mimé par le kisspeptine (Wahab et al., 2012b). Enfin, chez le poisson rouge *Carassius auratus*, l'injection i.p. de 26RFa induit une augmentation transitoire des niveaux sériques de LH alors que l'application de 26RFa dans le milieu de culture de cellules hypophysaires n'a pas d'effet sur la sécrétion de LH, suggérant que chez les poissons le peptide n'agirait sur l'axe gonadotrope qu'au niveau hypothalamique (Liu et al., 2009).

3.3.5 Rôle du 26RFa sur la glande surrénale

L'expression du QRFPR dans plusieurs glandes endocrines comme l'hypophyse, la surrénale et le testicule (Fukusumi et al., 2003) suggère que le 26RFa peut exercer des activités neuroendocrines. En particulier, de fortes concentrations d'ARNm codant le QRFPR ont été détectées dans la zone glomérulée du cortex surrénalien, indiquant que le 26RFa pourrait être impliqué dans le contrôle de la stéroïdogénèse surrénalienne. A l'appui de cette hypothèse, il a été montré que l'injection i.v. de 43RFa provoque une augmentation des taux plasmatiques d'aldostérone sans modifier les taux circulants de corticostérone (Fukusumi et al., 2003), suggérant une action spécifique du 43RFa au niveau de la zone glomérulée de la surrénale. *In vitro*, dans la lignée cellulaire adrénocorticale H295R, le 43RFa stimule la sécrétion d'aldostérone et, dans une moindre mesure, de cortisol (Ramanjaneya et al., 2013).

3.3.6 Rôle nociceptif du 26RFa

Compte-tenu de la forte expression du QRFPR dans la moelle épinière chez la souris et le rat (Bruzzone et al., 2007; Jiang et al., 2003), l'hypothèse d'un effet modulateur du 26RFa sur la transmission nociceptive a été émise. De fait, il a été montré que l'injection i.t. de 26RFa chez le rat atténue la douleur provoquée par une injection de formaline ou de carragénine au niveau de la voute plantaire (Yamamoto et al., 2008). Par ailleurs, les ARNm du QRFPR ont été localisés par hybridation *in situ* au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière et dans les ganglions rachidiens (Yamamoto et al., 2008). De plus, l'injection i.c.v. de 26RFa diminue l'effet nociceptif induit par l'administration de formaline dans la patte en phase aiguë et en phase chronique (Yamamoto et al., 2009), ce qui suggère l'implication du système 26RFa/QRFPR dans la transmission spinale et supraspinale des stimuli nociceptifs. L'antagoniste du récepteur Y1 du NPY, le BIBP 3226, bloque l'effet analgésique du 26RFa uniquement pendant la première phase (Yamamoto et al., 2009), suggérant que l'action anti-nociceptive du 26RFa passerait en partie par l'activation du récepteur Y1 et/ou des récepteurs du NPYF puisque le 26RFa et le BIBP 3226 se lient à ces récepteurs (cf chapitre 2, § 2.2.1.) (Bruzzone et al., 2007; Gouardères et al., 2007).

3.3.7 Rôle du 26RFa sur l'activité locomotrice

Des tests comportementaux ont révélé que des injections i.c.v. de 26RFa ou de 43RFa provoquent une augmentation dose-dépendante de l'activité locomotrice chez la souris (do Rego *et al.*, 2006). En accord avec ces données, les souris invalidées pour le 26RFa sont hypoactives (Okamoto et al., 2016). Cet effet a été confirmé par une autre équipe qui, de plus, a montré que le 43RFa stimule l'activité locomotrice diurne mais n'a aucun effet pendant la période nocturne (Takayasu et al., 2006). Chez les larves de poisson zèbre, la surexpression du gène QRFPR atténue leur activité locomotrice diurne sans pour autant induire leur sommeil (Chen et al., 2016). Réciproquement, chez les larves QRFPR^{-/-}, l'activité locomotrice diurne est améliorée et le nombre de périodes de sommeil est réduit pendant le jour mais pas pendant la nuit, suggérant que le complexe 26RFa/QRFPR est nécessaire pour maintenir une activité locomotrice normale et des niveaux de sommeil diurne chez le poisson zèbre (Chen et al., 2016).

3.3.8 Rôle du 26RFa sur le comportement anxieux

Chez la souris, les ARNm du GPR103A et GPR103B sont différentiellement exprimés dans le noyau du lit de la strie terminale, le septum latéral et la substance grise périaqueducale, des régions impliquées dans l'anxiété et le stress. L'injection i.c.v. du 26RFa réduit le comportement anxigène de la souris dans le test du labyrinthe effet médié *via* les récepteurs GABAergique et β -adrénergique (Palotai and Telegdy, 2016). Les souris déficientes en 26RFa/43RFa présentent un comportement anxiolytique exacerbé (Okamoto et al., 2016). Inversement, l'administration i.c.v. de 43RFa n'affecte pas l'état d'anxiété de la souris (Takayasu et al., 2006). Les effets divergents des deux peptides peuvent s'expliquer par une meilleure affinité du 26RFa que du 43RFa pour le NPF2-2 (Gouardères et al., 2007), dont l'activation provoque la libération de corticolibérine (CRH). Néanmoins, le 43RFa stimule les épisodes et le temps consacré au toilettage qui sont des marqueurs de stress. En fait, le 43RFa augmente l'expression des ARNm de la CRH dans les cellules hypothalamiques, suggérant que le 43RFa contribue, comme le 26RFa, à la réponse au stress (Ishigame et al., 2016).

3.3.9 Rôle du 26RFa sur la tumorigénèse

Bien qu'il n'y ait que peu d'études sur le rôle du 26RFa et du 43RFa et de ses récepteurs dans la tumorigénèse, le 26RFa et le 43RFa sont exprimés dans un certain nombre de lignées cancéreuses et tumorales, plus particulièrement, colorectales, testiculaires, pancréatiques mais aussi dans les cancers du foie, du sein, des ovaires et de la prostate (Human Protein Atlas www.proteinatlas.org). Le 26RFa étant produit par les cellules endocrines il est probable que le 26RFa/43RFa influence la gravité des cancers en affectant le processus métastatique, la croissance des cellules tumorales et l'angiogénèse. Des études d'immunohistochimie montrent, en effet, que les expressions du 26RFa et du QRFPR sont positivement corrélées avec la sévérité de tumeurs prostatiques. Des études sur la lignée cellulaire DU145, dérivée de cancer androgéno-indépendant de prostate, montrent que le 26RFa stimule la migration de ces cellules sans affecter leur prolifération et favorise la différenciation neuroendocrine (Alonzeau et al., 2013).

3.4 Etudes des relations structure-activité

L'activité *in vitro* du 43RFa, du 26RFa et du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sur des lignées cellulaires CHO et HEK293 surexprimant le QRFPR humain a été initialement déterminée par des études de déplacement du 43RFa radio-iodé sur sa tyrosine 32 [¹²⁵I-Tyr³²]43RFa, de variation de production d'AMPc et de changement de la [Ca²⁺]_i (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). Par la suite, ces approches ont été utilisées pour caractériser les propriétés pharmacologiques

de nombreux analogues peptidiques du 26RFa (Le Marec et al., 2011; Neveu et al., 2014). En accord avec une meilleure affinité pour le QRFPR, le 43RFa est plus puissant à inhiber la production d'AMPC et à stimuler la $[Ca^{2+}]_i$ que le 26RFa (Fukusumi et al., 2003). Le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ ne déplace pas la liaison du $[^{125}I\text{-Tyr}^{32}]43RFa$ mais celle du $[^{125}I\text{-Tyr}^{15}]26RFa$ à des concentrations micromolaires (Fukusumi et al., 2003; Neveu et al., 2012). De fait, en fonction des modèles cellulaires le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ est entre 35 et 50 fois moins puissant que le 43RFa ou le 26RFa pour activer le QRFPR (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003; Le Marec et al., 2011; Neveu et al., 2012). Ce résultat a été confirmé par la délétion systématique des résidus N-terminaux du 26RFa qui s'accompagne d'une perte graduelle d'affinité et d'activité vis-à-vis du *h*QRFPR d'abord légère, puis plus prononcée qui pourrait coïncider avec le raccourcissement ou la déstabilisation de l'hélice α . Tous les fragments N-terminaux synthétisés, comme les composés 26RFa₍₁₋₁₈₎, 26RFa₍₁₋₁₀₎ et encore le 26RFa₍₄₋₁₇₎, qui constitue à lui-seul l'enchaînement de l'hélice- α du peptide (Thuau et al., 2005), sont totalement dépourvus d'activité agoniste (Le Marec et al., 2011). L'ensemble de ces résultats indique clairement que l'essentiel de l'activité biologique du 26RFa est portée par son extrémité C-terminale, et que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, (Figure 28A) dont la séquence est hautement conservée chez les mammifères, est l'analogue le plus court conservant une certaine capacité à activer le QRFPR (Fukusumi et al., 2001; Le Marec et al., 2011). En effet, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ mime les effets orexigènes et hypophysiotropiques du 26RFa (Navarro et al., 2006; do Rego et al., 2006). Par ailleurs, la forme des-amide du 26RFa est environ 50 fois moins active que le peptide natif alors que le des-amide 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ est totalement dénué de toute activité (Fukusumi et al., 2003; Le Marec et al., 2011), suggérant l'implication de la fonction amide dans l'établissement de liaisons hydrogène avec le QRFPR au niveau de la poche de liaison. A l'appui de cette hypothèse, la mono ou la dialkylation du carboxamide conduit à des analogues moins puissants (Le Marec et al., 2011). En dépit d'une activité moindre, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ s'est imposé comme un châssis moléculaire adapté à la conception de ligands peptidiques du QRFPR de faible masse moléculaire. L'étude des RSA du 26RFa a été poursuivie par le remplacement systématique de chacun des résidus du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ par une alanine (*Alascan*) ou par leur énantiomère dextrogyre (*D-scan*) (Eustache et al., 2016), afin d'évaluer respectivement l'importance de la nature et de l'orientation de leur chaîne latérale dans l'activité biologique de l'heptapeptide C-terminal (Le Marec et al., 2011). Par exemple, la substitution des aa de la triade Phe²⁴-Arg²⁵-Phe²⁶-NH₂ conduit à des analogues dépourvus d'activité agoniste et antagoniste (Le Marec et al., 2011), suggérant que ce motif intervient directement dans l'activation du QRFPR comme cela a déjà été rapporté pour les systèmes à NPFF et PrRP (Boyle et al., 2005; Mazarguil et al., 2001). Il

est important de noter, que le docking du 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ dans le modèle 3D du QRFPR confirme le rôle du motif Phe²⁴-Arg²⁵-Phe²⁶-NH₂ dans l'activation du récepteur (cf chapitre 3, § 3.2.2). En revanche, la serine 23 qui n'est pas strictement conservée chez les vertébrés, est beaucoup moins sensible à son remplacement par une alanine, suggérant que sa chaîne latérale pourrait être optimisée par une chaîne alkyle ramifiée ou non. De fait, parmi une dizaine d'analogues préparés, le [Nva²³]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (Nva, norvaline; LV-2073) est trois fois plus puissant que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ à mobiliser le calcium intracellulaire (Le Marec et al., 2011). Ce gain d'activité pouvait être la conséquence d'une stabilisation locale d'une structure de type coude induite par la Nva, comme cela a déjà été montré pour l'isoleucine, la norleucine et la valine (Arfmann et al., 1977; Chin et al., 2005; Padmanabhan et al., 1990). Par ailleurs, l'acylation de l'extrémité N-terminale n'a pas d'impact sur l'activité biologique du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ mais pourrait protéger l'heptapeptide de sa dégradation par les peptidases. En revanche, la benzylation du 26RFa₍₁₇₋₂₆₎ conduit à un analogue avec une EC₅₀ environ 100 fois inférieure à celle du peptide non acylé sur la mobilisation calcique (Rouméas et al., 2015). Enfin, la mono- et la disubstitution de la fonction carboxamide réduisent l'activité agoniste du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (Le Marec et al., 2011).

Les coudes sont des éléments de structure secondaire stabilisés par des liaisons hydrogène intramoléculaires et constituent des motifs privilégiés de reconnaissance par les cibles moléculaires des peptides (Chou, 2000). Dans le but de favoriser ce genre de structuration au sein du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, une série d'analogues incorporant la forme aza-β³ de chaque résidu a été synthétisée et la capacité des pseudopeptides à mobiliser le calcium intracellulaire dans une lignée CHO exprimant le hQRFPR a été évaluée (Neveu et al., 2012). Les résultats montrent que le remplacement des résidus Gly²⁰ et Gly²¹ par des aza-β³-Gly permet d'augmenter de 2 à 5 fois l'activité des pseudopeptides, alors que l'analogue modifié par une aza-β³-Phe²² est trois fois moins puissant que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎. Le remplacement de la Ser²³ par une aza-β³-hydroxyhomothréonine (aza-β³-Hht) augmente de 2 fois la puissance de l'heptapeptide. En revanche, les pseudopeptides [aza-β³-Phe²⁴]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ et [aza-β³-Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sont totalement dénués d'effet sur la [Ca⁺²]_i, suggérant que l'incorporation de liaisons hydrogène en C-terminal est délétère à l'activité biologique, alors qu'elle est bénéfique au niveau N-terminale (Neveu et al., 2012). De façon surprenante, la combinaison des modifications favorables à l'activité des pseudopeptides dans un même analogue ne conduit pas à une addition des effets

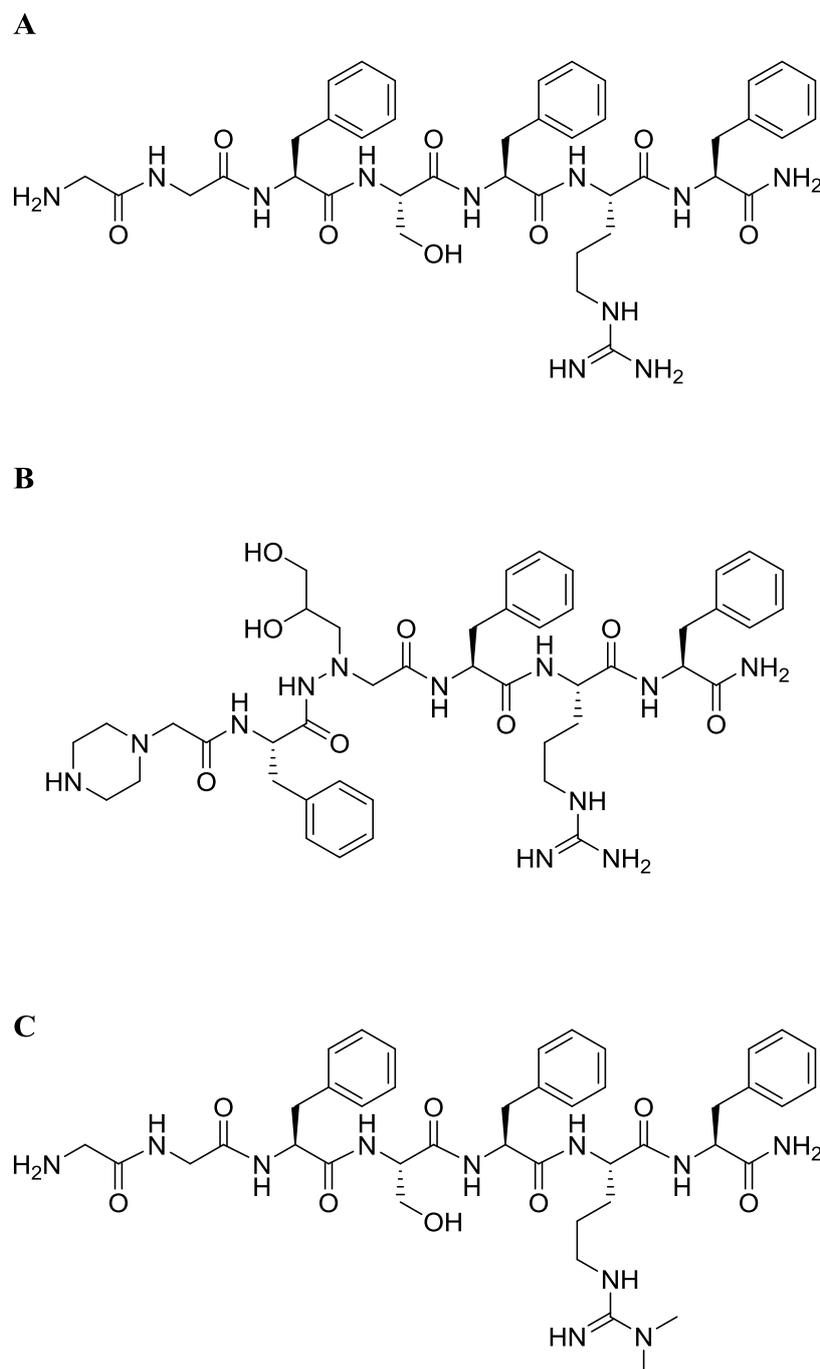


Figure 28 : Structure chimique des trois ligands peptidique et pseudopeptidique du QRFPR. (A) 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2021. (B) [cmpi²¹,aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₁₋₂₆₎, LV-2172, (Neveu et al., 2012). (C) [ADMA²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2185, (Neveu et al., 2014).

individuels. Néanmoins, le remplacement des 2 glycines par un motif 4-carboxyméthyl-pipérazine (Cmpi) couplé à la substitution de la Ser³ par l'aza-β³-Hht²³, a généré le

pseudopeptide, [Cmpi²¹,aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₁₋₂₆₎ (LV-2172, Figure 28B), qui est 8 fois plus puissant que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ à augmenter la [Ca²⁺]_i, 5 fois plus puissant à déplacer la liaison du 26RFa radio-iodé et présente aussi une demi-vie 3 fois plus élevée que celle du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (Neveu et al., 2012). *In vivo*, l'injection i.c.v. de LV-2172 chez des souris partiellement affamées provoque une augmentation dose-dépendante de la prise de nourriture similaire à celle induite par le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ durant la première heure mais, qui perdure 2 heures après l'injection contrairement au 26RFa₍₂₀₋₂₆₎. En conclusion, le pseudopeptide [Cmpi²¹,aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, est un composé de faible masse moléculaire, plus affiné, plus puissant, plus stable que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ et capable d'induire une hyperphagie plus durable que l'heptapeptide de référence en raison certainement de sa plus grande stabilité (Neveu et al., 2012). D'autres pseudopeptides ont été, par la suite, conçus pour améliorer la stabilité des analogues, tels que le LV-2094 et LV-2098 qui présentent des pseudoliasons peptidiques de type fluorooléfine (Pierry et al., 2013).

La caractérisation des points d'interaction entre un ligand et son site de liaison représente une étape importante dans la conception rationnelle de ligands. L'étude de docking menée par Neveu et ses collaborateurs a permis de prédire une interaction majeure entre l'Arg²⁵ du 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ et la Gln¹²⁵ située à l'extrémité N-terminale du segment TM3 (Neveu et al., 2014). Afin de valider cette interaction, deux approches complémentaires ont été mises en œuvre; d'une part la capacité du 26RFa à activer le QRFPR muté en position 125 par une alanine et d'autre part, l'aptitude d'analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ modifiés au niveau de la chaîne latérale de l'Arg²⁵ à activer le QRFPR sauvage. Il a ainsi été montré que la mutation du résidu Gln¹²⁵ du *h*QRFPR par une Ala conduit à un récepteur inactivable par le 26RFa. Réciproquement, la méthylation des deux atomes d'azote ω de la fonction guanidine de l'Arg²⁵ du peptide ou celle des atomes ω et ω' abolit l'activité agoniste des analogues vis-à-vis du *h*QRFPR sauvage et conduit même, dans le cas de la gem-diméthylation, à un analogue peptidique [ADMA²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, capable de s'opposer partiellement à l'effet du 26RFa (Neveu et al., 2014). L'ensemble de cette étude démontre clairement que l'interaction entre l'Arg²⁵ du 26RFa ou un de ses analogues et la Gln¹²⁵ du QRFPR participe, tout ou partie, à la reconnaissance des ligands et/ou l'activation du récepteur.

En 2010, la compagnie Banyu Pharmaceutical a décrit deux familles d'antagonistes non peptidiques du QRFPR: (1) des dérivés aryl-indole (Kishino et al., 2010) et (2), des dérivés indole-2-carboxamide (Haga et al., 2010) (Figure 29). Parmi ces deux séries, les dérivés aryl-indole **1** et **2** présentent respectivement des IC₅₀ de 33 et 50 nM. Les dérivés indole-

carboxamide **3**, **4** et **5** sont plus puissants à déplacer la liaison du [$^{125}\text{I-Tyr}^{15}$]26RFa avec des IC_{50} respective de 49, 5,5 et 6,1 nM. La puissance de deux derniers composés souligne l'importance du substituant diméthylamine dans l'affinité des composés. Bien que l'incorporation d'un atome de chlore sur le noyau indolique n'améliore pas nettement l'affinité du composé (**5** vs. **4**), cet halogène a été retenu dans les générations suivantes de ligands du QRFPR par Banyu Pharmaceutical.

Une nouvelle série de dérivés 5-chloro-indole-2-carboxamide substituée en position 3 par des noyaux aryls ou hétéroaryl a été brevetée par la même compagnie (Fujimura et al., 2010).

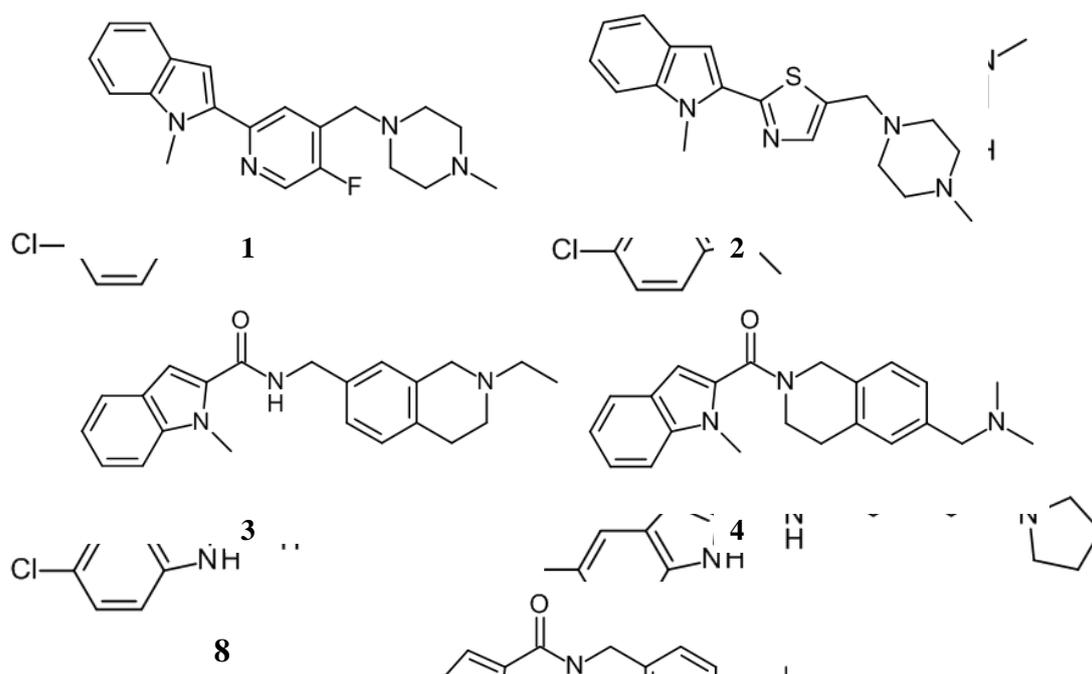


Figure 30 : Structure chimique de quelques ligands non-peptidiques de seconde génération du QRFPR développés par Banyu Pharmaceutical. Les composés 7, 8 et 9 sont des dérivés d'indole-2-carboxamide substitué en position 3. D'après Fujimura et al., 2010.

Figure 29 : Structure chimique de quelques ligands non-peptidiques de première génération du QRFPR développés par Banyu Pharmaceutical. Les composés 1 et 2 sont des dérivés d'indole, (Kishino et al., 2010); les composés 3, 4 et 5 sont des dérivés indole-2-carboxamide, (Haga et al., 2010a). L'incorporation d'un groupement furanyl en position 3 améliore sensiblement l'affinité de l'analogue **7** son IC_{50} est de 9,82 nM comparativement à celle du composé **6** ($\text{IC}_{50} = 22,36$ nM). De même, la présence d'un substituant alkylaminocarbonyl en position 2 du cycle indolique potentialise son effet antagoniste (composé **8**, $\text{IC}_{50} = 2,26$ nM). Parmi cette série, le composé **9** se présente comme le meilleur antagoniste du QRFPR avec une IC_{50} de 0,88 nM (Figure 30).

En 2010, la compagnie Banyu Pharmaceutical également décrit une autre famille d'antagonistes potentiels du QRFPR, des dérivés 2-aryl-imidazoline (Haga et al., 2010). En particulier, les auteurs ont montré que les composés substitués en position 1 de l'imidazoline par un

groupement diphenyl-méthyl et par un noyau aryl en position 2 étaient de bons antagonistes. Le dérivé 2-paraméthoxyphényl **10** présente en effet une IC_{50} de 11 nM (Figure 31).

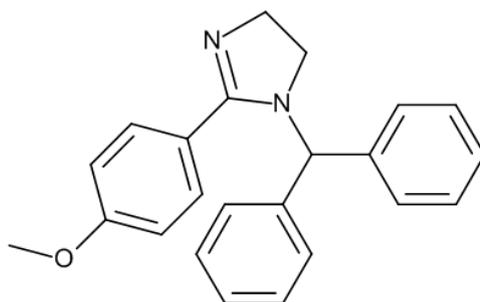
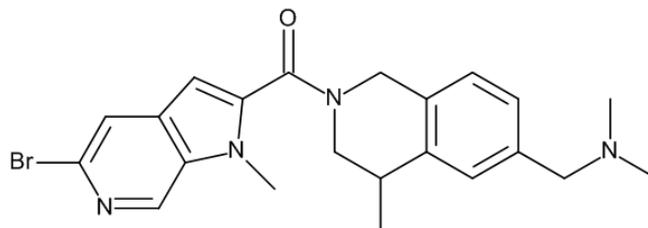
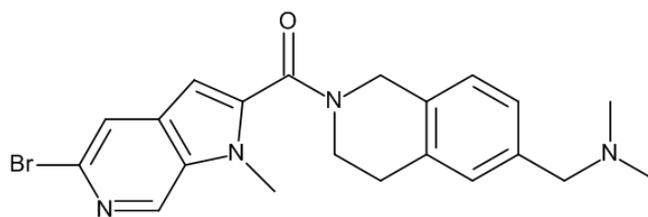
**10**

Figure 31 : Structure chimique d'un antagoniste non-peptidique du QRFPR développés par Banyu Pharmaceutical basé sur un squelette 2-aryl-imidazoline. D'après Haga et al, 2010b.

Enfin, des composés basés sur unsquelette pyrrolo[2,3-c]pyridine, alternatif au cycle indole,

**11****12**

ont été développés comme des antagonistes du QRFPR avec des propriétés physicochimiques, pharmacodynamiques et pharmacocinétiques potentiellement plus attractives (Georgsson et al.,

Figure 32 : Structure chimique de deux antagonistes non-peptidiques du QRFPR d'AstraZeneca basé sur un squelette Pyrrolo[2,3-c]pyridine. D'après Georgsson et al., 2014

2014). De fait, le composé **11** (Figure 32), bien que présentant une IC_{50} du même ordre de

grandeur que celle des composés de Banyu Pharmaceutical ($IC_{50} = 40$ nM), provoque par voie orale une réduction dose-dépendante de la prise alimentaire chez la souris (Georgsson et al., 2014). De façon intéressante le composé **12**, dans ses conformations de plus basse énergie, se superpose assez bien à la structure du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (Georgsson et al., 2014).

Chapitre 4 : Objectifs de la thèse

Environ 40% des médicaments ont pour cible des RCPGs (Hauser et al., 2017) et la conception de nouvelles molécules visant à modifier l'activité de ces récepteurs constitue une voie prometteuse pour le développement de médicaments innovants. C'est pourquoi l'identification des ligands endogènes des RCPGs orphelins est devenue un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique.

Les chercheurs du laboratoire dans lequel j'ai effectué mes travaux de thèse ont identifié pour la première fois le 26RFa à partir du cerveau de grenouille (Chartrel et al., 2003). Parallèlement, deux groupes pharmaceutiques internationaux ont montré, par des stratégies bioinformatiques distinctes, que le 26RFa et sa forme étendue en N-terminal, le 43RFa, lient avec une affinité nanomolaire, un RCPG jusqu'à là orphelin désigné initialement GPR103 rebaptisé actuellement QRFPR (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). Des expériences *in vivo* ou *ex vivo* menées chez le rongeur ont montré que le 26RFa et le 43RFa augmentent de façon dose-dépendante la consommation de nourriture (Chartrel et al., 2003; Kampe et al., 2006; Moriya et al., 2006; Primeaux et al., 2008; do Rego et al., 2006), stimulent la sécrétion de gonadotropines (Granata et al., 2014; Navarro et al., 2006; Patel et al., 2008) et la sécrétion d'aldostérone et modulent la libération d'insuline induite par le glucose (Egido et al., 2007; Prévost et al., 2015). Enfin, l'inactivation du gène codant le QRFPR chez la souris provoque une ostéoporose sévère (Baribault et al., 2006). L'ensemble de ces données indique que le 26RFa pourrait exercer d'importantes activités biologiques chez les vertébrés comme le contrôle de la prise alimentaire, de l'insulinémie, de la reproduction, de l'homéostasie hydrominérale et de l'ostéogenèse (Chartrel et al., 2011; Leprince, 2017). Par ailleurs, il est important de souligner que la forme tronquée en N-terminal du 26RFa, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, mime les effets orexigéniques, insulino-statiques et hypophysiotropes du peptide de référence (Egido et al., 2007; Navarro et al., 2006; do Rego et al., 2006).

Notre équipe a entrepris l'étude des RSA du 26RFa vis-à-vis du hQRFPR. Ce type de travail est essentiel au développement d'agonistes et d'antagonistes sélectifs qui permettront d'explorer le mécanisme d'action du peptide *in vivo* et qui constituent le point de départ pour la conception rationnelle de ligands non peptidiques. En effet, ces derniers présentent une meilleure biodisponibilité que les peptides et pourraient être utilisés dans le traitement des

troubles du comportement alimentaire, de la reproduction ou de l'ostéoporose. En particulier, il a été montré au sein de l'équipe qu'en dépit de mimer *in vivo* certains effets du 26RFa, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ est environ 75 fois moins puissant que celui-ci *in vitro* mais que la substitution du résidu Ser²³ par une norvaline conduit à un analogue, le LV-2073 ([Nva²³]26RFa₍₂₀₋₂₆₎), qui s'avère être 3 fois plus puissant que l'heptapeptide naturel (Le Marec et al., 2011). Ainsi, compte tenu de sa masse moléculaire relativement faible, de sa lipophilie plus importante que celle du 26RFa et de sa capacité, même restreinte, à activer le QRFPR, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ constitue un châssis moléculaire pertinent pour la conception de ligands du QRFPR. Dans la continuité de cette première étude, un nouveau analogue a été conçu le LV-2172 ([Cmpi²¹, aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₁₋₂₆₎), le premier analogue de faible masse moléculaire, plus affin, plus puissant, plus stable et capable d'induire une hyperphagie plus durable que le peptide 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (Neveu et al., 2012). Ce résultat constitue une avancée significative vers la conception rationnelle de ligands du QRFPR à visée thérapeutique notamment pour le traitement des troubles du comportement alimentaire. Plus récemment, un modèle du QRFPR humain par homologie a été construit, dans lequel le 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ a été docké. Ce modèle a permis de prédire une interaction majeure entre l'Arg²⁵ du peptide et la Gln¹²⁵ du récepteur. La validation expérimentale du complexe modélisé ligand/récepteur, par mutagenèse dirigée du QRFPR et la préparation de nouveaux analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, ont permis de mettre en évidence que cette interaction moléculaire forte est à l'origine de l'activation du QRFPR. Cette donnée capitale a été mise à profit pour concevoir le premier antagoniste de ce système, le LV-2185 (Neveu et al., 2014).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes fixés comme objectifs de répondre aux questions suivantes (1) quel est l'impact de la variation de la longueur de la chaîne et de l'alkylation de la fonction guanidinium de l'Arg²⁵ du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sur l'activation du QRFPR ? (2) quel est l'effet d'analogues remarquables du 26RFa humain sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique chez la souris ? (3) la boucle extracellulaire reliant les domaines transmembranaires 4 et 5 (ECL2) du QRFPR présente-t-elle réellement une hélice-α dans le récepteur *in cellulo* et est-elle capable d'interagir avec l'hélice α du 26RFa ?

Matériels et Méthodes



1. Culture cellulaire des lignées stables

Deux lignées de cellules CHO sont utilisées : la lignée stable de cellules CHO transfectées avec la sous unité α_{16} de la protéine G (CHO-G α_{16}) et la lignée transfectées avec la sous unité α_{16} de la protéine G et le récepteur QRFPR humain étiqueté par un tag M2 CHO-G α_{16} -hQRFPR-M2). Ces deux lignées sont maintenues dans un milieu Ham-F12 (Invitrogen) complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine, 1% de streptomycine/pénicilline (Gibco). L'expression de la sous-unité α_{16} de la protéine G est assurée par l'ajout de 200 $\mu\text{g/ml}$ d'hygromycine B et celle du récepteur QRFPR, par l'ajout de 500 $\mu\text{g/ml}$ de généticine G418 (Gibco). Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ et le milieu est renouvelé tous les 2-3 jours.

2. Etude de la fonctionnalité du 26RFa et de ses analogues par mesure de la variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Toutes les mesures de calcium sont réalisées grâce à un automate de criblage à moyen débit FlexstationTM-III⁹⁶ piloté par le logiciel SoftMax Pro (version 5.4) (Molecular Devices) dans le service de criblage de molécules bioactives de la plateforme PRIMACEN. Les cellules sont cultivées 24 h ou 48 h (avec un ensemencement initial de 20 000 ou 40 000 cellules/puits, respectivement) dans des plaques 96 puits noirs à fond clair (Corning Costar) en présence de 100 μl de milieu de culture (cf matériels et méthodes § 1.). Pour la mesure de l'auto-fluorescence, le milieu de culture est remplacé par 200 μl de solution de Hank (HBSS) (Gibco) contenant 2,5 mM de probénécide diluée dans une solution de NaOH à 0,5 M et d'HEPES à 5 mM. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 h en présence de 40 μl /puits du même milieu HBSS contenant la sonde Fluo-4AM à 2 μM et 0,25 $\mu\text{l/ml}$ d'acide pluronique (Molecular Devices). Les cellules sont ensuite lavées avec 150 μl de tampon HBSS/probénécide/HEPES puis, lors d'un essai agoniste, incubées 30 min dans 200 μl du même tampon avant la lecture de fluorescence. Les différents analogues (10^{-12} - 10^{-5}M , concentration finale) concentrés 5X sont injectés (50 μl) 18 sec après le début de la mesure de fluorescence qui se prolonge jusqu'à un temps total de lecture de 180 sec. Les paramètres suivants sont utilisés : $\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$; vitesse d'injection = 26 $\mu\text{l/sec}$; hauteur de pipette équivalente à un volume de 180 μl . Lors d'un essai antagoniste, les cellules baignent dans 160 μl de tampon (HBSS, 0.5 M NaOH, 5 mM HEPES, 2.5 mM probénécide) et les différents antagonistes (10^{-12} - 10^{-5}M , concentration finale) concentrés 5X sont injectés (40 μl) 18 sec après le début de la mesure de

la fluorescence. Trente minutes plus tard, l'agoniste de référence, le 26RFa (5X), est injecté (50 µl) par l'automate de criblage à une concentration unique correspondant à la dose minimale provoquant une augmentation maximale de fluorescence (10^{-7} M, concentration finale). Les données brutes collectées sont exportées depuis SoftMax Pro pour être traitées avec le logiciel GraphPad PrismTM (version 5) (GraphPad Software).

3. Etude des effets *in vivo* du 26RFa et de quelques analogues

3.1. Prise alimentaire

Les expérimentations sur les animaux sont réalisées en accord avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) et ont été approuvées par le comité d'éthique local (numéros d'autorisations : N/10-04-04-12, N/12-04-04-14 et N/13-04-04-15).

Les effets des ligands peptidiques et pseudopeptides du QRFPR sur la prise alimentaire sont évalués après injection i.c.v. des composés chez des souris sévèrement affamées. Les souris mâles Swiss albinos CD1 (IFFA-CREDO/Charles River) pesant 22 à 25 g sont isolées dans des cages individuelles 2 jours avec l'expérimentation avec un accès libre à l'eau et la nourriture placée sur le sol de la cage. Dix huit heures avant l'expérimentation, les souris sont privées de nourriture. Les injections i.c.v. (10 µl) sont effectuées manuellement dans le ventricule latéral selon la procédure de Haley & McCormick (1957), en utilisant une microseringue Hamilton (50µl) avec une aiguille de 0,5 mm de diamètre équipée d'une garde à 3,5 mm dans le but de limiter la pénétration dans le cerveau. Les agonistes [Arg (Me)²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) et [Cmpi²¹, aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₁₋₂₆₎ (LV-2172) dissous dans une solution de NaCl (0,9%) stérile sont injectés à la dose de 0.1 µg/souris, le 26RFa et l'antagoniste [ADMA²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185) sont administrés à la dose de 1 µg/souris. Dix minutes après l'injection, une quantité fixe de nourriture (5 g) est placée dans le fond de la cage de chaque souris. Pendant les 2 h du test, toutes les 30 min, la nourriture est retirée, pesée rapidement, puis redonnée à la souris. La différence entre la quantité de nourriture ingérée par les souris contrôles et celle ingérée par les souris ayant reçu les composés est analysée par un test de Mann & Whitney.

3.2. Test de tolérance à l'insuline (ITT)

Après 6 heures de jeûne, l'extrémité de la queue de souris mâles C57BL/6 est incisée à l'aide de ciseau stérile afin de pouvoir effectuer les mesures de glycémie par prélèvement sanguin (20 µl) à l'aide d'un glucomètre Accu Check Performa (Roche Diagnostics, Meylan, France). Suite

à une première mesure, les souris reçoivent une injection i.p. d'insuline humaine 0.75 UI/Kg (Umuline Rapide, Lilly, Fegersheim, France) contenant ou non du 26RFa (500 µg/Kg) ou un de ses analogues à différentes concentrations dans un des cadrans inférieurs de l'abdomen en évitant les cadrans supérieurs et la ligne médiane où se situe la vessie. La glycémie est évaluée 15, 30, 60 et 90 minutes après l'administration.

4. Etudes structurales de l'ECL2 du hQRFPR

4.1. Prédiction de l'hélicité par AGADIR

La prédiction de l'hélicité de différents fragments du QRFPR humain délimitant sa partie ECL2 (Leu¹⁶⁶-Phe²²³; Trp¹⁷⁰- Ile²¹³; Leu¹⁷¹-Lys²¹²; Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ et Met¹⁸⁰-Lys²¹²) a été effectuée en utilisant le programme AGADIR (<http://agadir.crg.es/>). La prédiction algorithmique est basée sur la théorie de transition *helix/coil*. Les calculs ont été effectués à pH 7, à T = 278 K avec une force ionique de 0,1 M.

4.2. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire reflètent les structures secondaires présentes au sein de macromolécules telles que les protéines, les peptides ou encore les acides nucléiques. Pour les protéines et les peptides, les chromophores qui participent au signal dichroïque sont les liaisons peptidiques, les chaînes latérales des aa aromatiques et les ponts disulfure. Il existe des spectres caractéristiques de différentes structures secondaires. Celui des hélices- α présente une bande positive à 190 nm et deux bandes négatives à 208 et 222 nm. Le spectre des feuillets β se caractérise par une bande positive à 195 nm et une large bande négative à 215 nm. Enfin, celui des protéines ou peptides de type *random coil* présente, quand à lui, un minimum négatif à 195 nm. Cependant, la structure générale d'une protéine est souvent la combinaison de diverses structures secondaires. De fait, le signal dichroïque est un signal global qui permet seulement de différencier les macromolécules à dominance en hélice α , en feuillet β ou non structurées.

Pratiquement, les spectres de dichroïsme circulaire sont enregistrés à température ambiante sur un dichrographe CD6 (Jobin-Yvon, Longjumeau, France). Les échantillons peptidiques en solution à 0,1 mM dans un tampon phosphate (20 mM, pH 6.0) contenant ou non 20, 30 ou 50% de trifluoroéthanol (TFE) ou 20 mM de DPC sont introduits dans une cellule de quartz de 0,5 mm de trajet optique. La différence d'absorption, ΔA , entre la composante droite et gauche de la lumière, est mesurée tous les 0,2 nm pour des longueurs d'ondes comprises entre 189 et 250 nm. Le signal du tampon correspondant est soustrait et la différence d'absorption résultante ΔA

est convertie en différence de coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ puis en ellipticité molaire $[\theta]$ exprimée en $\text{degrés.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$. Pour chaque condition, 3 spectres sont accumulés puis moyennés. Le pourcentage de chaque structure secondaire est calculé en utilisant le logiciel DICHROPROT V2.6 (CNRS, Lyon, France).

5. Etude des interactions hélice-hélice entre le 26RFa et l'ECL2 du QRFPR par thermophorèse à l'échelle microscopique

La thermophorèse à l'échelle microscopique (*microscale thermophoresis, MST*) est une technique récemment appliquée à la mesure d'interactions protéiques (Lvienken et al., 2010). Le principe de cette technique est de chauffer localement, grâce à un laser infrarouge, un capillaire contenant l'échantillon constitué par deux partenaires dont l'un est marqué par une sonde fluorescente. La différence de température induit va de 2 à 6 K à l'équilibre, et un gradient microscopique de température se forme. Ce gradient est à l'origine d'un déplacement des entités présentes, diminuant leur concentration dans la zone la plus chaude. Cette migration est dépendante, entre autres facteurs, du poids moléculaire. Ainsi, la déplétion observée est différente selon si la partenaire fluorescent est sous forme de complexe ou non. C'est grâce à ce phénomène qu'il est possible d'étudier les interactions par MST, et de déterminer les constantes d'affinité. En effet, si une telle mesure est effectuée à différents rapports de concentration des partenaires, il est donc possible d'accéder au K_d de l'interaction.

Pratiquement, le fragment ECL2₍₁₈₀₋₂₁₂₎ a été synthétisé sous sa forme marquée à l'Alexa fluor 647 via une liaison maléimide couplée à une cystéine en N-terminale dans le service de synthèse de peptides de la plateforme PRIMACEN et utilisé à une concentration constante de 10 nM dans un tampon phosphate 20 mM, pH 6,0 contenant 30% de TFE. Une gamme de 26RFa ($2,8.10^{-7}$ M - $8,5.10^{-12}$ M) est alors préparée dans la solution du partenaire marqué à concentration constante. Chaque échantillon est chargé dans un capillaire en verre et placé dans le Monolithe Nanotemper NT 115. La thermophorèse est réalisée à 21°C avec une puissance de MST de 40%. Le K_d est calculé en utilisant la loi d'action de masse à partir des sensorgrammes à l'aide du logiciel développé par le constructeur à partir de 2 expériences menées en triplicate.

Résultats



1. Article : Synthèse et évaluation fonctionnelle d'analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ contenant une fonction guanidine mono-, di- ou trisubstituée en position 25

Karima Alim, Benjamin Lefranc, Christophe Dubessy, Jean A. Boutin, Hubert Vaudry, Nicolas Chartrel, David Vaudry, Julien Chuquet and Jérôme Leprince

(Article soumis, *J. Med. Chem*)

Le 26RFa dernier membre de la famille des peptides Arg-Phe-NH₂ découvert chez les vertébrés, exerce diverses activités biologiques chez les mammifères telles que la régulation du métabolisme énergétique, de la minéralisation osseuse et de la sécrétion d'insuline relayées par son récepteur, le QRFPR. Par conséquent, la conception d'agonistes et/ou d'antagonistes du QRFPR pourrait contribuer au développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique traitant par exemple les troubles de l'homéostasie énergétique. Récemment, nous avons construit par homologie, un modèle tridimensionnel du QRFPR humain dans lequel le fragment biologiquement actif, le 26RFa₍₁₉₋₂₆₎, a été *docké*. Ce modèle de complexe ligand/récepteur nous a permis de prédire une interaction majeure entre l'Arg²⁵ du peptide et la Gln¹²⁵ du récepteur, impliquée, tout ou partie, dans l'activation du QRFPR. L'arginine 25 du 26RFa pourrait donc être un résidu stratégique pour le développement d'agonistes et d'antagonistes de son récepteur. Dans le présent travail, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- ✓ La chaîne alkyle portant la fonction guanidinium en position 25 du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ est-elle ajustable en longueur ?
- ✓ Quel est l'impact d'une mono-, di-, ou trialkylation de la fonction guanidinium portée par le résidu en position 25 du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sur l'activation du QRFPR ?

Nos résultats démontrent que (1) l'homologation de la chaîne latérale de l'Arg (homoarginine, Har) n'impacte pas significativement la puissance de l'heptapeptide C-terminal du 26RFa, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, alors que son raccourcissement d'un méthylène (norarginine, Nar) conduit à un analogue inactif, (2) la majorité des analogues incorporant une Har ou une Nar *N*-alkylée ne sont ni des agonistes ni des antagonistes du QRFPR, soulignant que la longueur de la chaîne latérale de l'arginine est optimale, (3) le [(Me)⁰Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) est 25 fois plus puissant que sa forme non méthylée et seulement 1,5 fois moins puissant que le 26RFa, (4) les

équivalents N^{ω} -éthyl, N^{ω} -propyl et N^{ω} -isobutyl présentent des activités agonistes similaires à celle du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, et (5) les composés [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵] (LV-2185) et [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279) bien qu'antagonisant l'effet du 26RFa sur la mobilisation du calcium intracellulaire, se comportent plus vraisemblablement comme des agonistes partiels du QRFPR.

Ainsi, le [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) est à ce jour l'agoniste le plus puissant du QRFPR ($EC_{50} = 66,4 \pm 16,2$ nM) avec une masse molaire aussi faible (MW = 829,95 g/mol). De plus, nos données suggèrent que les modifications stérique, électronique et physico-chimiques (log D, pKa) affectent nettement le profil pharmacologique des analogues. Enfin, la N^{ω} -méthylation de l'Arg²⁵ du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ pourrait être exploitée dans le développement de nouveaux agonistes du QRFPR.

Design, Synthesis and Functional Evaluation of a Novel Series of 26RFa Peptide Analogues Containing a Mono- or Polyalkyl Guanidino Arginine Derivative

Karima Alim,¹ Benjamin Lefranc,^{1,2} Christophe Dubessy,^{1,2} Jean A. Boutin,³ Hubert Vaudry,^{1,2} Nicolas Chartrel,¹ David Vaudry,^{1,2} Julien Chuquet,¹ and Jérôme Leprince^{1,2,*}

¹INSERM U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Normandy University, 76000 Rouen, France

²Cell imaging platform of Normandy, Normandy University 76000 Rouen, France

³IdRS, 125 Chemin de Ronde, 78290 Croissy-sur-Seine, France

***Correspondence:** should be addressed to Dr. Jérôme Leprince, INSERM U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Normandy University, 76000 Rouen, France.

jerome.leprince@inserm.fr

Abbreviations

Alloc, allyloxycarbonyl; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium concentration; CNS, central nervous system; Dab, 2,4-diamino-butyric acid; GPCR, G protein-coupled receptor; Har, homoarginine; Nar, norarginine; NPAF, neuropeptide AF; NPFF, neuropeptide FF; Orn, ornithine; PrRP, prolactin-releasing peptide; RFRP, RFamide-related peptide.

Competing Interests' Statement

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Key words

26RFa, QRFP, QRFPR, peptide drug design, arginine derivatives, alkyl guanidino arginine, $[Ca^{2+}]_i$.

SUMMARY

26RFa, the endogenous ligand of QRFPR, has been implicated in several physiological and pathological conditions; hence QRFPR ligands display therapeutic potential. At the molecular level, a functional interaction establishes between the guanidino group of the 26RFa Arg²⁵ residue and the amide side-chain of the QRFPR Gln¹²⁵ moiety, suggesting that arginine could be a pivotal residue for the development of potent QRFPR agonists and antagonists. Thus, we have designed and synthesized a series of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ analogues incorporating at position 25 norarginine, arginine and homoarginine derivatives modified by mono-, di- or trialkylated substituents. The impact of these modifications on 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ activity has been evaluated on the activation of QRFPR by assessing the [Ca²⁺]_i mobilizing activity of the analogues in stably transfected human QRFPR CHO cells. We found that conservation of the Arg²⁵ side-chain length was necessary to retain the activity of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ and that *N*-monoalkylation of arginine was accommodated by the QRFPR active site. In particular, [(Me)⁰Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) appeared to be 25-fold more potent than 26RFa₍₂₀₋₂₆₎. Other peptides were less potent than 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, exhibited partial agonistic activity or were totally inactive QRFPR ligands. However, all these new derivatives were more hydrophobic than 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ and thus may display changes in pharmacokinetic properties when evaluated *in vivo*. Finally, *N*-methyl substituted arginine-containing peptides represent lead compounds for further development of agonists that target the QRFPR binding site.

INTRODUCTION

In vertebrates, the term RFamide-related peptide (RFRP) designates a family of biologically active peptides that possess the Arg-Phe-NH₂ (RFamide) motif at their C-terminal extremity. Since the discovery of 26RFa in 2003 (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003) no novel RFRP has supplemented this family of regulatory peptides. Indeed, data mining in the mammalian genome databases using the RFGK or RFGR motif as queries failed, suggesting that the RFRP family is complete and composed, in human, by neuropeptide AF/neuropeptide FF (NPAF/NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP), RFRP-1 (GnIH)/RFRP-3, metastin/kisspeptin and 26RFa/QRFP peptides (Quillet et al., 2016).

The cDNA encoding the 26RFa precursor has been cloned in mammals including human (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003), bovine (Fukusumi et al., 2003), mouse (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003) and rat (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003), as well as in birds (Ukena et al., 2010; Tobari et al., 2011) and fish (Liu et al., 2009; Shu et al., 2014). Analysis of the human 26RFa precursor indicates that pre-pro26RFa may generate several additional peptides notably an N-terminally extended form, 43RFa, now known as QRFP (Leprince et al., 2017) and a truncated form, 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, that is strongly conserved across vertebrate species, although it has never been chemically isolated so far. In the human hypothalamus and spinal cord, processing of the precursor generates both 26RFa and QRFP (Bruzzone et al., 2007), while in the rat and chicken brain, the mature forms are the 43-residue long QRFP (Takayasu et al., 2006) and the 26-residue long 26RFa (Ukena et al., 2010) peptides, respectively.

26RFa and QRFP are the cognate ligands of the former human orphan receptor GPR103, also designed SP9155 or AQ27 (Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003) and now renamed QRFP (Leprince et al., 2017). QRFP is similarly activated by both 26RFa and QRFP, leading to a dose-dependent increase in cAMP formation in cultured rat anterior pituitary cells (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003) and an increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in CHO cells transfected by the human receptor (Fukusumi et al., 2003; Le Marec et al., 2011; Neveu et al., 2012). In the central nervous system (CNS), 26RFa/QRFP mRNA is expressed in discrete hypothalamic nuclei in rat (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003), mouse (Takayasu et al., 2006) and human (Bruzzone et al., 2007). The prepropeptide gene is also expressed in human endocrine glands particularly in the pituitary and prostate (Jiang et al., 2003). In human, the highest expression of QRFP is observed in the cerebral cortex, hypothalamus and vestibular nuclei (Jiang et al., 2003) whereas, in peripheral organs, the receptor gene is highly expressed in the retina, pituitary, heart, kidney, testis and bone (Lee

et al., 2001; Fukusumi et al., 2003; Baribault et al., 2006). Tissue distribution of 26RFa and QRFPR is consistent with the involvement of this peptide system in several physiological and pathophysiological processes (Chartrel et al., 2011, 2016) such as regulation of energy homeostasis (Prévost et al., 2015; Chartrel et al., 2016) and bone mineralization (Baribault et al., 2006). 26RFa also stimulates the hypothalamo-pituitary gonadal axis (Fukusumi et al., 2003; Navarro et al., 2006; Liu et al., 2009; Primeaux, 2011; Parhar et al., 2012; Schreiber et al., 2016), increases locomotor activity (Do Rego et al., 2006) and modulates analgesia (Yamamoto et al., 2008, 2009; Elhabazi et al., 2013) and glucose-evoked insulin secretion (Egido et al., 2007; Granata et al., 2014; Prévost et al., 2015) suggesting that QRFPR ligands should be amenable to drug development (Leprince et al., 2017).

