



Etude du rôle et du mécanisme d'action de deux peptides vasoactifs, l'urotensine II et l'urotensin II-related peptide sur la fonction astrocytaire

Mickael Diallo

► To cite this version:

Mickael Diallo. Etude du rôle et du mécanisme d'action de deux peptides vasoactifs, l'urotensine II et l'urotensin II-related peptide sur la fonction astrocytaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Rouen, France, 2009. Français. NNT: . tel-02417037

HAL Id: tel-02417037

<https://normandie-univ.hal.science/tel-02417037>

Submitted on 17 Dec 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.

Thèse

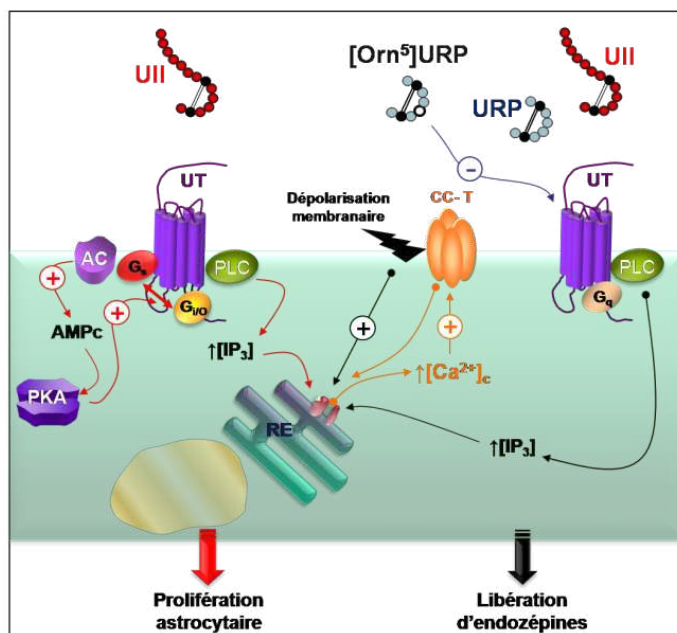
*Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Rouen
en vue de l'Obtention du Doctorat en Sciences
Discipline: Biologie Cellulaire
Spécialité: Neurosciences*

Etude du rôle et du mécanisme d'action de deux peptides vasoactifs, l'urotensine II et l'*urotensin II-related peptide* sur la fonction astrocytaire

par
Mickaël Diallo

soutenue le 11 mai 2009 devant le jury composé de:

Mr P. Pacaud	Professeur à l'Université de Nantes	Rapporteur
Mr L. Ouafik	Professeur à l'Université de la Méditerranée	Rapporteur
Mr R. Counis	Directeur de Recherche au CNRS, Paris	Examineur
Mr Y. Anouar	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Examineur
Mme M-C. Tonon	Directrice de Recherche à l'Inserm, Rouen	Examineur
Mr P. Gandolfo	Maître de Conférences à l'Université de Rouen	Directeur



A ma Mère Marie-Noëlle

*A mes Sœurs
Audrey, Kadiatou
et Assiatou*

A mon Père Mamadou-Aliou

Le Docteur Pierre PACAUD, Professeur à l'Université de Nantes, a accepté volontiers d'être rapporteur de ce travail. Je le remercie de me faire cet honneur.

Le Docteur L'Houcine OUAFIK, Professeur à l'Université de Marseille, me fait l'honneur de siéger dans ce jury de thèse en qualité de rapporteur. Je le remercie sincèrement de juger les travaux présentés dans ce manuscrit.

Le Docteur Raymond COUNIS, Directeur de Recherche au CNRS, a accepté de participer à ce jury en qualité d'examinateur. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je souhaite remercier sincèrement Le Docteur Youssef ANOUAR, Directeur de Recherche à l'Inserm, qui m'accueille actuellement au sein de son unité et qui siègera dans le jury en qualité d'examinateur de ce travail.

Je remercie très chaleureusement Le Docteur Marie-Christine TONON, Directrice de Recherche à l'Inserm, pour ses conseils, sa gentillesse et