Although less potent than 26RFa in activating QRFPR (Le Marec et al., 2011), the C-terminal heptapeptide 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (GGFSFRF-NH₂) mimics the orexigenic and gonadotropic effects of 26RFa (Navarro et al., 2006; Do Rego et al., 2006). Structure-activity relationship studies reveal that replacement of the Ser²³ residue by a norvaline leads to an analogue, [Nva²³]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2073), that is 3 times more potent than the native heptapeptide (Le Marec et al., 2011). Further studies have led to the design of [Cmpi²¹, aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₁₋₂₆₎ (LV-2172), which is more potent than 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ in mobilizing [Ca²⁺]_i and more stable in serum (Neveu et al., 2012). This pseudopeptide also exerts a long-lasting orexigenic effect in mice (Neveu et al., 2012). Similarly, replacement of the N-terminal degradation-sensitive Gly-Gly peptide bond by a fluoro-olefin moiety, which exhibits isosteric and isoelectronic properties similar to that of the native amide bond (Pierry et al., 2013). The resulting [$\Psi^{20,21}(\text{CF}=\text{CH})$]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ compound (LV-2098) displays a five-fold longer half-life in human serum and an activity similar to that of the parent 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ peptide (Pierry et al., 2013).

Structure of G-protein-coupled receptors (GPCRs) and mechanisms controlling ligand/receptor binding are required for rational drug design. Using the X-ray structure of the β₂-adrenergic receptor as a template, we have recently built a 3D molecular homology model of human QRFPR in which the bioactive peptide 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ has been docked (Neveu et al., 2014). A strong intermolecular interaction has been predicted between the guanidino group of the Arg²⁵ residue of 26RFa and the Gln¹²⁵ residue side-chain of QRFPR that was subsequently validated by QRFPR site-directed mutagenesis as a pivotal interaction exploitable to the development of QRFPR antagonists (Neveu et al., 2014). In fact, asymmetric dimethylation of the side-chain of arginine led to a first QRFPR peptide antagonist, [(Me,Me)^{0,0}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185), able to significantly reduce the 26RFa-evoked [Ca²⁺]_i increase in CHO cells transfected by the human QRFPR (Neveu et al., 2014).

The arginine residue of the RFamide motif plays a critical role in the biological activities of RFRPs (for review: Quillet et al., 2016). For instance, the positively charged arginine of FMRF-NH₂ is an essential residue for regulating access to the modulatory site of acid-sensing ionic channels (Ostrovskaya et al., 2004). In mammals, substitution of the arginine moiety by an alanine dramatically reduces the agonistic activity of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ and kisspeptin-10 (Gutiérrez-Pascual et al., 2009; Le Marec et al., 2011). To go further in the design of potent and low molecular weight peptide ligands of QRFPR, we have designed and synthesized a new series of Arg²⁵-modified 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ analogues and evaluated the impact of these modifications on the activation of QRFPR by assessing the Ca²⁺-mobilizing activity of the compounds in stably transfected human QRFPR CHO cells.

RESULTS AND DISCUSSION

We have previously demonstrated that the guanidino function of the arginine 25 residue of the peptide establishes a strong interaction with the lateral carbonyl group of glutamine 125 of QRFPR that contributes to the receptor activation process (Neveu et al., 2014). Indeed, impairing this ligand/receptor contact by gem-dimethylation of the N^{ω} -guanidino group of Arg²⁵ in 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ yields to an antagonist of QRFPR (Neveu et al., 2014). In order to develop more potent QRFPR ligands, we have designed a series of polyalkyl-guanidino arginine derivatives of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ as well as of their homo- and norarginine counterparts (Table 1).

All peptides were synthesized by standard Fmoc-based solid phase methodology as previously described (Leprince et al., 1998). Since Fmoc derivatives of arginine, norarginine (Nar), homoarginine (Har), N^{ω} -methyl-arginine, N^{ω},N^{ω} -dimethyl-arginine, and $N^{\omega},N^{\omega'}$ -dimethyl-arginine are commercially available, they were directly introduced in the synthetic route yielding 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2021), [Nar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2290), [Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2291), [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186), [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185), and [(Me,Me)^{ω,ω'}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2199), respectively (Supplemental Fig. S1-S6). Other analogues were obtained by the efficient strategy developed by Hamzé et al. (2005) as described in Scheme 1, which gives access to N^{ω} -mono, N^{ω},N^{ω} -di, $N^{\omega},N^{\omega'}$ -di or $N^{\omega},N^{\omega},N^{\omega'}$ -trialkylated Nar, Arg, or Har containing peptides by reaction of resin-bound *S*-methyl-norisoithiocitrulline, -isoithiocitrulline or -homoisoithiocitrulline moieties or their N^{ω} -methyl counterparts with a series of primary or secondary amines (Supplemental Fig. S7-S33). Briefly, three precursors, protected with a Boc group at their N-terminal extremity and containing, in position 25, a 2,4-diaminobutyric acid (Dab, **1a**), an ornithine (Orn, **1b**) or a lysine (**1c**) residue, orthogonally protected by an allyloxycarbonyl (Alloc) moiety, were first assembled on solid support (Scheme 1). After selective deprotection of the free lateral amines, reaction of **1** with Fmoc-isothiocyanate (Fmoc-NCS) followed by Fmoc removal, led to the corresponding grafted northio- (**2a**), thio- (**2b**) and homothiocitrulline (**2c**) derivatives, while treatment with methyl-isothiocyanate led to N^{ω} -methyl-northio- (**2a'**), N^{ω} -methyl-thio (**2b'**) and N^{ω} -methyl-homothiocitrulline (**2c'**) containing peptides, respectively (Scheme 1). As previously described, after piperidine-assisted Fmoc deprotection, resin beads were found to be negative to ninhydrin reaction indicating that carbamate formation did not occur from a nucleophile attack of the side-chain amino group on the carbonyl moiety of Fmoc-NCS (Kearney et al., 1998; Hamzé et al., 2005). In contrast to Fmoc-NCS, three successive additions of methyl-isothiocyanate were needed to obtain a total conversion of the free amines into N^{ω} -methyl-thiourea moieties, as determined by a ninhydrin-based colorimetric assay. This can be ascribed to better reactivity of

the isothiocyanate due to the presence of the carbamate fonction that increases its electrophile character. After *S*-methylation of the thiourea group by methyl iodide at room temperature for thrice 1 hour as activation, polymer-bound protected peptides **3** were separated in several portions to react overnight at 80°C in dry DMSO with different primary and secondary amines to afford, after resin cleavage, side-chain deprotection and purification, 27 highly pure analogues of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ with 6-39% yield (Table 1, Supplemental Fig. S7-S33). As previously reported, guanidinylation with isobutylamine was less efficient than that obtained with all other primary or secondary amines used even with higher quantity (2x eq.) and increased time (20 h) (Hamzé et al., 2005). *N*⁰,*N*⁰-diisopropyl-substituted compounds were not obtained by this method probably in reason of the steric hindrance of the isopropyl groups.

The synthetic route is illustrated by the preparation of [(Me,Me)^{0,0}Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2269) from homothiocitrulline containing compound (**2c**) (Scheme 1; Fig. 1). A small portion of **2c** was cleaved by TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) and analyzed by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) and MALDI-ToF mass spectrometry. The expected analogue was obtained in 82.8% yield and 72.6% purity (Fig. 1A). [Lys²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ was not detected in the chromatogram showing that carbamate formation did not occur. Resin-bound peptide **2c** was then methylated (CH₃I, DMF, 3 x 1h) affording the *S*-methylated supported intermediates **3c** which, after cleavage of a small portion, led to the expected peptide in 85.6% yield and 62.4% purity (Fig 1B). No undesired extra-methylation and no trace of starting material were detected by MALDI-ToF mass spectrometry. Guanidinylation of **3c** was achieved by reaction of 2 M dimethylamine solution in dry DMSO at 80°C for 16 h under an Ar atmosphere. Cleavage of the resulted polymer-supported peptide provided [(Me,Me)^{0,0}Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2269) in 50.3% crude yield and 55.5% purity (Fig. 1C). No precursor trace was detected indicating that guanidinylation was complete. Similarly, we did not detect homocitrulline containing peptide resulting from remaining traces of H₂O in the reaction solvent.

The pharmacological profile of these analogues was first assessed by testing their ability to increase [Ca²⁺]_i in human QRFPR-transfected CHO cells (Table 2). As previously reported, 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2021) was almost 40 fold less potent than 26RFa to activate QRFPR (Table 2; Le Marec et al., 2011). Homologation of the arginine side-chain (LV-2291) did not significantly alter this potency, while methylene shortening led to the inactive [Nar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2290) compound probably due to the lack of interactions with the Gln¹²⁵ and/or Glu¹³² residues of QRFPR (Neveu et al., 2014). As a matter of fact, all the peptides containing a mono-, a di-, or a tri-substituted guanidino Nar²⁵ moiety were totally devoid of agonistic activity (Table 1, n = 2; Table 2). Similarly, all the Har²⁵ derivative-containing peptides were inactive,

except [(*i*Bu)^ωHar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2289) that retained a weak potency to mobilize intracellular calcium in human QRFPR-transfected CHO cells (Table 1, n = 4; Table 2). In contrast, [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) was 25-fold more potent than the heptapeptide 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2021) and only 1.5 times less potent than the full-length peptide 26RFa (Fig. 2A; Table 2). Replacement of the *N*^ω-methyl group by a *N*^ω-ethyl (LV-2271), a *N*^ω-propyl (LV-2274) or a *N*^ω-isobutyl (LV-2288) substituent decreased the Ca²⁺-mobilizing activity of the analogues with potencies similar to that of the control peptide 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2021), whereas *N*^ω,*N*^ω, *N*^ω,*N*^ω and *N*^ω,*N*^ω,*N*^ω di- and trialkyl arginine-containing peptides were unable to activate QRFPR (Fig. 2B,C; Table 1, n = 3; Table 2). Taken together, these data indicate that the Arg residue in position 25 has an optimal side-chain length for conferring to the analogue an agonistic activity towards QRFPR and that its *N*^ω-methylation is accommodated by the active site. Furthermore, it has been reported that the C-terminal Phe-Arg-Phe-NH₂ part of 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ is anchored into the QRFPR binding pocket by, at least, two interactions originated in the *N*^ω and *N*^ω atoms, individually involved in binding and activation process (Neveu et al., 2014). Since mono-alkylation of the *N*^ω atom, which does not affect the positive charge of the guanidino group, enhanced the potency of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (*N*^ω-methylation), we can speculate either the occurrence of a new favorable interaction inside the cavity or the beneficial modification of the electrostatic characteristics of the initial interaction. Similar observations have been reported for kisspeptin-10 (Asami et al., 2012). In particular, the *N*^ω-methyl-arginine containing analogue and its *N*^ω-ethyl counterpart are, respectively, twice more than and as potent as kisspeptin-10 to stimulate [Ca²⁺]_i in a functional assay of human KiSS1R (Asami et al., 2012). This similarity highlights common recognition and activation processes between all the RFRPs and their cognate receptors as previously suggested (Neveu et al., 2014). In support of this hypothesis, human QRFPR shares 44-57% sequence similarity with the human NPFF1, NPFF2, GPR10 and KiSS1R in a LALIGN alignment (Huang and Miller, 1991).

Compounds devoid of agonistic activity were subsequently evaluated for their ability to antagonize the 26RFa-evoked [Ca²⁺]_i response. As a first step, a one-dose assay was used consisting in a 30-minute incubation of QRFPR-transfected cells with a 10⁻⁵ M analogue solution prior to an effective 10⁻⁷ M 26RFa application. As shown in figure 3A, the non-peptide antagonist 25e from Astra-Zeneca totally blocked the agonistic effect of 26RFa (Georgsson et al., 2014). At the same dose, the arginine-modified containing compounds did not significantly reduce the 26RFa-induced calcium increase except [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279) which antagonized 47% of the agonist response (Fig. 3A,B). At a concentration of 10⁻⁵ M, [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185) did not significantly reduce the 26RFa-evoked

response (Fig. 3). However, a concentration-response curve revealed that this compound inhibited the 26RFa-evoked $[Ca^{2+}]_i$ increase dose dependently (Fig 4A). The antagonistic effect of $[(Me,Me)^{\omega,\omega}Arg^{25}]26RFa_{(20-26)}$ (LV-2185) plateaued at 10^{-4} M (Fig 4A) with an IC_{50} of 6.0 μ M and a maximal efficacy of 80% (Table 2). The $[(Me,Me,Me)^{\omega,\omega,\omega'}Arg^{25}]26RFa_{(20-26)}$ (LV-2279) peptide analog and the pyrrolo[2,3-c]pyridine derivative (25e) displayed IC_{50} of 8.2 and 0.6 μ M, and efficacy of 87.5 and 100%, respectively (Fig. 4B,C and Table 2). Furthermore, compound 25e concurrently shifted the 26RFa dose-response curve to the right in a concentration-dependent manner whereas LV-2279 only affected the efficacy of the calcium increase, indicating that the non-peptide molecule acts as a competitive QRFPR antagonist while the arginine-modified containing peptide $[(Me,Me,Me)^{\omega,\omega,\omega'}Arg^{25}]26RFa_{(20-26)}$ (LV-2279) behaves as a partial agonist, in very much the same as $[(Me,Me)^{\omega,\omega}Arg^{25}]26RFa_{(20-26)}$ (LV-2185) (Fig. 5). Indeed, at supra-micromolar concentrations both peptide compounds, LV-2279 and LV-2185, exhibited a residual agonistic effect (data not shown). Thus, it can be assumed that during the incubation of QRFPR-transfected cells with 10^{-5} M concentrations of the analogues, partial receptor internalization occurred leading to minimization of the 26RFa effect.

Replacement of arginine residues by guanidino-alkylated derivatives within bioactive peptide sequences was previously found to improve stability of Kiss1R agonists towards digestion by trypsin-like proteases (Asami et al., 2012), to emulate bradykinin B2 receptor affinity of the Hoe 140 antagonist (Kennedy et al., 2002), and to enhance potency and duration of activity of GnRH antagonists (Nestor et al., 1988, Nestor et al. 1995). The selectivity of peptide-based thrombin inhibitors is also modulated by this kind of modification (Kokko et al., 2001). Similarly, specific peptide inhibitors targeting the substrate arginine-binding site of protein arginine *N*-methyltransferases and containing a single *N*^ω-ethyl-arginine residue have been designed (Lakowski et al., 2010; Thomas et al., 2014). Incorporation of *N*^ω-alkyl-arginine into peptides was also shown to increase lipophilicity (Kennedy et al., 2000; Asami et al., 2012) and to modify the basicity of the *N*-alkyl-guanidino group (Kennedy et al., 2000; Thomas et al., 2014). Generally, the alkyl substituent reduces available hydrogen bonding to the guanidino group while retaining a positive charge at physiological pH, and consequently modifies the peptide-receptor interactions of the alkylated ligand.

In conclusion, we have successfully synthesized 30 mono- or polyalkyl guanidino arginine derivative-containing 26RFa analogues by an efficient solid-phase methodology. *In vitro* evaluation of their pharmacological profiles in a calcium-mobilizing assay revealed that (i) a side-chain length corresponding to that of arginine is required to the analogue for displaying

agonist activity, (ii) N^0 -alkylation of Arg²⁵ is rather well tolerated and even leads to the most potent QRFPR agonist based on 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ disclosed so far in the case of N^0 -methylation and, (iii) other modifications yield partial agonists and inactive compounds. Our data also suggest that steric, electronic, logD and/or pK_a differences between arginine derivatives can account for the pharmacological behavior of these peptides. Finally, incorporation of N^0 -methyl-arginine at position 25 of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ may be exploited in the development of new QRFPR peptide ligands with higher agonistic activity and enhanced bioavailability.

Experimental Procedures

Fmoc-amino acid residues, Boc-glycine, *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) and Rink amide 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin were purchased from Christof Senn Laboratories (Dielsdorf, Switzerland), Novabiochem (Darmstadt, Germany) or IRIS Biotech (Marktredwitz, Germany). *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA), piperidine, acetic anhydride, trifluoroacetic acid (TFA), triisopropylsilane (TIS), *tert*-butylmethylether (TBME), tetrakis (triphenylphosphine)palladium(0) (Pd(PPh₃)₄), sodium diethyldithiocarbamate (DTC), dimethylsulfoxide (DMSO) and probenecid were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). *N*-methylpyrrolidone (NMP) and dimethylformamide (DMF) were from Biosolve (Dieuze, France), and dichloromethane (DCM), acetonitrile, phenylsilane (PhSiH₃), iodomethane, Fmoc-isothiocyanate, methylisothiocyanate and all the amines were from Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid was from LaserBio Labs (Sophia-Antipolis, France). Hank's balanced salt solution (HBSS) and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) were from Invitrogen (Courtaboeuf, France). Compound 25e was a generous gift from AstraZeneca.

Peptide Synthesis

All peptides were synthesized on a 433A Applied Biosystems automated peptide synthesizer (Villebon-Sur-Yvette, France) using the standard manufacturer's procedures (0.25 mmol scale) on a Rink amide MBHA resin as previously described (Leprince et al., 1998). All Fmoc-amino acids and Boc-glycine (1 mmol, 4 eq.) were coupled by *in situ* activation with HBTU (1.25 mmol, 5 eq.) and DIEA (2.5 mmol, 10 eq.) in NMP. Reactive side chains were protected as follows: Ser, *tert*-butyl (*t*Bu) ether; Arg, Har, pentamethyldihydrobenzofuran (Pbf) sulfonylamide; Nar, di-*tert*-butyloxycarbonyl (Boc)₂ dicarbamate; Dab, Orn, Lys, allyloxycarbonyl (Alloc) carbamate. After each coupling reaction, *N*-acylation of unreacted amino functions was performed by addition of a large excess of acetic anhydride (0.5 M) and DIEA.

Synthesis of Substituted Arginine Analogue Containing Peptides

After completion of the chain assembly, deprotection of the allyloxy carbamate was performed manually by Pd(0) under Ar as previously described (Thieriet et al., 1997; Leprince et al., 2001; Hamzé et al., 2005). Briefly, PhSiH₃ (24 eq.) dissolved in 6.5 mL of DCM was transferred to a sealed tube containing 1.2 g of Boc-peptidyl(Alloc)-resin (1 eq.) using an Ar flushed gas-tight syringe. A solution of Pd(PPh₃)₄ (0.3 eq.) in 19.5 mL of DCM was added and gently agitated for 1 hour at room temperature. The resin was then washed sequentially with DTC (0.02 M in

DMF), DMF and DCM. A 0.2 M solution of either Fmoc-isothiocyanate or methylisothiocyanate (5 eq.) in DCM was added to the resin, stirred for 2 hours at room temperature, washed with DMF and DCM, and subsequently treated with 20% piperidine in DMF for Fmoc removal. The resin was then treated with a 0.2 M solution of iodomethane (5 eq.) in DMF, stirred for 1 hour at room temperature and washed with DMF. The iodomethane addition step was repeated twice. The resulting resin was split into 10 equal parts and transferred into hermetically closed tubes; a 2 M solution of amine (10 eq.) in dry DMSO was added under inert atmosphere. The mixtures were heated for 16 hours at 80°C to obtain, after DMF and DCM washes, mono-, di- or tri-alkylated norarginine-, arginine- or homoarginine-containing peptide bound resins.

Peptide Cleavage and Purification

All peptides were deprotected and cleaved from the resin by adding 10 mL of an ice-cold mixture of TFA/TIS/H₂O (9.5:0.25:0.25, v/v/v) and stirring 3 hours at room temperature (Chatenet et al., 2006). After filtration, crude products were precipitated by addition of cold TBME and collected by centrifugation after 3 washes with TBME. Crude peptides were purified by RP-HPLC on a Vydac 218TP1022 C₁₈ column (2.2 x 25 cm; Grace, Columbia, SC) using a linear gradient (10-50% or 20-50% over 50 min) of acetonitrile (0.1% TFA) at a flow rate of 10 mL/min. Absorbance was simultaneously monitored at 215 and 280 nm using a UV detector. Analytical RP-HPLC analysis, performed on a Vydac 218TP54 C₁₈ column (0.46 x 25 cm; Grace), revealed that the purity of all peptides was higher than 97% (Table 1; Figure S1-S33). The authenticity of each peptide was verified by MALDI-TOF-MS on a voyager DE-PRO (AppleraFrance, Villebon-sur-Yvette, France) in the reflector mode with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix.

Cell Culture

Stably transfected human QRFPR CHO cells were obtained as previously described (Le Marec et al., 2011; Neveu et al., 2012). The cells were maintained in F-12 nutrient mixture (Ham-F12) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM glutamine, and penicillin-streptomycin. Expression of G α_{16} cells was maintained using selection antibiotic hygromycin B (200 μ g/mL) and that of QRFPR using geneticin G418 (500 μ g/mL) (Life Technologies, Villebon-Sur-Yvette, France) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Calcium Mobilization Assays

Changes in intracellular Ca²⁺ concentrations induced by 26RFa analogues in CHO-G α_{16} -hQRFPR-transfected cells were measured on a benchtop scanning fluorometer flexstation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) as previously described (Dubessy et al., 2008; Gutierrez-

Pascual et al., 2009; Le Marec et al., 2011; Neveu et al., 2012). Briefly, 96-well assay black plates with clear bottom (Corning international, Avon, France) were seeded at a density of 40,000 cells/well 24 h prior to assay. For profiling agonist experiments, cells were loaded with 2 μ M Fluo-4 acetoxymethyl ester (AM) (Invitrogen) during 1 h, washed thrice, and incubated 30 min with standard HBSS containing 2.5 mM probenecid and 5 mM HEPES. Compounds to be tested were added at final concentrations ranging from 10^{-11} to 10^{-5} M in HBSS, and the fluorescence intensity was measured during 3 min. To evaluate antagonistic potency of the test compounds, cells were incubated with each compounds over 15 min after Fluo-4 AM loading. Then, during fluorescence recording, a pulse of 26RFa at a final concentration of 10^{-7} M was administered. After subtraction of the mean fluorescence background, the baseline was normalized to 100%. Fluorescence peak values were determined for each concentration of compound.

Statistical Analysis

Calcium experiments were performed in triplicate, and data, expressed as mean \pm SEM, were analyzed with the Prism 6.0 software (Graphpad Software, San Diego, CA). EC₅₀ and the IC₅₀ values were determined from concentration-response curves using a sigmoidal dose-response fit with variable slope. Differences between 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ and analogue activities were analyzed by the Mann-Whitney test.

References

- Asami, T., Nishizawa, N., Ishibashi, Y., Nishibori, K., Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Ohtaki, T., and Kitada, C. (2012). Trypsin resistance of a decapeptide KISS1R agonist containing an N^o-methylarginine substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *22*, 6328–6332.
- Baribault, H., Danao, J., Gupte, J., Yang, L., Sun, B., Richards, W., and Tian, H. (2006). The G-protein-coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 709–717.
- Bonner, T.I., Carlebur, M., Davenport, A.P., Foord, S.M., Maguire, J.J. (2016). QRFP receptor. Accessed on 23/12/2016. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology, <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=54>.
- Bruzzo, F., Lectez, B., Alexandre, D., Jégou, S., Mounien, L., Tollemer, H., Chatenet, D., Leprince, J., Vallarino, M., Vaudry, H., et al. (2007). Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* *503*, 573–591.
- Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Régo, J.-C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., et al. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 15247–15252.
- Chartrel, N., Alonzeau, J., Alexandre, D., Jeandel, L., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Boutin, J., Vaudry, H., Anouar, Y., and Llorens-Cortes, C. (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front. Neuroendocrinol.* *32*, 387–397.
- Chartrel, N., Picot, M., El Medhi, M., Arabo, A., Berrahmoune, H., Alexandre, D., Maucotel, J., Anouar, Y., and Prévost, G. (2016). The neuropeptide 26RFa (QRFP) and its role in the regulation of energy homeostasis: A mini-review. *Front. Neurosci.* *10*, 549.
- Chatenet, D., Dubessy, C., Boullaran, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Lihmann, I., Pacaud, P., Tonon, M.C., Vaudry, H., Leprince, J. (2006). Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: identification of a urotensin II antagonist. *J. Med. Chem.* *49*, 7234–7238.
- Dubessy, C., Cartier, D., Lectez, B., Bucharles, C., Chartrel, N., Montero-Hadjadje, M., Bizet, P., Chatenet, D., Tostivint, H., Scalbert, E., et al. (2008). Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: evidence of urotensin II as the neuromuscular junction. *J. Neurochem.* *107*, 361–374.
- Do Rego, J.-C., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H., and Costentin, J. (2006). Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides* *27*, 2715–2721.
- Egido, E.M., Hernández, R., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H., Marco, J., and Silvestre, R.A. (2007). 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides* *28*, 725–730.
- Elhabazi, K., Humbert, J.P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J.J., Bucher, B., Becker, J.A., Sorg, T., Meziane, H., et al. (2013). Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPPF receptors. *Neuropharmacology* *75*, 164–171.

- Fukusumi, S., Yoshida, H., Fujii, R., Maruyama, M., Komatsu, H., Habata, Y., Shintani, Y., Hinuma, S., and Fujino, M. (2003). A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J. Biol. Chem.* 278, 46387–46395.
- Georgsson, J., Bergström, F., Nordqvist, A., Watson, M.J., Blundell, C.D., Johansson, M.J., Petersson, A.U., Yuan, Z.-Q., Zhou, Y., Kristensson, L., et al. (2014). GPR103 antagonists demonstrating anorexigenic activity in vivo: Design and development of pyrrolo[2,3-*c*]pyridines that mimic the C-terminal Arg-Phe motif of QRFP26. *J. Med. Chem.* 57, 5935–5948.
- Granata, R., Settanni, F., Trovato, L., Gallo, D., Gesmundo, I., Nano, R., Gallo, M.P., Bergandi, L., Volante, M., Alloatti, G., et al. (2014). RFamide peptides 43RFa and 26RFa both promote survival of pancreatic-cells and human pancreatic islets but exert opposite effects on insulin secretion. *Diabetes* 63, 2380–2393.
- Gutiérrez-Pascual, E., Leprince, J., Martínez-Fuentes, A.J., Ségalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., et al. (2009). In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. *Mol. Pharmacol.* 76, 58–67.
- Hamzé, A., Gandreuil, C., Lisowski, V., Andureau, F., Fulcrand, P., Martinez, J., and Hernandez, J.-F. (2005). Solid phase synthesis of mono- or disubstituted arginine containing peptides from an isothiocitrulline precursor. *Tetrahedron Lett.* 46, 7349–7353.
- Huang, X., and Miller, W. (1991). A time-efficient linear space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12, 337–357.
- Jiang, Y., Luo, L., Gustafson, E.L., Yadav, D., Lavery, M., Murgolo, N., Vassileva, G., Zeng, M., Laz, T.M., Behan, J., et al. (2003). Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J. Biol. Chem.* 278, 27652–27657.
- Kearney, P.C., Fernandez, M., and Flygare, J.A. (1998). Solid-phase synthesis of 2-aminothiazoles. *J. Org. Chem.* 63, 196–200.
- Kennedy, K.J., Lundquist, J.T., Simandan, T.L., Kokko, K.P., Beeson, C.C., and Dix, T.A. (2000). Design rationale, synthesis, and characterization of non-natural analogs of the cationic amino acids arginine and lysine. *J. Pept. Res.* 55, 348–358.
- Kennedy, K.J., Orwig, K.S., Dix, T.A., Christopher, J., and Jaffa, A.A. (2002). Synthesis and analysis of potent, more lipophilic derivatives of the bradykinin B2 receptor antagonist peptide Hoe 140. *J. Pept. Res.* 59, 139–148.
- Kokko, K.P., Arrigoni, C.E., and Dix, T.A. (2001). Selectivity enhancement induced by substitution of non-natural analogues of arginine and lysine in arginine-based thrombin inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1947–1950.
- Lakowski, T.M., 't Hart, P., Ahern, C.A., Martin, N.I., and Frankel, A. (2010). N η -substituted arginyl peptide inhibitors of protein arginine N-methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* 5, 1053–1063.

- Le Marec, O., Neveu, C., Lefranc, B., Dubessy, C., Boutin, J.A., Do-Régo, J.-C., Costentin, J., Tonon, M.-C., Tena-Sempere, M., Vaudry, H., et al. (2011). Structure–activity relationships of a series of analogues of the RFamide-related peptide 26RFa. *J. Med. Chem.* *54*, 4806–4814.
- Lee, D.K., Nguyen, T., Lynch, K.R., Cheng, R., Vanti, W.B., Arkhitko, O., Lewis, T., Evans, J.F., George, S.R., and O’Dowd, B.F. (2001). Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* *275*, 83–91.
- Leprince, J., Gandolfo, P., Thoumas, J.L., Patte, C., Fauchère, J.L., Vaudry, H., and Tonon, M.C. (1998). Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J. Med. Chem.* *41*, 4433–4438.
- Leprince, J., Oulyadi, H., Vaudry, D., Masmoudi, O., Gandolfo, P., Patte, C., Costentin, J., Fauchère, J.-L., Davoust, D., Vaudry, H., et al. (2001) Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *Eur. J. Biochem.* *268*, 6045–6057.
- Leprince, J., Bagnol, D., Bureau, R., Fukusumi, S., Granata, R., Hinuma, S., Larhammar, D., Primeaux, S., Sopkova-de Oliveiras Santos, J., Tsutsui, K., et al. (2017) The Arg-Phe-amide peptide 26RFa/QRFP and its Receptor. *IUPHAR Review. Br. J. Pharmacol.* (early edition).
- Liu, Y., Zhang, Y., Li, S., Huang, W., Liu, X., Lu, D., Meng, Z., and Lin, H. (2009). Molecular cloning and functional characterization of the first non-mammalian 26RFa/QRFP orthologue in Goldfish, *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* *303*, 82–90.
- Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Nogueiras, R., Vigo, E., Tovar, S., Chartrel, N., Le Marec, O., Leprince, J., Aguilar, E., Pinilla, L., et al. (2006). Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J. Physiol.* *573*, 237–249.
- Nestor, J.J. (1995). Improved duration of action of peptide drugs. In *Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism* (Yaylor, M.D., and Amidon, G.L., eds). Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 449–471.
- Nestor, J.J., Tahilramani, T., Ho, T.L., McRae, G.I., and Vickery, B.H. (1988). Potent, long-acting luteinizing hormone-releasing antagonists containing new synthetic amino acids: *N,N'*-dialkyl-D-homoarginines. *J. Med. Chem.* *31*, 65–72.
- Neveu, C., Lefranc, B., Tasseau, O., Do-Rego, J.-C., Bourmaud, A., Chan, P., Bauchat, P., Marec, O.L., Chuquet, J., Guilhaudis, L., et al. (2012). Rational design of a low molecular weight, stable, potent, and long-lasting GPR103 aza- β^3 -pseudopeptide agonist. *J. Med. Chem.* *55*, 7516–7524.
- Neveu, C., Dulin, F., Lefranc, B., Galas, L., Calbrix, C., Bureau, R., Rault, S., Chuquet, J., Boutin, J.A., Guilhaudis, L., et al. (2014). Molecular basis of agonist docking in a human GPR103 homology model by site-directed mutagenesis and structure-activity relationship studies: 26RFa docking. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 4425–4439.

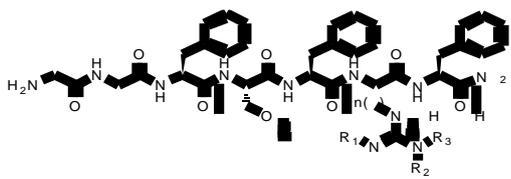
- Ostrovskaya, O., Moroz, L., and Krishtal, O. (2004). Modulatory action of RFamide-related peptides on acid-sensing ionic channels is pH dependent: the role of arginine. *J. Neurochem.* *91*, 252–255.
- Parhar, I., Ogawa, S., and Kitahashi, T. (2012). RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Prog. Neurobiol.* *98*, 176–196.
- Pierry, C., Couve-Bonnaire, S., Guilhaudis, L., Neveu, C., Marotte, A., Lefranc, B., Cahard, D., Ségalas-Milazzo, I., Leprince, J., and Pannecoucke, X. (2013). Fluorinated pseudopeptide analogues of the neuropeptide 26RFa: synthesis, biological, and structural studies. *ChemBioChem* *14*, 1620–1633.
- Prévost, G., Jeandel, L., Arabo, A., Coëffier, M., El Ouahli, M., Picot, M., Alexandre, D., Gobet, F., Leprince, J., Berrahmoune, H., et al. (2015). Hypothalamic neuropeptide 26RFa acts as an incretin to regulate glucose homeostasis. *Diabetes* *64*, 2805–2816.
- Primeaux, S.D. (2011). QRFP in female rats: effects on high fat food intake and hypothalamic gene expression across the estrous cycle. *Peptides* *32*, 1270–1275.
- Quillet, R., Ayachi, S., Bihel, F., Elhabazi, K., Ilien, B., and Simonin, F. (2016). RF-amide neuropeptides and their receptors in mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol. Ther.* *160*, 84–132.
- Schreiber, A.L., Arceneaux, K.P., Malbrue, R.A., Mouton, A.J., Chen, C.S., Bench, E.M., Braymer, H.D., and Primeaux, S.D. (2016). The effects of high fat diet and estradiol on hypothalamic prepro-QRFP mRNA expression in female rats. *Neuropeptides* *58*, 103–109.
- Shu, H., Chen, H., Liu, Y., Yang, L., Yang, Y., and Zhang, H. (2014). Molecular cloning, characterization and functional analysis of QRFP in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* *176*, 34–41.
- Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S.C., Iguchi, H., Kawasaki, Y.I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., et al. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 7438–7443.
- Thieriet, N., Alsina, J., Giralt, E., Guibé, F., and Albericio, F. (1997) Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron Lett.* *38*, 7275–7278.
- Thomas, D., Koopmans, T., Lakowski, T.M., Kreinin, H., Vhuiyan, M.I., Sedlock, S.A., Bui, J.M., Martin, N.I., and Frankel, A. (2014). Protein arginine N-methyltransferase substrate preferences for different Nⁿ-substituted arginyl peptides. *ChemBioChem* *15*, 1607–1613.
- Tobari, Y., Iijima, N., Tsunekawa, K., Osugi, T., Haraguchi, S., Ubuka, T., Ukena, K., Okanoya, K., Tsutsui, K., and Ozawa, H. (2011). Identification, localisation and functional implication of 26RFa orthologue peptide in the brain of zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Neuroendocrinol.* *23*, 791–803.
- Ukena, K., Tachibana, T., Iwakoshi-Ukena, E., Saito, Y., Minakata, H., Kawaguchi, R., Osugi, T., Tobari, Y., Leprince, J., Vaudry, H., et al. (2010). Identification, localization, and function

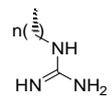
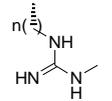
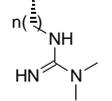
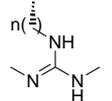
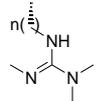
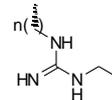
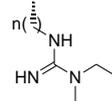
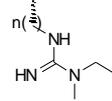
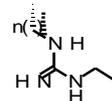
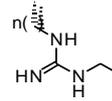
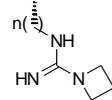
of a novel avian hypothalamic neuropeptide, 26RFa, and its cognate receptor, G protein-coupled receptor-103. *Endocrinology* *151*, 2255–2264.

Yamamoto, T., Wada, T., and Miyazaki, R. (2008). Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* *157*, 214–222.

Yamamoto, T., Miyazaki, R., and Yamada, T. (2009). Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides* *30*, 1683–1688.

Table 1: Chemical Data for Synthesized Compounds.



Side-chain	R ₁	R ₂	R ₃	n ^a	Compound	Formula	MH ⁺ calc. ^b	MH ⁺ obs. ^c	Purity (%)
	H	H	H	2	LV-2290	C ₃₉ H ₅₁ N ₁₁ O ₈	802.39	802.39	99.9
				3	LV-2021	C ₄₀ H ₅₃ N ₁₁ O ₈	816.41	816.43	99.9
				4	LV-2291	C ₄₁ H ₅₅ N ₁₁ O ₈	830.42	830.41	99.9
	H	H	Me	2	LV-2263	C ₄₀ H ₅₃ N ₁₁ O ₈	816.41	816.52	99.9
				3	LV-2186	C ₄₁ H ₅₅ N ₁₁ O ₈	830.42	830.42	99.9
				4	LV-2264	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	844.44	844.46	99.9
	H	Me	Me	2	LV-2268	C ₄₁ H ₅₅ N ₁₁ O ₈	830.42	830.42	99.9
				3	LV-2185	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	844.44	844.46	99.9
				4	LV-2269	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.43	99.9
	Me	H	Me	2	LV-2276	C ₄₁ H ₅₅ N ₁₁ O ₈	830.42	830.44	99.9
				3	LV-2199	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	844.44	844.46	99.9
				4	LV-2277	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.46	99.9
	Me	Me	Me	2	LV-2278	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	844.44	844.48	99.9
				3	LV-2279	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.50	99.9
				4	LV-2280	C ₄₄ H ₆₁ N ₁₁ O ₈	872.47	879.49	99.9
	H	H	Et	2	LV-2270	C ₄₁ H ₅₅ N ₁₁ O ₈	830.42	830.43	99.9
				3	LV-2271	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	844.44	844.55	99.9
				4	LV-2272	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.47	99.9
	H	Et	Et	2	LV-2265	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.35	99.9
				3	LV-2266	C ₄₄ H ₆₁ N ₁₁ O ₈	872.47	872.48	99.6
				4	LV-2267	C ₄₅ H ₆₃ N ₁₁ O ₈	886.49	886.45	99.9
	H	Me	Et	2	LV-2281	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	844.44	844.42	99.9
				3	LV-2282	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.52	97.3
				4	LV-2283	C ₄₄ H ₆₁ N ₁₁ O ₈	872.47	872.48	99.9
	H	H	Pr	2	LV-2273	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	844.44	844.60	99.9
				3	LV-2274	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.48	99.9
				4	LV-2275	C ₄₄ H ₆₁ N ₁₁ O ₈	872.47	872.54	98.5
	H	H	iBu	2	LV-2287	C ₄₃ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	858.45	858.46	99.9
				3	LV-2288	C ₄₄ H ₆₁ N ₁₁ O ₈	872.47	872.50	97.4
				4	LV-2289	C ₄₅ H ₆₃ N ₁₁ O ₈	886.49	886.50	99.9
	H	Aze		2	LV-2284	C ₄₂ H ₅₅ N ₁₁ O ₈	842.42	842.52	99.9
				3	LV-2285	C ₄₃ H ₅₇ N ₁₁ O ₈	856.44	856.47	99.9
				4	LV-2286	C ₄₄ H ₅₉ N ₁₁ O ₈	870.45	870.47	99.9

^an = 2, norarginine derivative-containing peptides; n = 3, arginine derivative-containing peptides; n = 4, homoarginine derivative-containing peptides. ^bCalculated molecular masses. ^cObserved molecular masses measured by MALDI-ToF mass spectrometry.

Table 2: Biological Data for Synthesized Compounds.

Compound	Agonist		Antagonist		Max effect (%) ^b
	EC ₅₀ (nM) ^a	pEC ₅₀	IC ₅₀ (nM)	pIC ₅₀	
26RFa	46 ± 30	8.28 ± 0.11	nd	-	-
LV-2290	> 10 ⁵	-	> 10 ⁵	-	-
LV-2021	1640 ± 259	6.13 ± 0.09	nd	-	-
LV-2291	1910 ± 310	5.75 ± 0.09	nd	-	-
LV-2263	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2186	66.4 ± 16.2 ^{***}	7.15 ± 0.10	nd	-	-
LV-2264	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2268	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2185	>10 ⁵	-	6060 ± 922	5.22 ± 0.07	80
LV-2269	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2276	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2199	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2277	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2278	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2279	>10 ⁵	-	8250 ± 569 [*]	5.08 ± 0.02	87.5
LV-2280	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2270	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2271	1370 ± 543	5.84 ± 0.15	nd	-	-
LV-2272	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2265	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2266	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2267	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2281	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2282	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2283	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2273	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2274	1400 ± 308	5.94 ± 0.16	nd	-	-
LV-2275	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2287	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2288	1500 ± 424	5.92 ± 0.25	nd	-	-
LV 2289	2747 ± 1460	5.76 ± 0.26	nd	-	-
LV-2284	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2285	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
LV-2286	>10 ⁵	-	>10 ⁵	-	-
25e	nd	-	579 ± 161	6.24 ± 0.20	100

^aData are mean ± SEM of at least three distinct experiments performed in triplicate. ^bThe maximal effect, at a concentration of 10⁻⁴M, is expressed as a percentage of the 26RFa-induced (10⁻⁷ M) mean calcium response inhibition. (***) *P* < 0.001 vs control 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ as assessed by Mann and Whitney test. nd, not determined.

Legend to figures**Scheme 1:**

General Synthetic Scheme for the Preparation of Substituted Norarginine- (n = 2), Arginine- (n = 3) and Homoarginine-containing Peptides (n = 4). The residue involved in the synthetic route is indicated in red. For clarity, N- and C-terminal parts have been removed on the second line.

Figure 1:

RP-HPLC Analysis of Crude Peptide Intermediates and [(Me,Me)^{ω,ω}Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2269) Analogue. Crude homothiocitrulline-containing peptide (A), S-methylhomoisothiocitrulline-containing peptide (B) and [(Me,Me)^{ω,ω}Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2269, C) were analyzed after resin cleavage and N-terminal and side-chain deprotection of resin grafted peptides.

Figure 2:

Effect of Graded Concentrations of Arg²⁵-Modified 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ Analogues on Basal [Ca²⁺]_i Mobilization in CHO-Gα₁₆-hQRFPR-transfected Cells. Representative dose-response curves of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (closed squares; A,B,C) and its analogues (closed circles) [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186; A), [(Et)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2271; B), and [(Pr)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2274; C). Data are mean ± SEM of triplicate. The EC₅₀ calculated from dose-response curves were 66.4 ± 16.2 nM for LV-2186, 1370 ± 543 nM for LV-2271 and 1400 ± 308 nM for LV-2274.

Figure 3:

Effect of Arg²⁵-Modified 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ Analogues on 26RFa-evoked [Ca²⁺]_i Mobilization in CHO-Gα₁₆-hQRFPR-transfected Cells. (A) Normalized response of 26RFa (10⁻⁷M) on calcium-mobilization in the absence (HBSS control) or presence of 10⁻⁵M of AstraZeneca antagonist 25e or Arg²⁵-modified analogues. (B) Percentage of inhibition induced by HBSS, AstraZeneca antagonist 25e or Arg²⁵-modified analogues on 26RFa-evoked [Ca²⁺]_i increase. Data are mean ± SEM at least three independent determinations. (*) *P* < 0.05, (***) *P* < 0.001.

Figure 4:

Effect of Graded Concentrations of Arg²⁵-Modified 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ Analogues on 26RFa-evoked [Ca²⁺]_i Mobilization in CHO-Gα₁₆-hQRFPR-transfected Cells. Representative dose-inhibition curves of Arg²⁵-modified analogues [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185; A), [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279; B) and AstraZeneca antagonist 25e (C) on (10⁻⁷ M) 26RFa-evoked response CHO-Gα₁₆-hQRFPR-transfected cells. Data are mean ± SEM of triplicate. The IC₅₀ value calculated from the data was 6060 ± 922 nM for

$[(\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega}\text{Arg}^{25}]\text{26RFa}_{(20-26)}$ (LV-2185), 8250 ± 569 nM for $[(\text{Me},\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega,\omega'}\text{Arg}^{25}]\text{26RFa}_{(20-26)}$ (LV-2279) and 579 ± 161 nM for 25e.

Figure 5:

Effect of Arg²⁵-Modified 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ Analogues on 26RFa-evoked [Ca²⁺]_i Mobilization in CHO-Gα₁₆-hQRFPR-transfected Cells. Representative dose-response curves showing the calcium-mobilizing effect of 26RFa in the absence (closed squares; A,B) or presence of 10⁻⁵ M (closed circles) of AstraZeneca antagonist 25e (A) or $[(\text{Me},\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega,\omega'}\text{Arg}^{25}]\text{26RFa}_{(20-26)}$ (LV-2279; B). Data are mean ± SEM of triplicate.

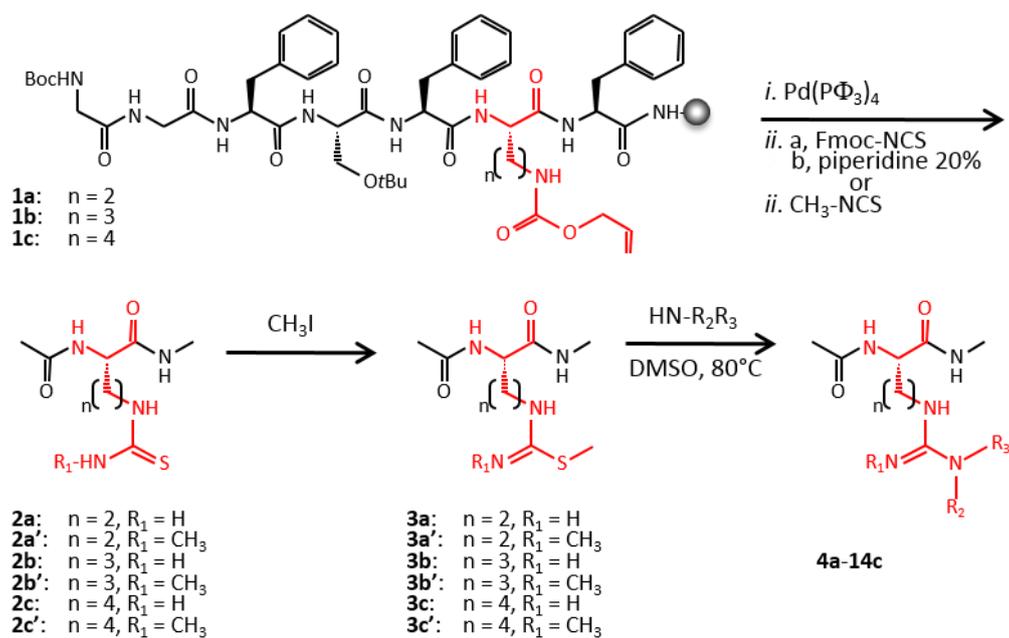


Schéma 1

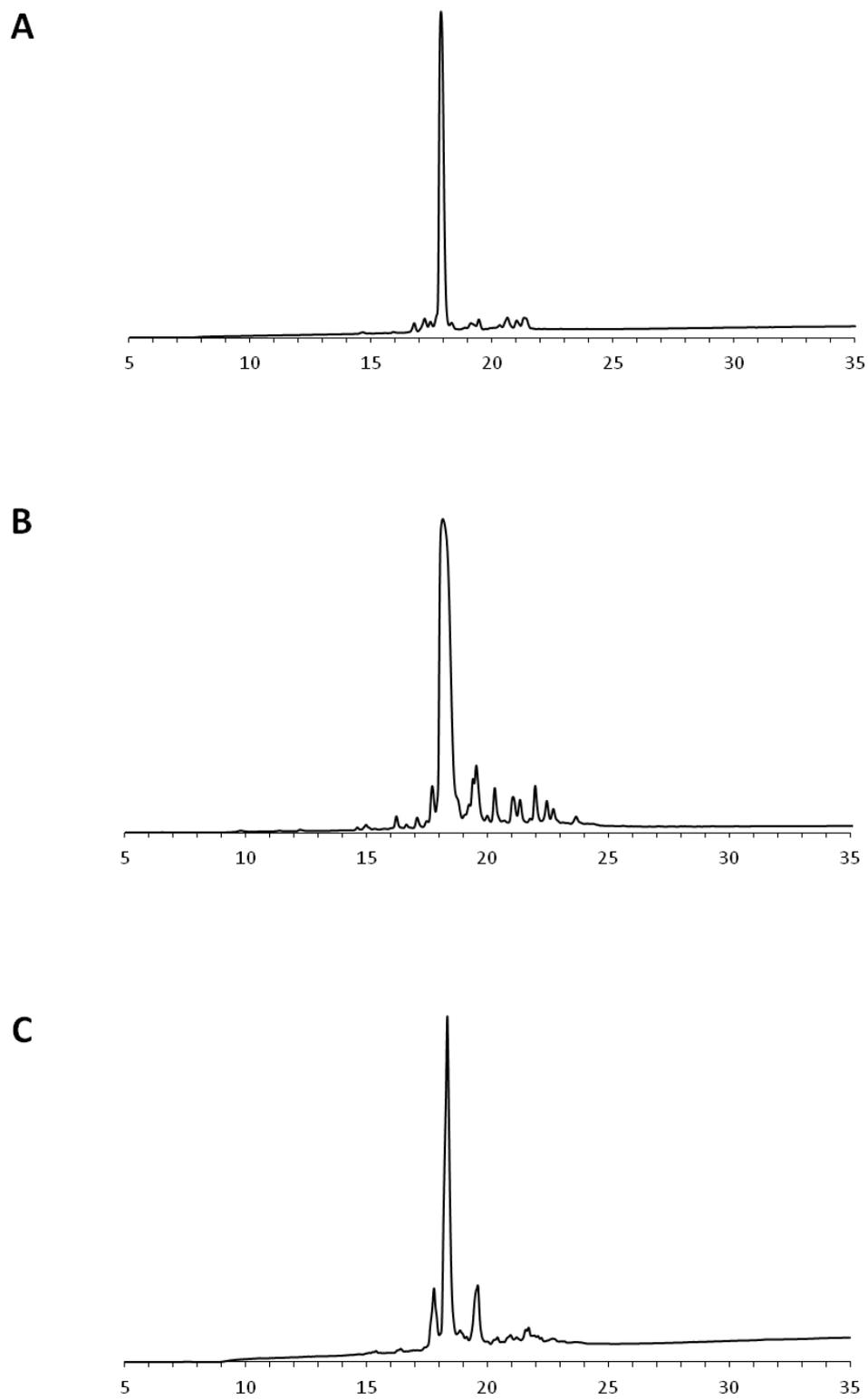


Figure 1

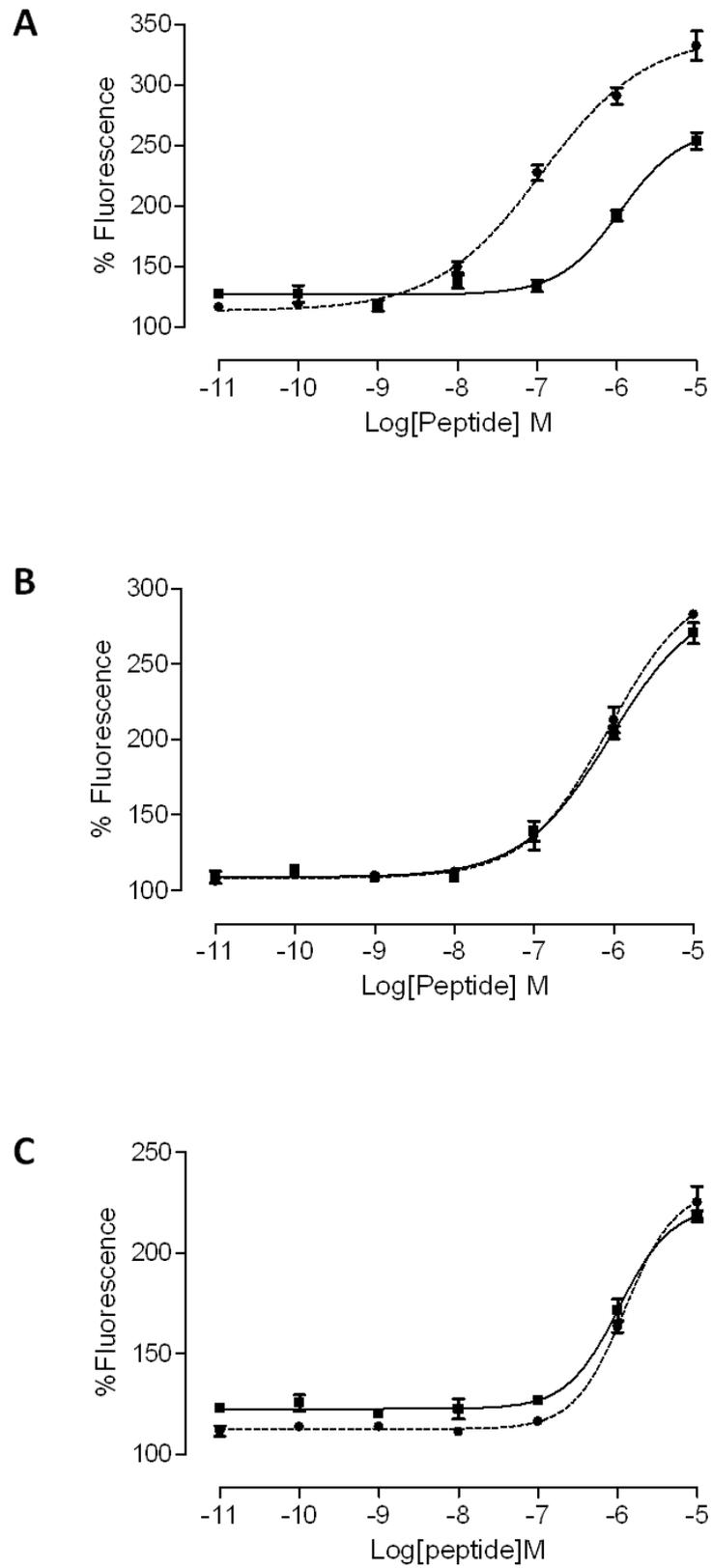


Figure 2

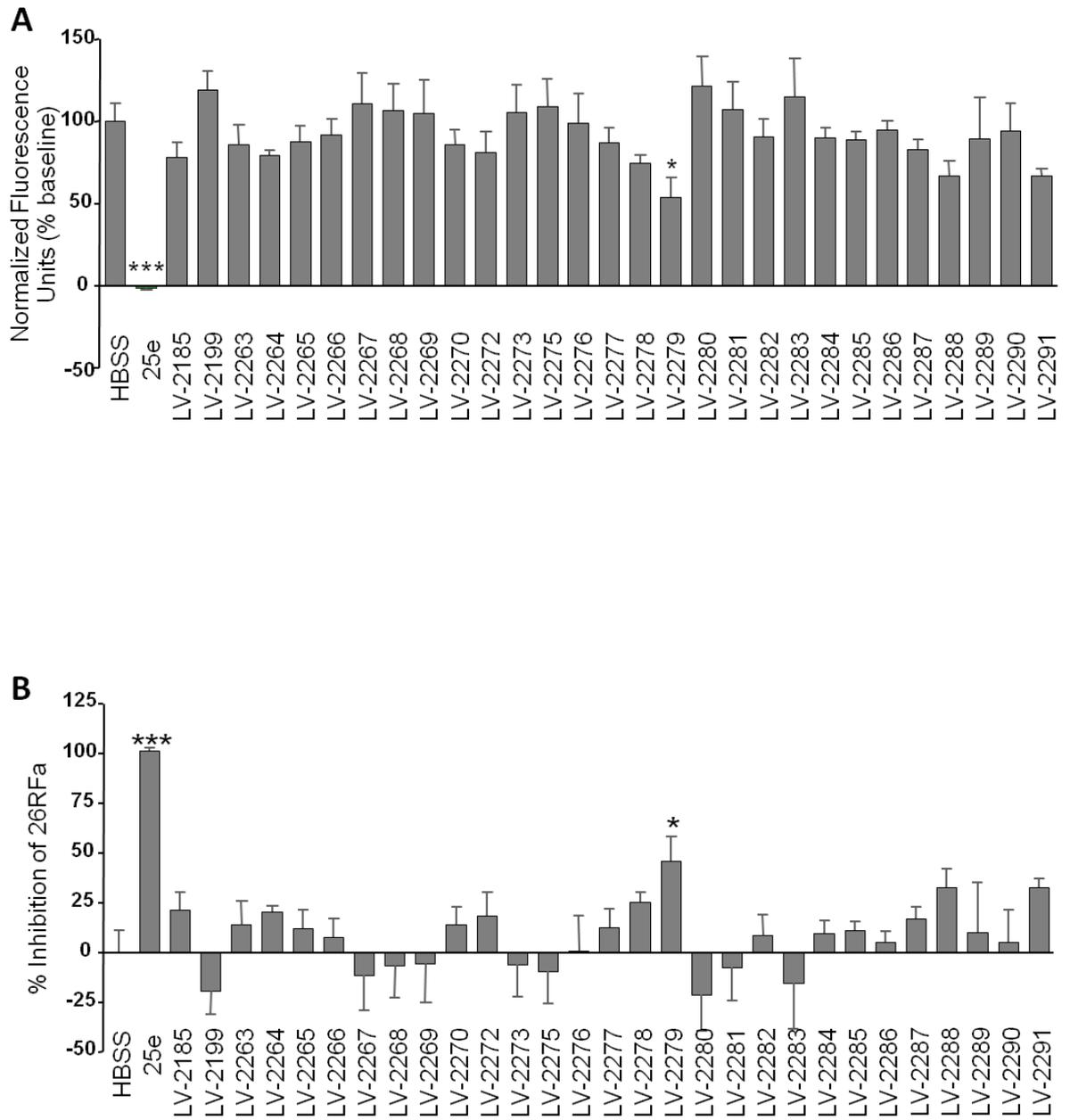


Figure 3

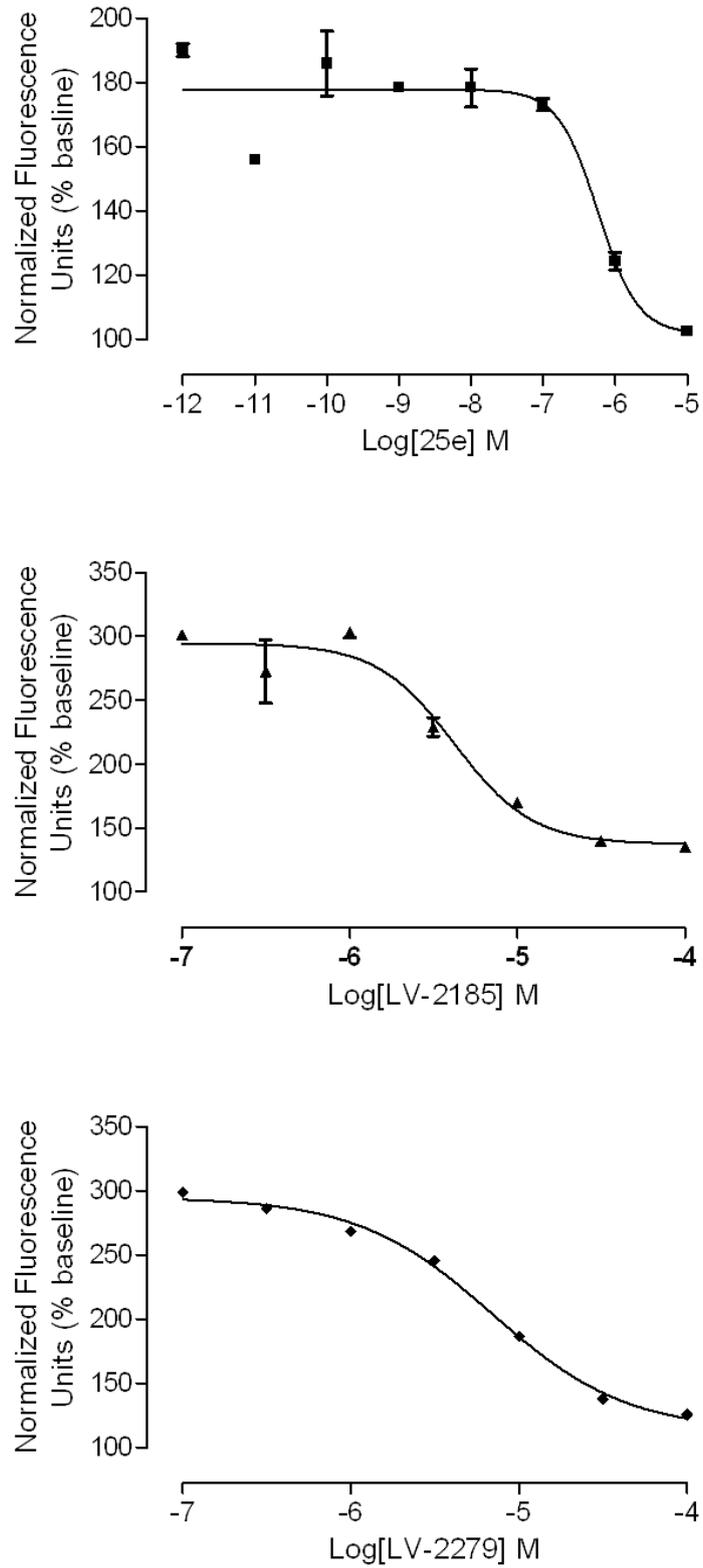
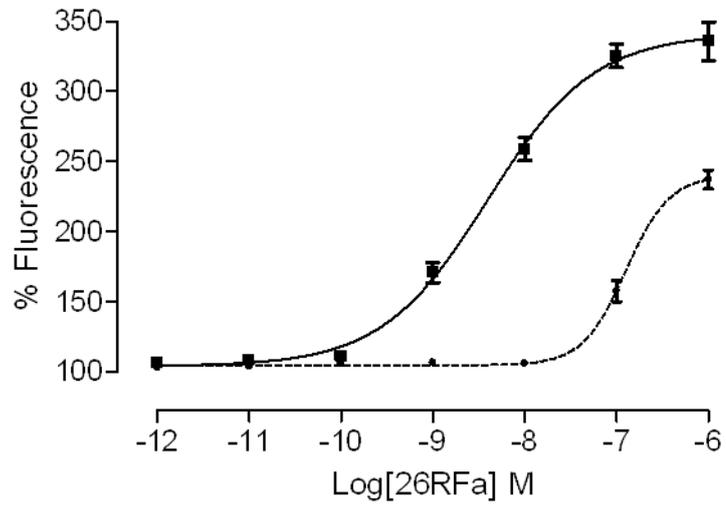


Figure 4

A



B

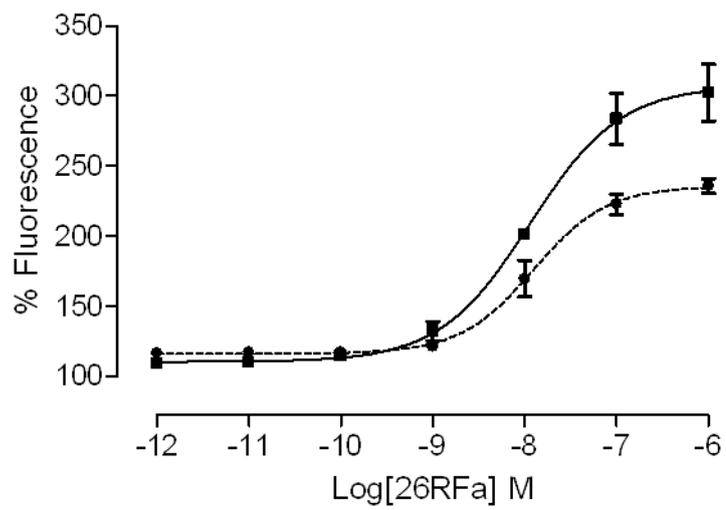
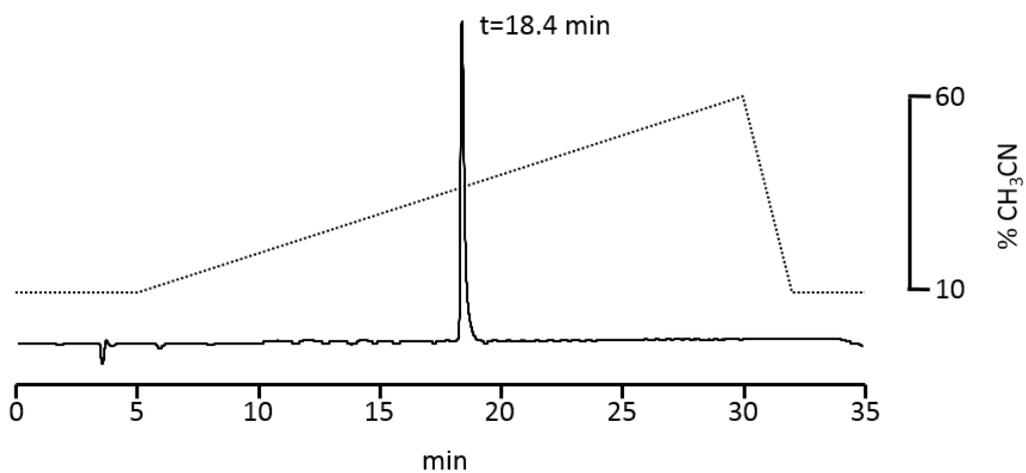
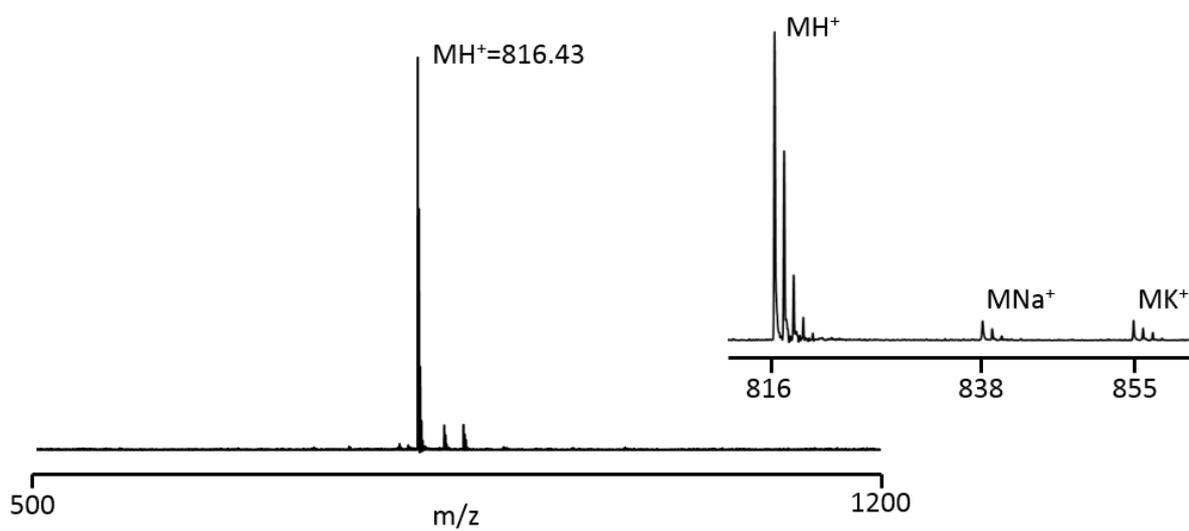
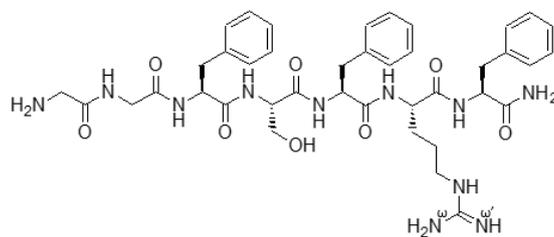


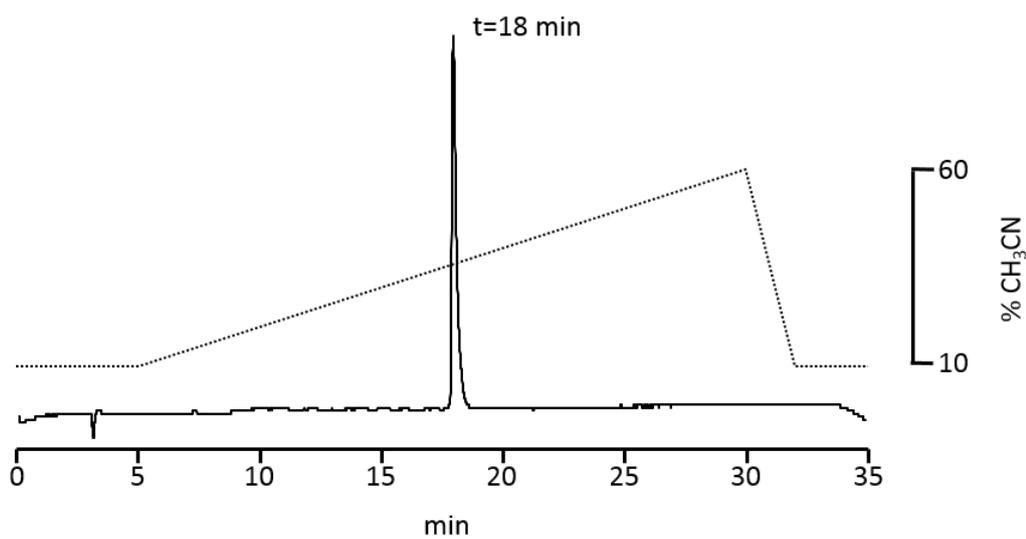
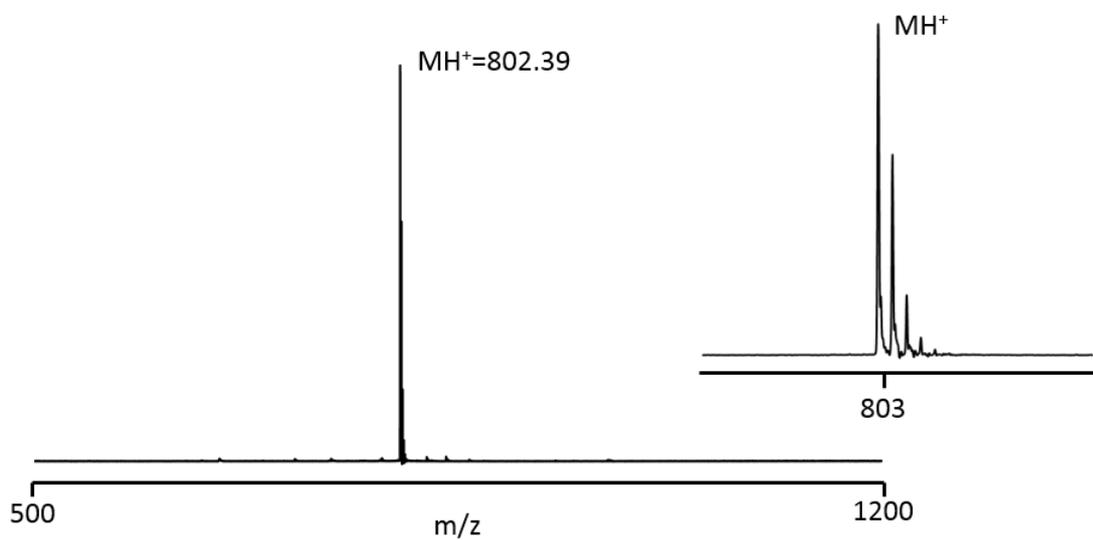
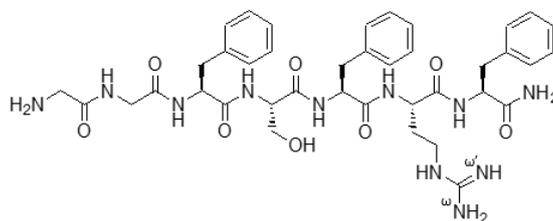
Figure 5

Supplemental Material

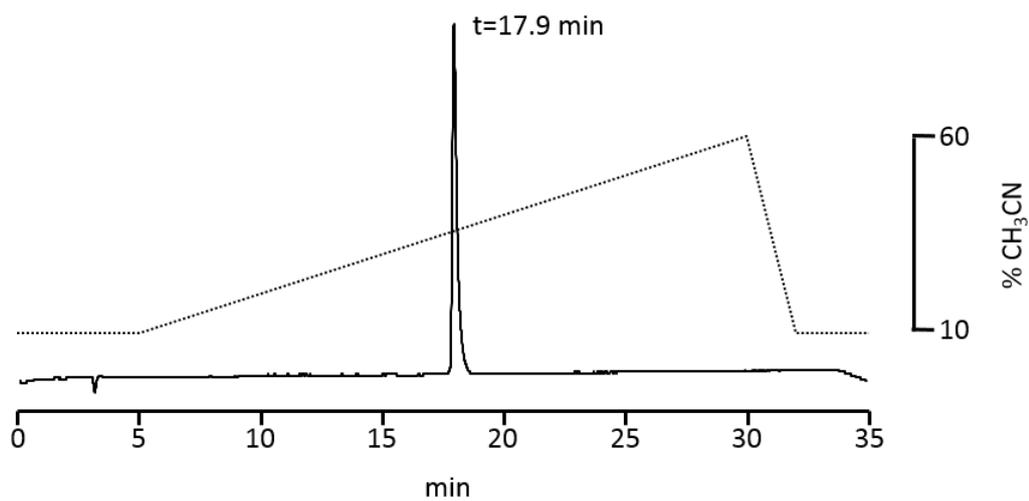
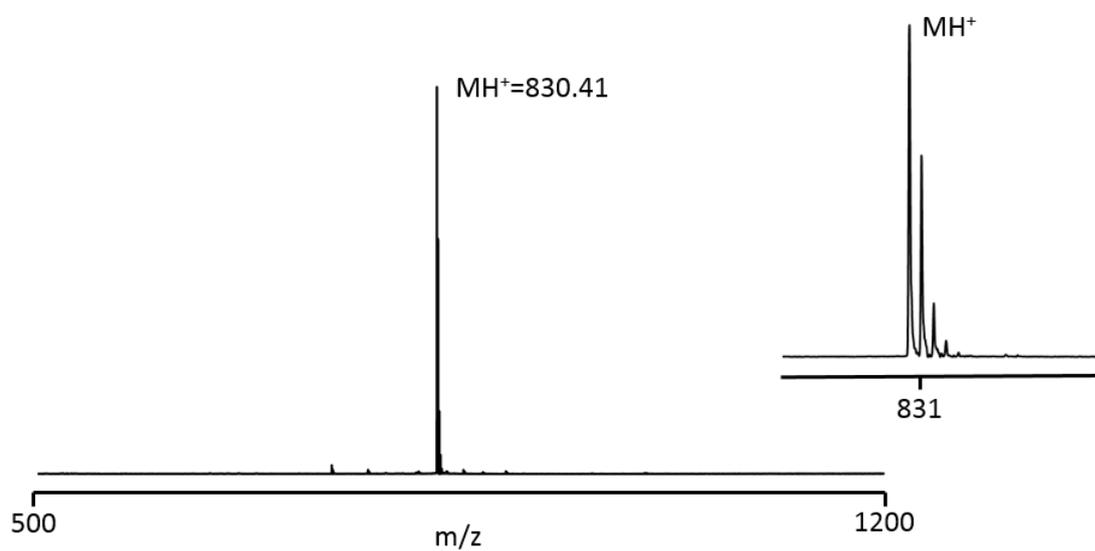
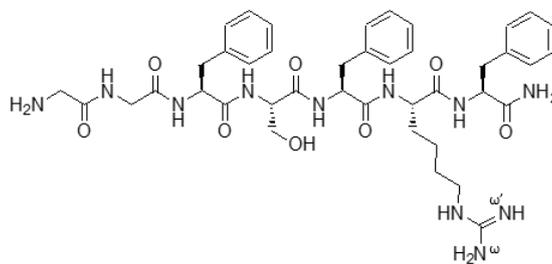
Supplementary Figure S1 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2021



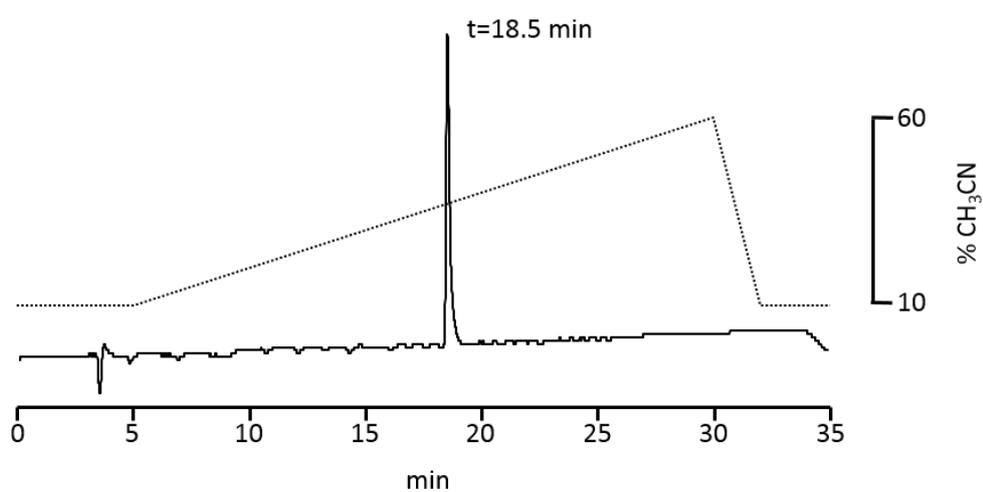
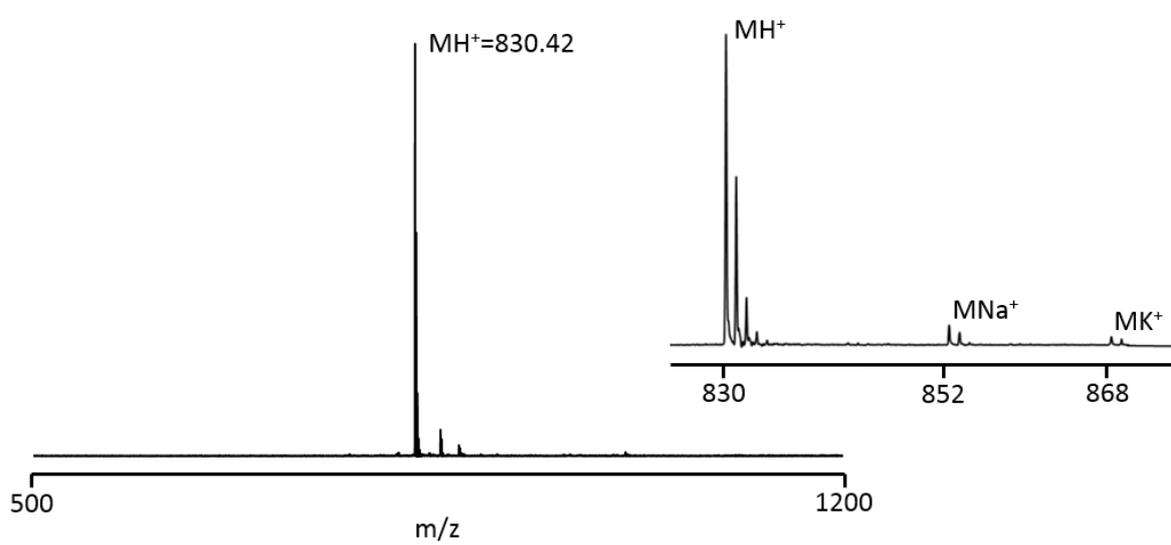
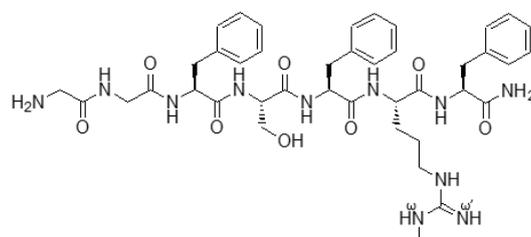
Supplementary Figure S2 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [Nar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2290



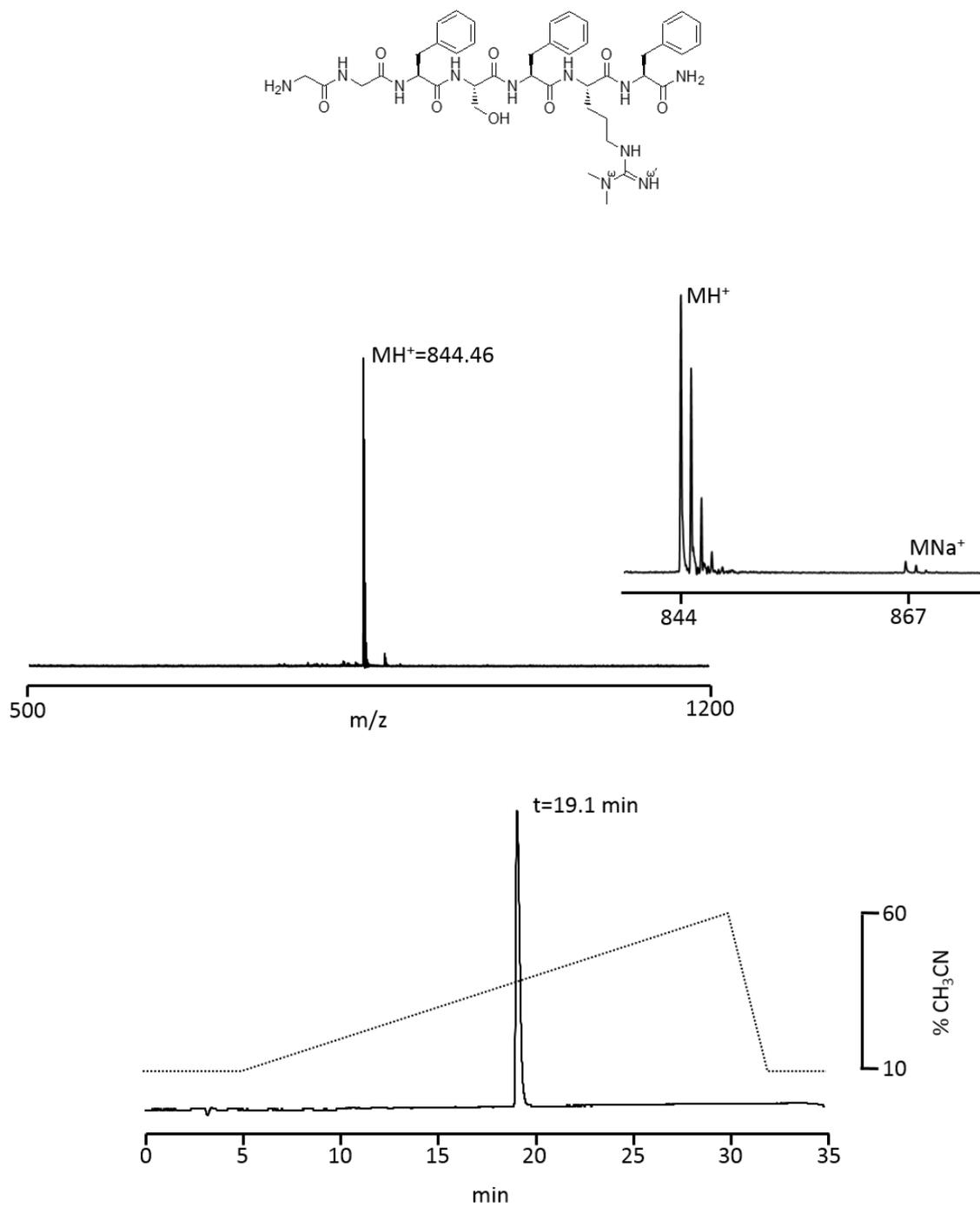
Supplementary Figure S3 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of [Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ LV-2291



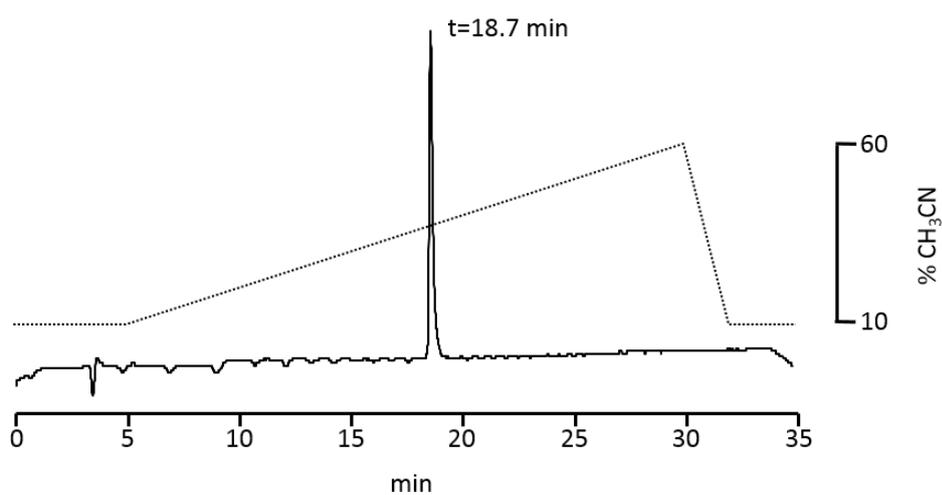
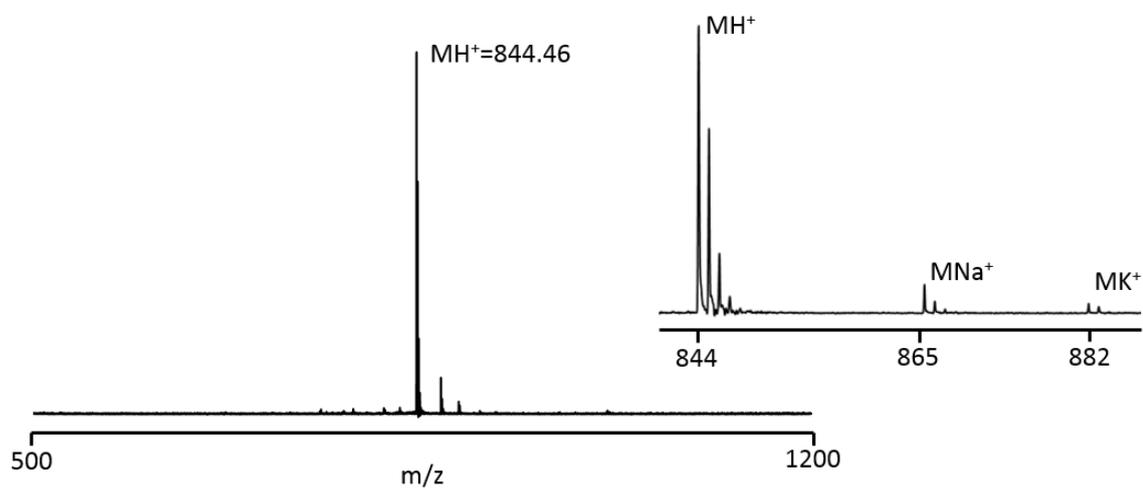
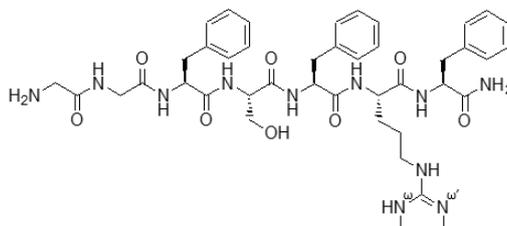
Supplementary Figure S4 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me})^{\omega}\text{Arg}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2186



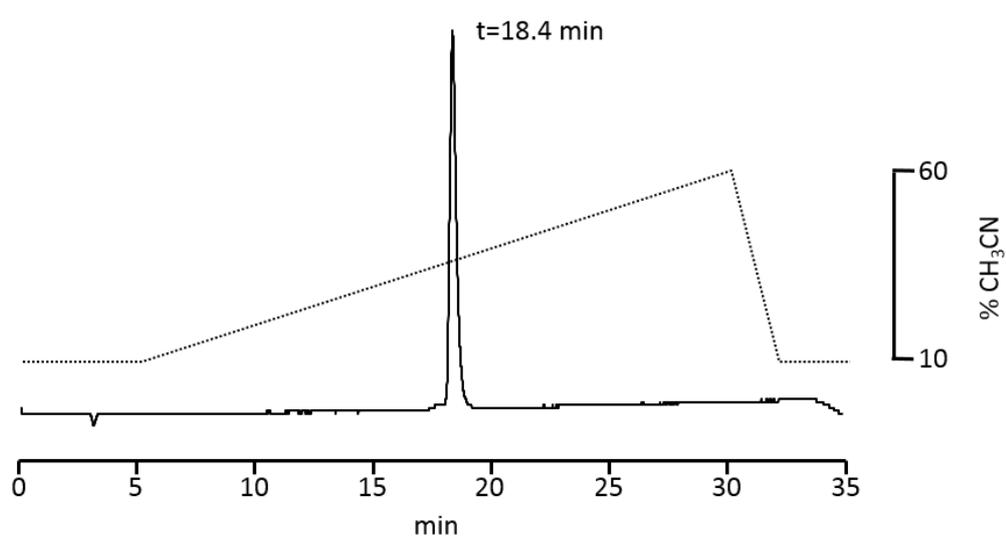
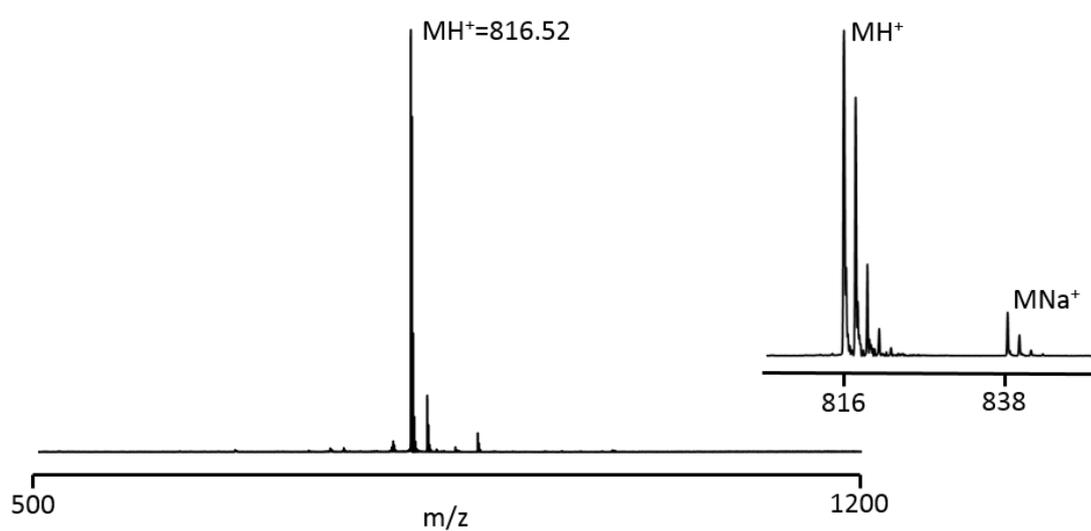
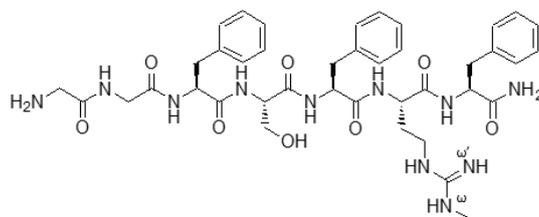
Supplementary Figure S5 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega}\text{Arg}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2185



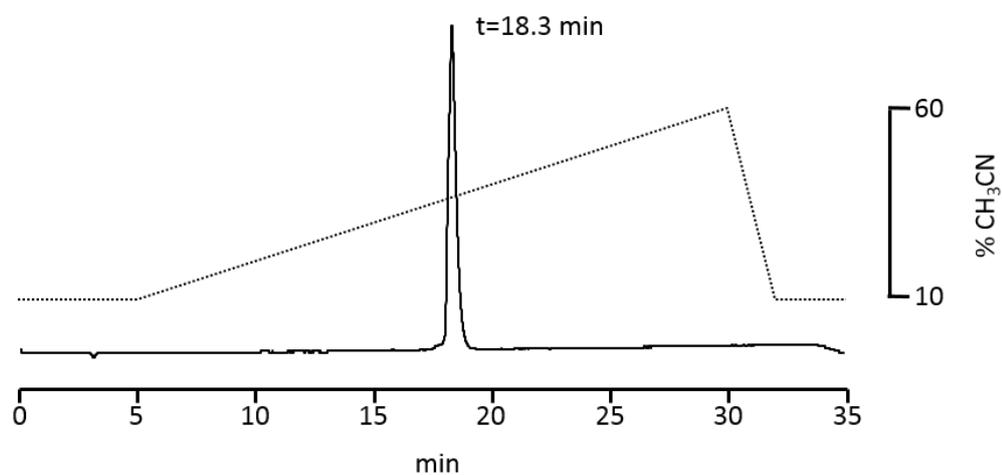
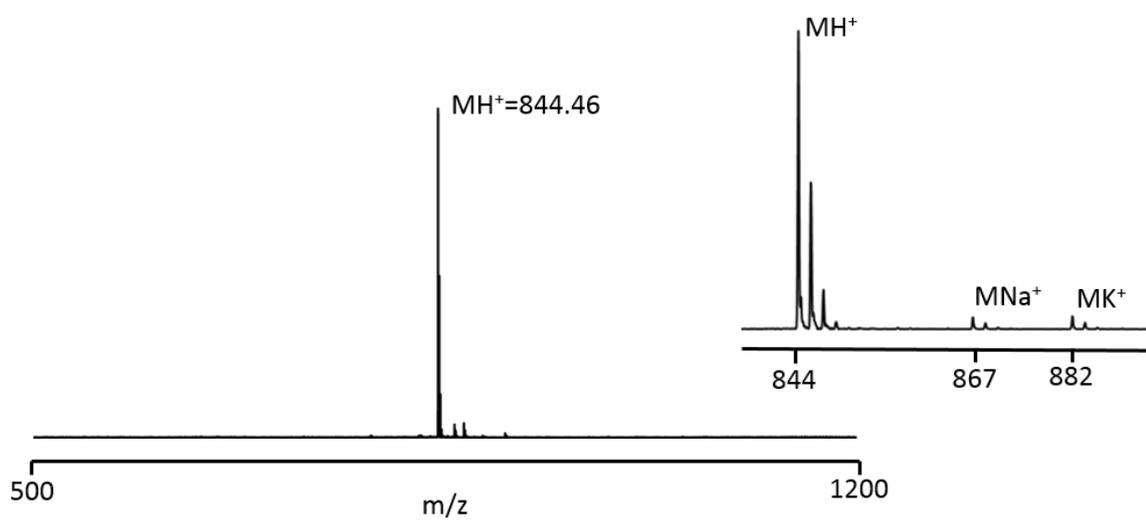
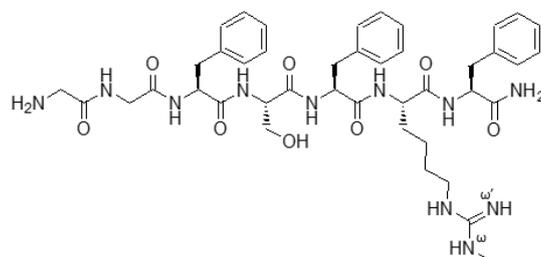
Supplementary Figure S6 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega'}\text{Arg}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2199



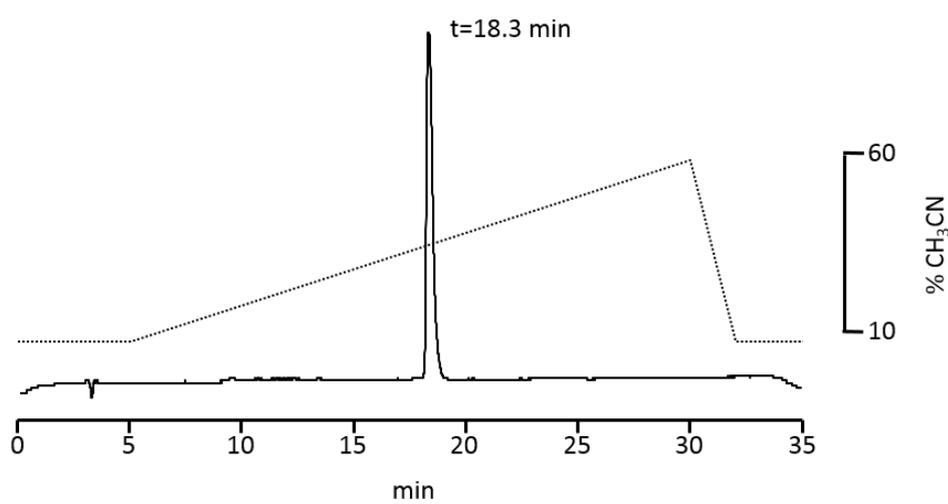
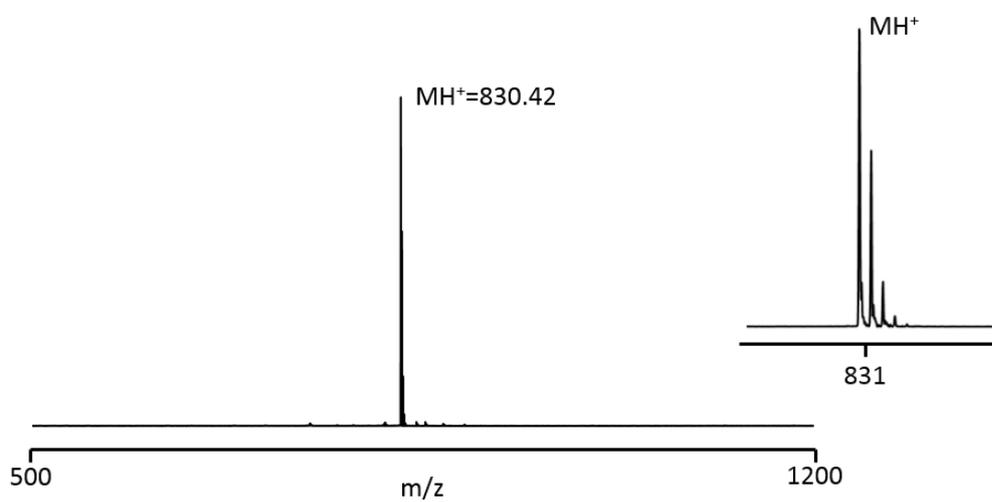
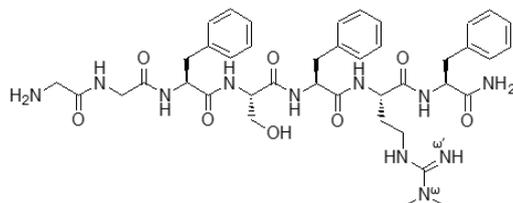
Supplementary Figure S7 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of $[(Me)^{\omega}Nar^{25}]26Rfa_{(20-26)}$, LV-2263



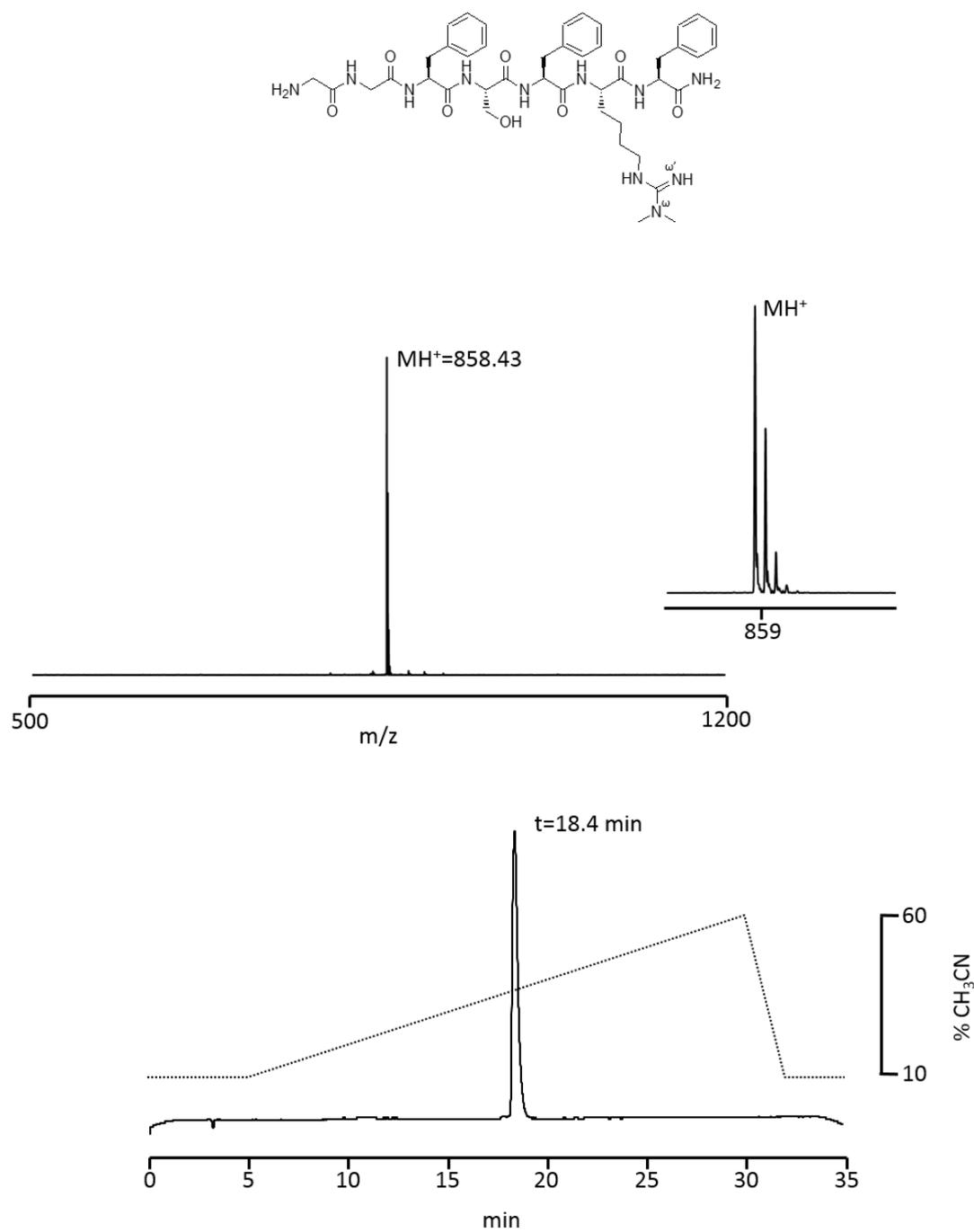
Supplementary Figure S8 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me})^{\omega}\text{Har}^{25}]_{26}\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2264



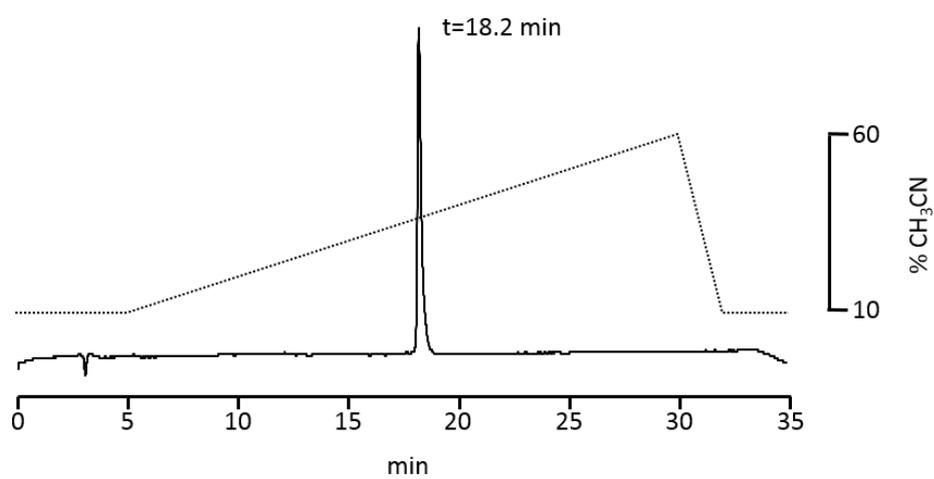
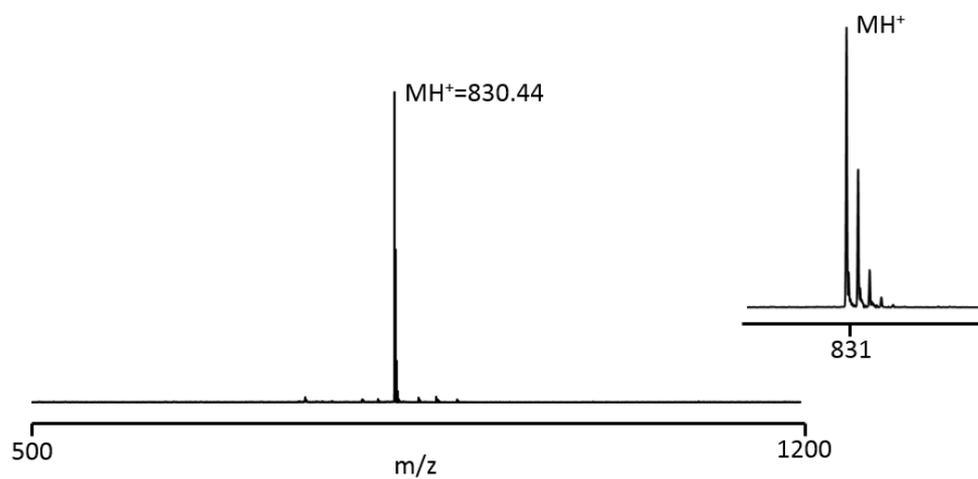
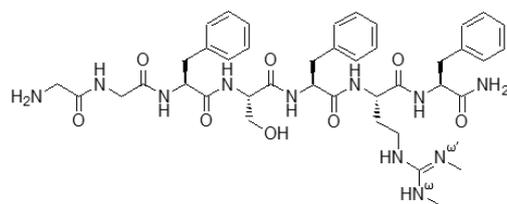
Supplementary Figure S9 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega'}\text{Nar}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2268



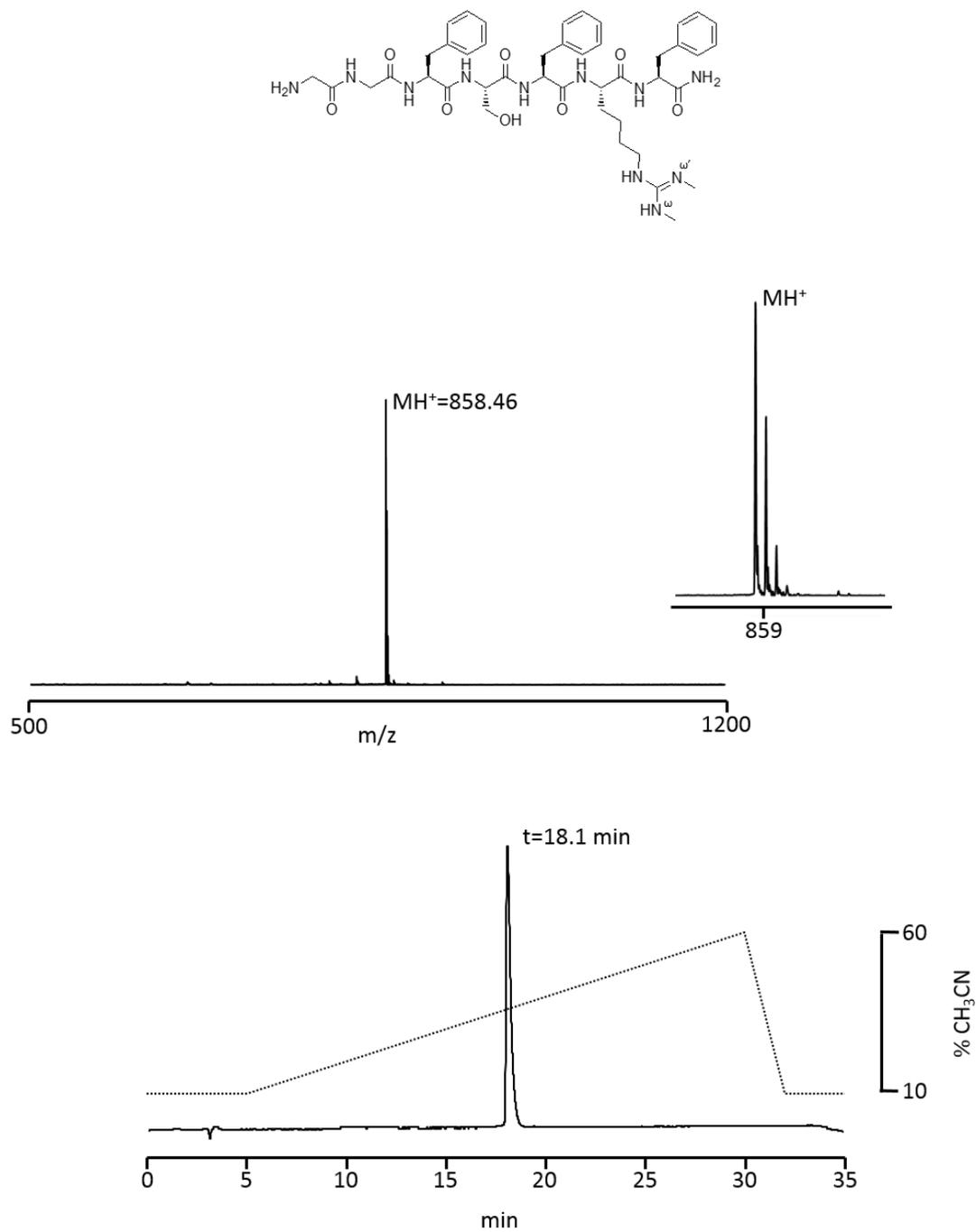
Supplementary Figure S10 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of [(Me,Me)^{ω,ω}Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2269



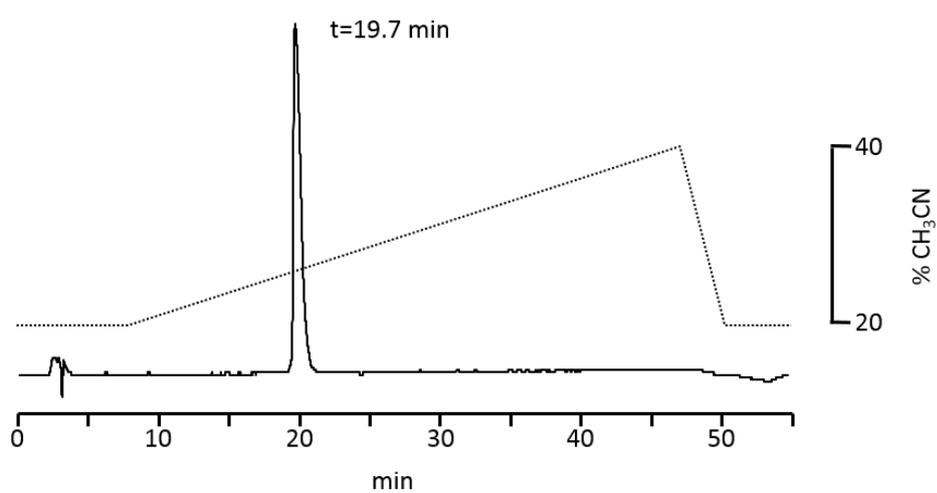
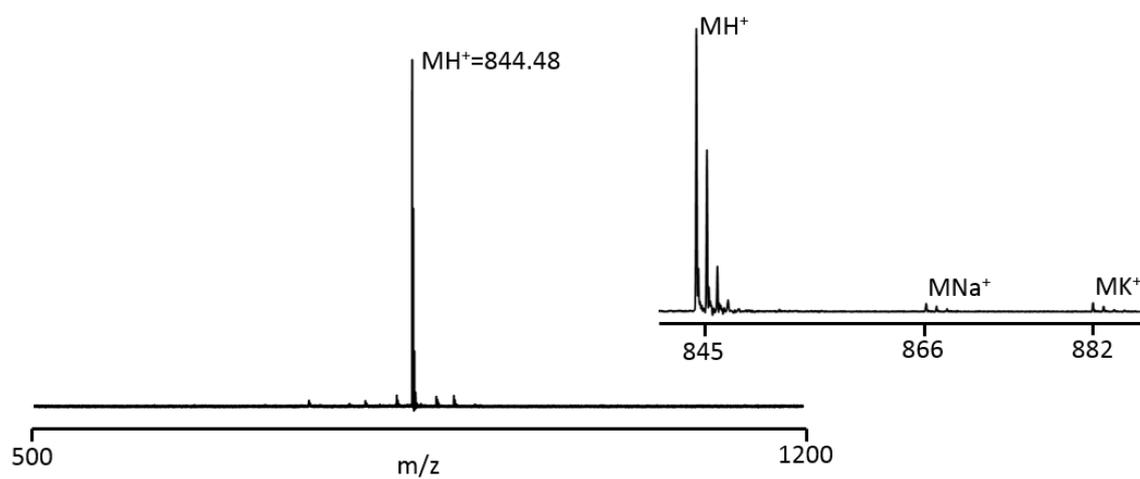
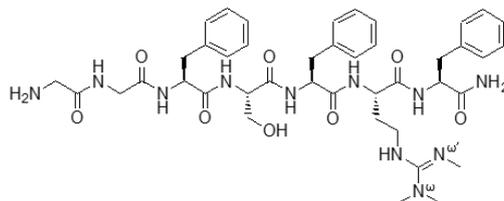
Supplementary Figure S11 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [(Me,Me)^{ω,ω'}Nar²⁵]₂₆RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2276



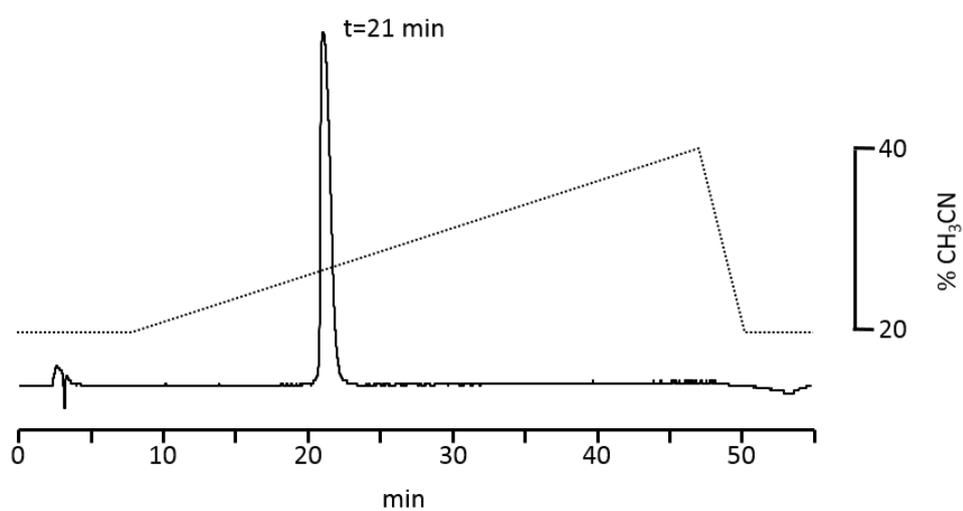
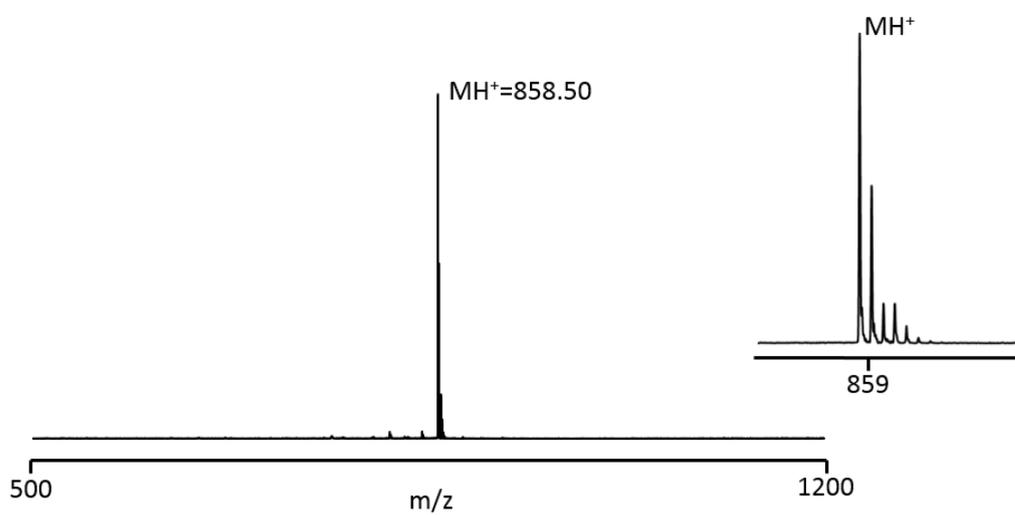
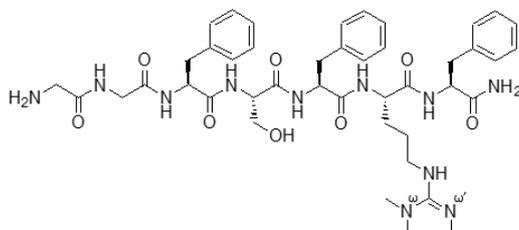
Supplementary Figure S12 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega'}\text{Har}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2277



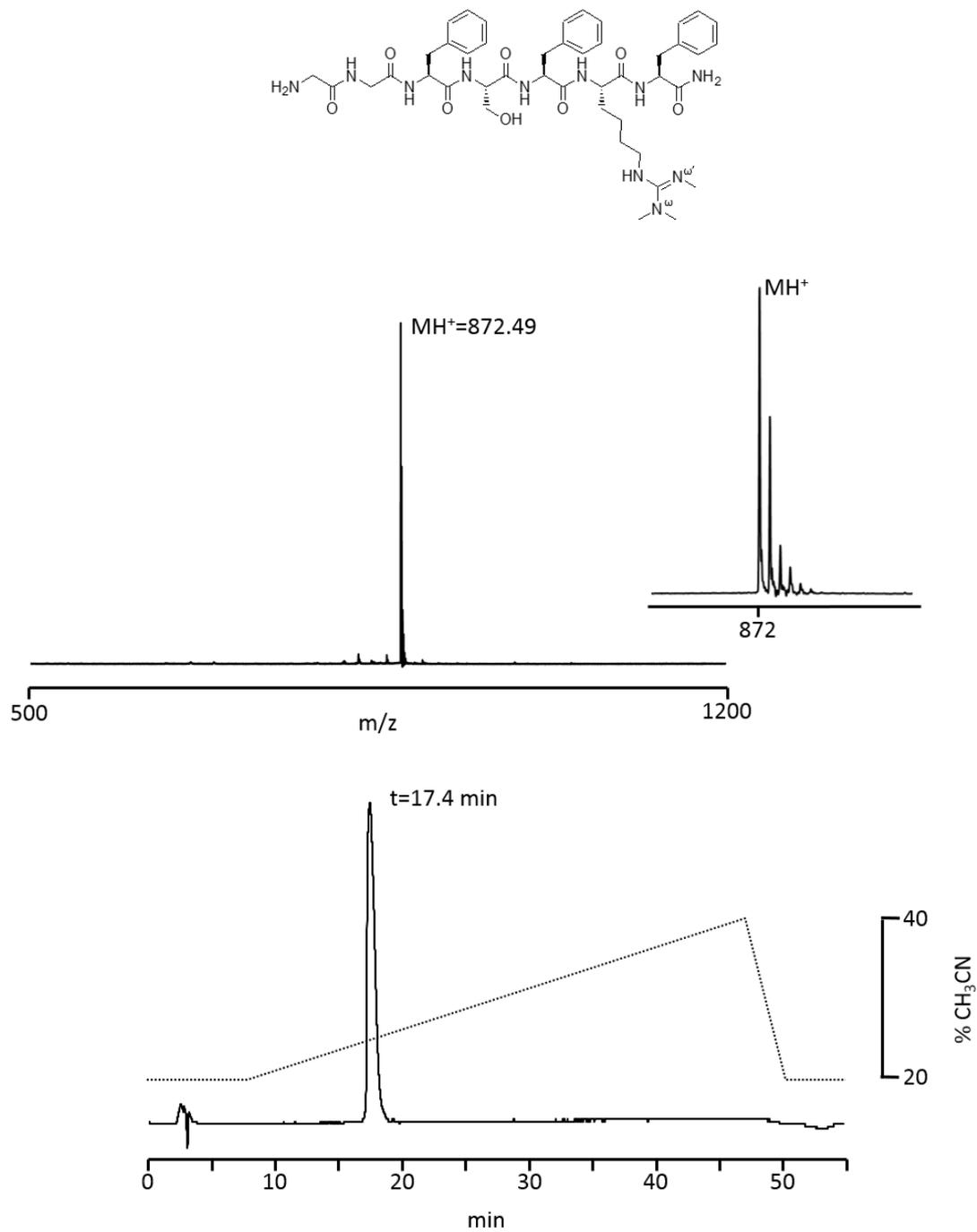
Supplementary Figure S13 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me},\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega,\omega'}\text{Nar}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2278



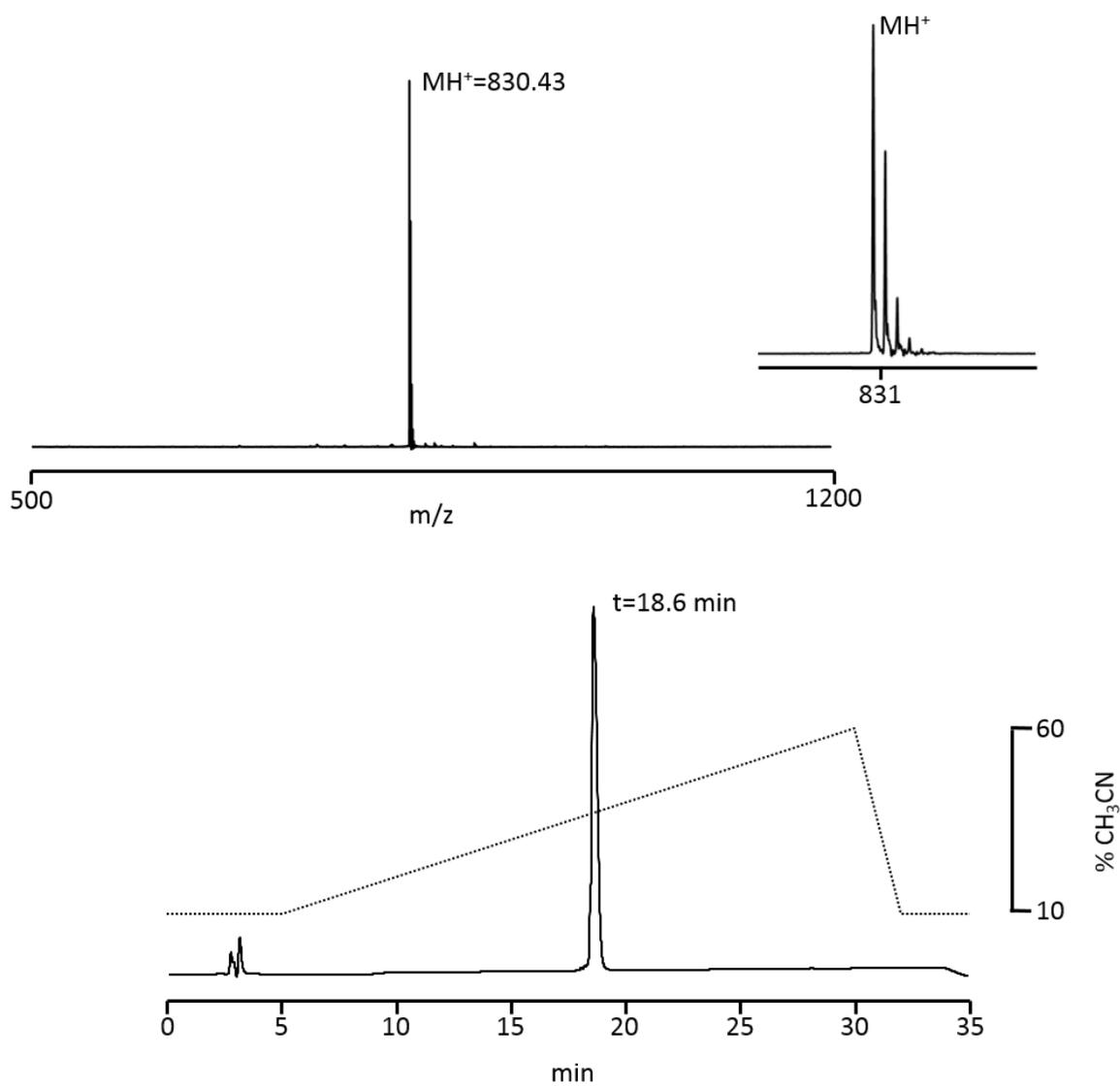
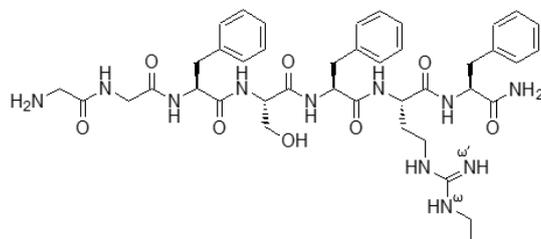
Supplementary Figure S14 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω'}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2279



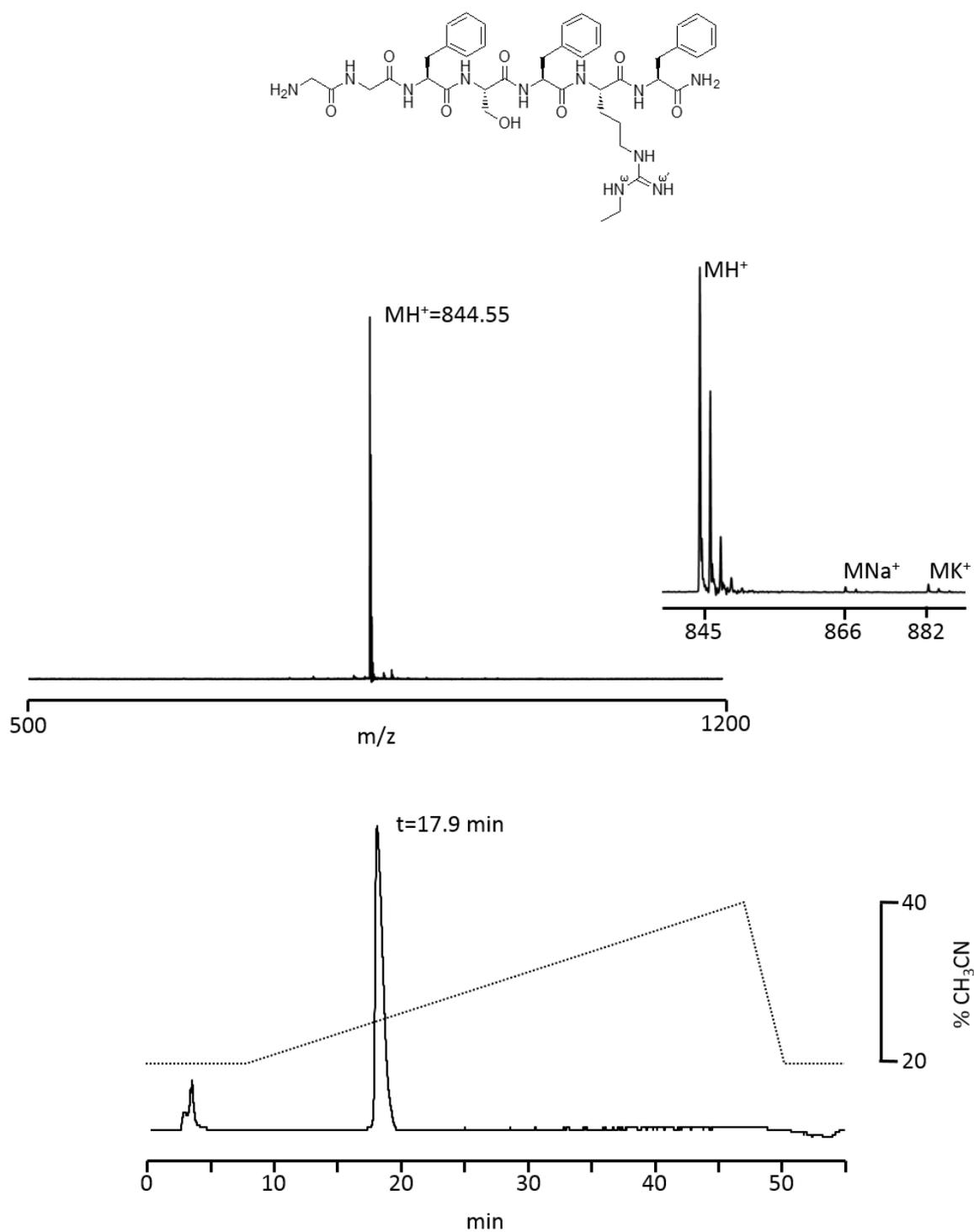
Supplementary Figure S15 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Me},\text{Me},\text{Me})^{\omega,\omega,\omega'}\text{Har}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2280



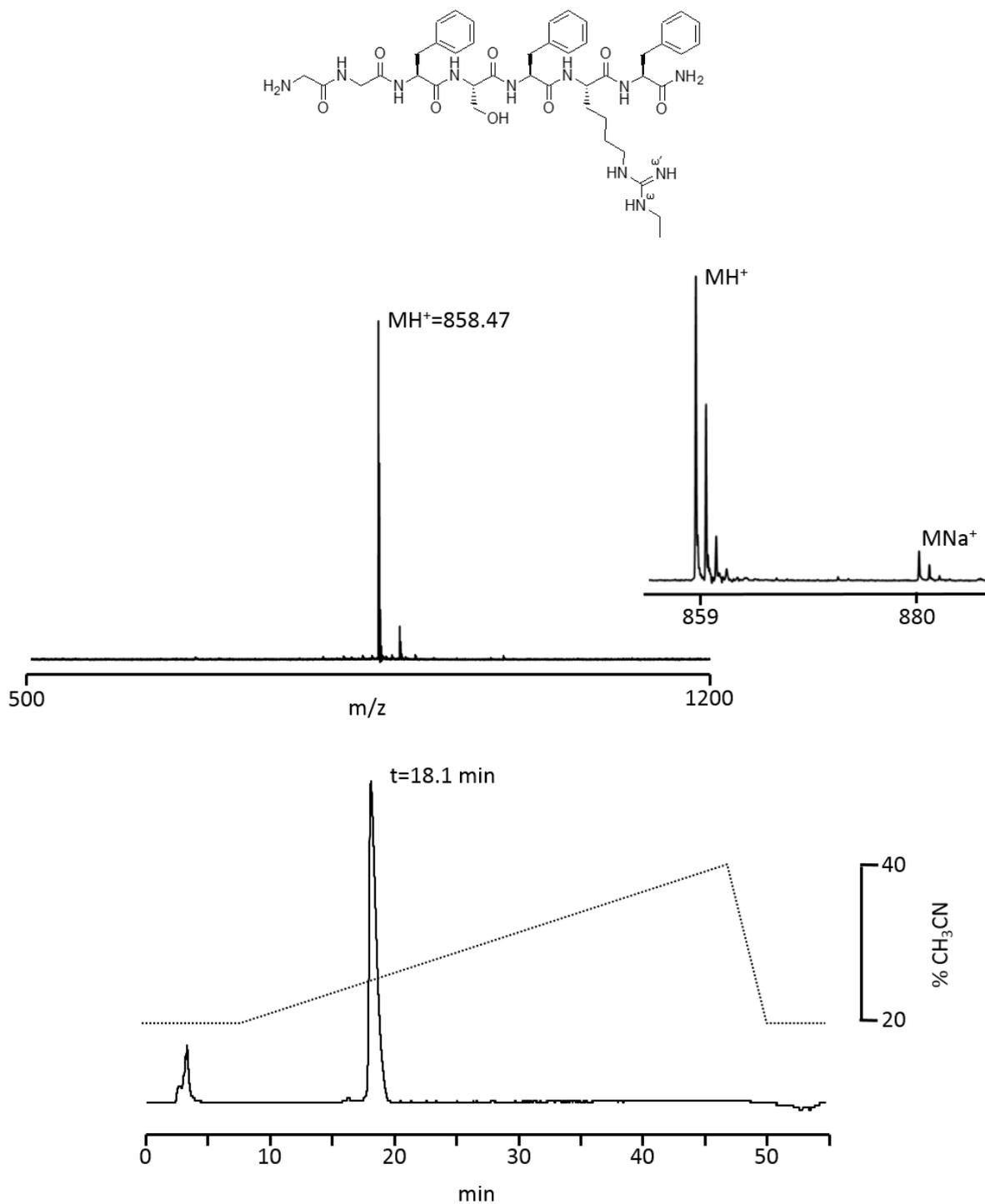
Supplementary Figure S16 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of $[(Et)^\omega \text{Nar}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2270



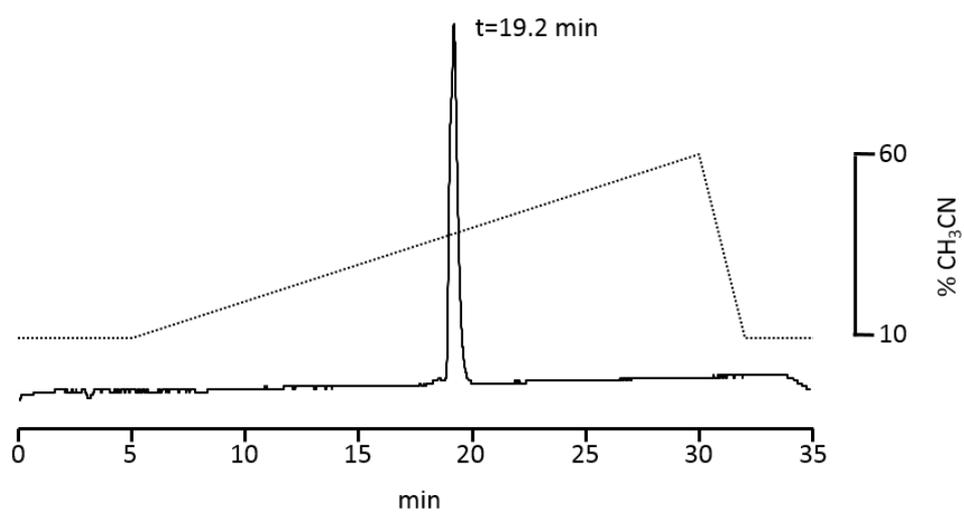
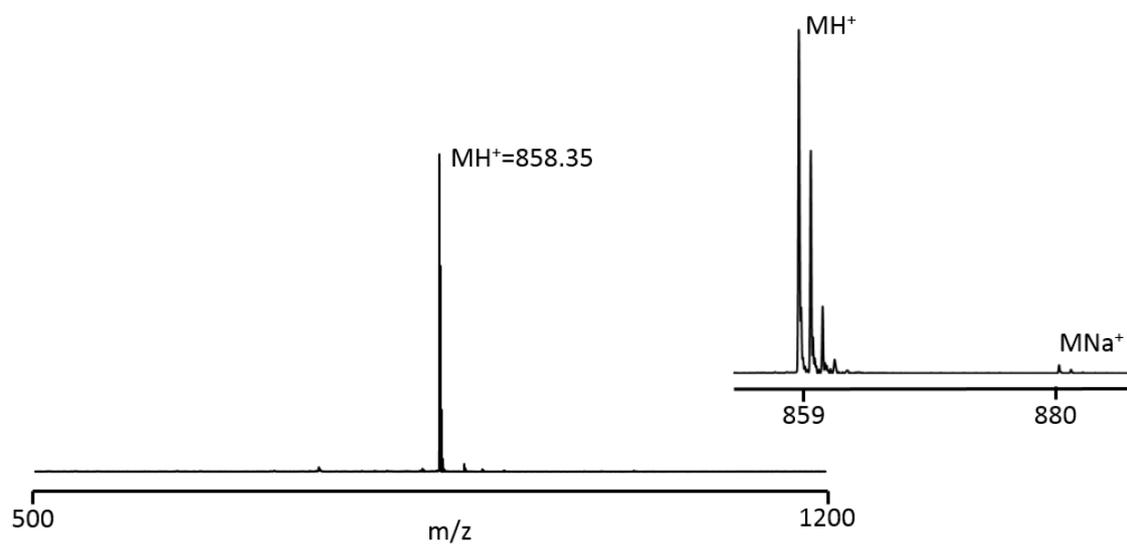
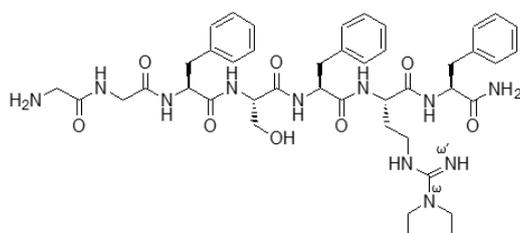
Supplementary Figure S17 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [(Et)^ωArg²⁵]²⁶Fa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2271



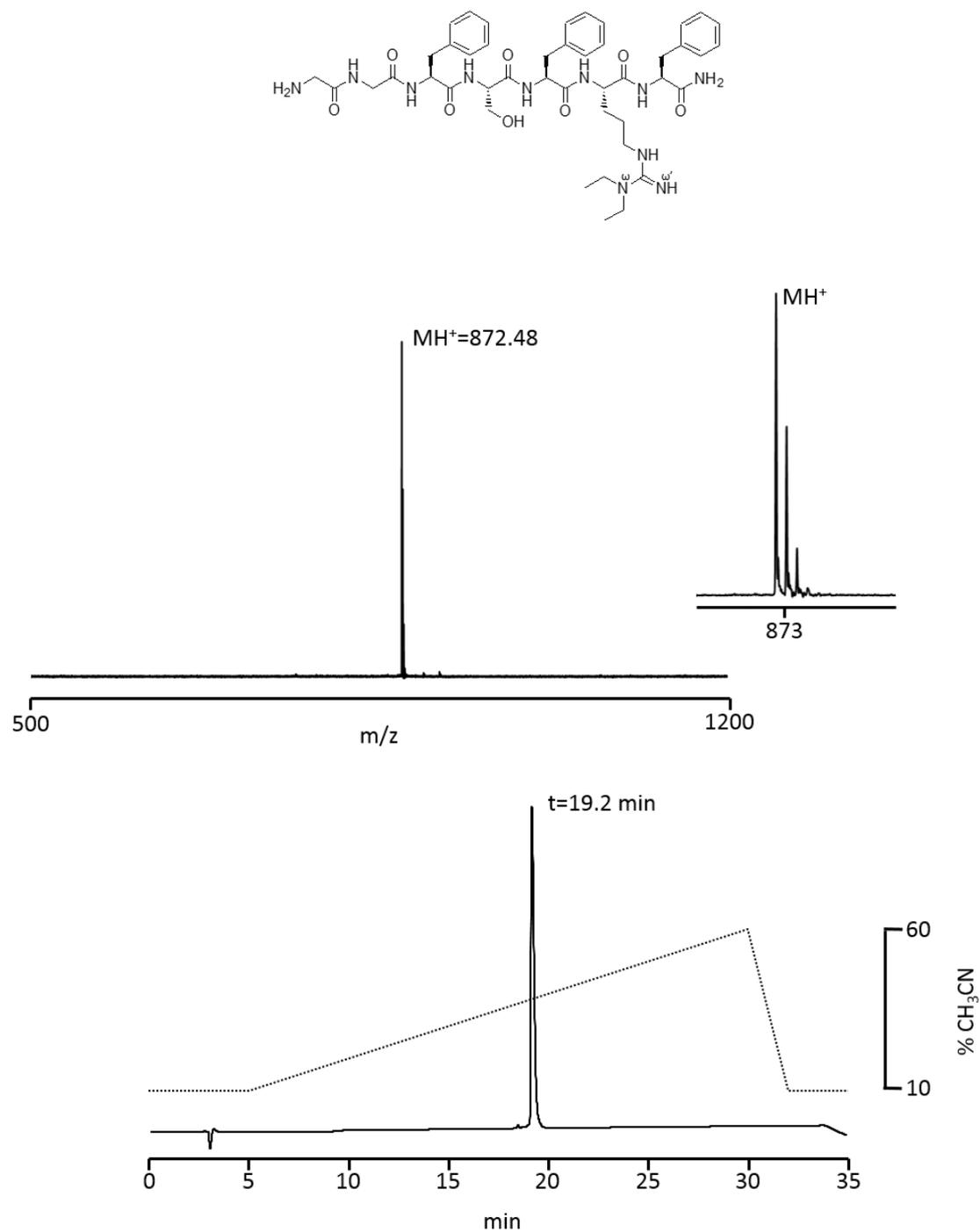
Supplementary Figure S18 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(Et)^{\omega}Har^{25}]26RFa_{(20-26)}$, LV-2272



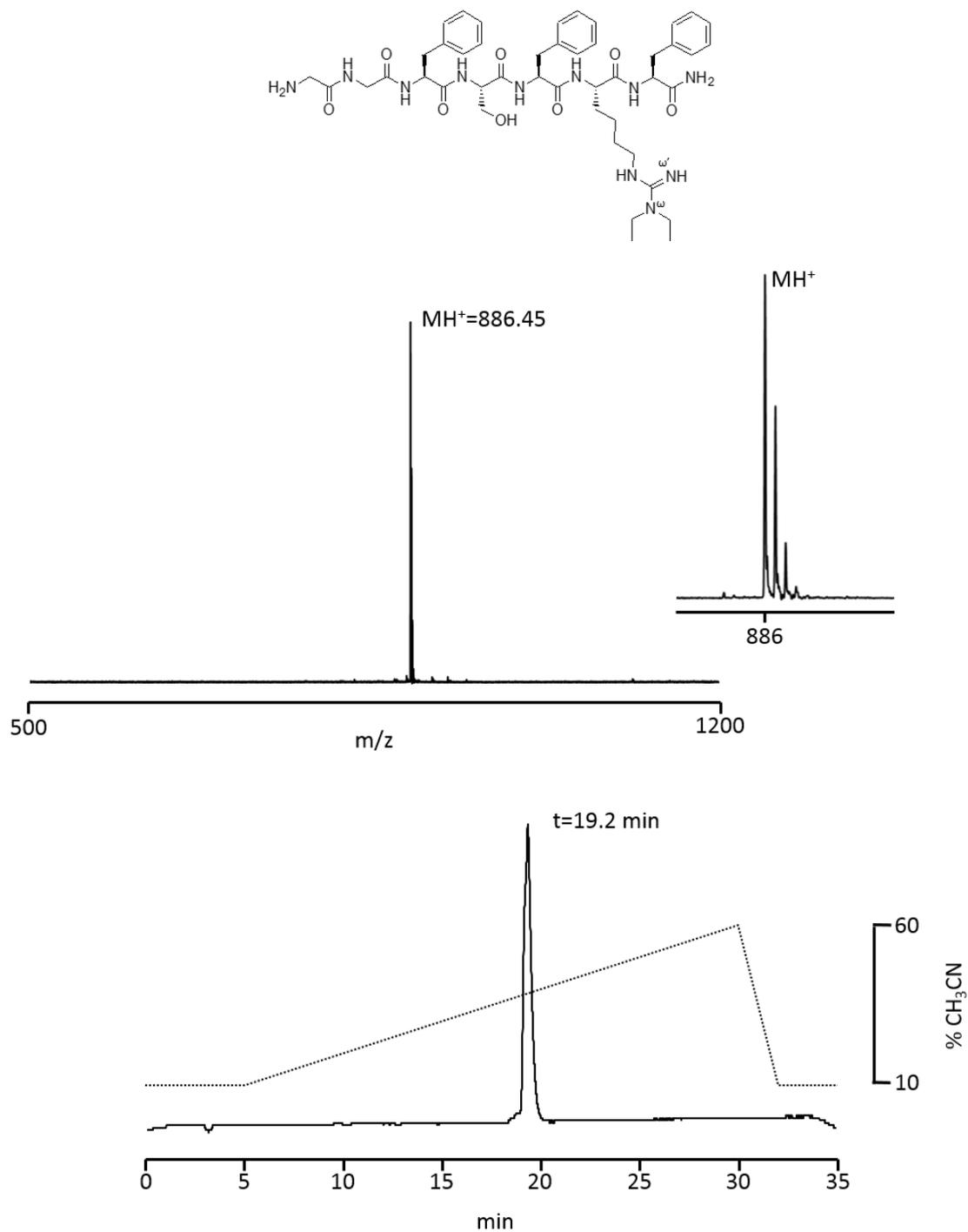
Supplementary Figure S19 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of [(Et,Et)^{ω,ω}Nar²⁵]²⁶Ra₍₂₀₋₂₆₎, LV-2265



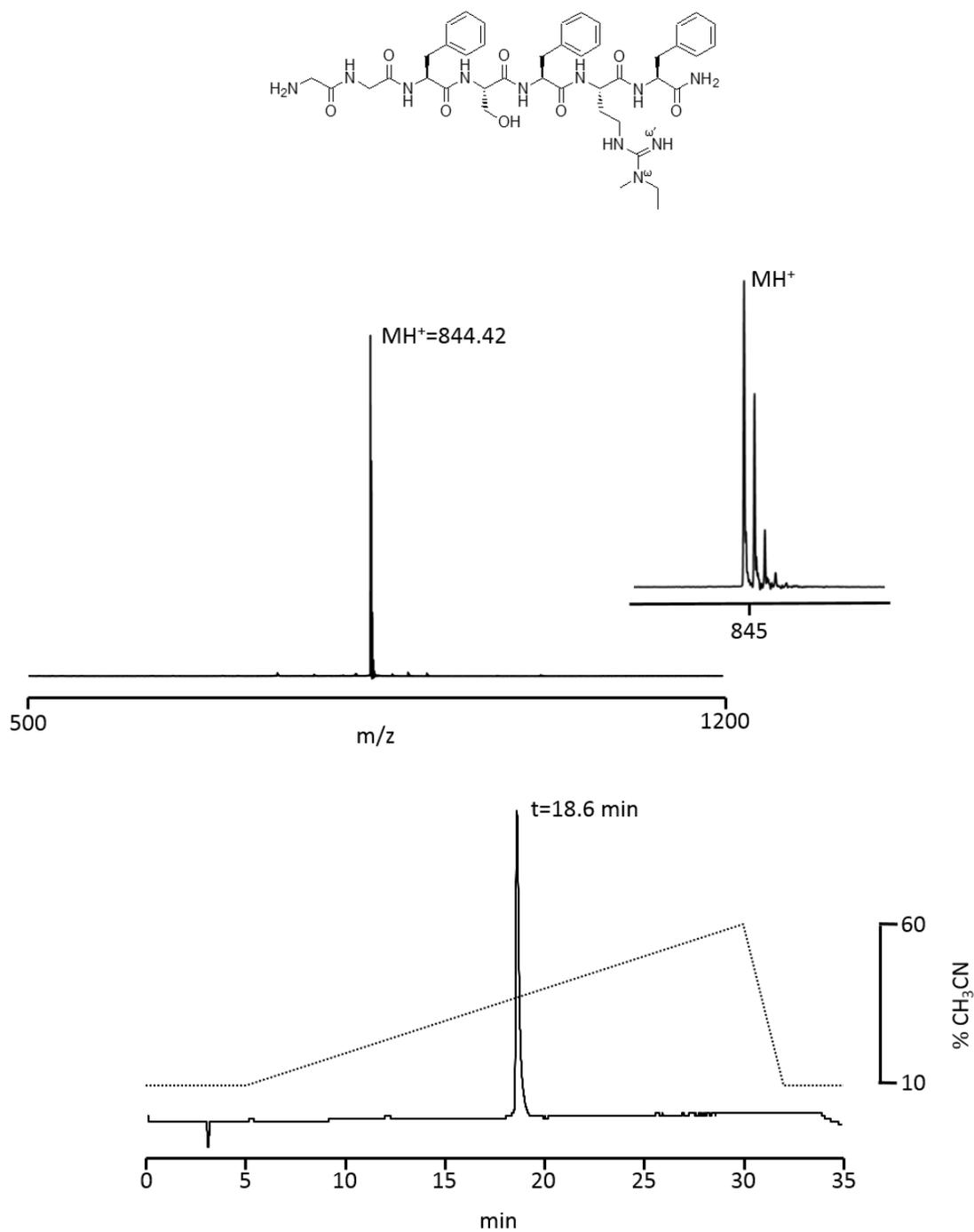
Supplementary Figure S20 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of [(Et,Et)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2266



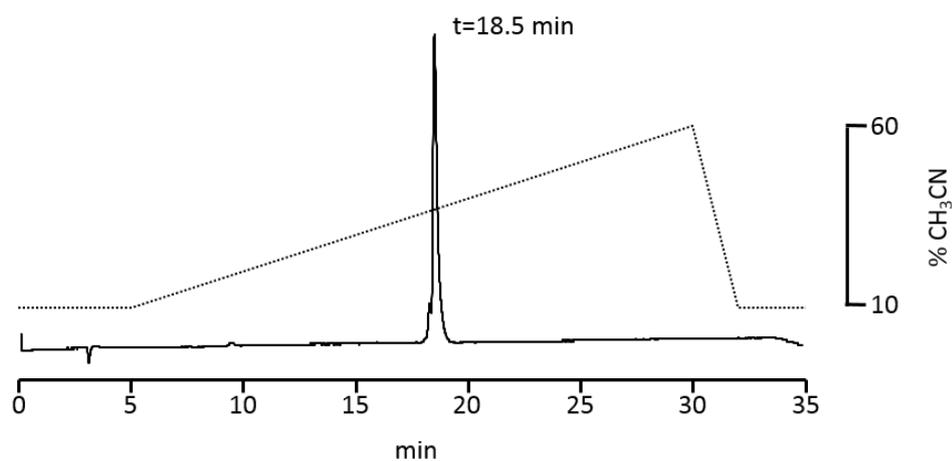
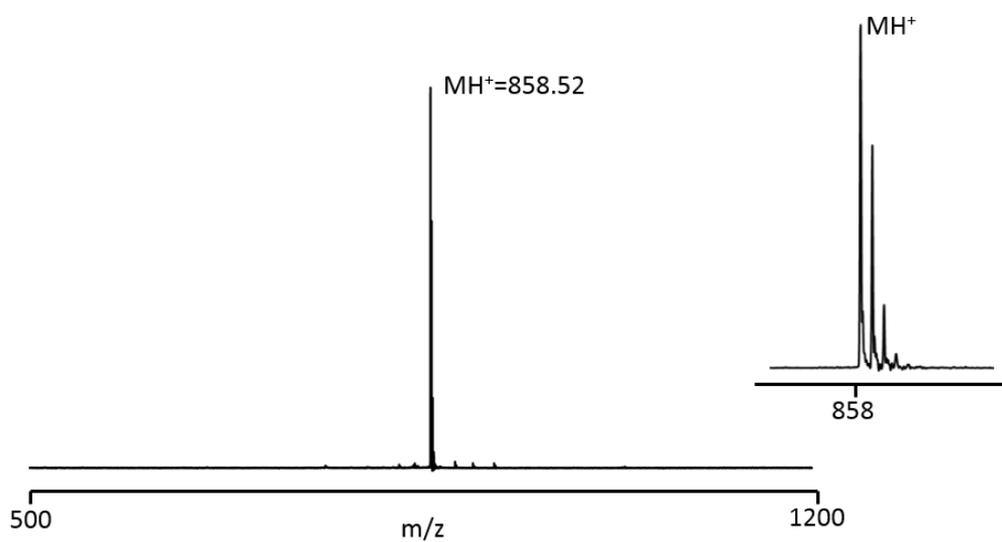
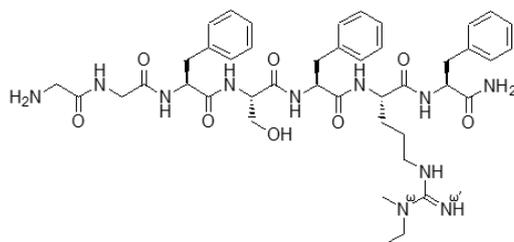
Supplementary Figure S21 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of [(Et,Et)^{ω,ω}Har²⁵]²⁶Fa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2267



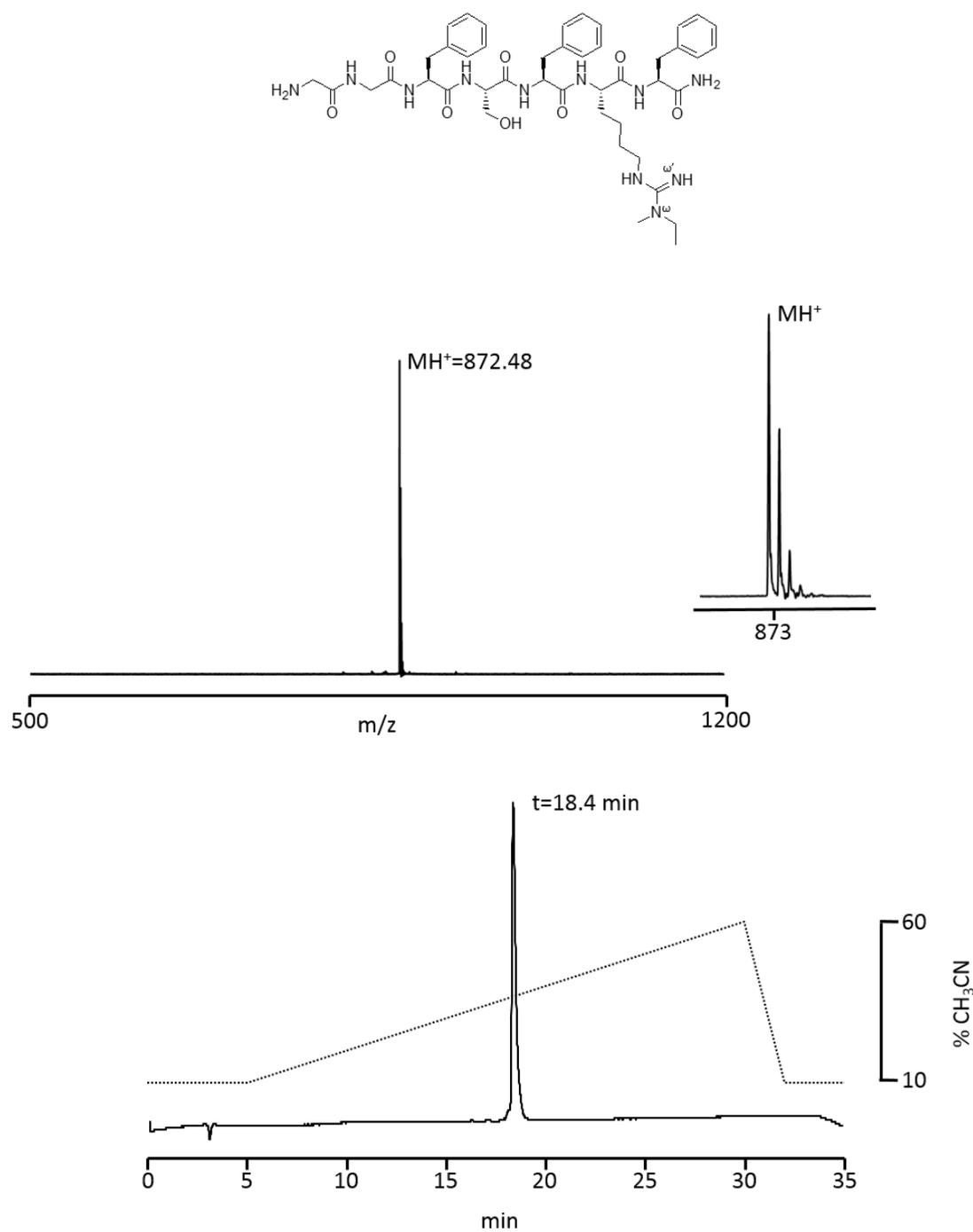
Supplementary Figure S22 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(Et,Me)^{\omega,\omega'}Nar^{25}]26Rfa_{(20-26)}$, LV-2281



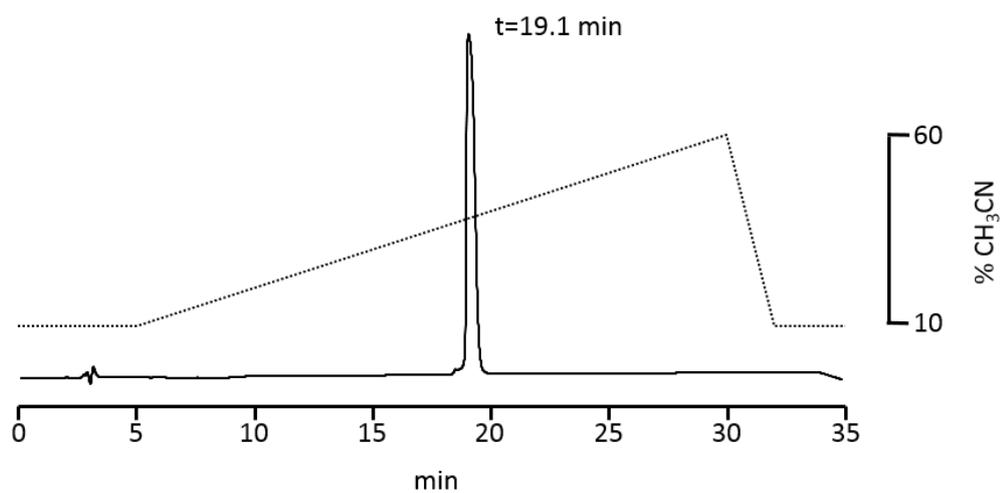
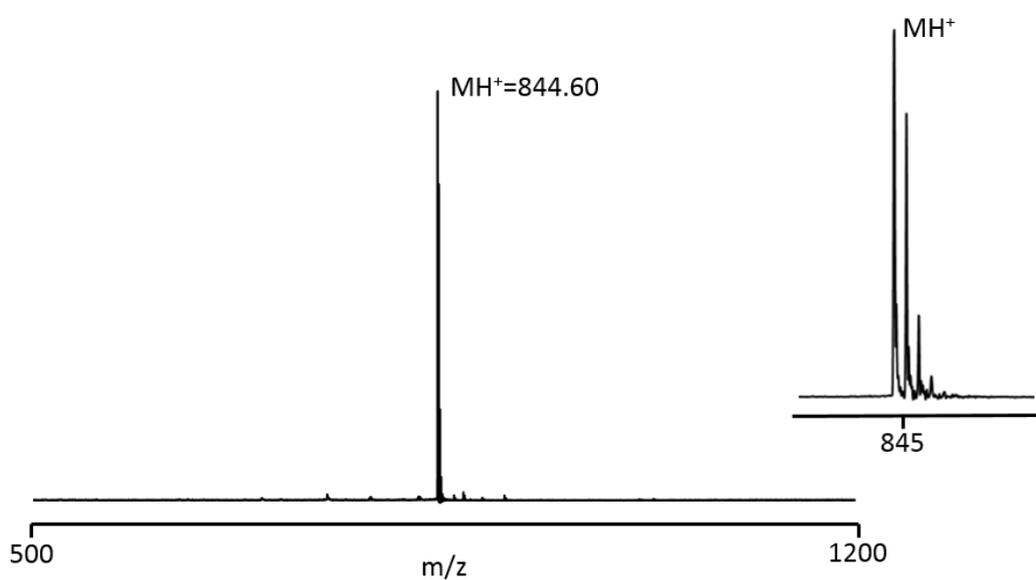
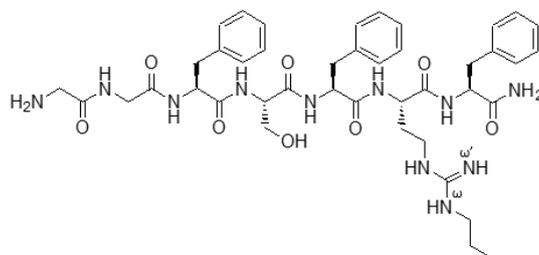
Supplementary Figure S23 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(\text{Et}, \text{Me})^{\omega, \omega} \text{Arg}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2282



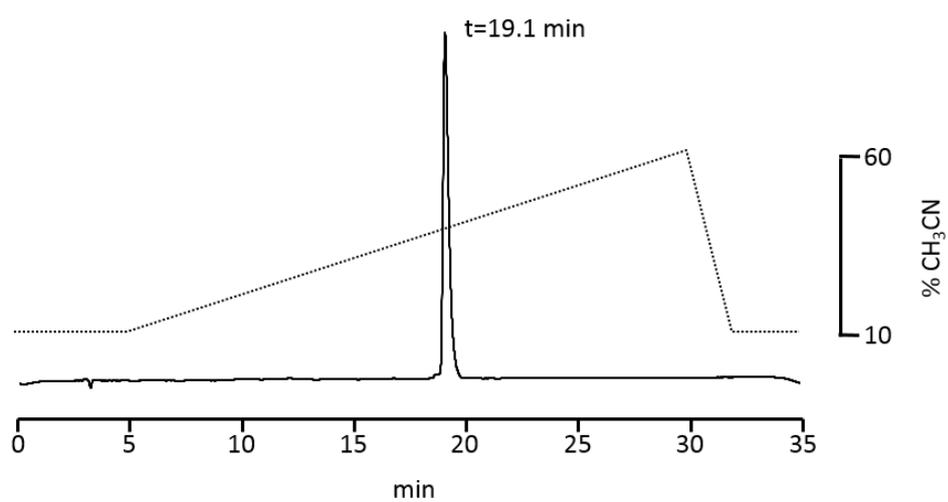
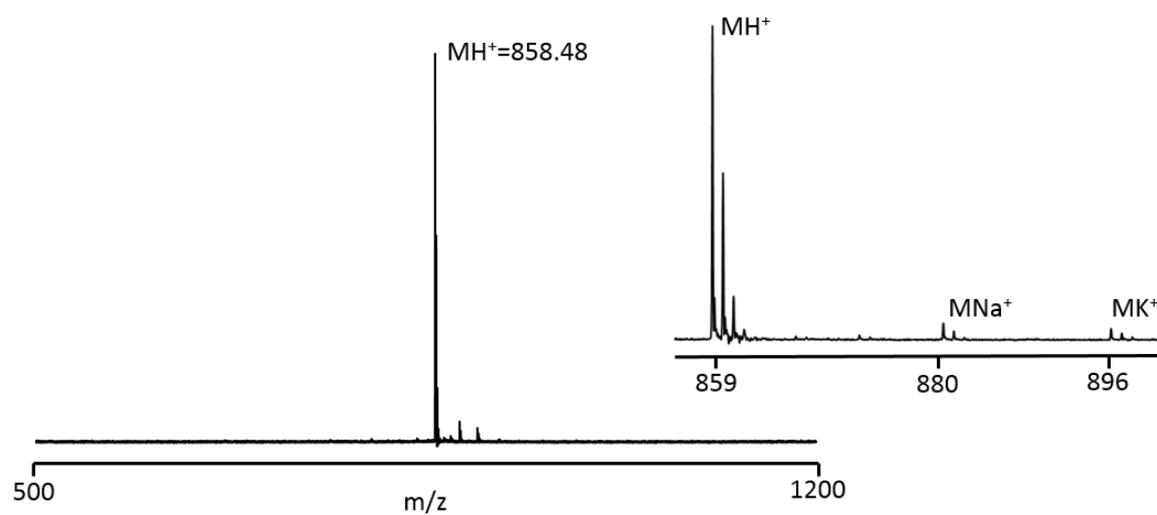
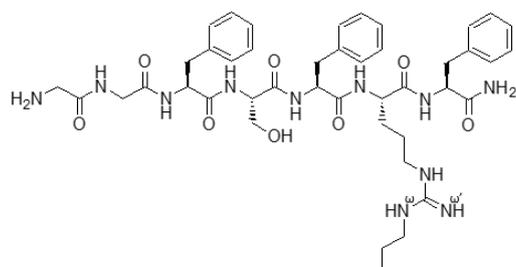
Supplementary Figure S24 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(Et,Me)^{\omega,\omega}Har^{25}]26Rfa_{(20-26)}$, LV-2283



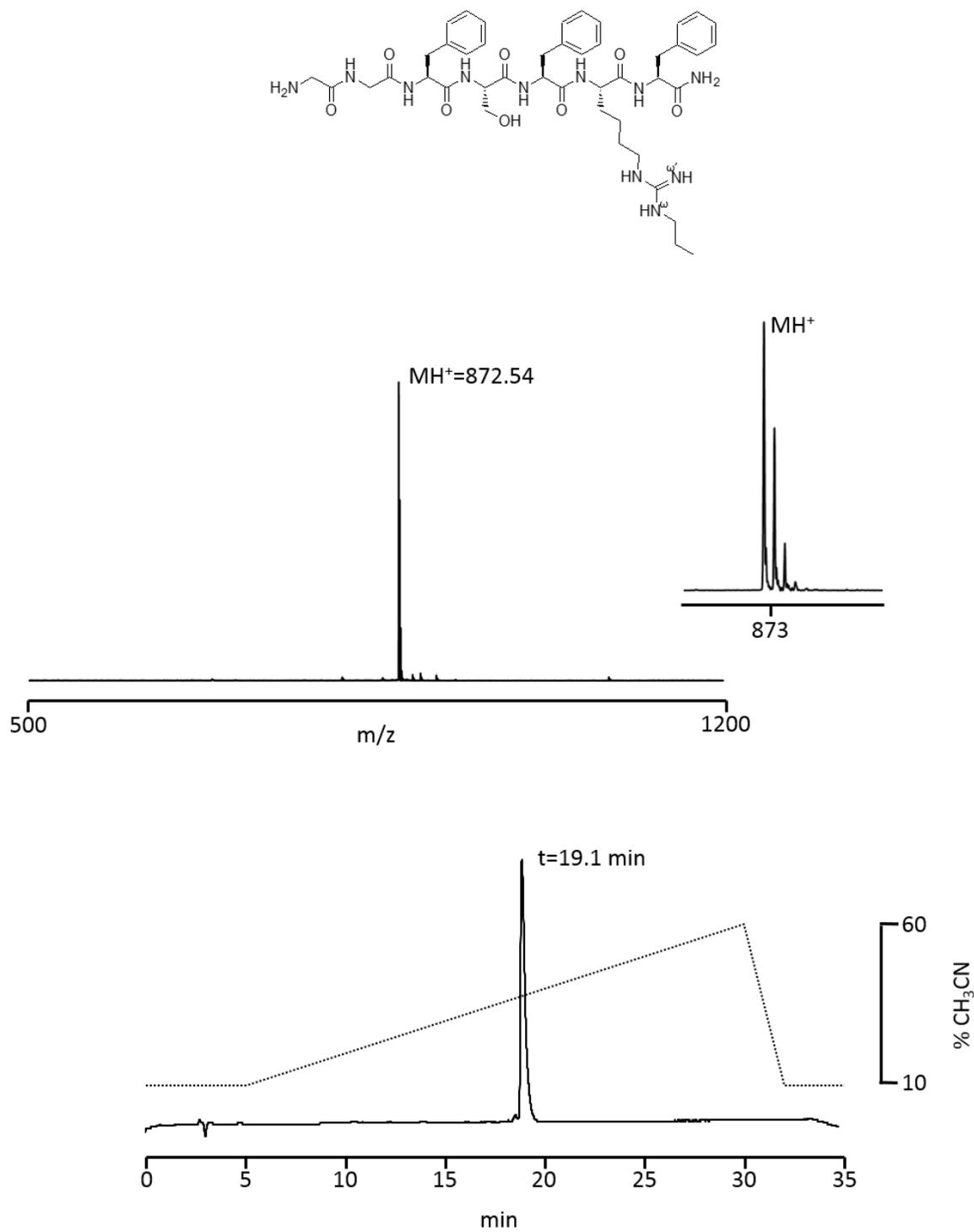
Supplementary Figure S25 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(Pr)^{\omega}Nar^{25}]26Rfa_{(20-26)}$, LV-2273



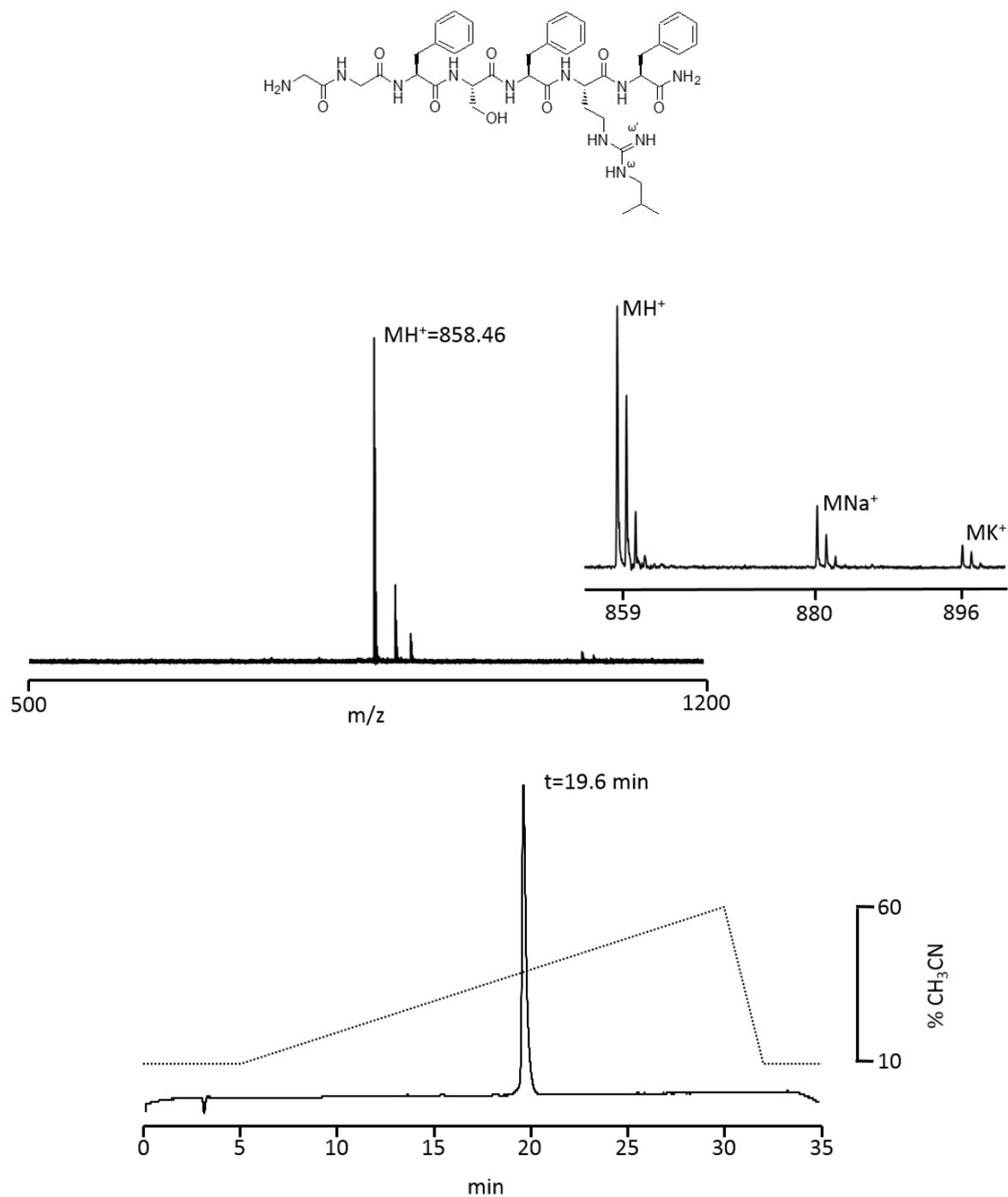
Supplementary Figure S26 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(Pr)^{\omega}Arg^{25}]26RFa_{(20-26)}$, LV-2274



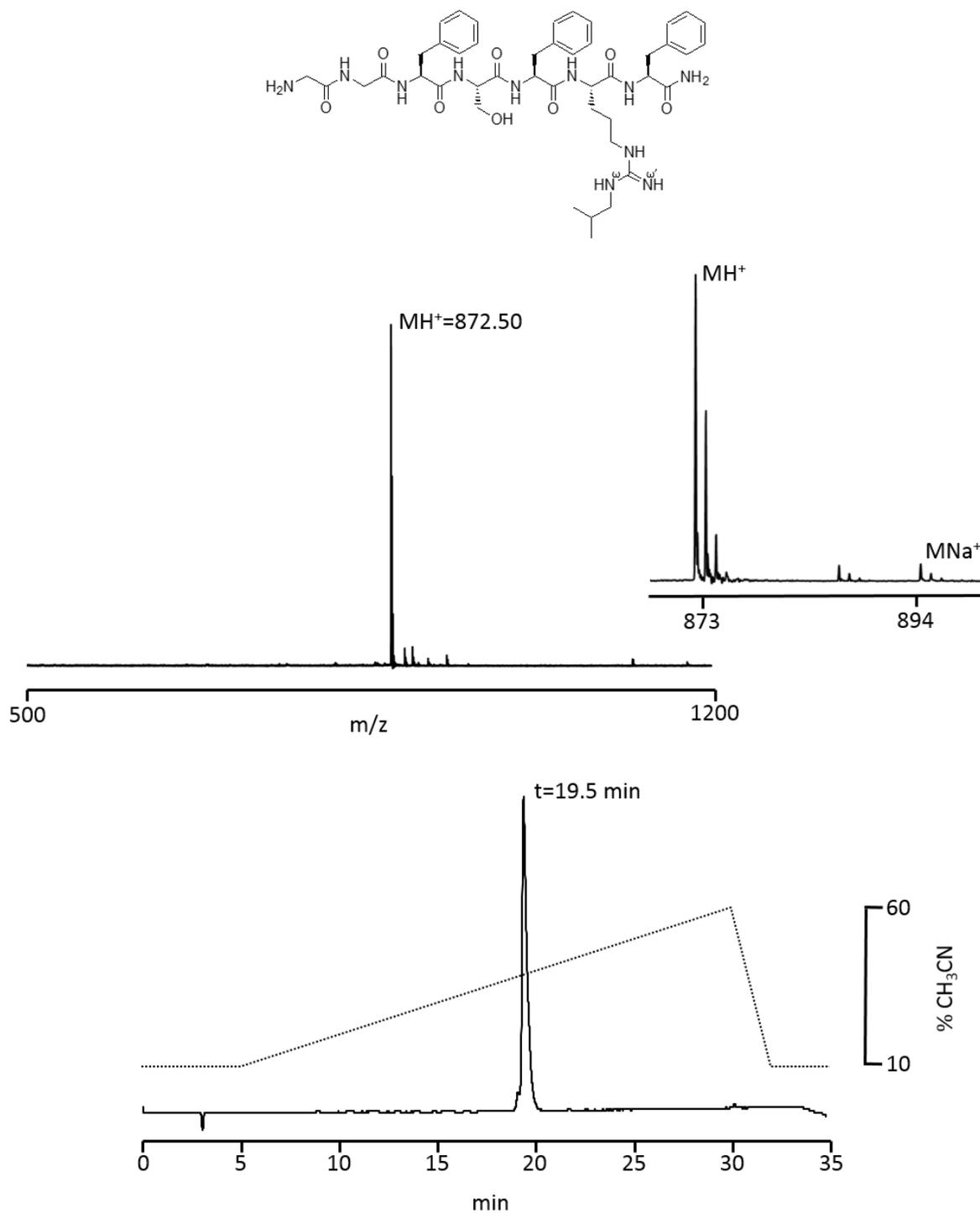
Supplementary Figure S27 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [(Pr)^ωHar²⁵]₂₆Fa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2275



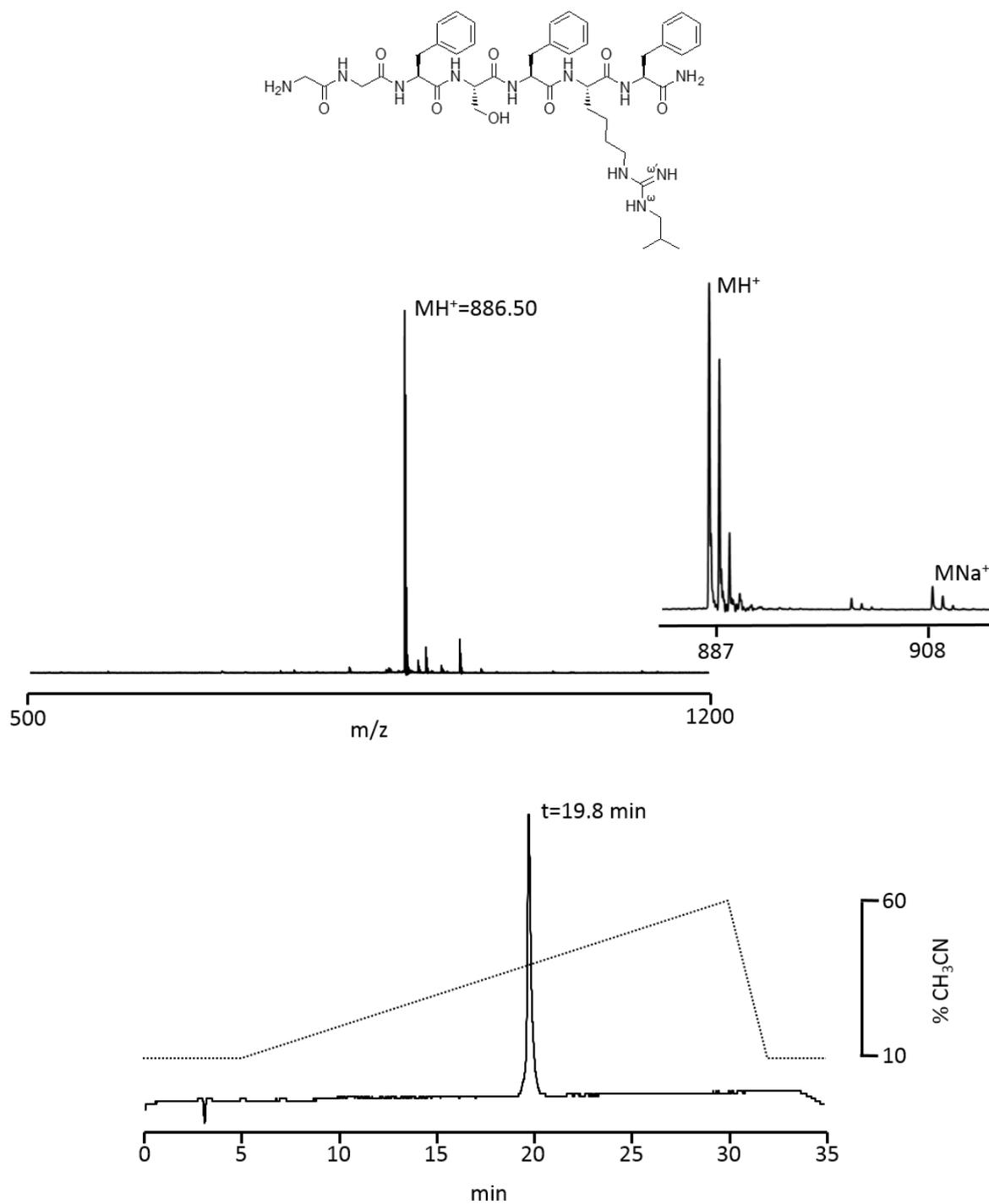
Supplementary Figure S28 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(i\text{Bu})^\omega\text{Nar}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2287



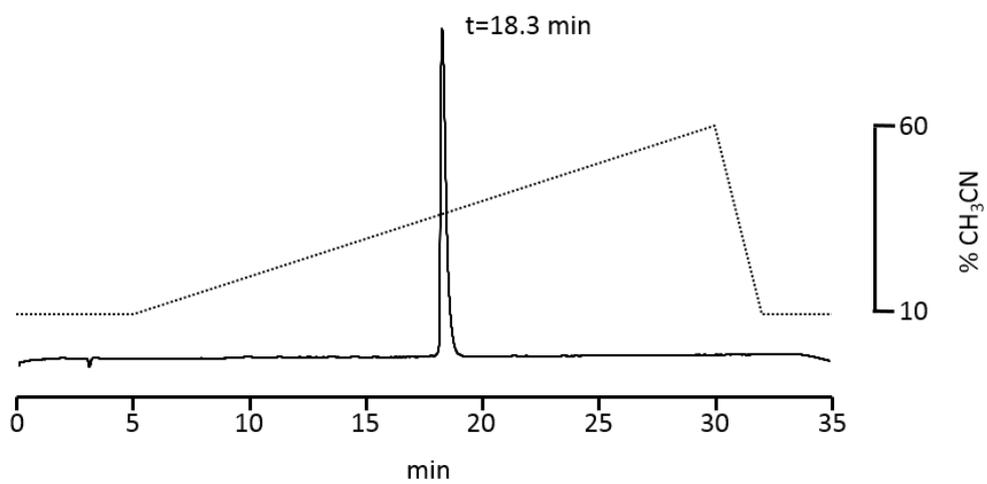
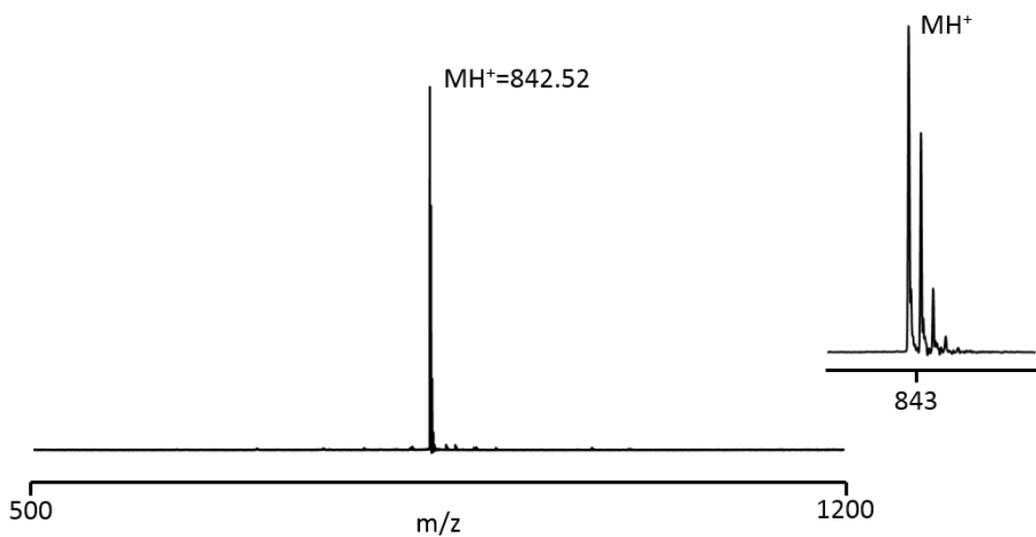
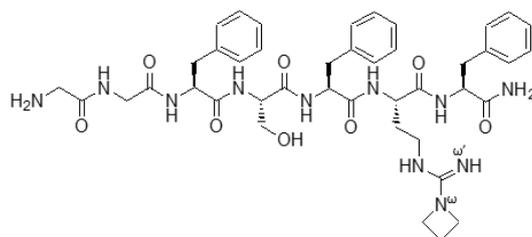
Supplementary Figure S29 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [(iBu)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2288



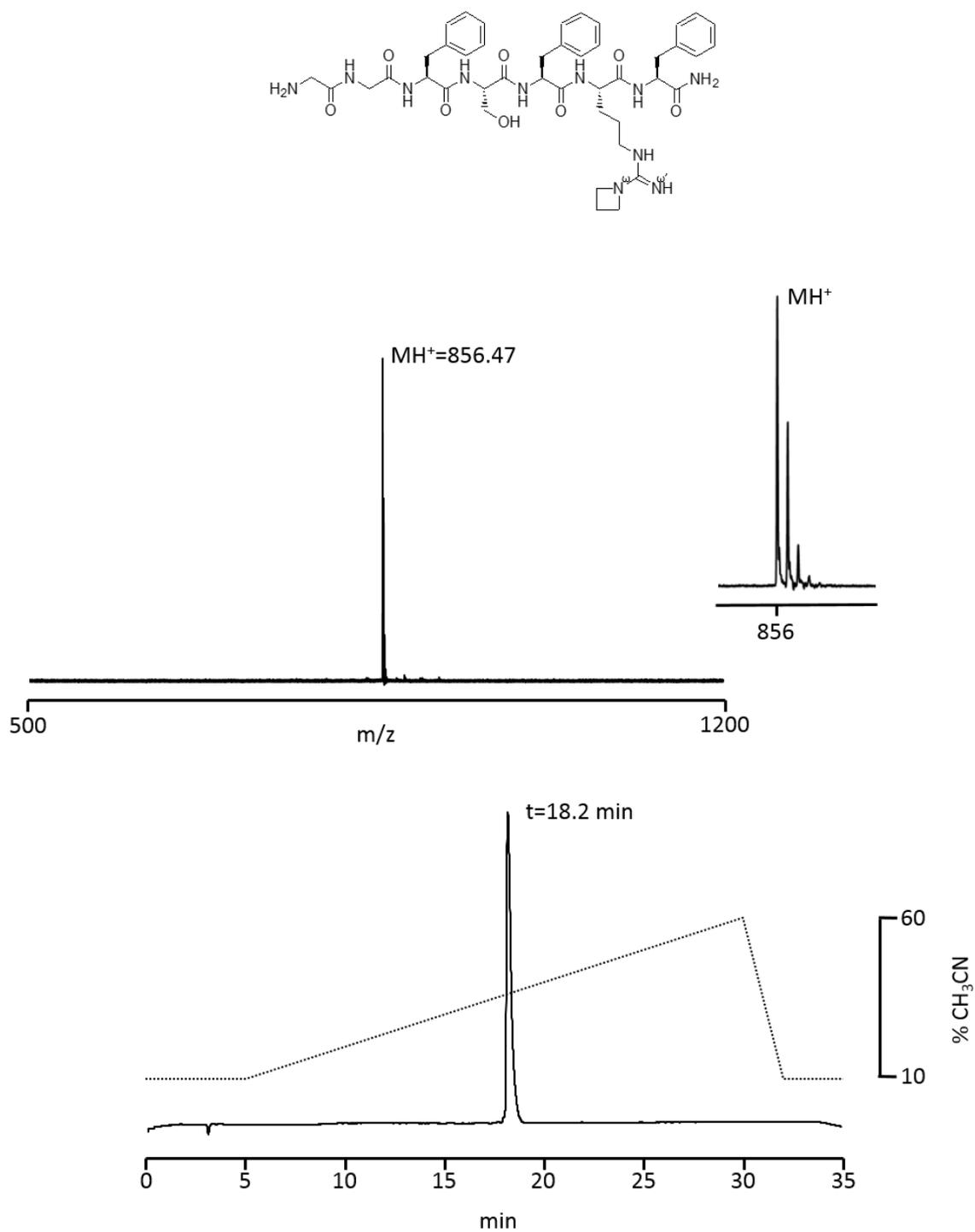
Supplementary Figure S30 : MALDI-ToF MS and RP-HPLC analysis of $[(i\text{Bu})^\omega\text{Har}^{25}]26\text{RFa}_{(20-26)}$, LV-2289



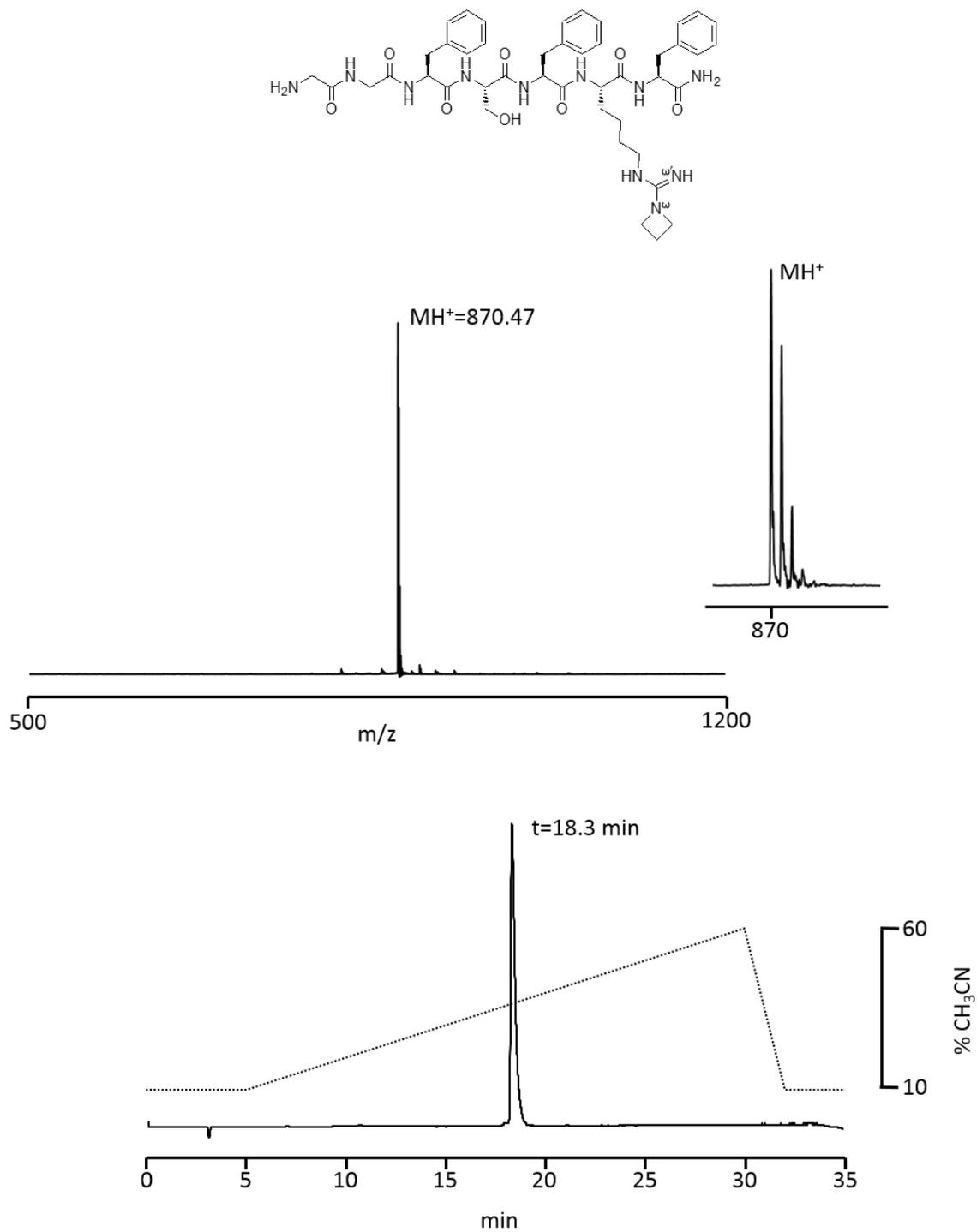
Supplementary Figure S31 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [(Aze)^ωNar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2284



Supplementary Figure S32 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [(Aze)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2285



Supplementary Figure S33 : MALDI-Tof MS and RP-HPLC analysis of [(Aze)^ωHar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, LV-2286



2. Etude *in vivo* de quelques analogues remarquables du 26RFa

Des travaux antérieurs menés dans l'équipe ont montré que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ mime certains effets du 26RFa pleine longueur comme ses actions orexigène, insulino-modulatrice et hypophysiotropes (Navarro et al., 2006; Prévost et al., 2015; do Rego et al., 2006).

J'ai, pour ma part, préparé et caractérisé le profil pharmacologique d'une trentaine de nouveaux analogues originaux du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ *in vitro* dont certains présentent des activités particulières (Alim et al., soumis). Dans la continuité de cette première étude, j'ai évalué l'activité *in vivo* des analogues LV-2185, LV-2186 et/ou LV-2172 sur le comportement alimentaire de souris pré-affamées et la tolérance des souris à l'insuline.

2.1. Effet d'analogues peptidiques et pseudopeptidiques du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sur la prise alimentaire

Pour cette étude, j'ai sélectionné deux analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ : le [(Me)⁰Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) considéré comme le meilleur agoniste du QRFPR de cette série chimique (Alim et al., soumis) et le [(Me,Me)^{0,0}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎, (LV-2185), initialement décrit comme un antagoniste du QRFPR *in vitro* (Neveu et al., 2014) mais que j'ai requalifié, plus probablement, d'agoniste partiel (Alim et al., soumis). L'effet d'une administration i.c.v. de ces deux analogues peptidiques sur la prise alimentaire de souris pré-affamées pendant dix huit heures, a été comparé à celui du 26RFa et du pseudopeptide [Cmpⁱ²¹,aza-β³-Hht²³]26RFa₍₂₁₋₂₆₎ (LV-2172) dont l'effet orexigène perdure au-delà de celui du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (Neveu et al., 2012). De plus, j'ai évalué le potentiel antagoniste du LV-2185 lors de sa co-injection i.c.v. avec le 26RFa.

L'analyse de la consommation alimentaire des souris qui ont reçu une administration i.c.v. de 26RFa montre une augmentation de 37,8% par rapport aux souris ayant reçu une solution saline (Figure 33). Cette augmentation se manifeste dès les 30 premières minutes et se maintient pendant les 30 suivantes. A la même dose de 0,1 µg, les composés LV-2186 et LV-2172, décrits comme des agonistes *in vitro* du récepteur humain, ne stimulent pas de façon significative la prise alimentaire. De même, les souris traitées par une dose 10 fois supérieure (1 µg) de LV-2185 ne consomment pas plus de nourriture que les animaux contrôle. En revanche, sa co-administration avec une dose effective de 26RFa bloque l'effet orexigène de ce dernier durant la première heure (Figure 33).

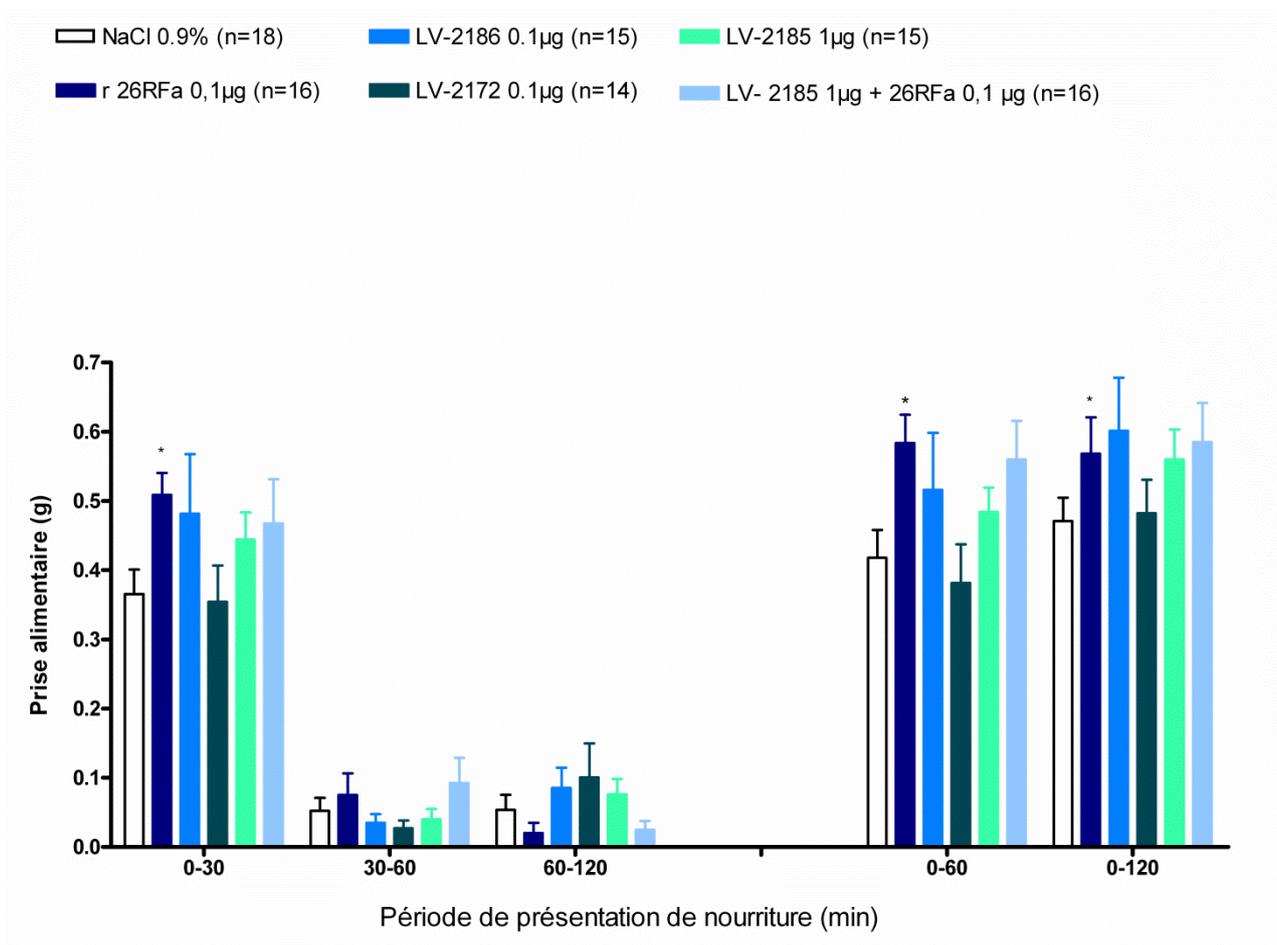


Figure 33 : Effet des analogues peptidiques et pseudo-peptidique du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sur la prise alimentaire.

Les souris pré-affamées pendant 18 heures reçoivent 10 µl (i.c.v.) de NaCl, r26RFa (0,1 µg), [Cmpⁱ²¹,aza-β³-Hht²³]_{26RFa(21-26)} (LV-2172, 0.1 µg), [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]_{26RFa(20-26)}, (LV-2185, 1 µg) ou de [(Me)^ωArg²⁵]_{26RFa(20-26)} (LV-2186, 0,1 µg). Dix minutes plus tard, chaque animal a accès à une quantité fixe de nourriture (5 g). Pendant les 2h du test, toutes les 30 min la nourriture est retirée, pesée rapidement, puis redonnée à la souris. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 14 animaux minimum. * p < 0,05.

2.2. Effet d'une injection périphérique de 26RFa et ses analogues au cours d'un test de tolérance à l'insuline (ITT)

Dans ce protocole, j'ai évalué l'effet des mêmes analogues du 26RFa que dans l'étude précédente sur un test de tolérance à l'insuline (ITT). En accord avec l'étude menée par Prévost et ses collaborateurs (2015), le 26RFa (500 µg/Kg) administré en i.p. avec une charge d'insuline humaine (0,75 UI/Kg) engendre une diminution significative de la glycémie à partir 30 minutes, qui perdure 1 heure et qui est supérieure à celle induite par l'insuline seule (Figure 34). Le LV-2172, ni à la dose équimolaire à celle du 26RFa (150 µg/Kg) ni à une dose 5 fois supérieure (750 µg/Kg) ne reproduit l'effet hypoglycémiant potentialisateur du 26RFa (Figure 34A). En revanche, l'agoniste peptidique du QRFPR humain, le LV-2186 (741 µg/Kg), le plus puissant de notre série, mime l'effet potentialisateur du 26RFa à 90 minutes (Figure 34B). L'analyse statistique révèle qu'il existe une interaction entre le temps et le traitement au cours de cette expérience [$F_{(12, 144)} = 2,104$, $p = 0,0200$] ce qui démontre que le LV-2186 à la dose la plus importante a un effet significatif sur l'évolution de la glycémie, contrairement à la dose inférieure testée, lorsqu'il est administré en concomitance avec l'insuline. Plus précisément, le test post-hoc indique que le LV-2186 a un effet potentialisateur d'insuline significatif qui apparaît tardivement au cours de la seconde moitié du test ($p < 0.05$ à 90 minutes ; Figure 34B). Enfin, l'antagoniste *in vitro* du QRFPR humain, le LV-2185, n'a aucun effet propre sur la glycémie. L'analyse statistique montre même une significativité ($p < 0.05$) entre l'effet anti-hypoglycémiant du LV-2185 et l'effet pro-hypoglycémiant du 26RFa à 60 minutes. Co-administré avec le 26RFa, il ne bloque pas l'effet potentialisateur hypoglycémiant du 26RFa dans l'heure qui suit l'injection i.p. des composés et de l'insuline mais s'y oppose à 90 minutes (Figure 34C).

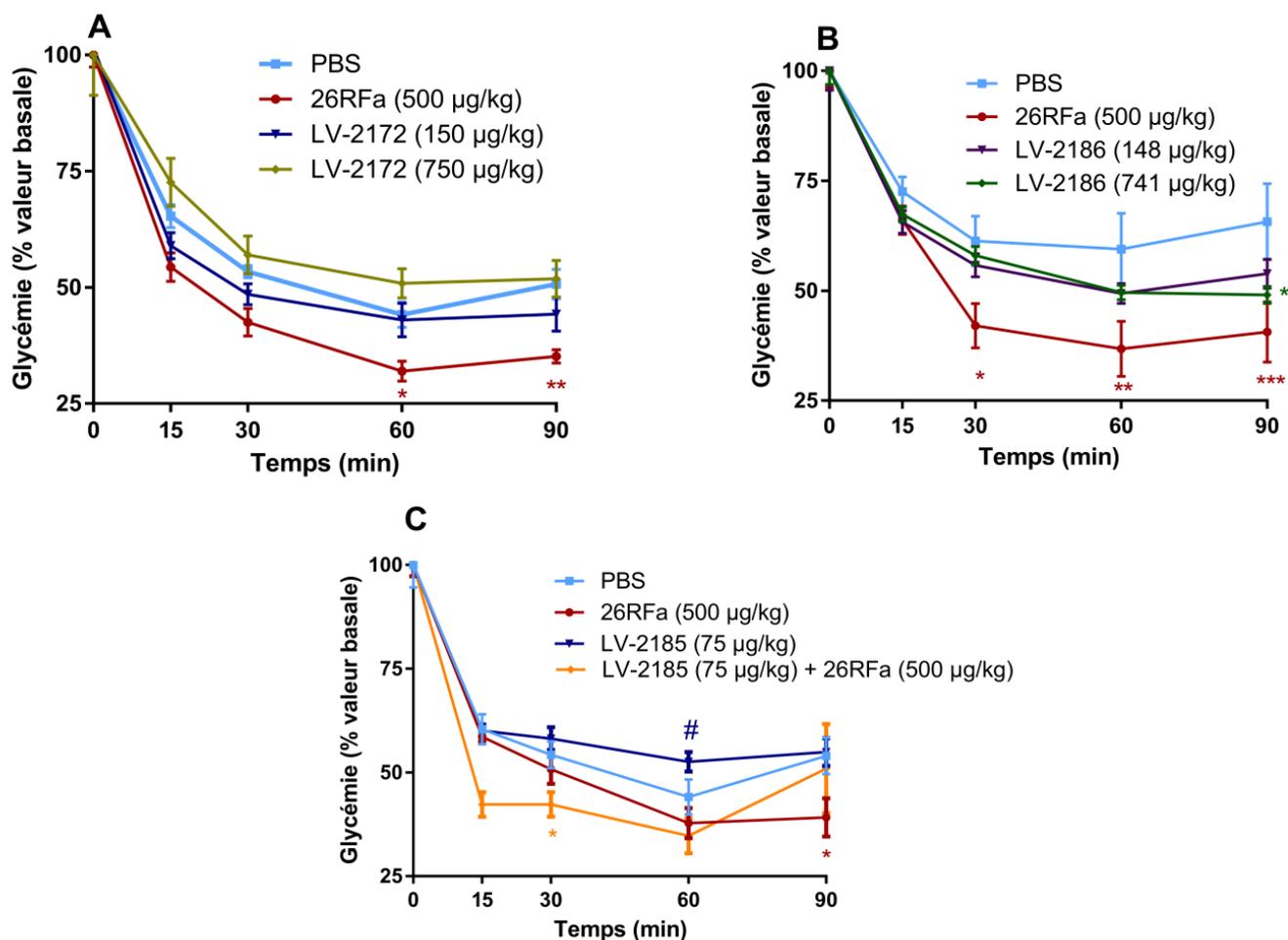


Figure 34 : Effet d'une administration i.p. de quelques analogues peptidiques du 26RFa au cours d'un test de tolérance à l'insuline (ITT). (A) Effet de l'administration de l'analogue pseudopeptidique du 26RFa, le LV-2172 (n=4) à deux doses (150 µg/Kg) et à (750 µg/kg) durant l'ITT. (B) Effet de l'administration de l'analogue peptidique du 26RFa, le LV-2186 (n=12) à deux doses (148 µg/Kg) et à (741 µg/kg) durant l'ITT. (C) Effet de l'administration d'un antagoniste du *h*QRFPR, LV-2185 (n= 15) à (75 µg/kg) durant l'ITT. La glycémie a été mesurée toutes les 15 minutes puis toutes les 30 minutes jusqu'à 90 minutes. Chaque point représente la glycémie moyenne observée en % de la valeur à T0 ± SEM. * p < 0,05 ; **p < 0,01 ; *** p < 0,001 : PBS vs. Analogues ; #< 0.05 : 26RFa vs. LV-2185. T0 est le début de l'expérience, 15 minutes avant l'injection des composés.

3. Etude moléculaire de l'interaction entre le 26RFa et la boucle extracellulaire 2 (ECL2) du QRFPR

A l'instar du récepteur β -adrénergique humain sur lequel il a été préalablement construit, le modèle 3D du QRFPR humain présente une courte hélice- α (I¹⁸⁸-E¹⁹⁷) non transmembranaire dans sa portion ECL2 (Q¹⁸⁴-Q²¹¹). Comme le 26RFa présente également une structure hélicoïdale dans sa partie centrale (Thuau et al., 2005), nous avons émis l'hypothèse d'une interaction initiale entre ces deux structures potentiellement à l'origine de la reconnaissance moléculaire ligand-récepteur. J'ai donc entrepris de vérifier cette hypothèse en étudiant tout d'abord les prédictions structurales *in silico* de différents fragments du QRFPR délimitant sa partie ECL2 (Leu¹⁶⁶-Phe²²³; Trp¹⁷⁰- Ile²¹³; Leu¹⁷¹-Lys²¹²; Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ et Met¹⁸⁰-Lys²¹²) en utilisant le logiciel AGADIR. Compte tenu des résultats de prédiction obtenus et de la bonne corrélation entre la position de l'hélice de la partie ECL2 dans le modèle du QRFPR et celle prédite par AGADIR, nous avons sélectionné les fragments Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHI; LV-2252) et [Ser^{200,201}]Met¹⁸⁰-Lys²¹² (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHISSLEEWTSPPVHQB ; LV-2262) du QRFPR pour une vérification expérimentale de leur structure par une étude en CD dans un tampon phosphate (20 mM, pH 7), contenant 20, 30 ou 50% de TFE ou de la DPC (20 mM). Enfin, nous avons tenté de mettre en évidence l'existence d'une interaction entre les hélices du 26RFa et de la boucle ECL2 du QRFPR par thermophorèse.

3.1. Prédiction de l'hélicité par AGADIR

Cet algorithme a été utilisé pour la prédiction de l'hélicité de l'ECL2 du QRFPR humain. Nous avons sélectionné cinq fragments du QRFPR délimitant sa partie ECL2 (Leu¹⁶⁶-Phe²²³; Trp¹⁷⁰-Ile²¹³; Leu¹⁷¹-Lys²¹²; Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ et Met¹⁸⁰-Lys²¹²) (Figure 35A). Les cinq fragments ont tous une tendance à se structurer en hélice, d'une intensité modérée à forte en fonction de la longueur de la chaîne peptidique, entre les résidus Pro¹⁷⁹ et Thr²⁰⁶ (Figure 35B).

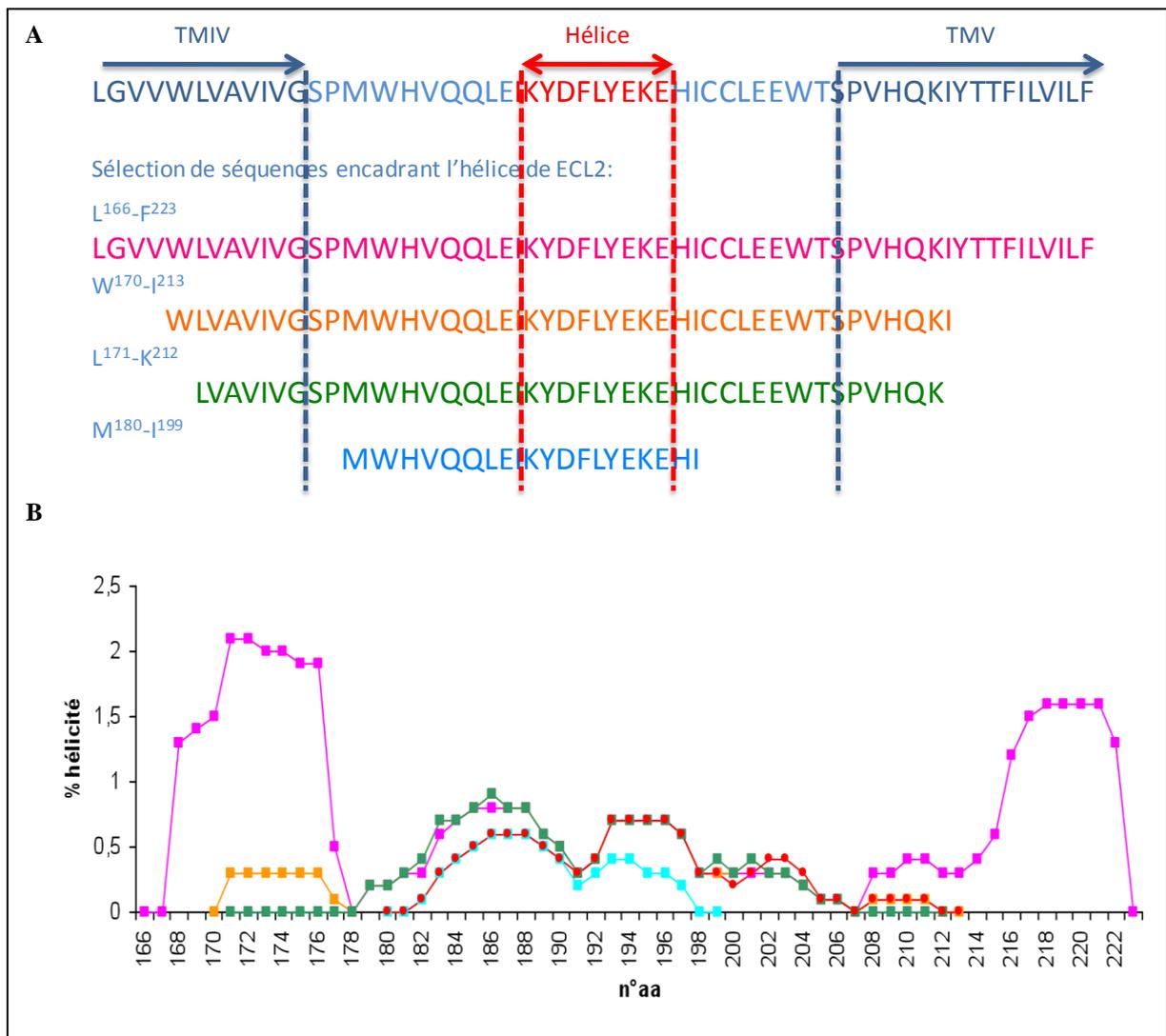


Figure 35 : Prédiction de l'hélicité par AGADIR. (A) Séquences des fragments délimitant la partie ECL2 du modèle de *h*QRFPR sélectionnés pour une simulation de leur hélicité par AGADIR. (B) Pourcentage d'hélicité des 4 fragments simulés par AGADIR à pH 7, 278 K dans un milieu de force ionique 0,1 M.

3.2. Vérification expérimentale de la structure de l'ECL2 par dichroïsme circulaire

Les spectres de CD des segments Met¹⁸⁰-Ile¹⁹⁹ (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHI; LV-2252) et [Ser^{200,201}]Met¹⁸⁰-Lys²¹² (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHISSLEEWTSPPVHQQ; LV-2262) du *h*QRFPR, obtenus dans le tampon phosphate (20 mM, pH 6), se caractérisent par la présence d'une bande négative autour de 195 nm et un faible signal positif pour une longueur d'onde d'environ 218 nm, indiquant que les LV-2252 et le LV-2262 évoluent dynamiquement en milieu aqueux sous une forme essentiellement non ordonnée et donc non stabilisée. En revanche, les spectres enregistrés pour les deux peptides en présence de TFE présentent des caractéristiques d'un mélange d'hélice- α et de conformation aléatoire avec une bande positive à 190 nm et des bandes négatives à 205 et 218 nm qui évoluent vers une stabilisation de l'hélice quand le pourcentage de TFE augmente. Bien que peu solubles dans la DPC, les fragments de l'ECL2 adoptent une structure hélicoïdale similaire à celles enregistrées dans le TFE (Figure 36 A, B)

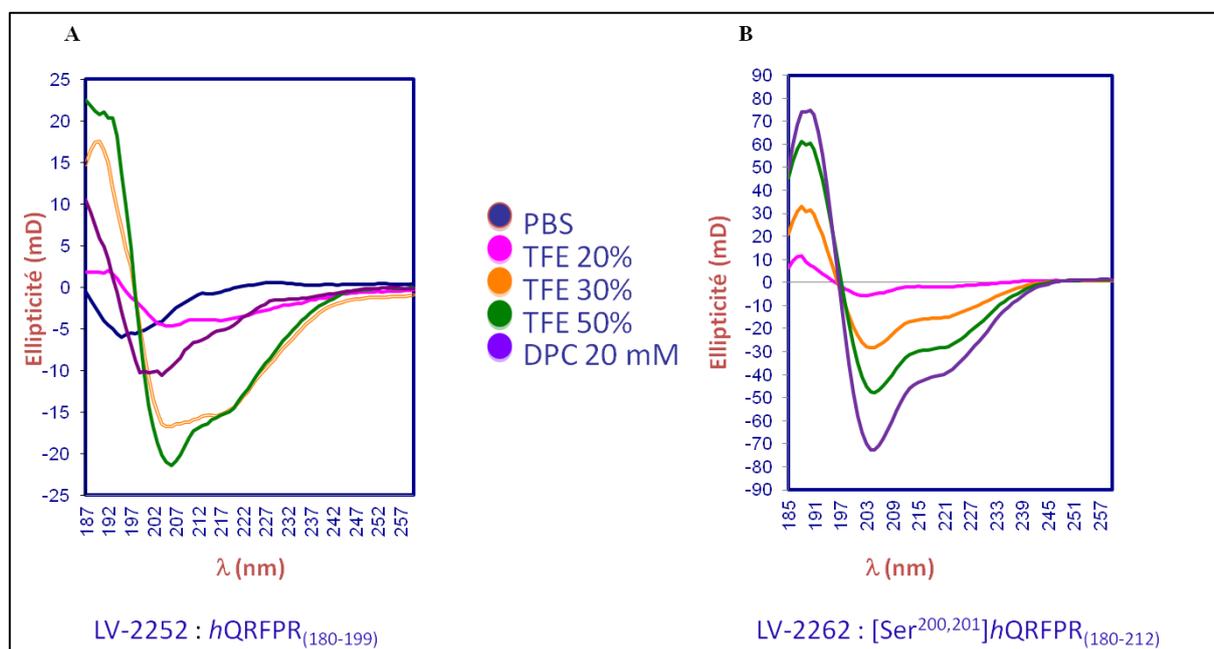


Figure 36 : Spectres de dichroïsme circulaire du (A) fragment *h*QRFPR₍₁₈₀₋₁₉₉₎ et (B) [Ser^{200,201}]*h*QRFPR₍₁₈₀₋₂₁₂₎ dans différents solvants. L'ellipticité est rapportée en milidegrés (mD).

3.3. Etude préliminaire de l'interaction hélice-hélice entre le 26RFa et L'ECL2 de QRFPR par thermophorèse à l'échelle microscopique

Nous avons mené des expériences préliminaires de MST dans le but de déterminer l'existence ou non d'une interaction entre l'hélice- α du 26RFa et celle de l'ECL2 du QRFPR. J'ai choisi de conduire une première étude dans 20 mM de tampon phosphate pH 6 contenant 30% de TFE un milieu dans lequel, l'ECL2 présente une hélice- α (cf résultats § 3.2). En l'absence d'énergie de MST, l'excitation de l'Alexa-fluor 647, porté par le fragment 180-212 de l'ECL2 en concentration constante (10 nM) dans les 16 capillaires à analyser contenant une quantité croissante de 26RFa ($2,8 \cdot 10^{-7}$ M à $8,5 \cdot 10^{-12}$ M), montre une hétérogénéité de fluorescence qui constitue un obstacle aux expériences de MST (données non présentées). Lors d'un second essai, nous avons enrichi le milieu précédent de 1% de DMSO et 0,4% d'acide pluronique et ainsi pu obtenir une fluorescence homogène dans l'ensemble des capillaires. Dans ces conditions et en présence d'énergie de MST (40%), nous avons observé des différences thermophorétiques d'un capillaire à l'autre qui traduisent l'établissement d'une interaction entre les deux partenaires. Néanmoins, la dispersion des valeurs ne nous a pas permis d'accéder à la détermination d'une constante de dissociation (Figure 37).

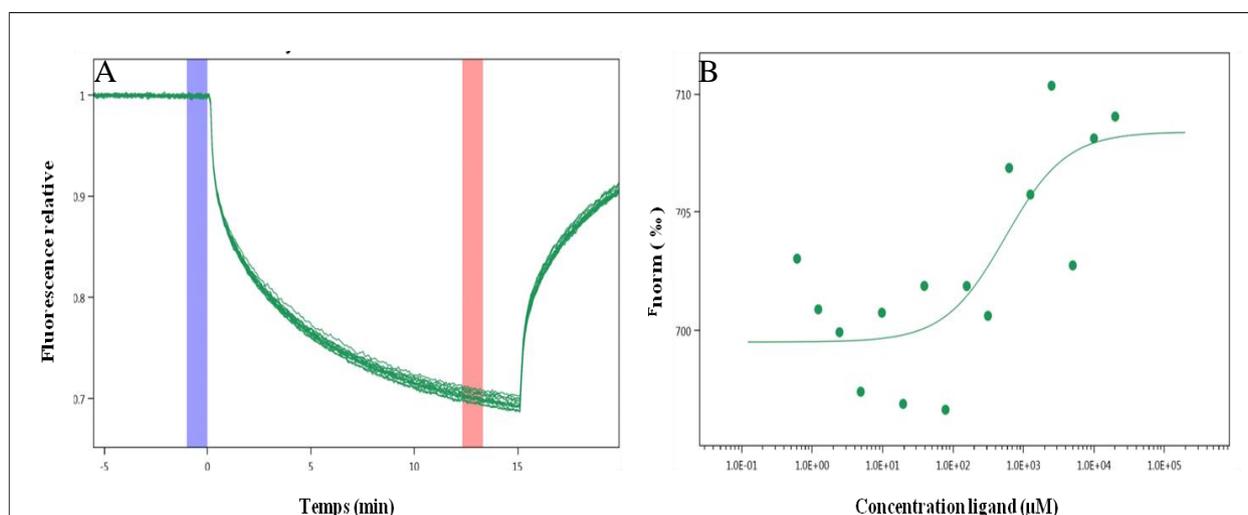


Figure 37 : Analyse de l'interaction entre le 26RFa et l'ECL2 du hQRFPR par MST. (A) Thermophorégrammes des 16 capillaires contenant une quantité croissante de 26RFa ($2,8 \cdot 10^{-7}$ M à $8,5 \cdot 10^{-12}$ M) en présence de 10 nM de $[\text{Ser}^{200,201}]h\text{QRFPR}_{(180-192)}$ marqué à l'Alexa-fluor 647, dans un tampon phosphate (20 mM, pH 6) contenant 30% de TFE, 1% de DMSO et 0,4% d'acide pluronique. L'énergie de MST (40%) est appliquée au système durant 15 s. La fluorescence est détectée durant l'application de l'énergie de MST (bande rouge) et rapportée à la fluorescence basale (bande bleue) pour chaque capillaire. (B) Représentation de la fluorescence normalisée en fonction de la concentration de 26RFa

Discussion



Le 26RFa, dernier membre de la famille des peptides RFamide découvert chez les vertébrés, est le ligand endogène d'un RCPG jusque là orphelin, le QRFPR (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003). L'ADNc du précurseur du 26RFa a été caractérisé chez plusieurs espèces de vertébrés depuis les mammifères jusqu'aux poissons (Chartrel et al., 2003; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003; Liu et al., 2009; Tobari et al., 2011; Ukena et al., 2010, 2014), ainsi que chez l'amphioxus *Branchiostoma Floridae*, seul invertébré chez lequel le peptide a été identifié (Elphick and Mirabeau, 2014; Xu et al., 2015). La structure primaire du 26RFa est fortement conservée au cours de l'évolution suggérant que ce peptide exerce d'importantes activités biologiques (Chartrel et al., 2011; Leprince et al., 2017). De fait, il a été montré que le 26RFa et le 43RFa augmentent de façon dose-dépendante la consommation de nourriture (Chartrel et al., 2003; do Rego et al., 2006; Takayasu et al., 2006), stimulent la sécrétion de gonadotropines (Navarro et al., 2006; Patel et al., 2008) et de l'aldostérone (Fukusumi et al., 2003) et modulent la libération d'insuline (Egido et al., 2007; Gesmundo et al., 2017; Granata et al., 2014; Prévost et al., 2015). De plus, l'inactivation du gène codant le QRFPR chez la souris provoque une ostéoporose sévère (Baribault et al., 2006). Par conséquent, la conception d'agonistes et/ou d'antagonistes du QRFPR pourrait contribuer au développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique traitant par exemple des troubles de l'homéostasie énergétique. Récemment, nous avons construit, par homologie de séquence, un modèle tridimensionnel du QRFPR humain dans lequel le fragment biologiquement actif, 26RFa₍₁₉₋₂₆₎, a été *docké* (Neveu et al., 2014). Ce modèle de complexe ligand/récepteur nous a permis de prédire une interaction majeure entre l'Arg²⁵ du peptide et la Gln¹²⁵ du récepteur, impliquée, tout ou partie, dans l'activation du QRFPR. L'arginine 25 du 26RFa pourrait donc être un résidu stratégique pour le développement d'agonistes et d'antagonistes de ce récepteur. De plus, l'établissement d'une primo-interaction de surface entre les hélices- α du 26RFa et de l'ECL2 du QRFPR pourrait constituer un déterminant moléculaire de reconnaissance lors de processus d'interaction ligand/récepteur. Finalement, notre étude devrait parfaire notre compréhension des mécanismes d'interaction entre le 26RFa et le QRFPR.

1. Synthèse et évaluation fonctionnelle d'analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ contenant une fonction guanidine mono-, di- ou trisubstituée en position 25

Récemment, nous avons montré que la fonction guanidine de l'Arg²⁵ du 26RFa établit une liaison hydrogène avec la Gln¹²⁵ du récepteur, qui contribue au processus d'activation du QRFPR (Neveu et al., 2014). De fait, l'entrave de cette interaction par la gem-diméthylation de l'azote- ω de la guanidine portée par l'arginine conduit à un antagoniste du QRFPR (Neveu et al., 2014).

Dans cette première partie de notre travail notre objectif était de synthétiser et d'évaluer une série d'analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ modifiés au niveau de l'Arg²⁵ et d'évaluer l'impact de ces modifications sur l'activation du QRFPR dans des cellules CHO exprimant le *h*QRFPR en mesurant leur capacité à mobiliser la concentration intracellulaire de calcium.

Tous les analogues peptidiques ont été synthétisés sur phase solide en stratégie Fmoc selon les protocoles couramment utilisés au sein du service de synthèse de peptide et criblage fonctionnel de la plate-forme PRIMACEN (Leprince et al., 1998). Dans la mesure du possible les dérivés guanidino-(poly) alkylés de la norarginine (Nar), de l'arginine et de l'homoarginine (Har) commerciaux ont été utilisés. A l'inverse, tous les autres analogues ont été préparés à partir de 3 précurseurs peptidiques contenant en position 25, respectivement l'acide 2,4-diaminobutyrique, l'ornithine et la lysine selon la méthode développée par Hamzé (Hamzé et al., 2005). Après la deprotection sélective de la fonction amine latérale, réaction avec le Fmoc-isothiocyanate et départ du groupement Fmoc, nous avons obtenu les dérivés northio, thio- et homothiocitrulline portés par la résine, et les composés *N*⁰-méthylnorthio-, *N*⁰-méthylthio- et *N*⁰-méthylhomothiocitrulline dans le cas de l'emploi du méthylisothiocyanate. A ce stade, nous nous sommes assurés qu'après départ du groupement Fmoc, la résine restait négative au test colorimétrique de Kaiser (Kaiser et al., 1970) qui aurait révélé, dans le cas contraire, la formation d'un intermédiaire carbonate résultant de l'attaque nucléophile de la fonction amine sur la partie carbonyle du Fmoc-NCS comme rapporté précédemment (Hamzé et al., 2005). Notons aussi la réactivité moindre de méthyl-NCS comparativement au Fmoc-NCS, due à l'absence de la fonction carbonate qui accentue l'électrophilie de l'isothiocyanate, et qui a nécessité 3 additions successives (3x5 eq) du méthyl-NCS. Après *S*-méthylation à l'iodure de méthyle, réaction avec différentes amines primaires et secondaires, clivage et purification nous avons obtenu avec succès une série complète d'analogues guanidino-(poly) alkylés en position

25 du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ déclinés en version Nar, Arg, et Har avec des rendements compris entre 6 et 39% et des puretés supérieures à 97,4% pour les composés issus des 3 précurseurs. Les analogues portant la modification *N*^ω-isobutyl ont été obtenus avec les rendements les plus faibles alors que les composés *N*^ω-*N*^ω-diisopropyl n'ont pas pu être préparés probablement en raison d'un encombrement stérique trop important. Chaque étape a été suivie par l'analyse HPLC et en spectrométrie de masse du produit brut de micro-clivage, et n'a pas révélé la présence résiduelle de produit de départ ni de produit d'hyperméthylation lors de l'usage d'iodure de méthyle.

Chaque peptide et analogue peptidique de cette série a tout d'abord été évalué pour sa capacité à mobiliser le calcium cytosolique dans la lignée cellulaire CHO-surexprimant le *h*QRFPR entretenue au laboratoire. Compte-tenu que les composés préparés partagent avec le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ le même squelette peptidique nous avons utilisé cet heptapeptide comme molécule de référence. Néanmoins, nous avons pu confirmer que son activité propre est environ 40 fois inférieure à celle du 26RFa pleine longueur. En effet, l'étude pionnière de RSA menée par Le Marec et ses collaborateurs a montré que le raccourcissement N-terminal du 26RFa s'accompagne d'une diminution graduelle de l'activité et que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ constitue l'analogue le plus court qui conserve une activité appréciable (Le Marec et al., 2011).

L'homologation de la chaîne latérale de l'arginine, nous a conduit au composé [Har²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-229) qui présente une puissance similaire à celle du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, alors que sa rétraction d'un méthylène, conduit au composé inactif [Nar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2290). Cette perte d'activité est probablement due à l'altération irréversible des contacts établis entre l'Arg²⁵ et la Gln¹²⁵ de part des distances interatomiques augmentées. En conséquence, tous les dérivés mono-, di-, ou tri-alkylés au niveau de la guanidine de la Nar²⁵ sont totalement dépourvus d'activité agoniste. Même si l'Har est tolérée dans la poche de liaison en raison probablement de sa grande flexibilité, son alkylation est largement délétère à l'activité agoniste ; seul le composé [(*i*Bu)^ωHar²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2289) conserve une activité modérée à mobiliser le calcium intracellulaire. En revanche, le [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) est 25 fois plus puissant que le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2021) et seulement une fois et demi moins puissant que le ligand naturel, le 26RFa. Le remplacement du groupement *N*^ω-méthyle par un radical *N*^ω-éthyl (LV-2271), *N*^ω-propyl (LV-2274) et *N*^ω-isobutyl (LV-2288) réduit l'activité des analogues à une puissance similaire à celle du peptide de référence, tandis que les disubstitutions (ω,ω et ω,ω') et la trisubstitution conduisent à des analogues incapables d'activer le QRFPR.

Il a été rapporté que la partie C-terminale, Phe-Arg-Phe-NH₂ du 26RFa₍₁₉₋₂₆₎ est ancrée dans la poche de liaison du QRFPR par au moins deux interactions provenant des atomes *N*^ω et *N*^{ω'},

individuellement impliqués dans le processus de liaison et d'activation (Neveu et al., 2014). Comme la mono-alkylation de l'atome N^ω n'affecte pas la charge positive du groupement guanidine mais augmente la puissance du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, on peut suspecter soit l'établissement d'une nouvelle interaction favorable à l'intérieur de la cavité ou soit une modification bénéfique des caractéristiques électrostatiques de l'interaction initiale. Des observations similaires ont été rapportées pour le Kp-10 (Asami et al., 2012b). En effet, le Kp-10 contenant la modification N^ω -méthyl-arginine au niveau du motif RFamide et son analogue N^ω -éthyle sont respectivement deux fois plus puissants et aussi puissant que le Kp-10 à stimuler la $[Ca^{2+}]_i$ dans un test fonctionnel impliquant le KiSS1R humain (Asami et al., 2012b). Cette similitude met en évidence probablement des processus communs de reconnaissance et d'activation entre tous les RFRPs et leurs récepteurs apparentés, comme cela a déjà été suggéré (Neveu et al., 2014). A l'appui de cette hypothèse, le QRFPR humain partage de 44 à 57% de similarité de séquence avec les NPPF-1, NPPF-2, GPR10 et KiSS1R humains. L'ensemble de ces données indique que le résidu Arg en position 25 a une longueur de chaîne latérale optimale pour conférer aux analogues une activité agoniste vis-à-vis de QRFPR et que sa N^ω -méthylation est acceptée par le site actif.

Les composés dépourvus d'activité agoniste ont été testés pour leur capacité à antagoniser la réponse calcique induite par le 26RFa. L'incubation des cellules CHO transfectées par le QRFPR humain pendant 30 minutes en présence de l'antagoniste pyrrolo[2,3-c]pyridine d'AstraZeneca (25e) (Georgsson et al., 2014) à la concentration de 10^{-5} M bloque complètement l'effet stimulateur d'une administration de 10^{-7} M de 26RFa. Dans ces mêmes conditions, le composé [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279) réduit de 47% la réponse calcique induite par le 26RFa alors que le [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185) n'a pas d'effet significatif. Néanmoins, la courbe dose-inhibition du LV-2185 a révélé un effet antagoniste maximal à la concentration de 10^{-4} M avec une IC₅₀ de 0,6 μM et une efficacité maximale de 80%. L'analogue triméthylé LV-2279 et le dérivé 25e présentent respectivement, une IC₅₀ de 8,2 et 0,6 μM, et une efficacité de 87,5 et 100%. En outre, le composé 25e décale parallèlement vers la droite et de façon dose-dépendante la courbe dose-réponse du 26RFa alors que LV-2279 n'affecte que l'efficacité du peptide de référence indiquant que la molécule non peptidique agit comme un antagoniste compétitif du QRFPR tandis que le [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279) se comporte comme un agoniste partiel, tout comme le [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵] 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185). En effet, à des concentrations supra-micromolaires, ces deux composés peptidiques, présentent un effet agoniste résiduel qui

pourrait conduire dans un premier temps à l'internalisation du QRFPR lors de l'incubation des cellules transfectées et à un effet agoniste moindre du 26RFa dans un second temps.

Le remplacement d'une arginine par un résidu à chaîne alkyl-guanidino dans une séquence peptidique bioactive été utilisé avec succès pour améliorer la stabilité des agonistes du Kiss1R vis-à-vis de la digestion par les protéases trypsiques (Asami et al., 2012b), pour augmenter l'affinité de l'HOE-140 pour le récepteur B2 de la bradykinine (Kennedy et al., 2002), et pour augmenter la puissance et la durée d'action d'antagonistes du récepteur de la GnRH (Nestor et al., 1988). Par ailleurs, la sélectivité d'inhibiteurs peptidiques de la thrombine est également favorablement modulée par ce type de modification (Kokko et al., 2001). De même, des inhibiteurs spécifiques d'arginine *N*-méthyltransférase contenant le résidu *N*^ω-éthyle-arginine ont été conçus (Lakowski et al., 2010; Thomas et al., 2014). Enfin, l'incorporation de *N*^ω-alkyl-arginine dans des peptides accroît la lipophile (Asami et al., 2012b; Kennedy et al., 2000) et modifie la basicité du groupe guanidinium (Kennedy et al., 2000; Thomas et al., 2014). Généralement, le substituant alkyle réduit les possibilités d'établissement de liaisons hydrogène de la fonction guanidine tout en conservant une charge positive à un pH physiologique, et par conséquent modifie les interactions peptide-récepteur engagées au niveau de l'arginine du partenaire.

En conclusion de cette première partie, nous avons démontré que l'homologation de la chaîne latérale de l'Arg²⁵ n'impacte pas significativement la puissance de l'heptapeptide C-terminal du 26RFa, alors que son raccourcissement d'un méthylène conduit à un analogue inactif. De plus, la majorité des analogues incorporant une Har²⁵ ou une Nar²⁵ *N*-alkylée ne sont ni des agonistes ni des antagonistes du QRFPR, montrant que la longueur de la chaîne latérale de l'arginine est optimale au sein de la poche d'interaction. Nous avons également mis en exergue que, le [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) est 25 fois plus puissant que sa forme non méthylée et seulement 1,5 fois moins puissant que le 26RFa. Enfin, les composés [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185) et [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2279) bien qu'antagonisant l'effet du 26RFa sur la mobilisation du calcium intracellulaire se comportent plus vraisemblablement comme des agonistes partiels du QRFPR. Ces résultats valident une nouvelle fois notre modèle 3D du QRFPR humain et démontrent l'importance de l'Arg²⁵ dans les interactions moléculaires entre le 26RFa et son récepteur, le QRFPR.

2. Etude *in vivo* de quelques analogues remarquables du 26RFa

Le 26RFa, présente de nombreuses activités biologiques (Leprince et al., 2017). De fait, le 26RFa stimule la prise alimentaire lorsqu'il est injecté au niveau central chez les rongeurs, et son activité orexigène est renforcée chez les animaux obèses (Chartrel et al., 2003; do Rego et al., 2006; Takayasu et al., 2006). De plus, des données récentes indiquent que le 26RFa intervient aussi dans la régulation de l'homéostasie glucidique (Egido et al., 2007; Gesmundo et al., 2017; Granata et al., 2014; Prévost et al., 2015). En particulier, le 26RFa réduit significativement l'hyperglycémie induite par le glucose, augmente la sensibilité à l'insuline ainsi que l'insulinémie (Prévost et al., 2015). De plus, l'ingestion orale de glucose stimule fortement la libération de 26RFa par le tube digestif, révélant que le 26RFa agit comme une nouvelle incrétine au même titre que le *gastric inhibitory polypeptide* et le *glucagon-like peptide 1* (Prévost et al., 2015). Même si l'action insulinothrompe est controversée, le 26RFa prévient la mort et l'apoptose des cellules β pancréatiques (Granata et al., 2014). Ces travaux montrent que le 26RFa est un neuropeptide clé dans le contrôle du métabolisme énergétique ce qui fait de ce peptide une cible particulièrement intéressante pour le développement d'agonistes et/ou d'antagonistes à visée thérapeutique. Ces molécules pourraient également être des précieux outils pharmacologiques pour mieux comprendre l'implication physiologique du système 26RFa/QRFP.

Sur la base des résultats acquis *in vitro*, nous avons choisi de tester nos analogues les plus prometteurs sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique au cours d'un test de tolérance à l'insuline chez la souris.

L'analyse de la consommation alimentaire, suite à une administration i.c.v. de 26RFa, montre une augmentation de 37,8% dès les 30 premières minutes conformément à la littérature (do Rego et al., 2006). A la même dose de 0,1 μg , les agonistes peptidique LV-2186 et pseudo-peptidique LV-2172 ne stimulent pas de façon significative la prise alimentaire. L'absence d'effet du LV-2172 est en désaccord avec l'étude menée par Neveu et ses collaborateurs (Neveu et al., 2012). En effet, ce pseudopeptide stimule de façon dose-dépendante la prise alimentaire pour des doses comprises entre 0,12 et 1,2 nmol, ce qui correspond respectivement à des quantités injectées de 0,1 et 1 μg par animal. Notons qu'à une dose 10 fois moindre (0,01 μg), le LV-2172 n'engendre pas d'effet orexigène (Neveu et al., 2012). Le fait de nous être placés à la dose liminaire de 0,1 μg /animal ne peut expliquer à lui seul cette différence. Il est parfaitement envisageable d'incriminer les conditions expérimentales que nous avons utilisées

et en particulier le status métabolique des souris. En effet, dans leur étude, Neveu et ses collaborateurs ont utilisé des souris partiellement affamées pendant 18 heures, *i.e* des souris ayant reçu à leur disposition qu'une demi-quantité quotidienne nourriture. Dans ces conditions, l'effet orexigène du LV-2172 se manifeste pendant plus de 2 heures, alors que celui du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ s'estompe en 90 minutes (Neveu et al., 2012). Dans ces mêmes conditions, l'effet du 26RFa se maintient également au moins pendant une heure et demie (Chartrel et al., 2003). Pour ma part, j'ai utilisé des souris sévèrement affamées qui n'ont reçu aucune nourriture pendant 18h heures. Dès présentation de nourriture, les souris s'alimentent et stoppent leur repas au bout de 30 minutes. Durant cette période, le 26RFa induit une augmentation significative de la prise alimentaire. Néanmoins, aucun effet orexigène n'a été constaté au-delà. On peut facilement supposer que les animaux à jeun ont compensé leur manque de nourriture par une utilisation exacerbée de leur réserve énergétique dûe à une lipolyse accélérée ou ont subi une modification comportementale plus profonde. Ainsi, le status énergétique des animaux que j'ai utilisé pourrait masquer tout ou partie des effets attendus, *i.e* partiellement l'effet orexigène du 26RFa et totalement ceux du LV-2172 et LV-2186 qui présentent *in vitro* des EC₅₀ supérieures à celle du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎. A l'appui de ces hypothèses, Ellacott et ses collaborateurs ont rapporté qu'un jeun modéré était parfaitement approprié à l'évaluation des propriétés orexigène d'une molécule, et qu'au-delà d'une douzaine d'heures, la privation constitue un facteur majeur de stress qui altère le comportement alimentaire des animaux (Ellacott et al., 2010). Par ailleurs, quel que soit l'intervalle de temps considéré, le LV-2185 est sans effet propre à la dose de 1 µg sur la prise alimentaire. En revanche, sa co-administration avec une dose effective de 26RFa bloque l'effet orexigène de ce dernier durant la première demi-heure. Ce résultat inédit suggère l'implication du GPR103A dans l'effet orexigène du 26RFa chez la souris et qu'une transposition chez l'homme pourrait être envisagée. Toutefois, l'utilisation d'un ligand du QRFPR chez l'homme dans le but d'augmenter sa consommation alimentaire pourrait être freinée par une baisse de sensibilité du 26RFa des patients anorexiques dont les taux circulants importants (Galusca et al., 2012) reflètent probablement un comportement adaptatif plus au moins défailant de l'organisme pour palier la dénutrition.

Au sein du laboratoire, l'équipe du Dr. N. Chartrel a étudié en détail le rôle et le mécanisme d'action du 26RFa dans le contrôle périphérique de l'homéostasie glucidique. L'étude révèle, entre autre, que l'injection i.p. de 26RFa atténue significativement l'hyperglycémie induite par une co-injection i.p. de glucose pendant les 2 heures qui suivent (Prévost et al., 2015). En revanche, le neuropeptide n'a pas d'effet sur la glycémie basale, suggérant que le 26RFa exerce

un rôle anti-hyperglycémiant et n'est recruté qu'en cas d'hyperglycémie pour rétablir une glycémie physiologique (Prévoist et al., 2015). Simultanément, les mêmes auteurs ont observé que le 26RFa augmente la sensibilité à l'insuline durant l'ITT suite à leur co-injection i.p. chez la souris. Nous avons choisi ce test simple à mettre en œuvre pour évaluer l'effet de quelques uns de nos nouveaux analogues du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎. De manière similaire à l'étude sur la prise alimentaire, le LV-2172 ne mime pas l'effet potentialisateur du 26RFa sur l'hypoglycémie induite par l'administration conjointe d'insuline. En revanche, notre meilleur agoniste, le LV-2186 reproduit l'action du 26RFa 90 minutes après leur co-administration i.p. pour une dose molaire quintuple à celle du 26RFa. L'effet tardif du LV-2186 pourrait néanmoins s'expliquer par une puissance inférieure à celle du 26RFa vis-à-vis de l'activation du QRFPR.

Le mécanisme d'action du 26RFa dans le contrôle de l'homéostasie glucidique chez les rongeurs est complexe au regard des résultats paradoxaux rapportés dans la littérature (Egido et al., 2007; Granata et al., 2014; Prévoist et al., 2015) et l'intervention potentielle de trois récepteurs (Chartrel et al., 2011; Leprince et al., 2017). Historiquement considéré comme absent du pancréas (Egido et al., 2007; Fukusumi et al., 2003; Jiang et al., 2003), le QRFPR a depuis été identifié dans les îlots pancréatiques humains, ainsi que dans les lignées murines INS-1E et MIN6 (Granata et al., 2014; Prévoist et al., 2015) sans pour autant distinguer les deux isoformes présentes chez les rongeurs. De plus, le NPPF-2 pourrait également relayer les effets insulino-modulateurs pancréatiques du 26RFa (Gesmundo et al., 2017; Granata et al., 2014). De fait, l'effet insulino-statique du 26RFa décrit par Granata et ses collaborateurs n'est pas bloqué par l'inhibition de l'expression du QRFPR par des siRNA dans les cellules β , alors que l'effet insulino-trope opposé du 43RFa est abrogé (Granata et al., 2014). Mes résultats tendent à montrer que l'effet du 26RFa sur l'homéostasie glucidique de la souris ne suit que partiellement la pharmacologie du QRFPR humain. Nos analogues sont conçus autour du récepteur humain et il est envisageable que son orthologue chez la souris (GPR103A) soit finalement absent du pancréas au profit du GPR103B. Une absence d'affinité pour le GPR103B et/ou pour le NPPF-2 pourrait aussi expliquer l'absence d'effet du LV-2172. Même si le GPR103B n'a pas encore été clairement identifié dans le pancréas de la souris, il est intéressant de noter qu'il relaie l'effet inhibiteur du 26RFa sur la lipolyse induite par l'isoprotérénol chez les animaux rendus obèses par une alimentation hypercalorique (Mulumba et al., 2010).

En accord avec notre hypothèse d'un effet pancréatique relayé par le GPR103B et/ou le NPPF-2, l'effet pro-hypoglycémiant du LV-2186 et l'action antagoniste du LV-2185 suggèrent que

ces deux analogues soient potentiellement moins spécifiques du GPR103A que ne le serait le LV-2172.

En conclusion de cette partie *in vivo*, nous avons confirmé les effets orexigène et pro-hypoglycémiant du 26RFa. De façon inédite, j'ai montré sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique que l'agoniste récemment développé au sein de l'équipe, le LV-2186, reproduit dans une moindre mesure l'effet pro-hypoglycémiant du 26RFa, et que l'antagoniste de la réponse calcique, le LV-2185 bloque *in vivo* ses deux effets. A la lumière de mes résultats, il semble que l'homéostasie glucidique chez la souris ne constitue pas une approche pertinente d'évaluation pharmacologique de ligands du QRFPR humain contrairement à la prise alimentaire. A notre connaissance, l'antagoniste non peptidique d'AstraZeneca bloque totalement l'effet orexigène du 26RFa chez la souris mais que partiellement son effet pro-hypoglycémiant (El Mehdi et al., résultats personnels).

3. Etude des interactions 26RFa/QRFPR

Récemment, notre équipe a construit un modèle tridimensionnel du QRFPR humain par homologie de séquence avec le β 2AR avec lequel il présentait, à l'époque, la plus forte homologie parmi les récepteurs cristallisés (Neveu et al., 2014). En conséquence, notre modèle de QRFPR contient les 2 courtes hélices non-transmembranaires du β 2AR localisées dans l'ECL2 et le segment C-terminal intracellulaire (Figure 25). Depuis cette étude, plusieurs RCPG ont été cristallisés dont certains présentent comme ligand endogène un peptide tels que les récepteurs CXCR4 des chimiokines, NTS1 de la neurotensine ou encore OX1 des orexines (Gacasan et al., 2017). Au printemps 2018, on dénombrait 223 structures cristallines de RCPG incluant 50 récepteurs différents (<http://GPCR.org>). A partir de cette nouvelle liste, un nouvel alignement de séquence rapproche toujours le QRFPR du β 2AR même si localement une forte identité ou similarité de séquence peut être relevée avec d'autres RCPG comme ceux des orexines.

Une des limites des modèles de RCPG par homologie réside dans la faible similitude structurale des boucles, ce qui impacte profondément les prédictions de *docking* et par extension le *structure-based drug design* (Coudrat et al., 2017; Goldfeld et al., 2011). Comme évoqué précédemment, une des particularités du β 2AR est la présence d'une courte hélice dans son ECL2 alors que la grande majorité des RCPG de classe A possède plutôt un motif *β -hairpin* à l'instar des récepteurs humains CXCR4 (4RWS) et OX1R (4Z58) et NTS1 de rat (4XE5). La présence de cette hélice dans le modèle de QRFPR, combinée à une position de *docking* du

26RFa₍₁₉₋₂₆₎ qui suppose que l'hélice- α du 26RFa reste en surface du récepteur (Neveu et al., 2014) nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une interaction entre ces deux hélices. Toutefois, nous avons souhaité tout d'abord nous appuyer sur une prédiction structurale *in silico* puis sur une validation expérimentale que la partie ECL2 définie dans le modèle du QRFPR se structure bien localement en hélice- α plutôt qu'en β -hairpin.

D'après le logiciel AGADIR (<http://agadir.crg.es/>) les séquences 166-223, 170-213, 171-212, 180-199 et 180-212 du QRFPR, couvrant tout ou partie de l'ECL2 délimitée dans le modèle par les résidus Gln¹⁸⁴ et Gln²¹¹ (Neveu et al., 2014), présentent toutes une tendance à se structurer en hélice, d'une intensité modérée à forte, entre les résidus Pro¹⁷⁹ et Thr²⁰⁶, en fonction de la chaîne peptidique considérée. Forts de ce résultat, nous avons poursuivi ce travail par la préparation des deux peptides QRFPR₍₁₈₀₋₁₉₉₎ (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHI ; LV-2252) et [Ser^{200,201}]QRFPR₍₁₈₀₋₂₁₂₎ (MWHVQQLEIKYDFLYEKEHISSLEEWTSVPVHQK; LV-2262) dans lequel les deux cystéines natives et non-appareillées entre-elles ont été substituées à leur isostère sérine. Difficiles d'accès et assez peu solubles dans un tampon phosphate (2 mM, pH 6) ces deux peptides adoptent en présence de TFE une structure hélicoïdale de plus en plus prononcée quand la proportion du TFE augmente. Cette propension du TFE à stabiliser les hélices est bien documentée (Buck, 1998) et trouve son origine dans sa capacité à enrober le peptide en excluant les molécules d'eau du contact avec le peptide (Roccatano et al., 2002; Vymétal et al., 2016). Ainsi, les liaisons hydrogènes dites alternatives car concernant l'eau de solvation, sont éliminées au profit des liaisons hydrogènes intramoléculaires et par extension à celui de la stabilisation des structures secondaires. Il convient aussi de compléter cette action par le fait que le TFE réduit l'environnement diélectrique du peptide et diminue le coût entropique de la formation de l'hélice par la rupture du réseau de molécules d'eau par un effet chaotrope (Walgers et al., 1998). La présence manifeste d'une hélice dans l'ECL2 du QRFPR pourrait donc être due à l'effet inducteur de structure du TFE dans l'échantillon et masquer éventuellement un arrangement en β -hairpin plus communément rencontré dans cette partie extracellulaire des RCPG. Une étude de simulation de dynamiques moléculaires montre néanmoins que des peptides qui présentent des structures β -hairpin naissantes en milieu aqueux voient leur arrangement s'amplifier dans le TFE et non évoluer vers des hélices (Blanco et al., 1994; Kortemme et al., 1998). Enfin, on ne peut pas exclure que l'hélicité visible dans les spectres de CD des peptides QRFPR₍₁₈₀₋₁₉₉₎ et [Ser^{200,201}]QRFPR₍₁₈₀₋₂₁₂₎ ne provienne qu'exclusivement des résidus appartenant à la fin du TM4 (Met¹⁸⁰-Val¹⁸³). Une étude en

spectroscopie RMN est actuellement en cours pour définitivement conclure sur l'existence et la position précise de cette boucle non-transmembranaire de l'ECL2 du QRFPR.

La région extracellulaire des RCPG est particulièrement sollicitée dans la liaison des ligands peptidiques, tels que la vasopressine (Conner et al., 2007), l'endothéline (Arai et al., 1993) ou les peptides opioïdes (Dietrich et al., 1998), mais aussi des ligands de grande taille comme les hormones glycoprotéiques, telles que la TSH (Perlman et al., 1995). On distingue deux types d'arrangements de la région extracellulaire des récepteurs de classe A : certaines sont disposées de telle sorte qu'elles occluent la poche de liaison du ligand tandis que d'autres laissent un vaste espace ouvert permettant à l'agoniste d'atteindre ou de quitter la poche de liaison située au sein des TM (Wang and Duan, 2009). Ces deux organisations dépendent principalement du caractère hydrophobe ou hydrophile du ligand. À titre d'exemple, la partie N-terminale et la boucle ECL2 de la rhodopsine adoptent chacune, grâce à la présence de deux feuillet β , une conformation qui permet de recouvrir le 11-cis-rétinol, ligand hydrophobe lié de façon covalente au récepteur, ce qui prévient son hydrolyse (Palczewski et al., 2000). Pour les récepteurs liants des molécules plus hydrophiles, il n'existe pas de structure fondamentalement conservée pour ces régions. Comme évoqué ci-dessus, l'ECL2 peut être organisée en hélice- α ou feuillet β ou encore seulement partiellement structurée à l'instar des récepteurs muscariniques, et façonne la voie d'entrée du ligand dans la poche de liaison. De fait, des simulations de dynamiques moléculaires suggèrent que l'ECL2 serait nécessaire aux premières étapes de reconnaissance et de sélectivité des ligands des récepteurs β -adrénergiques (Dror et al., 2011; González et al., 2011; Kruse et al., 2012).

Plusieurs études sur les RCPG de classe A ayant pour ligand endogène un peptide indiquent que l'ECL2 joue également un rôle important dans la liaison du ligand et/ou dans la signalisation intracellulaire (Woolley and Conner, 2017). Par exemple, l'ECL2 du modèle de GALR2 participe à la liaison de la galanine, par son acide aminé Tyr¹⁶³, mais également à la formation d'un site allostérique accessible à des modulateurs positifs (Hui et al., 2016). Par ailleurs, la mutation de résidus de l'ECL2 de l'APJR provoque une signalisation biaisée et une activation de la voie G_i par l'apéline-13 alors que les mutations dans son ECL3 orientent le couplage de l'APJR vers une protéine G_q (Kumar et al., 2016). De même, l'ECL2 des récepteurs muscariniques de type M1 joue un rôle prépondérant dans la sélectivité de ligands bitopiques en coordination avec une signalisation biaisée dirigée soit vers une mobilisation du calcium intracellulaire ou soit vers la phosphorylation d'ERK1/2 (Keov et al., 2014).

L'ensemble de ces données soulignent l'importance de l'ECL2 dans les processus de reconnaissance et/ou activation, en particulier des RCPG de classe A. Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer la possibilité que les hélices du 26RFa (Thuau et al., 2005) et de l'ECL2 du QRFPR puissent interagir; le caractère amphiphile de ces deux hélices renforçant notre hypothèse.

Pour cela, nous avons mis en œuvre des analyses en MST, une technique récemment disponible dans notre Institut qui permet de quantifier une interaction entre 2 molécules comme par exemple un ligand et son récepteur (Corin et al., 2011). Contrairement à la résonance plasmonique de surface, l'immobilisation d'un des 2 partenaires n'est pas requise et nécessite juste son étiquetage par un fluorochrome. Comme dans les études de CD, la solubilisation du fragment QRFPR₍₁₈₀₋₂₁₂₎ couplé en N-terminal à l'Alexa-Fluor 647 est l'étape critique de la mise en œuvre des expériences de MST (Corin et al., 2011). Nos résultats préliminaires obtenus en présence de 30% de TFE, 1% de DMSO et 0,4% d'acide pluronique semblent encourageants et en faveur d'une interaction très probable du 26RFa en surface du QRFPR, qui coïnciderait avec la présence d'une hélice dans l'ECL2 (cf § résultats) ainsi que dans le 26RFa (Thuau et al., 2005). Contrairement aux premiers essais menés en tampon phosphate à pH 6, ces conditions encore perfectibles, n'ont pas laissé paraître de phénomène d'agrégation quand la concentration en 26RFa augmente dans les capillaires.

En conclusion de ce dernier volet, nous avons montré que la boucle extracellulaire 2 du QRFPR se structure localement très vraisemblablement en hélice- α et que celle-ci pourrait directement interagir avec celle du 26RFa.

Conclusion et perspectives



L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse apporte de nouvelles informations concernant, (1) les RSA de l'heptapeptide C-terminal du 26RFa, le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎, (2) les mécanismes d'action du 26RFa sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique chez la souris, (3) la structure secondaire de l'ECL2 du hQRFPR, et (4) la reconnaissance moléculaire ligand/récepteur du système 26RFa/QRFPR.

Dans la première partie, nous avons conçu et synthétisé avec succès une nouvelle série d'analogues peptidiques du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ modifiés au niveau de la chaîne latérale de l'Arg²⁵, basés sur des variations de longueur de chaîne, de nature et de nombre de substituants portés par la fonction guanidine (Figure 38).

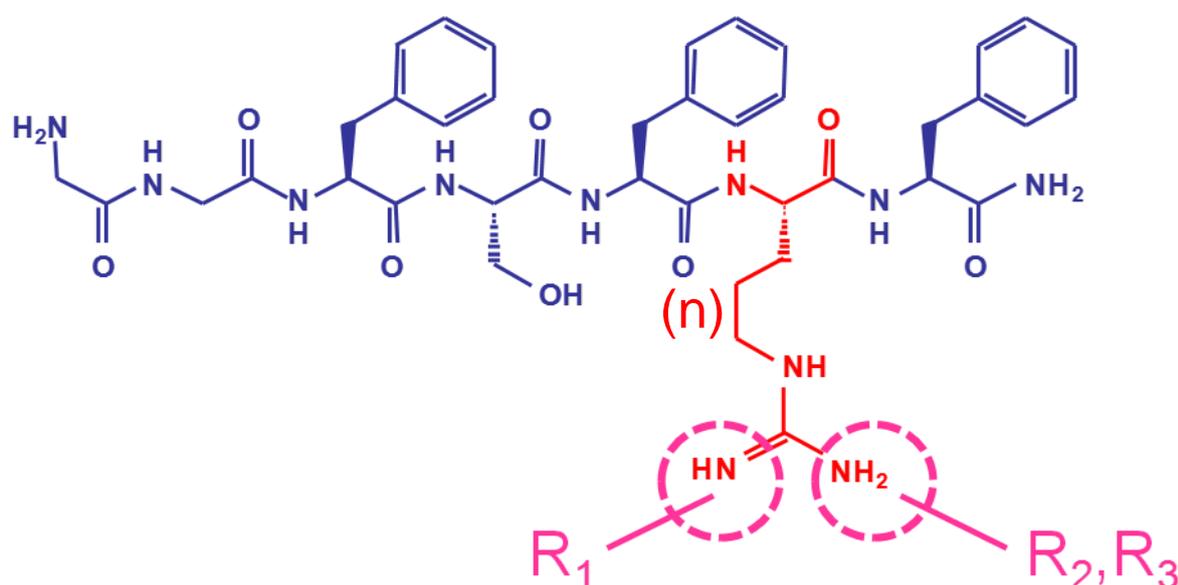
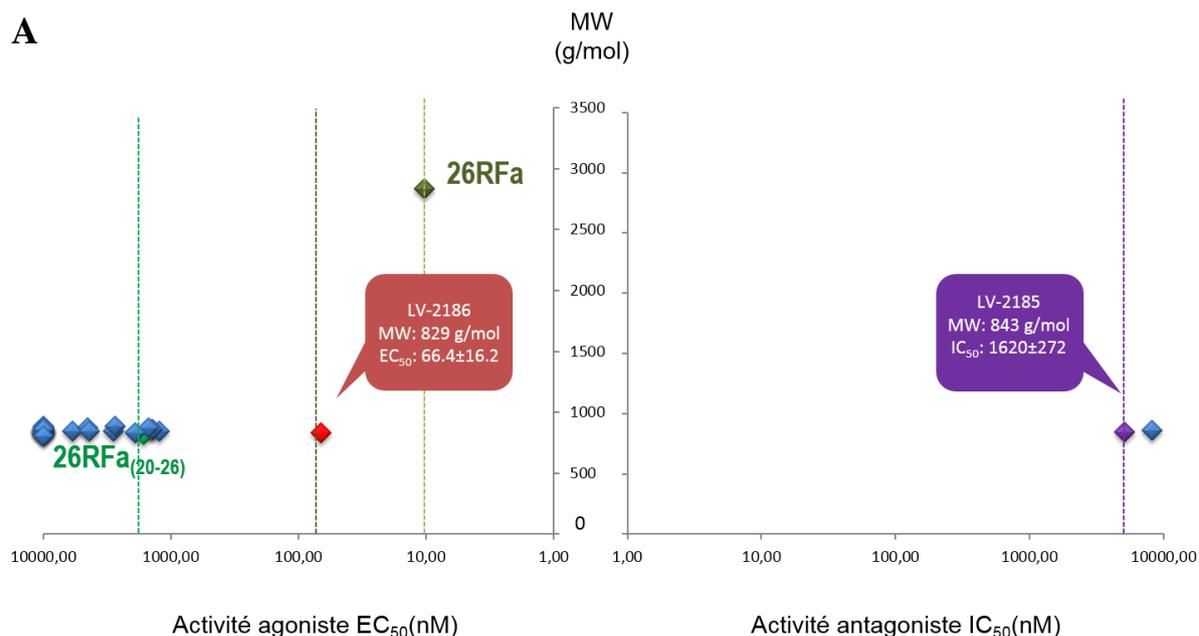


Figure 38 : Les modifications chimiques apportées sur la chaîne latérale de l'Arg²⁵ du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎.
n = 2 ; Nar-Arg, n = 3 ; Arg, n = 4 ; homo-Arg.

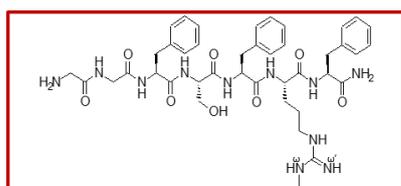
Ces différents analogues originaux ont été testés pour leur capacité à mobiliser la $[Ca^{2+}]_i$ dans une lignée CHO surexprimant de manière stable le QRFPR humain. Nous avons démontré que l'homologation (Har) de la chaîne latérale de l'Arg²⁵ n'impacte pas significativement la puissance de l'heptapeptide C-terminal du 26RFa, alors que son raccourcissement (Nar) d'un méthylène conduit à un analogue inactif. De plus, la majorité des analogues incorporant une Har²⁵ ou une Nar²⁵ mono ou poly-N-alkylée ne sont ni des agonistes ni des antagonistes du QRFPR, montrant que la longueur de la chaîne latérale de l'arginine est optimale au sein de la poche d'interaction. Nous avons également mis en exergue que le $[(Me)^0Arg^{25}]26RFa_{(20-26)}$ (LV-2186) est 25 fois plus puissant que sa forme non méthylée et seulement 1,5 fois moins

puissant que le 26RFa. Ce composé agoniste constitue à l'heure actuelle l'analogue du 26RFa le plus puissant ($EC_{50} = 66,4 \pm 16,2$ nM vs. 46 ± 30 nM pour le 26RFa) avec une masse molaire aussi faible (826,96 g/mol vs. 2832,17 g/mol pour le 26RFa) (Figure 39). Enfin, les composés [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185) et [(Me,Me,Me)^{ω,ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2179) bien qu'antagonisant l'effet du 26RFa sur la mobilisation du calcium intracellulaire se comportent plus vraisemblablement comme des agonistes partiels du QRFPR. Ces résultats valident une nouvelle fois le modèle 3D du QRFPR humain et assoient l'importance de l'Arg²⁵ dans les interactions moléculaires entre le 26RFa et son récepteur (Alim et al., soumis). Dans la continuité de ces travaux, nous synthétiserons et évaluerons l'activité de la forme longue du LV-2186 en introduisant au sein du 26RFa pleine longueur une *N*-méthylarginine en position 25. L'apport de la partie N-terminale combinée à la modification *N*-méthylarginine devrait conduire à un analogue, le [(Me)^ωArg²⁵]26RFa, plus puissant que le 26RFa, confirmant ainsi la pertinence de cette modification. Nous poursuivrons également notre travail par l'étude de modélisation moléculaire, déjà initiée en collaboration avec le CERMN (Normandie Université) dans laquelle les analogues LV-2185, LV-2186 et LV-2179 sont *dockés* dans le modèle du QRFPR. Cette étude devrait permettre d'interpréter leur profil pharmacologique au regard de leurs interactions avec le *h*QRFPR. Enfin, nous projetons de concevoir et préparer de nouveaux analogues du 26RFa en portant une attention particulière au développement d'antagoniste du *h*QRFPR. A titre d'exemple nous substituerons à l'Arg²⁵ du 26RFa et/ou du 26RFa₍₂₀₋₂₆₎ par la L-canavanine (acide 2-amino-4-(guanidinoxy)butyrique) dont la basicité du groupement hydroxyguanidine est plus faible que celle du groupement guanidine. A notre connaissance aucun peptide ou analogue peptidique n'incorpore cet acide aminé, dont la stabilité en milieu acide pourrait être un frein à leur préparation.

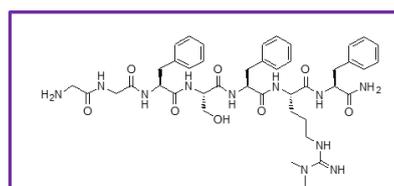
Dans la seconde partie de ce travail, nous avons évalué l'activité des analogues les plus intéressants de notre série, d'un point de vue pharmacologique, sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique au cours d'un test ITT chez la souris. Nos résultats confirment tout d'abord les effets orexigène et pro-hypoglycémiant du 26RFa. Ils montrent également que l'agoniste [(Me)^ωArg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) du *h*QRFPR est capable de reproduire tardivement l'effet du 26RFa dans l'ITT et que l'antagoniste de la réponse calcique du 26RFa développé par rapport au récepteur humain, [(Me,Me)^{ω,ω}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185), bloque l'effet potentialisateur, à 90 minutes, du 26RFa sur l'hypoglycémie induite par l'insuline. A ce titre, nous évaluerons à plus long terme la glycémie des souris traitées au LV-2186 afin de déterminer si l'effet perdure au-delà de celui du 26RFa, ce qui constituerait un réel avantage.



B



[N^ω-methyl-arginine²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎: LV-2186



[N^{ω,ω}-dimethyl-arginine²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎: LV-2185

Figure 39 : Représentation des activités agoniste et antagoniste des 32 analogues du 26RFa synthésisés dans cette étude en fonction de leur masse moléculaire (A) et formule développée de quelques-uns d'entre-deux (B). L'activité agoniste est représentée par les valeurs d'EC₅₀ en nM et l'activité antagoniste par les valeurs d'IC₅₀ en nM. La couleur des points en (A) renvoie aux formules correspondantes en (B)

Nous souhaitons aussi reconduire l'étude de l'effet du LV-2185 et LV-2186 sur la prise alimentaire des souris dans un paradigme identique à celui utilisé par Neveu et ses collaborateurs (Neveu et al., 2012) dans le but de s'affranchir du stress occasionné par une privation alimentaire drastique des animaux. Enfin, au niveau pharmacologique, nous envisagerons de poursuivre ce travail par l'expression stable des deux variants murins du QRFPR, le GPR103A et GPR103 B dans une lignée CHO-Gα₁₆ afin d'évaluer la sélectivité de nos molécules vis-à-vis des deux formes de récepteurs chez la souris. Nous compléterons ces expériences en déterminant l'affinité de ces mêmes molécules sur le NPF2-1 à travers l'établissement d'une collaboration. Finalement, nous identifierons quelle forme du QRFPR est

présente dans le pancréas de souris par PCR grâce à l'utilisation de *primers* spécifiques de chacune des formes murines de QRFPR.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons montré grâce au logiciel AGADIR que les différents fragments encadrant l'ECL2 du QRFPR humain tendent à se structurer en hélice- α . Sur la base de cette observation, nous avons souhaité vérifier expérimentalement la présence de cette hélice par une étude de CD. De fait, les fragments 180-199 (LV-2252) et 180-212 (LV-2262) du *h*QRFPR adoptent une structure hélicoïdale en présence de TFE ou de micelle de DPC. Par la suite, nous avons obtenu des résultats préliminaires de MST qui montrent des modifications thermophorétiques compatibles avec une interaction physique entre le peptide [Ser^{200,201}]QRFPR₍₁₈₀₋₂₁₂₎, délimitant l'ECL2 du récepteur, et le 26RFa. Nous souhaitons réaliser de nouvelles expériences de MST en augmentant dans un premier temps le pourcentage de TFE de 30% à 50%. Parallèlement, nous souhaitons mettre en place une étude RMN en collaboration avec le Centre de Spectroscopie de l'IRCOF (Normandie Université) visant à caractériser les interactions moléculaires établies entre le 26RFa et le fragment 180-212 du *h*QRFPR. Certaines données recueillies pourraient être mises à profit pour affiner la structure du modèle de QRFPR, en particulier au niveau de l'ECL2. Enfin, en partenariat avec le CERMN, nous évaluerons le profil pharmacologique de composés non-peptidiques, répertoriés dans leur chimiothèque interne et dans la chimiothèque nationale, et sélectionnés par un criblage virtuel dans le modèle de QRFPR.

En conclusion, ce travail a conduit à la conception du [(Me)⁰Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2186) qui constitue actuellement l'agoniste du *h*QRFPR le plus puissant avec une masse molaire aussi faible, et à la reclassification du [(Me,Me)^{0,0}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2185), initialement décrit comme un antagoniste (Neveu et al., 2014), comme un agoniste partiel tout comme le [(Me,Me,Me)^{0,0,0}Arg²⁵]26RFa₍₂₀₋₂₆₎ (LV-2179). Nous avons montré, *in vivo*, que le LV-2185 bloque l'effet orexigène du 26RFa et son action pro-hypoglycémiant. De plus, nous avons démontré que le LV-2186 mime, avec retard, l'effet du 26RFa dans l'ITT. Nos résultats obtenus *in vivo* suggèrent que (1) la régulation de la prise alimentaire de la souris mobilise le GPR103A, (2) celle de l'homéostasie glucidique requiert l'activation du GPR103B et/ou du NPFF-2, et (3) que les composés LV-2186 et LV-2172 reconnaissent les deux isoformes murines du QRFPR voire le NPFF-2. Finalement, nous avons montré que la partie ECL2 du *h*QRFPR se structure très probablement en hélice- α et interagit physiquement avec celle du 26RFa. Pris dans leur ensemble, nos résultats contribuent à une compréhension approfondie des interactions moléculaires régissant le système 26RFa/QRFPR et devraient faciliter le développement de

nouveaux ligands du QRFPR d'intérêt thérapeutique, notamment pour le traitement des troubles du comportement alimentaire.



Références bibliographiques



-A-

- Abbara, A., Jayasena, C.N., Christopoulos, G., Narayanaswamy, S., Izzi-Engbeaya, C., Nijher, G.M.K., Cominos, A.N., Peters, D., Buckley, A., Ratnasabapathy, R., et al. (2015). Efficacy of kisspeptin-54 to trigger oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) during in vitro fertilization (IVF) therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *100*, 3322–3331.
- van Aerle, R., Kille, P., Lange, A., and Tyler, C.R. (2008). Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* *29*, 57–64.
- Agersnap, M., Zhang, M.-D., Harkany, T., Hökfelt, T., and Rehfeld, J.F. (2016). Nonsulfated cholecystokinins in cerebral neurons. *Neuropeptides* *60*, 37–44.
- Ahn, S.-J., Martin, R., Rao, S., and Choi, M.-Y. (2017). Neuropeptides predicted from the transcriptome analysis of the gray garden slug *Deroceras reticulatum*. *Peptides* *93*, 51–65.
- Allerton, T.D., and Primeaux, S.D. (2015). QRFP-26 enhances insulin's effects on glucose uptake in rat skeletal muscle cells. *Peptides* *69*, 77–79.
- Allia, E., Tarabra, E., Volante, M., Cerrato, M., Ghigo, E., Muccioli, G., and Papotti, M. (2005). Expression of cortistatin and MrgX2, a specific cortistatin receptor, in human neuroendocrine tissues and related tumours. *J. Pathol.* *207*, 336–345.
- Allison, D.S., and Young, E.T. (1989). Mutations in the signal sequence of prepro-alpha-factor inhibit both translocation into the endoplasmic reticulum and processing by signal peptidase in yeast cells. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 4977–4985.
- Alonzeau, J., Alexandre, D., Jeandel, L., Courel, M., Hautot, C., El Yamani, F.-Z., Gobet, F., Leprince, J., Magoul, R., Amarti, A., et al. (2013). The neuropeptide 26RFa is expressed in human prostate cancer and stimulates the neuroendocrine differentiation and the migration of androgeno-independent prostate cancer cells. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *49*, 511–519.
- Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S., and Evans, R.M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* *298*, 240–244.
- Ames, R.S., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Willette, R.N., Aiyar, N.V., Romanic, A.M., Louden, C.S., Foley, J.J., Sauermelch, C.F., Coatney, R.W., et al. (1999). Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* *401*, 282–286.
- Anderson, G.M., Relf, H.-L., Rizwan, M.Z., and Evans, J.J. (2009). Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology* *150*, 1834–1840.
- Anjum, S., Krishna, A., Sridaran, R., and Tsutsui, K. (2012). Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), kisspeptin and GnRH receptor and their possible roles in testicular activities from birth to senescence in mice. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Genet. Physiol.* *317*, 630–644.

Anjum, S., Krishna, A., and Tsutsui, K. (2014). Inhibitory roles of the mammalian GnIH ortholog RFRP3 in testicular activities in adult mice. *J. Endocrinol.* 223, 79–91.

Anoop, A., Ranganathan, S., Das Dhaked, B., Jha, N.N., Pratihari, S., Ghosh, S., Sahay, S., Kumar, S., Das, S., Kombrabail, M., et al. (2014). Elucidating the role of disulfide bond on amyloid formation and fibril reversibility of somatostatin-14: relevance to its storage and secretion. *J. Biol. Chem.* 289, 16884–16903.

Arfmann, H.A., Labitzke, R., and Wagner, K.G. (1977). Conformational properties of L-leucine, L-isoleucine, and L-norleucine side chains in L-lysine copolymers. *Biopolymers* 16, 1815–1826.

Asami, T., Nishizawa, N., Ishibashi, Y., Nishibori, K., Nakayama, M., Horikoshi, Y., Matsumoto, S., Yamaguchi, M., Matsumoto, H., Tarui, N., et al. (2012a). Serum stability of selected decapeptide agonists of KISS1R using pseudopeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6391–6396.

Asami, T., Nishizawa, N., Ishibashi, Y., Nishibori, K., Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Ohtaki, T., and Kitada, C. (2012b). Trypsin resistance of a decapeptide KISS1R agonist containing an N ω -methylarginine substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6328–6332.

Asami, T., Nishizawa, N., Matsui, H., Nishibori, K., Ishibashi, Y., Horikoshi, Y., Nakayama, M., Matsumoto, S., Tarui, N., Yamaguchi, M., et al. (2013). Design, synthesis, and biological evaluation of novel investigational nonapeptide KISS1R agonists with testosterone-suppressive activity. *J. Med. Chem.* 56, 8298–8307.

Asami, T., Nishizawa, N., Matsui, H., Takatsu, Y., Suzuki, A., Kiba, A., Terada, M., Nishibori, K., Nakayama, M., Ban, J., et al. (2014). Physicochemically and pharmacokinetically stable nonapeptide KISS1 receptor agonists with highly potent testosterone-suppressive activity. *J. Med. Chem.* 57, 6105–6115.

Ayachi, S., and Simonin, F. (2014). Involvement of mammalian RF-amide peptides and their receptors in the modulation of nociception in rodents. *Front. Endocrinol.* 5, 158.

-B-

Baeuerle, P.A., and Huttner, W.B. (1987). Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J. Cell Biol.* 105, 2655–2664.

Bang, A.S., Soule, S.G., Yandle, T.G., Richards, A.M., and Pemberton, C.J. (2007). Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma. *J. Endocrinol.* 192, 313–323.

Baribault, H., Danao, J., Gupte, J., Yang, L., Sun, B., Richards, W., and Tian, H. (2006). The G-Protein-Coupled receptor GPR103 regulates bone formation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 709–717.

Bass, C., Katanski, C., Maynard, B., Zurro, I., Mariane, E., Matta, M., Loi, M., Melis, V., Capponi, V., Muroli, P., et al. (2014). Conserved residues in RF-NH₂ receptor models identify predicted contact sites in ligand-receptor binding. *Peptides* 53, 278–285.

- Bechtold, D.A., and Luckman, S.M. (2006). Prolactin-releasing peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice. *Endocrinology* 147, 4723–4729.
- Beck, B. (2001). KO's and organisation of peptidergic feeding behavior mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 143–158.
- Beinfeld, M.C. (1994). Inhibition of pro-cholecystokinin (CCK) sulfation by treatment with sodium chlorate alters its processing and decreases cellular content and secretion of CCK 8. *Neuropeptides* 26, 195–200.
- Beltramo, M., Robert, V., Galibert, M., Madinier, J.-B., Marceau, P., Dardente, H., Decourt, C., De Roux, N., Lomet, D., Delmas, A.F., et al. (2015). Rational design of triazololipopeptides analogs of kisspeptin inducing a long-lasting increase of gonadotropins. *J. Med. Chem.* 58, 3459–3470.
- Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.-C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., et al. (2004). NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.* 279, 48865–48875.
- Bentley, G.E., Perfito, N., Ukena, K., Tsutsui, K., and Wingfield, J.C. (2003). Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J. Neuroendocrinol.* 15, 794–802.
- Bentley, G.E., Ubuka, T., McGuire, N.L., Chowdhury, V.S., Morita, Y., Yano, T., Hasunuma, I., Binns, M., Wingfield, J.C., and Tsutsui, K. (2008). Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 34–43.
- Bicknell, A.B. (2008). The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J. Neuroendocrinol.* 20, 692–699.
- Bihel, F., Humbert, J.-P., Schneider, S., Bertin, I., Wagner, P., Schmitt, M., Laboureyras, E., Petit-Demoulière, B., Schneider, E., Mollereau, C., et al. (2015). Development of a peptidomimetic antagonist of neuropeptide FF receptors for the prevention of opioid-induced hyperalgesia. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 438–445.
- Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C., Malli, R., Sharabi, A., Hiden, U., Graier, W., et al. (2004). Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J. Cell Sci.* 117, 1319–1328.
- Bishop, L., Dimaline, R., Blackmore, C., Deavall, D., Dockray, G.J., and Varro, A. (1998). Modulation of the cleavage of the gastrin precursor by prohormone phosphorylation. *Gastroenterology* 115, 1154–1162.
- Bjursell, M., Lennerås, M., Göransson, M., Elmgren, A., and Bohlooly-Y, M. (2007). GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 633–638.
- Blake, C.A., Campbell, G.T., Mascagni, F., Culler, M.D., and Negro-Vilar, A. (1993). Effects of injection of anti-luteinizing hormone (LH)-releasing hormone serum and anti-gonadotropin-

releasing hormone-associated peptide serum into neonatal rats on LH and follicle-stimulating hormone cells. *Biol. Reprod.* 49, 965–971.

Blanco, F.J., Rivas, G., and Serrano, L. (1994). A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nat. Struct. Biol.* 1, 584–590.

Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67, 835–851.

Bloomquist, B.T., Eipper, B.A., and Mains, R.E. (1991). Prohormone-converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 5, 2014–2024.

Bodner, M., Fridkin, M., and Gozes, I. (1985). Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3548–3551.

Bonini, J.A., Jones, K.A., Adham, N., Forray, C., Artymyshyn, R., Durkin, M.M., Smith, K.E., Tamm, J.A., Boteju, L.W., Lakhiani, P.P., et al. (2000). Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J. Biol. Chem.* 275, 39324–39331.

Bonnard, E., Burlet-Schiltz, O., Francés, B., Mazarguil, H., Monsarrat, B., Zajac, J.M., and Roussin, A. (2001). Identification of neuropeptide FF-related peptides in rodent spinal cord. *Peptides* 22, 1085–1092.

Bonnard, E., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., Girard, J.-P., and Zajac, J.-M. (2003). Identification of proNeuropeptide FFA peptides processed in neuronal and non-neuronal cells and in nervous tissue. *Eur. J. Biochem.* 270, 4187–4199.

Bousquet-Moore, D., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (2010). Peptidylglycine α -amidating monooxygenase and copper: a gene-nutrient interaction critical to nervous system function. *J. Neurosci. Res.* 88, 2535–2545.

Boyle, R.G., Downham, R., Ganguly, T., Humphries, J., Smith, J., and Travers, S. (2005). Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 11, 161–165.

Bradbury, A.F., and Smyth, D.G. (1983). Substrate specificity of an amidating enzyme in porcine pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 372–377.

Bradbury, A.F., Finnie, M.D., and Smyth, D.G. (1982). Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* 298, 686–688.

Bruzzo, F., Lectez, B., Tollemer, H., Leprince, J., Dujardin, C., Rachidi, W., Chatenet, D., Baroncini, M., Beauvillain, J.-C., Vallarino, M., et al. (2006). Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *J. Neurochem.* 99, 616–627.

Bruzzo, F., Lectez, B., Alexandre, D., Jégou, S., Mounien, L., Tollemer, H., Chatenet, D., Leprince, J., Vallarino, M., Vaudry, H., et al. (2007). Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 503, 573–591.

Buck, M. (1998). Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* *31*, 297–355.

Bulant, M., Roussel, J.P., Astier, H., Nicolas, P., and Vaudry, H. (1990). Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biologically active peptide, prepro-TRH-(160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4439–4443.

Bulant, M., Richter, K., Kuchler, K., and Kreil, G. (1992). A cDNA from brain of *Xenopus laevis* coding for a new precursor of thyrotropin-releasing hormone. *FEBS Lett.* *300*, 197.

Bundgaard, J.R., Vuust, J., and Rehfeld, J.F. (1995). Tyrosine O-sulfation promotes proteolytic processing of progastrin. *EMBO J.* *14*, 3073–3079.

Bundgaard, J.R., Vuust, J., and Rehfeld, J.F. (1997). New consensus features for tyrosine O-sulfation determined by mutational analysis. *J. Biol. Chem.* *272*, 21700–21705.

Burlet-Schiltz, O., Mazarguil, H., Sol, J.-C., Chaynes, P., Monsarrat, B., Zajac, J.-M., and Roussin, A. (2002). Identification of neuropeptide FF-related peptides in human cerebrospinal fluid by mass spectrometry. *FEBS Lett.* *532*, 313–318.

Busby, W.H., Quackenbush, G.E., Humm, J., Youngblood, W.W., and Kizer, J.S. (1987). An enzyme(s) that converts glutaminyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *262*, 8532–8536.

-C-

Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Saïd, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., and Clarke, I.J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* *148*, 5258–5267.

Castaño, J.P., Martínez-Fuentes, A.J., Gutiérrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., and Malagón, M.M. (2009). Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* *30*, 10–15.

Cerstiaens, A., Benfekih, L., Zouiten, H., Verhaert, P., De Loof, A., and Schoofs, L. (1999). Led-NPF-1 stimulates ovarian development in locusts. *Peptides* *20*, 39–44.

Chan, Y.-M., Butler, J.P., Pinnell, N.E., Pralong, F.P., Crowley, W.F., Ren, C., Chan, K.K., and Seminara, S.B. (2011). Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E908-915.

Chartrel, N., Conlon, J.M., Danger, J.M., Fournier, A., Tonon, M.C., and Vaudry, H. (1991a). Characterization of melanotropin-release-inhibiting factor (melanostatin) from frog brain: homology with human neuropeptide Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3862–3866.

Chartrel, N., Tonon, M.C., Vaudry, H., and Conlon, J.M. (1991b). Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology* *129*, 3367–3371.

- Chartrel, N., Braun, B., Collin, F., Pierreuse, B., Coulouarn, Y., Tostivint, H., Jeandel, L., Trabucchi, M., Vieau, D., Lihrmann, I., et al. (1998). Strategy for identification of new neuropeptides. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* *192*, 619–638.
- Chartrel, N., Dujardin, C., Leprince, J., Desrues, L., Tonon, M.-C., Cellier, E., Cosette, P., Jouenne, T., Simonnet, G., and Vaudry, H. (2002). Isolation, characterization, and distribution of a novel neuropeptide, Rana RFamide (R-RFa), in the brain of the European green frog *Rana esculenta*. *J. Comp. Neurol.* *448*, 111–127.
- Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Régo, J.-C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., et al. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15247–15252.
- Chartrel, N., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Iturrioz, X., Reaux-Le Goazigo, A., Audinot, V., Chomarar, P., Coge, F., Nosjean, O., Rodriguez, M., et al. (2007). Comment on “Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin’s effects on food intake.” *Science* *315*, 766.
- Chartrel, N., Alonzeau, J., Alexandre, D., Jeandel, L., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Boutin, J., Vaudry, H., Anouar, Y., and Llorens-Cortes, C. (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front. Neuroendocrinol.* *32*, 387–397.
- Chen, A., Chiu, C.N., Mosser, E.A., Kahn, S., Spence, R., and Prober, D.A. (2016). QRFP and its receptors regulate locomotor activity and sleep in zebra fish. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 1823–1840.
- Chin, W., Piuzzi, F., Dognon, J.-P., Dimicoli, I., and Mons, M. (2005). Gas-phase models of gamma turns: effect of side-chain/backbone interactions investigated by IR/UV spectroscopy and quantum chemistry. *J. Chem. Phys.* *123*, 084301.
- Chou, K.C. (2000). Prediction of protein structural classes and subcellular locations. *Curr. Protein Pept. Sci.* *1*, 171–208.
- Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., et al. (2008). Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* *149*, 5811–5821.
- Clarkson, J., d’Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., Caraty, A., and Herbison, A.E. (2009). Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J. Neuroendocrinol.* *21*, 673–682.
- Cline, M.A., and Mathews, D.S. (2008). Anorectic effects of neuropeptide FF are mediated via central mu and kappa subtypes of opioid receptors and receptor ligands. *Gen. Comp. Endocrinol.* *159*, 125–129.
- Clynen, E., Husson, S.J., and Schoofs, L. (2009). Identification of new members of the (short) neuropeptide F family in locusts and *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1163*, 60–74.

- Conlon, J.M., O'Harte, F., Smith, D.D., Tonon, M.C., and Vaudry, H. (1992). Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 578–583.
- Conlon, J.M., Collin, F., Chiang, Y.C., Sower, S.A., and Vaudry, H. (1993). Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ribibunda*: purification, characterization, and distribution. *Endocrinology* 132, 2117–2123.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., and Nowotny, N. (2009). Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1556–1563.
- Conner, M., Hawtin, S.R., Simms, J., Wootten, D., Lawson, Z., Conner, A.C., Parslow, R.A., and Wheatley, M. (2007). Systematic analysis of the entire second extracellular loop of the V(1a) vasopressin receptor: key residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, identified. *J. Biol. Chem.* 282, 17405–17412.
- Corin, K., Baaske, P., Geissler, S., Wienken, C.J., Duhr, S., Braun, D., and Zhang, S. (2011). Structure and function analyses of the purified GPCR human vomeronasal type 1 receptor 1. *Sci. Rep.* 1, 172.
- Costanzi, S., and Wang, K. (2014). The GPCR crystallography boom: providing an invaluable source of structural information and expanding the scope of homology modeling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 796, 3–13.
- Coudrat, T., Christopoulos, A., Sexton, P.M., and Wootten, D. (2017). Structural features embedded in G protein-coupled receptor co-crystal structures are key to their success in virtual screening. *PLoS One* 12, e0174719.
- Coulouarn, Y., Lihmann, I., Jegou, S., Anouar, Y., Tostivint, H., Beauvillain, J.C., Conlon, J.M., Bern, H.A., and Vaudry, H. (1998). Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15803–15808.
- Curlewis, J.D., Kusters, D.H.L., Barclay, J.L., and Anderson, S.T. (2002). Prolactin-releasing peptide in the ewe: cDNA cloning, mRNA distribution and effects on prolactin secretion in vitro and in vivo. *J. Endocrinol.* 174, 45–53.
- Curtis, A.E., Cooke, J.H., Baxter, J.E., Parkinson, J.R.C., Bataveljic, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Murphy, K.G. (2010). A kisspeptin-10 analog with greater in vivo bioactivity than kisspeptin-10. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E296-303.
- Czyzyk, T.A., Ning, Y., Hsu, M.-S., Peng, B., Mains, R.E., Eipper, B.A., and Pintar, J.E. (2005). Deletion of peptide amidation enzymatic activity leads to edema and embryonic lethality in the mouse. *Dev. Biol.* 287, 301–313.

-D-

- Darby, N.J., Kemmink, J., and Creighton, T.E. (1996). Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 35, 10517–10528.
- Darby, N.J., Penka, E., and Vincentelli, R. (1998). The multi-domain structure of protein disulfide isomerase is essential for high catalytic efficiency. *J. Mol. Biol.* 276, 239–247.
- Dave, A., Krishna, A., and Tsutsui, K. (2017). Direct effects of RFRP-1, a mammalian GnIH ortholog, on ovarian activities of the cyclic mouse. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Davies, J., Chen, J., Pink, R., Carter, D., Saunders, N., Sotiriadis, G., Bai, B., Pan, Y., Howlett, D., Payne, A., et al. (2015). Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Sci. Rep.* 5, 12584.
- De, M., Bell, J., Blackburn, N.J., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (2006). Role for an essential tyrosine in peptide amidation. *J. Biol. Chem.* 281, 20873–20882.
- Deakin, J.F., Doströvsky, J.O., and Smyth, D.G. (1980). Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis on the analgesic activity of beta-endorphin. *Biochem. J.* 189, 501–506.
- Deluca, S.H., Rathmann, D., Beck-Sickinger, A.G., and Meiler, J. (2013). The activity of prolactin releasing peptide correlates with its helicity. *Biopolymers* 99, 314–325.
- Deschenes, R.J., Lorenz, L.J., Haun, R.S., Roos, B.A., Collier, K.J., and Dixon, J.E. (1984). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 726–730.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Patterson, M., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Badman, M.K., McGowan, B.M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M.A., et al. (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 6609–6615.
- Dietrich, G., Gaibelet, G., Capeyrou, R., Butour, J.L., Pontet, F., and Emorine, L.J. (1998). Implication of the first and third extracellular loops of the mu-opioid receptor in the formation of the ligand binding site: a study using chimeric mu-opioid/angiotensin receptors. *J. Neurochem.* 70, 2106–2111.
- Dockray, G.J. (2004). The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour: RFamide peptides and food intake. *Exp. Physiol.* 89, 229–235.
- Dodd, G.T., and Luckman, S.M. (2013). Physiological Roles of GPR10 and PrRP Signaling. *Front. Endocrinol.* 4, 20.
- Douglass, J., Civelli, O., and Herbert, E. (1984). Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 665–715.
- Dror, R.O., Pan, A.C., Arlow, D.H., Borhani, D.W., Maragakis, P., Shan, Y., Xu, H., and Shaw, D.E. (2011). Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13118–13123.

Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., and Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100, 197–207.

Dupuy, A., Lindberg, I., Zhou, Y., Akil, H., Lazure, C., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Day, R. (1994). Processing of prodynorphin by the prohormone convertase PC1 results in high molecular weight intermediate forms. Cleavage at a single arginine residue. *FEBS Lett.* 337, 60–65.

D'Ursi, A.M., Albrizio, S., Di Fenza, A., Crescenzi, O., Carotenuto, A., Picone, D., Novellino, E., and Rovero, P. (2002). Structural studies on Hgr3 orphan receptor ligand prolactin-releasing peptide. *J. Med. Chem.* 45, 5483–5491.

-E-

Egido, E.M., Hernández, R., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H., Marco, J., and Silvestre, R.A. (2007). 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides* 28, 725–730.

Eipper, B.A., and Mains, R.E. (1988). Peptide alpha-amidation. *Annu. Rev. Physiol.* 50, 333–344.

Eipper, B.A., Perkins, S.N., Husten, E.J., Johnson, R.C., Keutmann, H.T., and Mains, R.E. (1991). Peptidyl-alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase. Purification, characterization, and expression. *J. Biol. Chem.* 266, 7827–7833.

Eipper, B.A., Stoffers, D.A., and Mains, R.E. (1992a). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 57–85.

Eipper, B.A., Green, C.B., Campbell, T.A., Stoffers, D.A., Keutmann, H.T., Mains, R.E., and Ouafik, L. (1992b). Alternative splicing and endoproteolytic processing generate tissue-specific forms of pituitary peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM). *J. Biol. Chem.* 267, 4008–4015.

Eipper, B.A., Milgram, S.L., Husten, E.J., Yun, H.Y., and Mains, R.E. (1993). Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2, 489–497.

Elagoz, A., Benjannet, S., Mammabassi, A., Wickham, L., and Seidah, N.G. (2002). Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J. Biol. Chem.* 277, 11265–11275.

Elefteriou, F., Takeda, S., Ebihara, K., Magre, J., Patano, N., Kim, C.A., Ogawa, Y., Liu, X., Ware, S.M., Craigen, W.J., et al. (2004). Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3258–3263.

Elhabazi, K., Trigo, J.M., Mollereau, C., Moulédous, L., Zajac, J.-M., Bihel, F., Schmitt, M., Bourguignon, J.J., Meziane, H., Petit-demoulière, B., et al. (2012). Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br. J. Pharmacol.* 165, 424–435.

- Elizur, A. (2009). The KiSS1/GPR54 system in fish. *Peptides* 30, 164–170.
- Ellacott, K.L.J., Morton, G.J., Woods, S.C., Tso, P., and Schwartz, M.W. (2010). Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab.* 12, 10–17.
- Elphick, M.R., and Mirabeau, O. (2014). The evolution and variety of RFamide-type neuropeptides: insights from deuterostomian invertebrates. *Front. Endocrinol.* 5, article 93.
- Elshourbagy, N.A., Ames, R.S., Fitzgerald, L.R., Foley, J.J., Chambers, J.K., Szekeres, P.G., Evans, N.A., Schmidt, D.B., Buckley, P.T., Dytko, G.M., et al. (2000). Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 25965–25971.
- Engström, M., Brandt, A., Wurster, S., Savola, J.-M., and Panula, P. (2003). Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 825–832.
- Ensho, T., Maruyama, K., Mori, K., Miyazato, M., Kangawa, K., Nakahara, K., and Murakami, N. (2017). Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 412–418.
- Eustache, S., Leprince, J., and Tufféry, P. (2016). Progress with peptide scanning to study structure-activity relationships: the implications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 11, 771–784.
- Evans, B.D., Pohl, J., Kartsonis, N.A., and Calabrese, R.L. (1991). Identification of RFamide neuropeptides in the medicinal leech. *Peptides* 12, 897–908.

-F-

- Fang, Q., Guo, J., He, F., Peng, Y.-L., Chang, M., and Wang, R. (2006). In vivo inhibition of neuropeptide FF agonism by BIBP3226, an NPY Y1 receptor antagonist. *Peptides* 27, 2207–2213.
- Fang, Q., Wang, Y.-Q., He, F., Guo, J., Guo, J., Chen, Q., and Wang, R. (2008). Inhibition of neuropeptide FF (NPFF)-induced hypothermia and anti-morphine analgesia by RF9, a new selective NPFF receptors antagonist. *Regul. Pept.* 147, 45–51.
- Fang, Q., Li, N., Jiang, T., Liu, Q., Li, Y., and Wang, R. (2010). Pressor and tachycardic responses to intrathecal administration of neuropeptide FF in anesthetized rats. *Peptides* 31, 683–688.
- Farina, A., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Rizzo, N., Banzola, I., Concu, M., Morano, D., Giommi, F., Bevini, M., Mabrook, M., et al. (2006). Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls. *Prenat. Diagn.* 26, 1115–1120.
- Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., and Gómez, A. (2009). Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312, 61–71.

- Feng, G., Reale, V., Chatwin, H., Kennedy, K., Venard, R., Ericsson, C., Yu, K., Evans, P.D., and Hall, L.M. (2003). Functional characterization of a neuropeptide F-like receptor from *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 227–238.
- Ferrari, D.M., and Söling, H.D. (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* *339*, 1–10.
- Ferrero, P., Santi, M.R., Conti-Tronconi, B., Costa, E., and Guidotti, A. (1986). Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 827–831.
- Findeisen, M., Rathmann, D., and Beck-Sickinger, A.G. (2011). Structure-activity studies of RFamide peptides reveal subtype-selective activation of neuropeptide FF1 and FF2 receptors. *ChemMedChem* *6*, 1081–1093.
- Findeisen, M., Würker, C., Rathmann, D., Meier, R., Meiler, J., Olsson, R., and Beck-Sickinger, A.G. (2012). Selective mode of action of guanidine-containing non-peptides at human NPFF receptors. *J. Med. Chem.* *55*, 6124–6136.
- Fischer, W.H., and Spiess, J. (1987). Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 3628–3632.
- Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., and Caraty, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci. Lett.* *401*, 225–230.
- Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (1998). The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* *1*, 161–170.
- Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* *4*, 469–477.
- Frand, A.R., Cuzzo, J.W., and Kaiser, C.A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* *10*, 203–210.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R., and Tuite, M.F. (1994). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* *19*, 331–336.
- Freedman, R.B., Desmond, J.L., Byrne, L.J., Heal, J.W., Howard, M.J., Sanghera, N., Walker, K.L., Katrine Wallis, A., Wells, S.A., Williamson, R.A., et al. (2017). “Something in the way she moves”: The functional significance of flexibility in the multiple roles of protein disulfide isomerase (PDI). *Biochim. Biophys. Acta.*
- Fricker, L.D. (1988). Carboxypeptidase E. *Annu. Rev. Physiol.* *50*, 309–321.
- Fricker, L.D., and Snyder, S.H. (1982). Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 3886–3890.

Fujii, R., Fukusumi, S., Hosoya, M., Kawamata, Y., Habata, Y., Hinuma, S., Sekiguchi, M., Kitada, C., Kurokawa, T., Nishimura, O., et al. (1999). Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regul. Pept.* 83, 1–10.

Fujimoto, M., Takeshita, K., Wang, X., Takabatake, I., Fujisawa, Y., Teranishi, H., Ohtani, M., Muneoka, Y., and Ohta, S. (1998). Isolation and characterization of a novel bioactive peptide, Carassius RFamide (C-RFa), from the brain of the Japanese crucian carp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 436–440.

Fujimura, T., Kishino, H., Mizutani, T., Sakuraba, S., Sasaki, T., Sato, N., and K.K, M. (2010). 3 aryl or heteroaryl-substituted indole derivative.

Fukusumi, S., Habata, Y., Yoshida, H., Iijima, N., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Kitada, C., Shintani, Y., et al. (2001). Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1540, 221–232.

Fukusumi, S., Yoshida, H., Fujii, R., Maruyama, M., Komatsu, H., Habata, Y., Shintani, Y., Hinuma, S., and Fujino, M. (2003). A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J. Biol. Chem.* 278, 46387–46395.

Fukusumi, S., Fujii, R., and Hinuma, S. (2006). Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 27, 1073–1086.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., and Gustafson, E.L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1357–1363.

Furuta, M., Yano, H., Zhou, A., Rouillé, Y., Holst, J.J., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L., Furuta, H., and Steiner, D.F. (1997). Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6646–6651.

-G-

Gacasan, S.B., Baker, D.L., and Parrill, A.L. (2017). G protein-coupled receptors: the evolution of structural insight. *Biophysics* 4, 491–527.

Gach, K., Belkacemi, O., Lefranc, B., Perlikowski, P., Masson, J., Walet-Balieu, M.-L., Do-Rego, J.-C., Galas, L., Schapman, D., Lamtahi, R., et al. (2015). Detection, characterization and biological activities of [bisphospho-thr3,9]ODN, an endogenous molecular form of ODN released by astrocytes. *Neuroscience* 290, 472–484.

Galanopoulou, A.S., Seidah, N.G., and Patel, Y.C. (1995a). Direct role of furin in mammalian prosomatostatin processing. *Biochem. J.* 309, 33–40.

Galanopoulou, A.S., Seidah, N.G., and Patel, Y.C. (1995b). Heterologous processing of rat prosomatostatin to somatostatin-14 by PC2: requirement for secretory cell but not the secretion granule. *Biochem. J.* 311, 111–118.

- Galusca, B., Jeandel, L., Germain, N., Alexandre, D., Leprince, J., Anouar, Y., Estour, B., and Chartrel, N. (2012). Orexigenic neuropeptide 26RFa: new evidence for an adaptive profile of appetite regulation in anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *97*, 2012–2018.
- Garczynski, S.F., Brown, M.R., Shen, P., Murray, T.F., and Crim, J.W. (2002). Characterization of a functional neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Peptides* *23*, 773–780.
- Gaytán, F., Gaytán, M., Castellano, J.M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sánchez-Criado, J.E., Millar, R.P., Pellicer, A., et al. (2009). KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E520-531.
- Gealageas, R., Schneider, S., Humbert, J.-P., Bertin, I., Schmitt, M., Laboureyras, E., Dugave, C., Mollereau, C., Simonnet, G., Bourguignon, J.-J., et al. (2012). Development of sub-nanomolar dipeptidic ligands of neuropeptide FF receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *22*, 7471–7474.
- George, J.T., Veldhuis, J.D., Roseweir, A.K., Newton, C.L., Faccenda, E., Millar, R.P., and Anderson, R.A. (2011). Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E1228-1236.
- Georgsson, J., Bergström, F., Nordqvist, A., Watson, M.J., Blundell, C.D., Johansson, M.J., Petersson, A.U., Yuan, Z.-Q., Zhou, Y., Kristensson, L., et al. (2014). GPR103 antagonists demonstrating anorexigenic activity in vivo: design and development of pyrrolo[2,3-c]pyridines that mimic the C-terminal Arg-Phe motif of QRFP26. *J. Med. Chem.* *57*, 5935–5948.
- Gesmundo, I., Villanova, T., Banfi, D., Gamba, G., and Granata, R. (2017). Role of melatonin, galanin, and RFamide neuropeptides QRFP26 and QRFP43 in the neuroendocrine control of pancreatic β -cell function. *Front. Endocrinol.* *8*, article 143.
- Gicquel, S., Mazarguil, H., Allard, M., Simonnet, G., and Zajac, J.M. (1992). Analogues of F8Famide resistant to degradation, with high affinity and in vivo effects. *Eur. J. Pharmacol.* *222*, 61–67.
- Gigoux, V., Escrieut, C., Silvente-Poirot, S., Maigret, B., Gouilleux, L., Fehrentz, J.A., Gully, D., Moroder, L., Vaysse, N., and Fourmy, D. (1998). Met-195 of the cholecystokinin-A receptor interacts with the sulfated tyrosine of cholecystokinin and is crucial for receptor transition to high affinity state. *J. Biol. Chem.* *273*, 14380–14386.
- Gigoux, V., Maigret, B., Escrieut, C., Silvente-Poirot, S., Bouisson, M., Fehrentz, J.A., Moroder, L., Gully, D., Martinez, J., Vaysse, N., et al. (1999). Arginine 197 of the cholecystokinin-A receptor binding site interacts with the sulfate of the peptide agonist cholecystokinin. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *8*, 2347–2354.
- Gilmore, R. (1993). Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* *75*, 589–592.
- Goldfeld, D.A., Zhu, K., Beuming, T., and Friesner, R.A. (2011). Successful prediction of the intra- and extracellular loops of four G-protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8275–8280.

González, A., Perez-Acle, T., Pardo, L., and Deupi, X. (2011). Molecular basis of ligand dissociation in β -adrenergic receptors. *PloS One* 6, e23815.

Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145, 4073–4077.

Gouardères, C., Jhamandas, K., Sutak, M., and Zajac, J.M. (1996). Role of opioid receptors in the spinal antinociceptive effects of neuropeptide FF analogues. *Br. J. Pharmacol.* 117, 493–501.

Gouardères, C., Mazarguil, H., Mollereau, C., Chartrel, N., Leprince, J., Vaudry, H., and Zajac, J.-M. (2007). Functional differences between NPF1 and NPF2 receptor coupling: High intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [35S]GTP γ S binding. *Neuropharmacology* 52, 376–386.

Grace, C.R.R., Cervini, L., Gulyas, J., Rivier, J., and Riek, R. (2007). Astressin-amide and astressin-acid are structurally different in dimethylsulfoxide. *Biopolymers* 87, 196–205.

Granata, R., Settanni, F., Trovato, L., Gallo, D., Gesmundo, I., Nano, R., Gallo, M.P., Bergandi, L., Volante, M., Alloatti, G., et al. (2014). RFamide peptides 43RFa and 26RFa both promote survival of pancreatic β -cells and human pancreatic islets but exert opposite effects on insulin secretion. *Diabetes* 63, 2380–2393.

Gu, W., Geddes, B.J., Zhang, C., Foley, K.P., and Stricker-Krongrad, A. (2004). The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice. *J. Mol. Neurosci.* 22, 93–103.

Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B.J., Gage, L.P., and Udenfriend, S. (1982). Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295, 206–208.

Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J.A., Knierman, M.D., Jin, Z., Witcher, D.R., Luo, S., Onyia, J.E., and Hale, J.E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6320–6325.

Gutiérrez-Pascual, E., Leprince, J., Martínez-Fuentes, A.J., Ségalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., et al. (2009). In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. *Mol. Pharmacol.* 76, 58–67.

-H-

Haga, Y., Mizutani, S., and Sato, N. (2010). Indole-2-carboxamide derivatives as QRFPR receptor (GPR103) antagonists. WO2010126164A1.

Hamzé, A., Gandreuil, C., Lisowski, V., Andureau, F., Fulcrand, P., Martinez, J., and Hernandez, J.-F. (2005). Solid phase synthesis of mono- or disubstituted arginine containing peptides from an isothiocitrulline precursor. *Tetrahedron Lett.* 46, 7349–7353.

- Harvey, S., and Cogburn, L.A. (1996). Cryptic peptides of prepro-TRH antagonize TRH-induced GH secretion in chickens at extrapituitary sites. *J. Endocrinol.* *151*, 359–364.
- Hauge-Evans, A.C., Richardson, C.C., Milne, H.M., Christie, M.R., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2006). A role for kisspeptin in islet function. *Diabetologia* *49*, 2131–2135.
- Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 829–842.
- von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* *14*, 4683–4690.
- Hillson, D.A., Lambert, N., and Freedman, R.B. (1984). Formation and isomerization of disulfide bonds in proteins: protein disulfide-isomerase. *Methods Enzymol.* *107*, 281–294.
- Hinke, S.A., Pospisilik, J.A., Demuth, H.U., Mannhart, S., Kühn-Wache, K., Hoffmann, T., Nishimura, E., Pederson, R.A., and McIntosh, C.H. (2000). Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. Characterization of glucagon degradation products and DPIV-resistant analogs. *J. Biol. Chem.* *275*, 3827–3834.
- Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., et al. (1998). A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* *393*, 272–276.
- Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Watanabe, T., Kikuchi, K., Terao, Y., et al. (2000). New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat. Cell Biol.* *2*, 703–708.
- Hoek, R.M., Li, K.W., van Minnen, J., Lodder, J.C., de Jong-Brink, M., Smit, A.B., and van Kesteren, R.E. (2005). LFRFamides: a novel family of parasitism-induced -RFamide neuropeptides that inhibit the activity of neuroendocrine cells in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurochem.* *92*, 1073–1080.
- Holman, G.M., Cook, B.J., and Nachman, R.J. (1986). Primary structure and synthesis of a blocked myotropic neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Comp. Biochem. Physiol. C* *85*, 219–224.
- Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S., and Kangawa, K. (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J. Biol. Chem.* *278*, 64–70.
- Huang, K.-F., Liu, Y.-L., and Wang, A.H.-J. (2005a). Cloning, expression, characterization, and crystallization of a glutaminyl cyclase from human bone marrow: a single zinc metalloenzyme. *Protein Expr. Purif.* *43*, 65–72.
- Huang, K.-F., Liu, Y.-L., Cheng, W.-J., Ko, T.-P., and Wang, A.H.-J. (2005b). Crystal structures of human glutaminyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13117–13122.

Huang, K.-F., Wang, Y.-R., Chang, E.-C., Chou, T.-L., and Wang, A.H.-J. (2008). A conserved hydrogen-bond network in the catalytic centre of animal glutaminyl cyclases is critical for catalysis. *Biochem. J.* *411*, 181–190.

Hui, W.-Q., Cheng, Q., Liu, T.-Y., and Ouyang, Q. (2016). Homology modeling, docking, and molecular dynamics simulation of the receptor GALR2 and its interactions with galanin and a positive allosteric modulator. *J. Mol. Model.* *22*, article 90.

Huttner, W.B. (1988). Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu. Rev. Physiol.* *50*, 363–376.

-I-

Ibrahimi, I., and Gentz, R. (1987). A functional interaction between the signal peptide and the translation apparatus is detected by the use of a single point mutation which blocks translocation across mammalian endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *262*, 10189–10194.

Ikeguchi, M., Hirooka, Y., and Kaibara, N. (2003). Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *129*, 531–535.

Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* *80*, 264–272.

Ishigame, N., Kageyama, K., Takayasu, S., Furumai, K., Nakada, Y., and Daimon, M. (2016). Regulation of the expression of corticotropin-releasing factor gene by pyroglutamylated RFamide peptide in rat hypothalamic 4B cells. *Endocr. J.* *63*, 919–927.

Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N., and Okamoto, H. (1983). Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature* *304*, 547–549.

-J-

Jarry, H., Heuer, H., Schomburg, L., and Bauer, K. (2000). Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo. *Neuroendocrinology* *71*, 262–267.

Jászberényi, M., Bagosi, Z., Thurzó, B., Földesi, I., Szabó, G., and Telegdy, G. (2009). Endocrine, behavioral and autonomic effects of neuropeptide AF. *Horm. Behav.* *56*, 24–34.

Jayasena, C.N., Comninou, A.N., Veldhuis, J.D., Misra, S., Abbara, A., Izzi-Engbeaya, C., Donaldson, M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Dhillon, W.S. (2013). A single injection of kisspeptin-54 temporarily increases luteinizing hormone pulsatility in healthy women. *Clin. Endocrinol.* *79*, 558–563.

Jayasena, C.N., Abbara, A., Veldhuis, J.D., Comninou, A.N., Ratnasabapathy, R., De Silva, A., Nijher, G.M.K., Ganiyu-Dada, Z., Mehta, A., Todd, C., et al. (2014). Increasing LH pulsatility in women with hypothalamic amenorrhoea using intravenous infusion of Kisspeptin-54. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E953-961.

Jensen, R.T., Lemp, G.F., and Gardner, J.D. (1982). Interactions of COOH-terminal fragments of cholecystinin with receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 257, 5554–5559.

Jiang, T., Zhang, S., Lin, B., Meng, L., and Gao, H. (2005). Expression and clinical significance of KISS-1 and GPR54 mRNA in endometrial carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 27, 229–231.

Jiang, Y., Luo, L., Gustafson, E.L., Yadav, D., Lavery, M., Murgolo, N., Vassileva, G., Zeng, M., Laz, T.M., Behan, J., et al. (2003). Identification and Characterization of a Novel RF-amide Peptide Ligand for Orphan G-protein-coupled Receptor SP9155. *J. Biol. Chem.* 278, 27652–27657.

Johnson, E., Ringo, J., and Dowse, H. (2000). Native and heterologous neuropeptides are cardioactive in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 46, 1229–1236.

Johnson, M.A., Tsutsui, K., and Fraley, G.S. (2007). Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm. Behav.* 51, 171–180.

-K-

Kaiser, E., Colecott, R.L., Bossinger, C.D., and Cook, P.I. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34, 595–598.

Kaminski, S., Orłowski, E., Berry, K., and Nichols, R. (2002). The effects of three *Drosophila melanogaster* myotropins on the frequency of foregut contractions differ. *J. Neurogenet.* 16, 125–134.

Kampe, J., Wiedmer, P., Pfluger, P.T., Castaneda, T.R., Burget, L., Mondala, H., Kerr, J., Liaw, C., Oldfield, B.J., Tschöp, M.H., et al. (2006). Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat. *Brain Res.* 1119, 133–149.

Keating, C.D., Kriek, N., Daniels, M., Ashcroft, N.R., Hopper, N.A., Siney, E.J., Holden-Dye, L., and Burke, J.F. (2003). Whole-genome analysis of 60 G protein-coupled receptors in *Caenorhabditis elegans* by gene knockout with RNAi. *Curr. Biol. CB* 13, 1715–1720.

Kennedy, K.J., Lundquist, J.T., Simandan, T.L., Kokko, K.P., Beeson, C.C., and Dix, T.A. (2000). Design rationale, synthesis, and characterization of non-natural analogs of the cationic amino acids arginine and lysine. *J. Pept. Res.* 55, 348–358.

Kennedy, K.J., Orwig, K.S., Dix, T.A., Christopher, J., and Jaffa, A.A. (2002). Synthesis and analysis of potent, more lipophilic derivatives of the bradykinin B2 receptor antagonist peptide Hoe 140. *J. Pept. Res.* 59, 139–148.

Keov, P., López, L., Devine, S.M., Valant, C., Lane, J.R., Scammells, P.J., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2014). Molecular mechanisms of bitopic ligand engagement with the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 289, 23817–23837.

- Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Joh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D., and Barr, P.J. (1991). Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* *10*, 757–769.
- Kim, J.S., Brownjohn, P.W., Dyer, B.S., Beltramo, M., Walker, C.S., Hay, D.L., Painter, G.F., Tyndall, J.D.A., and Anderson, G.M. (2015). Anxiogenic and stressor effects of the hypothalamic neuropeptide RFRP-3 are overcome by the NPFFR antagonist GJ14. *Endocrinology* *156*, 4152–4162.
- Kimura, A., Ohmichi, M., Tasaka, K., Kanda, Y., Ikegami, H., Hayakawa, J., Hisamoto, K., Morishige, K., Hinuma, S., Kurachi, H., et al. (2000). Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 3667–3674.
- Kirby, E.D., Geraghty, A.C., Ubuka, T., Bentley, G.E., and Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11324–11329.
- Kirby, H.R., Maguire, J.J., Colledge, W.H., and Davenport, A.P. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol. Rev.* *62*, 565–578.
- Kishino, H., Mizutani, S., Sakuraba, S., and Sato, N. (2010). Preparation of aryl indole derivatives as human QRFP receptor (GPR103) antagonists. WO2010117085A1.
- Kitabgi, P., Poustis, C., Granier, C., Van Rietschoten, J., Rivier, J., Morgat, J.L., and Freychet, P. (1980). Neurotensin binding to extraneural and neural receptors: comparison with biological activity and structure--activity relationships. *Mol. Pharmacol.* *18*, 11–19.
- Klappa, P., Freedman, R.B., and Zimmermann, R. (1995). Protein disulphide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *Eur. J. Biochem.* *232*, 755–764.
- Kobayashi, T., Sasaki, S., Tomita, N., Fukui, S., Kuroda, N., Nakayama, M., Kiba, A., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Itoh, F., et al. (2010a). Synthesis and structure-activity relationships of 2-acylamino-4,6-diphenylpyridine derivatives as novel antagonists of GPR54. *Bioorg. Med. Chem.* *18*, 3841–3859.
- Kobayashi, T., Sasaki, S., Tomita, N., Fukui, S., Nakayama, M., Kiba, A., Kusaka, M., Matsumoto, S., Yamaguchi, M., Itoh, F., et al. (2010b). 2-Acylamino-4,6-diphenylpyridine derivatives as novel GPR54 antagonists with good brain exposure and in vivo efficacy for plasma LH level in male rats. *Bioorg. Med. Chem.* *18*, 5157–5171.
- Koda, A., Ukena, K., Teranishi, H., Ohta, S., Yamamoto, K., Kikuyama, S., and Tsutsui, K. (2002). A novel amphibian hypothalamic neuropeptide: isolation, localization, and biological activity. *Endocrinology* *143*, 411–419.
- Kojima, M., and Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* *85*, 495–522.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* *402*, 656–660.

- Kolhekar, A.S., Bell, J., Shiozaki, E.N., Jin, L., Keutmann, H.T., Hand, T.A., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (2002). Essential features of the catalytic core of peptidyl-alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase. *Biochemistry* *41*, 12384–12394.
- Kortemme, T., Ramírez-Alvarado, M., and Serrano, L. (1998). Design of a 20-amino acid, three-stranded beta-sheet protein. *Science* *281*, 253–256.
- Kotani, M., Mollereau, C., Detheux, M., Le Poul, E., Brézillon, S., Vakili, J., Mazarguil, H., Vassart, G., Zajac, J.M., and Parmentier, M. (2001a). Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides. *Br. J. Pharmacol.* *133*, 138–144.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., et al. (2001b). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* *276*, 34631–34636.
- Krajniak, K.G. (2013). Invertebrate FMRFamide related peptides. *Protein Pept. Lett.* *20*, 647–670.
- Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., and Silver, R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2410–2415.
- 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.
- Krsmanovic, L.Z., Mores, N., Navarro, C.E., Arora, K.K., and Catt, K.J. (2003). An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2969–2974.
- Kruse, A.C., Hu, J., Pan, A.C., Arlow, D.H., Rosenbaum, D.M., Rosemond, E., Green, H.F., Liu, T., Chae, P.S., Dror, R.O., et al. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* *482*, 552–556.
- Kubiak, T.M., Larsen, M.J., Burton, K.J., Bannow, C.A., Martin, R.A., Zantello, M.R., and Lowery, D.E. (2002). Cloning and functional expression of the first *Drosophila melanogaster* sulfakinin receptor DSK-R1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *291*, 313–320.
- Kubiak, T.M., Larsen, M.J., Bowman, J.W., Geary, T.G., and Lowery, D.E. (2008). FMRFamide-like peptides encoded on the *flp-18* precursor gene activate two isoforms of the orphan *Caenorhabditis elegans* G-protein-coupled receptor Y58G8A.4 heterologously expressed in mammalian cells. *Biopolymers* *90*, 339–348.
- Kumar, P., Ashokan, A., and Aradhyam, G.K. (2016). Apelin binding to human APJ receptor leads to biased signaling. *Biochim. Biophys. Acta* *1864*, 1748–1756.

-L-

- Labarrère, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M.-C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., et al. (2003). Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* *18*, 77–88.
- Labrousse, S., Laulin, J.P., Le Moal, M., Tramu, G., and Simonnet, G. (1998). Neuropeptide FF in the rat adrenal gland: presence, distribution and pharmacological effects. *J. Neuroendocrinol.* *10*, 559–565.
- Laguzzi, R., Nosjean, A., Mazarguil, H., and Allard, M. (1996). Cardiovascular effects induced by the stimulation of neuropeptide FF receptors in the dorsal vagal complex: an autoradiographic and pharmacological study in the rat. *Brain Res.* *711*, 193–202.
- Lakowski, T.M., 't Hart, P., Ahern, C.A., Martin, N.I., and Frankel, A. (2010). N η -substituted arginyl peptide inhibitors of protein arginine N-methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* *5*, 1053–1063.
- Landreh, M., Johansson, J., Wahren, J., and Jörnvall, H. (2014). The structure, molecular interactions and bioactivities of proinsulin C-peptide correlate with a tripartite molecule. *Biomol. Concepts* *5*, 109–118.
- Lanfranco, F., Gromoll, J., von Eckardstein, S., Herding, E.M., Nieschlag, E., and Simoni, M. (2005). Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur. J. Endocrinol.* *153*, 845–852.
- Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D., Chan, Y.-M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E., and Seminara, S.B. (2007). Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* *148*, 4927–4936.
- Laurent, P., Becker, J.A.J., Valverde, O., Ledent, C., de Kerchove d'Exaerde, A., Schiffmann, S.N., Maldonado, R., Vassart, G., and Parmentier, M. (2005). The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10. *Nat. Neurosci.* *8*, 1735–1741.
- Lawrence, C.B., Celsi, F., Brennand, J., and Luckman, S.M. (2000). Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat. Neurosci.* *3*, 645–646.
- Lawrence, C.B., Ellacott, K.L.J., and Luckman, S.M. (2002). PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology* *143*, 360–367.
- Lawrence, C.B., Liu, Y.-L., Stock, M.J., and Luckman, S.M. (2004). Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *286*, R101-107.
- Le Marec, O., Neveu, C., Lefranc, B., Dubessy, C., Boutin, J.A., Do-Régo, J.-C., Costentin, J., Tonon, M.-C., Tena-Sempere, M., Vaudry, H., et al. (2011). Structure–Activity Relationships of a Series of Analogues of the RFamide-Related Peptide 26RFa. *J. Med. Chem.* *54*, 4806–4814.

- de Lecea, L., Criado, J.R., Prospero-Garcia, O., Gautvik, K.M., Schweitzer, P., Danielson, P.E., Dunlop, C.L., Siggins, G.R., Henriksen, S.J., and Sutcliffe, J.G. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381, 242–245.
- Lechan, R.M., Wu, P., Jackson, I.M., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G., and Goodman, R.H. (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231, 159–161.
- Lectez, B., Jeandel, L., El-Yamani, F.-Z., Arthaud, S., Alexandre, D., Mardargent, A., Jégou, S., Mounien, L., Bizet, P., Magoul, R., et al. (2009). The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology* 150, 2342–2350.
- Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., et al. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 446, 103–107.
- Lee, D.K., Nguyen, T., Lynch, K.R., Cheng, R., Vanti, W.B., Arkhitko, O., Lewis, T., Evans, J.F., George, S.R., and O'Dowd, B.F. (2001). Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* 275, 83–91.
- Lee, G., Bahn, J.H., and Park, J.H. (2006). Sex- and clock-controlled expression of the neuropeptide F gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12580–12585.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., and Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1731–1737.
- Lee, K.-S., You, K.-H., Choo, J.-K., Han, Y.-M., and Yu, K. (2004). *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *J. Biol. Chem.* 279, 50781–50789.
- Lee, K.-S., Kwon, O.-Y., Lee, J.H., Kwon, K., Min, K.-J., Jung, S.-A., Kim, A.-K., You, K.-H., Tatar, M., and Yu, K. (2008). *Drosophila* short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. *Nat. Cell Biol.* 10, 468–475.
- Lee, Y., Yang, S.P., Soares, M.J., and Voogt, J.L. (2000). Distribution of prolactin-releasing peptide mRNA in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 51, 171–176.
- Lee, Y.R., Tsunekawa, K., Moon, M.J., Um, H.N., Hwang, J.-I., Osugi, T., Otaki, N., Sunakawa, Y., Kim, K., Vaudry, H., et al. (2009). Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology* 150, 2837–2846.
- Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., and Goodman, R.L. (2010). Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* 1364, 90–102.
- León, S., García-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Barroso, A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Roa, J., Vázquez, M.J., Gaytan, F., Blomenrohr, M., et al. (2014). Physiological roles of gonadotropin-inhibitory hormone signaling in the control of mammalian reproductive axis: studies in the NPF1 receptor null mouse. *Endocrinology* 155, 2953–2965.
- Leprince, J., Gandolfo, P., Thoumas, J.L., Patte, C., Fauchère, J.L., Vaudry, H., and Tonon, M.C. (1998). Structure-activity relationships of a series of analogues of the

octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J. Med. Chem.* *41*, 4433–4438.

Leprince, J., Bagnol, D., Bureau, R., Fukusumi, S., Granata, R., Hinuma, S., Larhammar, D., Primeaux, S., Sopkova-de Oliveiras Santos, J., Tsutsui, K., et al. (2017). The Arg-Phe-amide peptide 26RFa/glutamine RF-amide peptide and its receptor: IUPHAR Review 24. *Br. J. Pharmacol.* *174*, 3573–3607.

Lin, S., Boey, D., and Herzog, H. (2004). NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* *38*, 189–200.

Liu, B., Poulter, L., Neacsu, C., and Burbach, J.P. (1988). Isolation and identification of vasopressin- and oxytocin-immunoreactive substances from bovine pineal gland. Presence of N alpha-acetyloxytocin. *J. Biol. Chem.* *263*, 72–75.

Liu, Q., Guan, X.M., Martin, W.J., McDonald, T.P., Clements, M.K., Jiang, Q., Zeng, Z., Jacobson, M., Williams, D.L., Yu, H., et al. (2001). Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J. Biol. Chem.* *276*, 36961–36969.

Liu, Y., Zhang, Y., Li, S., Huang, W., Liu, X., Lu, D., Meng, Z., and Lin, H. (2009). Molecular cloning and functional characterization of the first non-mammalian 26RFa/QRFP orthologue in Goldfish, *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* *303*, 82–90.

Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 6691–6695.

Lyles, M.M., and Gilbert, H.F. (1991). Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry* *30*, 613–619.

-M-

Ma, L., MacTavish, D., Simonin, F., Bourguignon, J.-J., Watanabe, T., and Jhamandas, J.H. (2009a). Prolactin-releasing peptide effects in the rat brain are mediated through the Neuropeptide FF receptor. *Eur. J. Neurosci.* *30*, 1585–1593.

Ma, M., Bors, E.K., Dickinson, E.S., Kwiatkowski, M.A., Sousa, G.L., Henry, R.P., Smith, C.M., Towle, D.W., Christie, A.E., and Li, L. (2009b). Characterization of the *Carcinus maenas* neuropeptidome by mass spectrometry and functional genomics. *Gen. Comp. Endocrinol.* *161*, 320–334.

MacLean, D.B., Matsui, H., Suri, A., Neuwirth, R., and Colombel, M. (2014). Sustained exposure to the investigational Kisspeptin analog, TAK-448, down-regulates testosterone into the castration range in healthy males and in patients with prostate cancer: results from two phase 1 studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E1445-1453.

Maestro, J.L., Aguilar, R., Pascual, N., Valero, M.L., Piulachs, M.D., Andreu, D., Navarro, I., and Bellés, X. (2001). Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification

of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach. Are arthropod sulfakinins homologous to vertebrate gastrins-cholecystokinins? *Eur. J. Biochem.* 268, 5824–5830.

Maletínská, L., Spolcová, A., Maixnerová, J., Blechová, M., and Zelezná, B. (2011). Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide. *Peptides* 32, 1887–1892.

Maletínská, L., Nagelová, V., Tichá, A., Zemenová, J., Pirník, Z., Holubová, M., Špolcová, A., Mikulášková, B., Blechová, M., Sýkora, D., et al. (2015). Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration. *Int. J. Obes.* 2005 39, 986–993.

Marsh, D.J., Hollopeter, G., Kafer, K.E., and Palmiter, R.D. (1998). Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat. Med.* 4, 718–721.

Maruyama, M., Matsumoto, H., Fujiwara, K., Noguchi, J., Kitada, C., Hinuma, S., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., Higuchi, T., et al. (1999). Central administration of prolactin-releasing peptide stimulates oxytocin release in rats. *Neurosci. Lett.* 276, 193–196.

Matsui, H., Tanaka, A., Yokoyama, K., Takatsu, Y., Ishikawa, K., Asami, T., Nishizawa, N., Suzuki, A., Kumano, S., Terada, M., et al. (2012). Chronic administration of the metastin/kisspeptin analog KISS1-305 or the investigational agent TAK-448 suppresses hypothalamic pituitary gonadal function and depletes plasma testosterone in adult male rats. *Endocrinology* 153, 5297–5308.

Matsumoto, M., Hosoda, H., Kitajima, Y., Morozumi, N., Minamitake, Y., Tanaka, S., Matsuo, H., Kojima, M., Hayashi, Y., and Kangawa, K. (2001). Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 142–146.

Maule, A.G., Shaw, C., Halton, D.W., Brennan, G.P., Johnston, C.F., and Moore, S. (1992). Neuropeptide F (*Moniezia expansa*): localization and characterization using specific antisera. *Parasitology* 105 (Pt 3), 505–512.

Mayer, C., and Boehm, U. (2011). Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. *Nat. Neurosci.* 14, 704–710.

Mazarguil, H., Gouardères, C., Tafani, J.A., Marcus, D., Kotani, M., Mollereau, C., Roumy, M., and Zajac, J.M. (2001). Structure-activity relationships of neuropeptide FF: role of C-terminal regions. *Peptides* 22, 1471–1478.

Merte, J., and Nichols, R. (2002). *Drosophila melanogaster* myotropins have unique functions and signaling pathways. *Peptides* 23, 757–763.

Mertens, I., Meeusen, T., Huybrechts, R., De Loof, A., and Schoofs, L. (2002). Characterization of the short neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 1140–1148.

Mertens, I., Meeusen, T., Janssen, T., Nachman, R., and Schoofs, L. (2005). Molecular characterization of two G protein-coupled receptor splice variants as FLP2 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 967–974.

- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., et al. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1761–1766.
- Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2009). The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* *30*, 26–33.
- Millar, R.P., and Roseweir, A.K. (2009). Compound, use and method. WO2009047513 A2.
- Millington, G.W. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr. Metab.* *4*, article 18.
- Minami, S., Nakata, T., Tokita, R., Onodera, H., and Imaki, J. (1999). Cellular localization of prolactin-releasing peptide messenger RNA in the rat brain. *Neurosci. Lett.* *266*, 73–75.
- Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M., and Dixon, J.E. (1984). Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 4577–4581.
- Miskolzie, M., and Kotovych, G. (2003). The NMR-derived conformation of neuropeptide AF, an orphan G-protein coupled receptor peptide. *Biopolymers* *69*, 201–215.
- Misono, K.S., Grammer, R.T., Fukumi, H., and Inagami, T. (1984). Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *123*, 444–451.
- Mollereau, C., Mazarguil, H., Marcus, D., Quelven, I., Kotani, M., Lannoy, V., Dumont, Y., Quirion, R., Dethoux, M., Parmentier, M., et al. (2002). Pharmacological characterization of human NPPF(1) and NPPF(2) receptors expressed in CHO cells by using NPY Y(1) receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* *451*, 245–256.
- Moosler, A., Rinehart, K.L., and Grimmelikhuijzen, C.J. (1996). Isolation of four novel neuropeptides, the hydra-RFamides I-IV, from *Hydra magnipapillata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *229*, 596–602.
- Moosler, A., Rinehart, K.L., and Grimmelikhuijzen, C.J. (1997). Isolation of three novel neuropeptides, the *Cyanea*-RFamides I-III, from *Scyphomedusae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *236*, 743–749.
- Morales, P., Hurst, D.P., and Reggio, P.H. (2017). Methods for the Development of In Silico GPCR Models. *Methods Enzymol.* *593*, 405–448.
- Moriya, R., Sano, H., Umeda, T., Ito, M., Takahashi, Y., Matsuda, M., Ishihara, A., Kanatani, A., and Iwaasa, H. (2006). RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* *147*, 2916–2922.
- Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., et al. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.* *276*, 28969–28975.

Mulumba, M., Jossart, C., Granata, R., Gallo, D., Escher, E., Ghigo, E., Servant, M.J., Marleau, S., and Ong, H. (2010). GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Mol. Endocrinol.* *24*, 1615–1625.

Munro, S., and Pelham, H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* *48*, 899–907.

-N-

Nachman, R.J., Holman, G.M., Haddon, W.F., and Ling, N. (1986a). Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science* *234*, 71–73.

Nachman, R.J., Holman, G.M., Cook, B.J., Haddon, W.F., and Ling, N. (1986b). Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *140*, 357–364.

Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C., Cohen, S.N., and Numa, S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* *278*, 423–427.

Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T., and Murakami, K. (1992). Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J. Biol. Chem.* *267*, 5897–5900.

Nässel, D.R. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog. Neurobiol.* *68*, 1–84.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* *145*, 4565–4574.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M.J., Barreiro, M.L., Magni, P., et al. (2005a). Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* *146*, 156–163.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., et al. (2005b). Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* *146*, 1689–1697.

Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Nogueiras, R., Vigo, E., Tovar, S., Chartrel, N., Le Marec, O., Leprince, J., Aguilar, E., Pinilla, L., et al. (2006). Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J. Physiol.* *573*, 237–249.

- Nelson, L.S., Rosoff, M.L., and Li, C. (1998). Disruption of a neuropeptide gene, *flp-1*, causes multiple behavioral defects in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 281, 1686–1690.
- Nelson, M.D., Lee, K.H., Churgin, M.A., Hill, A.J., Van Buskirk, C., Fang-Yen, C., and Raizen, D.M. (2014). FMRFamide-like FLP-13 neuropeptides promote quiescence following heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol. CB* 24, 2406–2410.
- Nelson, M.D., Janssen, T., York, N., Lee, K.H., Schoofs, L., and Raizen, D.M. (2015). FRPR-4 Is a G-Protein Coupled Neuropeptide Receptor That Regulates Behavioral Quiescence and Posture in *Caenorhabditis elegans*. *PloS One* 10, e0142938.
- Nestor, J.J., Tahilramani, R., Ho, T.L., McRae, G.I., and Vickery, B.H. (1988). Potent, long-acting luteinizing hormone-releasing hormone antagonists containing new synthetic amino acids: N,N'-dialkyl-D-homoarginines. *J. Med. Chem.* 31, 65–72.
- Neveu, C., Lefranc, B., Tasseau, O., Do-Rego, J.-C., Bourmaud, A., Chan, P., Bauchat, P., Marec, O.L., Chuquet, J., Guilhaudis, L., et al. (2012). Rational Design of a Low Molecular Weight, Stable, Potent, and Long-Lasting GPR103 Aza- β^3 -pseudopeptide Agonist. *J. Med. Chem.* 55, 7516–7524.
- Neveu, C., Dulin, F., Lefranc, B., Galas, L., Calbrix, C., Bureau, R., Rault, S., Chuquet, J., Boutin, J.A., Guilhaudis, L., et al. (2014). Molecular basis of agonist docking in a human GPR103 homology model by site-directed mutagenesis and structure-activity relationship studies. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4425–4439.
- Nichols, R. (2003). Signaling pathways and physiological functions of *Drosophila melanogaster* FMRFamide-related peptides. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 485–503.
- Nichols, R., McCormick, J., Cohen, M., Howe, E., Jean, C., Paisley, K., and Rosario, C. (1999). Differential processing of neuropeptides influences *Drosophila* heart rate. *J. Neurogenet.* 13, 89–104.
- Nicklous, D.M., and Simansky, K.J. (2003). Neuropeptide FF exerts pro- and anti-opioid actions in the parabrachial nucleus to modulate food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R1046-1054.
- Niehrs, C., and Huttner, W.B. (1990). Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase. *EMBO J.* 9, 35–42.
- Nieminen, M.L., Brandt, A., Pietilä, P., and Panula, P. (2000). Expression of mammalian RFamide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat. *Peptides* 21, 1695–1701.
- Niida, A., Wang, Z., Tomita, K., Oishi, S., Tamamura, H., Otaka, A., Navenot, J.-M., Broach, J.R., Peiper, S.C., and Fujii, N. (2006). Design and synthesis of downsized metastatin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 134–137.
- Nikolics, K., Mason, A.J., Szönyi, E., Ramachandran, J., and Seeburg, P.H. (1985). A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316, 511–517.

-O-

O'Donohue, T.L., Handelmann, G.E., Chaconas, T., Miller, R.L., and Jacobowitz, D.M. (1981). Evidence that N-acetylation regulates the behavioral activity of alpha-MSH in the rat and human central nervous system. *Peptides* 2, 333–344.

O'Donohue, T.L., Handelmann, G.E., Miller, R.L., and Jacobowitz, D.M. (1982). N-acetylation regulates the behavioral activity of alpha-melanotropin in a multineurotransmitter neuron. *Science* 215, 1125–1127.

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., et al. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411, 613–617.

Okamoto, K., Yamasaki, M., Takao, K., Soya, S., Iwasaki, M., Sasaki, K., Magoori, K., Sakakibara, I., Miyakawa, T., Mieda, M., et al. (2016). QRFP-deficient mice are hypophagic, lean, hypoactive and exhibit increased anxiety-like behavior. *PloS One* 11, e0164716.

Onaka, T., Takayanagi, Y., and Leng, G. (2010). Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 287–293.

Orsini, M.J., Klein, M.A., Beavers, M.P., Connolly, P.J., Middleton, S.A., and Mayo, K.H. (2007). Metastin (KiSS-1) mimetics identified from peptide structure-activity relationship-derived pharmacophores and directed small molecule database screening. *J. Med. Chem.* 50, 462–471.

Van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Keizer, G.D., Dorssers, L.C., and Van de Ven, W.J. (1990). Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res.* 14, 265–275.

Ozawa, A., Cai, Y., and Lindberg, I. (2007). Production of bioactive peptides in an *in vitro* system. *Anal. Biochem.* 366, 182–189.

-P-

Padmanabhan, S., Marqusee, S., Ridgeway, T., Laue, T.M., and Baldwin, R.L. (1990). Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids. *Nature* 344, 268–270.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745.

Palotai, M., and Telegdy, G. (2016). Anxiolytic effect of the GPR103 receptor agonist peptide P550 (homolog of neuropeptide 26RFa) in mice. Involvement of neurotransmitters. *Peptides* 82, 20–25.

Panula, P., Aarnisalo, A.A., and Wasowicz, K. (1996). Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Prog. Neurobiol.* 48, 461–487.

Panula, P., Kalso, E., Nieminen, M., Kontinen, V.K., Brandt, A., and Pertovaara, A. (1999). Neuropeptide FF and modulation of pain. *Brain Res.* 848, 191–196.

- Parhar, I., Ogawa, S., and Kitahashi, T. (2012). RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Prog. Neurobiol.* *98*, 176–196.
- Parthsarathy, V., Hogg, C., Flatt, P.R., and O’Harte, F.P.M. (2017). Beneficial long-term antidiabetic actions of N- and C-terminally modified analogues of apelin-13 in diet-induced obese diabetic mice. *Diabetes Obes. Metab.* *10*, 4927-4936.
- Patel, S.R., Murphy, K.G., Thompson, E.L., Patterson, M., Curtis, A.E., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2008). Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* *149*, 4747–4754.
- Payza, K., and Malin, D. (1993). A peptide analog. WO 9306841.
- Payza, K., Akar, C.A., and Yang, H.Y. (1993). Neuropeptide FF receptors: structure-activity relationship and effect of morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *267*, 88–94.
- Perkins, S.N., Husten, E.J., and Eipper, B.A. (1990). The 108-kDA peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase precursor contains two separable enzymatic activities involved in peptide amidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *171*, 926–932.
- Perlman, J.H., Wang, W., Nussenzveig, D.R., and Gershengorn, M.C. (1995). A disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the thyrotropin-releasing hormone receptor is critical for binding. *J. Biol. Chem.* *270*, 24682–24685.
- Perone, M.J., and Castro, M.G. (1997). Prohormone and proneuropeptide synthesis and secretion. *Histol. Histopathol.* *12*, 1179–1188.
- Perry, S.J., Yi-Kung Huang, E., Cronk, D., Bagust, J., Sharma, R., Walker, R.J., Wilson, S., and Burke, J.F. (1997). A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPPF and FMRFamide. *FEBS Lett.* *409*, 426–430.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* *8*, 785–786.
- Peymen, K., Watteyne, J., Frooninckx, L., Schoofs, L., and Beets, I. (2014). The FMRFamide-like peptide family in nematodes. *Front. Endocrinol.* *5*, Article 90.
- Pierry, C., Couve-Bonnaire, S., Guilhaudis, L., Neveu, C., Marotte, A., Lefranc, B., Cahard, D., Ségalas-Milazzo, I., Leprince, J., and Pannecoucke, X. (2013). Fluorinated pseudopeptide analogues of the neuropeptide 26RFa: synthesis, biological, and structural studies. *ChemBioChem* *14*, 1620–1633.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blomenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., et al. (2010a). Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *299*, E39-46.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Roseweir, A., Romero, M., Sanchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Morgan, K., Pinilla, L., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2010b). Critical roles of

kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151, 722–730.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 92, 1235–1316.

Pinna, L.A., Meggio, F., and Donella-Deana, A. (1980). Structure of the Sites of substrate proteins undergoing phosphorylation by protein kinases, with special reference to liver ‘Casein Kinases’. In: protein phosphorylation and bio-regulation, (G. Thomas, E.J. Podesta and J. Gordon eds.), pp. 8-16. Karger, Basel.

Plant, T.M., Ramaswamy, S., and Dipietro, M.J. (2006). Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 147, 1007–1013.

Pollard, M.G., Travers, K.J., and Weissman, J.S. (1998). Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 1, 171–182.

Praissman, M., Fara, J.W., Praissman, L.A., and Berkowitz, J.M. (1982). Preparation of an N-acetyl-octapeptide of cholecystokinin. The role of N-acetylation in protecting the octapeptide from degradation by smooth muscle tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 716, 240–248.

Predel, R., Rapus, J., and Eckert, M. (2001). Myoinhibitory neuropeptides in the American cockroach. *Peptides* 22, 199–208.

Prévost, G., Jeandel, L., Arabo, A., Coëffier, M., El Ouahli, M., Picot, M., Alexandre, D., Gobet, F., Leprince, J., Berrahmoune, H., et al. (2015). Hypothalamic neuropeptide 26RFa acts as an incretin to regulate glucose homeostasis. *Diabetes* 64, 2805–2816.

Price, D.A., and Greenberg, M.J. (1977). Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep. Biochem.* 7, 261–281.

Prigge, S.T., Kolhekar, A.S., Eipper, B.A., Mains, R.E., and Amzel, L.M. (1997). Amidation of bioactive peptides: the structure of peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase. *Science* 278, 1300–1305.

Primeaux, S.D. (2011). QRFP in female rats: effects on high fat food intake and hypothalamic gene expression across the estrous cycle. *Peptides* 32, 1270–1275.

Primeaux, S.D., Blackmon, C., Barnes, M.J., Braymer, H.D., and Bray, G.A. (2008). Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides* 29, 1994–2000.

Primeaux, S.D., Barnes, M.J., and Braymer, H.D. (2013). Hypothalamic QRFP: regulation of food intake and fat selection. *Horm. Metab.* 45, 967–974.

-Q-

Qaiser, F., Wahab, F., Wiqar, M.A., Hashim, R., Leprince, J., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., and Shahab, M. (2012). Study of the role of novel RF-amide neuropeptides in affecting growth hormone secretion in a representative non-human primate (*Macaca mulatta*). *Endocrine* 42, 658–663.

Qian, Z., Bilderback, T.R., and Barmack, N.H. (2008). Acyl coenzyme A-binding protein (ACBP) is phosphorylated and secreted by retinal Müller astrocytes following protein kinase C activation. *J. Neurochem.* 105, 1287–1299.

Qiao, C., Wang, C., Shang, T., and Lin, Q. (2005). Clinical significance of KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 expression in trophoblasts of women with preeclampsia and their relation to perinatal outcome of neonates. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 40, 585–590.

-R-

Ramanjaneya, M., Karteris, E., Chen, J., Rucinski, M., Ziolkowska, A., Ahmed, N., Kagerer, S., Jöhren, O., Lehnert, H., Malendowicz, L.K., et al. (2013). QRFP induces aldosterone production via PKC and T-type calcium channel-mediated pathways in human adrenocortical cells: evidence for a novel role of GPR103. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E1049–1058.

Rasmussen, M., Leander, M., Ons, S., and Nichols, R. (2015). Conserved molecular switch interactions in modeled cardioactive RF-NH₂ peptide receptors: Ligand binding and activation. *Peptides* 71, 259–267.

Redei, E., Hilderbrand, H., and Aird, F. (1995a). Corticotropin release inhibiting factor is encoded within prepro-TRH. *Endocrinology* 136, 1813–1816.

Redei, E., Hilderbrand, H., and Aird, F. (1995b). Corticotropin release-inhibiting factor is preprothyrotropin-releasing hormone-(178-199). *Endocrinology* 136, 3557–3563.

do Rego, J.-C., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H., and Costentin, J. (2006). Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides* 27, 2715–2721.

Rehfeld, J.F. (2006). The endoproteolytic maturation of progastrin and procholecystokinin. *J. Mol. Med.* 84, 544–550.

Ren, A.-J., Guo, Z.-F., Wang, Y.-K., Wang, L.-G., Wang, W.-Z., Lin, L., Zheng, X., and Yuan, W.-J. (2008). Inhibitory effect of obestatin on glucose-induced insulin secretion in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 969–972.

Ren, X.-R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W., and Lefkowitz, R.J. (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1448–1453.

Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A., and Kottler, M.-L. (2008). KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J. Neuroendocrinol.* 20, 381–393.

- Richard, N., Corvaisier, S., Camacho, E., and Kottler, M.-L. (2009). KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides* 30, 123–129.
- Ricquier, D. (1998). Neonatal brown adipose tissue, UCP1 and the novel uncoupling proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 120–123.
- Rifflet, A., Gavaldà, S., Téné, N., Orivel, J., Leprince, J., Guilhaudis, L., Génin, E., Vétillard, A., and Treilhou, M. (2012). Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* 38, 363–370.
- Rivier, J., Brazeau, P., Vale, W., and Guillemin, R. (1975). Somatostatin analogs. Relative importance of the disulfide bridge and of the Ala-Gly side chain for biological activity. *J. Med. Chem.* 18, 123–126.
- Rizwan, M.Z., Poling, M.C., Corr, M., Cornes, P.A., Augustine, R.A., Quennell, J.H., Kauffman, A.S., and Anderson, G.M. (2012). RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* 153, 3770–3779.
- Robas, N., Mead, E., and Fidock, M. (2003). MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J. Biol. Chem.* 278, 44400–44404.
- Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M., and Mark, A.E. (2002). Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12179–12184.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P., and Van de Ven, W.J. (1986). Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J.* 5, 2197–2202.
- Rogers, C., Reale, V., Kim, K., Chatwin, H., Li, C., Evans, P., and de Bono, M. (2003). Inhibition of *Caenorhabditis elegans* social feeding by FMRFamide-related peptide activation of NPR-1. *Nat. Neurosci.* 6, 1178–1185.
- Roland, B.L., Sutton, S.W., Wilson, S.J., Luo, L., Pyati, J., Huvar, R., Erlander, M.G., and Lovenberg, T.W. (1999). Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 140, 5736–5745.
- Rosa, P., Mantovani, S., Rosboch, R., and Huttner, W.B. (1992). Monensin and brefeldin A differentially affect the phosphorylation and sulfation of secretory proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 12227–12232.
- Roseweir, A.K., Kauffman, A.S., Smith, J.T., Guerriero, K.A., Morgan, K., Pielecka-Fortuna, J., Pineda, R., Gottsch, M.L., Tena-Sempere, M., Moenter, S.M., et al. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J. Neurosci.* 29, 3920–3929.
- Rouméas, L., Humbert, J.-P., Schneider, S., Doebelin, C., Bertin, I., Schmitt, M., Bourguignon, J.-J., Simonin, F., and Bihel, F. (2015). Effects of systematic N-terminus deletions and benzoylations of endogenous RF-amide peptides on NPFF1R, NPFF2R, GPR10, GPR54 and GPR103. *Peptides* 71, 156–161.

Roumy, M., and Zajac, J.M. (1998). Neuropeptide FF, pain and analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* *345*, 1–11.

Rourke, I.J., Johnsen, A.H., Din, N., Petersen, J.G., and Rehfeld, J.F. (1997). Heterologous expression of human cholecystokinin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a lysine-specific endopeptidase in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *272*, 9720–9727.

Roussel, J.P., Hollande, F., Bulant, M., and Astier, H. (1991). A prepro-TRH connecting peptide (prepro-TRH 160-169) potentiates TRH-induced TSH release from rat perfused pituitaries by stimulating dihydropyridine- and omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ channels. *Neuroendocrinology* *54*, 559–565.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., and Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10972–10976.

Rudman, D., Chawla, R.K., and Hollins, B.M. (1979). N,O-Diacetylserine1 alpha-melanocyte-stimulating hormone, a naturally occurring melanotropic peptide. *J. Biol. Chem.* *254*, 10102–10108.

-S-

Sachon, E., Nielsen, P.F., and Jensen, O.N. (2007). Characterization of N-palmitoylated human growth hormone by in situ liquid-liquid extraction and MALDI tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* *JMS* *42*, 724–734.

Salzet, M., Bulet, P., Watez, C., and Malecha, J. (1994). FMRFamide-related peptides in the sex segmental ganglia of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Identification and involvement in the control of hydric balance. *Eur. J. Biochem.* *221*, 269–275.

Samson, W.K., Resch, Z.T., and Murphy, T.C. (2000). A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res.* *858*, 19–25.

Samson, W.K., Keown, C., Samson, C.K., Samson, H.W., Lane, B., Baker, J.R., and Taylor, M.M. (2003). Prolactin-releasing peptide and its homolog RFRP-1 act in hypothalamus but not in anterior pituitary gland to stimulate stress hormone secretion. *Endocrine* *20*, 59–66.

Sanchez-Carbayo, M., Capodiceci, P., and Cordon-Cardo, C. (2003). Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am. J. Pathol.* *162*, 609–617.

Satake, H., Hisada, M., Kawada, T., Minakata, H., Ukena, K., and Tsutsui, K. (2001). Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem. J.* *354*, 379–385.

Sato, K., Shirai, R., Hontani, M., Shinooka, R., Hasegawa, A., Kichise, T., Yamashita, T., Yoshizawa, H., Watanabe, R., Matsuyama, T.-A., et al. (2017). Potent vasoconstrictor kisspeptin-10 induces atherosclerotic plaque progression and instability: reversal by its receptor GPR54 antagonist. *J. Am. Heart Assoc.* *6*, article 4.

- Satoh, M., Yokosawa, H., and Ishii, S. (1988). Membrane-bound trypsin-like enzyme functioning in degradation of dynorphin in neuroblastoma cells. Purification and characterization. *J. Biochem.* *103*, 493–498.
- Schally, A.V., Bowers, C.Y., Kuroshima, A., Ishida, Y., Carter, W.H., and Redding, T.W. (1964). Effect of lysine vasopressin dimers on blood pressure and some endocrine functions. *Am. J. Physiol.* *207*, 378–384.
- Schnabel, E., Mains, R.E., and Farquhar, M.G. (1989). Proteolytic processing of pro-ACTH/endorphin begins in the Golgi complex of pituitary corticotropes and AtT-20 cells. *Mol. Endocrinol.* *3*, 1223–1235.
- Schwaller, M., Wilkinson, B., and Gilbert, H.F. (2003). Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* *278*, 7154–7159.
- Scott, G., Ahmad, I., Howard, K., MacLean, D., Oliva, C., Warrington, S., Wilbraham, D., and Worthington, P. (2013). Double-blind, randomized, placebo-controlled study of safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of TAK-683, an investigational metastatin analogue in healthy men. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *75*, 381–391.
- Seal, L.J., Small, C.J., Dhillon, W.S., Kennedy, A.R., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2002). Prolactin-releasing peptide releases corticotropin-releasing hormone and increases plasma adrenocorticotropin via the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroendocrinology* *76*, 70–78.
- Seeburg, P.H., and Adelman, J.P. (1984). Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* *311*, 666–668.
- Seidah, N.G. (2009). PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. *Expert Opin. Ther. Targets* *13*, 19–28.
- Seidah, N.G. (2011). What lies ahead for the proprotein convertases? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1220*, 149–161.
- Seidah, N.G. (2016). New developments in proprotein convertase subtilisin-kexin 9's biology and clinical implications. *Curr. Opin. Lipidol.* *27*, 274–281.
- Seidah, N.G., and Chrétien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* *848*, 45–62.
- Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., and Chrétien, M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* *9*, 789.
- Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Lazure, C., Mbikay, M., and Chrétien, M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol. Endocrinol.* *5*, 111–122.

- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., and Chrétien, M. (1992). Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol. Endocrinol.* *6*, 1559–1570.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., and Day, R. (1996). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3388–3393.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Touré, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., et al. (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1321–1326.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 928–933.
- Seidah, N.G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. (2008). The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 1111–1125.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., et al. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.* *349*, 1614–1627.
- Sevier, C.S., and Kaiser, C.A. (2008). Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 549–556.
- Shen, L.P., Pictet, R.L., and Rutter, W.J. (1982). Human somatostatin I: sequence of the cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 4575–4579.
- Shonberg, J., Kling, R.C., Gmeiner, P., and Löber, S. (2015). GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorg. Med. Chem.* *23*, 3880–3906.
- Siezen, R.J., and Leunissen, J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *6*, 501–523.
- Simon, S.M., and Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* *65*, 371–380.
- Simonin, F., Schmitt, M., Laulin, J.-P., Laboureyras, E., Jhamandas, J.H., MacTavish, D., Matifas, A., Mollereau, C., Laurent, P., Parmentier, M., et al. (2006). RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 466–471.
- Smeeckens, S.P., and Steiner, D.F. (1990). Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J. Biol. Chem.* *265*, 2997–3000.

- Smeeckens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J., and Steiner, D.F. (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 340–344.
- Smyth, D.G., Massey, D.E., Zakarian, S., and Finnie, M.D. (1979). Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of alpha-N-acetyl peptides. *Nature* *279*, 252–254.
- Soares, J.-B., and Leite-Moreira, A.F. (2008). Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides* *29*, 1255–1270.
- Song, L., and Fricker, L.D. (1995). Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.* *270*, 25007–25013.
- Song, L., and Fricker, L.D. (1996). Tissue distribution and characterization of soluble and membrane-bound forms of metallo-carboxypeptidase D. *J. Biol. Chem.* *271*, 28884–28889.
- Song, I., Chuang, C.Z., and Bateman, R.C. (1994). Molecular cloning, sequence analysis and expression of human pituitary glutamyl cyclase. *J. Mol. Endocrinol.* *13*, 77–86.
- Sossin, W.S., Fisher, J.M., and Scheller, R.H. (1989). Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron* *2*, 1407–1417.
- Southan, C., and Kruse, L.I. (1989). Sequence similarity between dopamine beta-hydroxylase and peptide alpha-amidating enzyme: evidence for a conserved catalytic domain. *FEBS Lett.* *255*, 116–120.
- Spittaels, K., Verhaert, P., Shaw, C., Johnston, R.N., Devreese, B., Van Beeumen, J., and De Loof, A. (1996). Insect neuropeptide F (NPF)-related peptides: isolation from Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) brain. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *26*, 375–382.
- Stewart, L.C., and Klinman, J.P. (1991). Cooperativity in the dopamine beta-monooxygenase reaction. Evidence for ascorbate regulation of enzyme activity. *J. Biol. Chem.* *266*, 11537–11543.
- Sun, B., Fujiwara, K., Adachi, S., and Inoue, K. (2005). Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regul. Pept.* *126*, 27–33.

-T-

- Takahashi, K., Abe, T., Matsumoto, K., and Tomita, M. (2000). Does prolactin releasing peptide receptor regulate prolactin-secretion in human pituitary adenomas? *Neurosci. Lett.* *291*, 159–162.
- Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S.C., Iguchi, H., Kawasaki, Y.I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., et al. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 7438–7443.

- Talbi, R., Laran-Chich, M.-P., Magoul, R., El Ouezzani, S., and Simonneaux, V. (2016). Kisspeptin and RFRP-3 differentially regulate food intake and metabolic neuropeptides in the female desert jerboa. *Sci. Rep.* *6*, 36057.
- Talmont, F., Moulédous, L., Piedra-Garcia, L., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J.-J., Zajac, J.-M., and Mollereau, C. (2010). Pharmacological characterization of the mouse NPF2 receptor. *Peptides* *31*, 215–220.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P.C., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B.L., et al. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10714–10719.
- Tatemoto, K., and Mutt, V. (1981). Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon--secretin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 6603–6607.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., and Mutt, V. (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* *296*, 659–660.
- Tatemoto, K., Rökaeus, A., Jörnvall, H., McDonald, T.J., and Mutt, V. (1983). Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.* *164*, 124–128.
- Tatemoto, K., Lundberg, J.M., Jörnvall, H., and Mutt, V. (1985). Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *128*, 947–953.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., et al. (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *251*, 471–476.
- Teles, M.G., Bianco, S.D.C., Brito, V.N., Trarbach, E.B., Kuohung, W., Xu, S., Seminara, S.B., Mendonca, B.B., Kaiser, U.B., and Latronico, A.C. (2008). A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N. Engl. J. Med.* *358*, 709–715.
- Teles, M.G., Trarbach, E.B., Noel, S.D., Guerra-Junior, G., Jorge, A., Beneduzzi, D., Bianco, S.D., Mukherjee, A., Baptista, M.T., Costa, E.M., et al. (2010). A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur. J. Endocrinol.* *163*, 29–34.
- Tenenbaum-Rakover, Y., Commenges-Ducos, M., Iovane, A., Aumas, C., Admoni, O., and de Roux, N. (2007). Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 1137–1144.
- Tensen, C.P., Cox, K.J., Burke, J.F., Leurs, R., van der Schors, R.C., Geraerts, W.P., Vreugdenhil, E., and Heerikhuizen, H. (1998). Molecular cloning and characterization of an invertebrate homologue of a neuropeptide Y receptor. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 3409–3416.
- Thomas, D., Koopmans, T., Lakowski, T.M., Kreinin, H., Vhuiyan, M.I., Sedlock, S.A., Bui, J.M., Martin, N.I., and Frankel, A. (2014). Protein arginine N-methyltransferase substrate

preferences for different N η -substituted arginyl peptides. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *15*, 1607–1613.

Thomas, G.B., Cummins, J.T., Doughton, B.W., Griffin, N., Millar, R.P., Milton, R.C., and Clarke, I.J. (1988). Gonadotropin-releasing hormone associated peptide (GAP) and putative processed GAP peptides do not release luteinizing hormone or follicle-stimulating hormone or inhibit prolactin secretion in the sheep. *Neuroendocrinology* *48*, 342–350.

Thuau, R., Guilhaudis, L., Ségalas-Milazzo, I., Chartrel, N., Oulyadi, H., Boivin, S., Fournier, A., Leprince, J., Davoust, D., and Vaudry, H. (2005). Structural studies on 26RFa, a novel human RFamide-related peptide with orexigenic activity. *Peptides* *26*, 779–789.

Tobari, Y., Iijima, N., Tsunekawa, K., Osugi, T., Haraguchi, S., Ubuka, T., Ukena, K., Okanoya, K., Tsutsui, K., and Ozawa, H. (2011). Identification, localisation and functional implication of 26RFa orthologue peptide in the brain of zebra fish (*Taeniopygia guttata*). *J. Neuroendocrinol.* *23*, 791–803.

Tomita, K., Niida, A., Oishi, S., Ohno, H., Cluzeau, J., Navenot, J.-M., Wang, Z., Peiper, S.C., and Fujii, N. (2006). Structure-activity relationship study on small peptidic GPR54 agonists. *Bioorg. Med. Chem.* *14*, 7595–7603.

Tomita, K., Oishi, S., Ohno, H., Peiper, S.C., and Fujii, N. (2008). Development of novel G-protein-coupled receptor 54 agonists with resistance to degradation by matrix metalloproteinase. *J. Med. Chem.* *51*, 7645–7649.

Tostivint, H., Lihmann, I., Bucharles, C., Vieau, D., Coulouarn, Y., Fournier, A., Conlon, J.M., and Vaudry, H. (1996). Occurrence of two somatostatin variants in the frog brain: characterization of the cDNAs, distribution of the mRNAs, and receptor-binding affinities of the peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 12605–12610.

Tsuji, A., Hine, C., Mori, K., Tamai, Y., Higashine, K., Nagamune, H., and Matsuda, Y. (1994). A novel member, PC7, of the mammalian kexin-like protease family: homology to PACE4A, its brain-specific expression and identification of isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *202*, 1452–1459.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., and Sharp, P.J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *275*, 661–667.

Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G.E., and Kriegsfeld, L.J. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen. Comp. Endocrinol.* *177*, 305–314.

-U-

Ubuka, T., Ukena, K., Sharp, P.J., Bentley, G.E., and Tsutsui, K. (2006). Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* *147*, 1187–1194.

Ukena, K., Iwakoshi, E., Minakata, H., and Tsutsui, K. (2002). A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry. *FEBS Lett.* *512*, 255–258.

Ukena, K., Tachibana, T., Iwakoshi-Ukena, E., Saito, Y., Minakata, H., Kawaguchi, R., Osugi, T., Tobari, Y., Leprince, J., Vaudry, H., et al. (2010). Identification, localization, and function of a novel avian hypothalamic neuropeptide, 26RFa, and its cognate receptor, G protein-coupled receptor-103. *Endocrinology* *151*, 2255–2264.

Ukena, K., Osugi, T., Leprince, J., Vaudry, H., and Tsutsui, K. (2014). Molecular evolution of GPCRs: 26RFa/GPR103. *J. Mol. Endocrinol.* *52*, T119-131.

Um, H.N., Han, J.M., Hwang, J.-I., Hong, S.I., Vaudry, H., and Seong, J.Y. (2010). Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1200*, 67–74.

-V-

Vacher, P., Mariot, P., Dufy-Barbe, L., Nikolics, K., Seeburg, P.H., Kerdelhue, B., and Dufy, B. (1991). The gonadotropin-releasing hormone associated peptide reduces calcium entry in prolactin-secreting cells. *Endocrinology* *128*, 285–294.

Vale, W., and Rivier, C., (1975) *Handbook of Psychopharmacology*. (L. L; Iverson, S. D., Iverson and S. H., Snyder eds.) *5*, 195-238.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* *213*, 1394–1397.

Van Coillie, E., Proost, P., Van Aelst, I., Struyf, S., Polfliet, M., De Meester, I., Harvey, D.J., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1998). Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Biochemistry* *37*, 12672–12680.

Varro, A., Desmond, H., Pauwels, S., Gregory, H., Young, J., and Dockray, G.J. (1988). The human gastrin precursor. Characterization of phosphorylated forms and fragments. *Biochem. J.* *256*, 951–957.

Vaudry, H., Chartrel, N., and Conlon, J.M. (1992). Isolation of [Pro²,Met¹³]somatostatin-14 and somatostatin-14 from the frog brain reveals the existence of a somatostatin gene family in a tetrapod. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *188*, 477–482.

van de Ven, W.J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Roebroek, A.J., and Siezen, R.J. (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* *14*, 265–275.

Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* *494*, 185–194.

Viereck, J.C., and Beinfeld, M.C. (1992). Characterization of a cholecystokinin 8-generating endoprotease purified from rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* *267*, 19475–19481.

Vilim, F.S., Aarnisalo, A.A., Nieminen, M.L., Lintunen, M., Karlstedt, K., Kontinen, V.K., Kalso, E., States, B., Panula, P., and Ziff, E. (1999). Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol. Pharmacol.* *55*, 804–811.

- Vishnuvardhan, D., and Beinfeld, M.C. (2000). Use of expression of antisense mRNA for proprotein convertases 1 and 2 in prohormone processing. *Methods Enzymol.* 314, 103–117.
- Vos, M.D., Jones, J.E., and Treston, A.M. (1995). Human peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase transcripts derived by alternative mRNA splicing of an unreported exon. *Gene* 163, 307–311.
- Vyas, N., Mollereau, C., Chev e, G., and McCurdy, C.R. (2006). Structure-activity relationships of neuropeptide FF and related peptidic and non-peptidic derivatives. *Peptides* 27, 990–996.
- Vym etal, J., Bedn arova, L., and Vondrasek, J. (2016). Effect of TFE on the helical content of AK17 and HAL-1 peptides: theoretical insights into the mechanism of helix stabilization. *J. Phys. Chem. B* 120, 1048–1059.

-W-

- Wahab, F., Salahuddin, H., Anees, M., Leprince, J., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., and Shahab, M. (2012a). Study of the effect of 26RF- and 43RF-amides on testosterone and prolactin secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Peptides* 36, 23–28.
- Wahab, F., Riaz, T., Khan, L.A., Leprince, J., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., and Shahab, M. (2012b). Peripheral administration of the human kisspeptin-10 and 26RF-amide inhibits plasma testosterone levels in the adult male broiler breeder birds (*Gallus domesticus*). *Pak. J. Zool.* 44, 7–14.
- Walgers, R., Lee, T.C., and Cammers-Goodwin, A. (1998). An indirect chaotropic mechanism for the stabilization of helix conformation of peptides in aqueous trifluoroethanol and hexafluoro-2-propanol. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5073–5079.
- Walker, R.J., Papaioannou, S., and Holden-Dye, L. (2009). A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoa. *Invert. Neurosci.* 9, 111–153.
- Walter, P., and Lingappa, V.R. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 499–516.
- Walter, P., Gilmore, R., and Blobel, G. (1984). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 38, 5–8.
- Wang, T., and Duan, Y. (2009). Ligand entry and exit pathways in the beta2-adrenergic receptor. *J. Mol. Biol.* 392, 1102–1115.
- Wang, Y.-Q., Guo, J., Wang, S.-B., Fang, Q., He, F., and Wang, R. (2008). Neuropeptide FF receptors antagonist, RF9, attenuates opioid-evoked hypothermia in mice. *Peptides* 29, 1183–1190.
- Welch, S.K., O’Hara, B.F., Kilduff, T.S., and Heller, H.C. (1995). Sequence and tissue distribution of a candidate G-coupled receptor cloned from rat hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 606–613.
- de Wied, D., Diamant, M., and Fodor, M. (1993). Central nervous system effects of the neurohypophysial hormones and related peptides. *Front. Neuroendocrinol.* 14, 251–302.

Wilkinson, B., and Gilbert, H.F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699, 35–44.

Woolley, M.J., and Conner, A.C. (2017). Understanding the common themes and diverse roles of the second extracellular loop (ECL2) of the GPCR super-family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 449, 3–11.

Wu, C.-H., Tao, P.-L., and Huang, E.Y.-K. (2010). Distribution of neuropeptide FF (NPFF) receptors in correlation with morphine-induced reward in the rat brain. *Peptides* 31, 1374–1382.

Wu, Q., Wen, T., Lee, G., Park, J.H., Cai, H.N., and Shen, P. (2003). Developmental control of foraging and social behavior by the *Drosophila* neuropeptide Y-like system. *Neuron* 39, 147–161.

-X-

Xu, B., Bergqvist, C.A., Sundström, G., Lundell, I., Vaudry, H., Leprince, J., and Larhammar, D. (2015). Characterization of peptide QRFP (26RFa) and its receptor from amphioxus, *Branchiostoma floridae*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 210, 107–113.

-Y-

Yamamoto, T., Wada, T., and Miyazaki, R. (2008). Analgesic effects of intrathecally administered 26RFa, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* 157, 214–222.

Yamamoto, T., Miyazaki, R., and Yamada, T. (2009). Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides* 30, 1683–1688.

Yang, H., and Taché, Y. (1994). Prepro-TRH-(160-169) potentiates gastric acid secretion stimulated by TRH microinjected into the dorsal motor nucleus of the vagus. *Neurosci. Lett.* 174, 43–46.

Yang, H.Y., Fratta, W., Majane, E.A., and Costa, E. (1985). Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 7757–7761.

Yang, H.-Y.T., Tao, T., and Iadarola, M.J. (2008a). Modulatory role of neuropeptide FF system in nociception and opiate analgesia. *Neuropeptides* 42, 1–18.

Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., and Goldstein, J.L. (2008b). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132, 387–396.

Yano, T., Iijima, N., Kakihara, K., Hinuma, S., Tanaka, M., and Ibata, Y. (2003). Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Res.* 982, 156–167.

Yoshida, H., Habata, Y., Hosoya, M., Kawamata, Y., Kitada, C., and Hinuma, S. (2003). Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1593, 151–157.

Yu, W.H., Seeburg, P.H., Nikolics, K., and McCann, S.M. (1988). Gonadotropin-releasing hormone-associated peptide exerts a prolactin-inhibiting and weak gonadotropin-releasing activity in vivo. *Endocrinology* 123, 390–395.

Yu, W.H., Arisawa, M., Millar, R.P., and McCann, S.M. (1989). Effects of the gonadotropin-releasing hormone associated peptides (GAP) on the release of luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and prolactin (PRL) in vivo. *Peptides* 10, 1133–1138.

-Z-

Zatylny-Gaudin, C., Bernay, B., Zanuttini, B., Leprince, J., Vaudry, H., and Henry, J. (2010). Characterization of a novel LFRFamide neuropeptide in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Peptides* 31, 207–214.

Zhang, J.V., Ren, P.-G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.-W., Rauch, R., Klein, C., and Hsueh, A.J.W. (2005). Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310, 996–999.

Zhang, J.V., Jahr, H., Luo, C.-W., Klein, C., Van Kolen, K., Ver Donck, L., De, A., Baart, E., Li, J., Moechars, D., et al. (2008). Obestatin induction of early-response gene expression in gastrointestinal and adipose tissues and the mediatory role of G protein-coupled receptor, GPR39. *Mol. Endocrinol.* 22, 1464–1475.

Zhang, Q., Qiu, P., Arreaza, M.G., Simon, J.S., Golovko, A., Laverty, M., Vassileva, G., Gustafson, E.L., Rojas-Triana, A., Bober, L.A., et al. (2007). P518/Qrfp sequence polymorphisms in SAMP6 osteopenic mouse. *Genomics* 90, 629–635.

Zhao, S., Zhu, E., Yang, C., Bentley, G.E., Tsutsui, K., and Kriegsfeld, L.J. (2010). RFamide-related peptide and messenger ribonucleic acid expression in mammalian testis: association with the spermatogenic cycle. *Endocrinology* 151, 617–627.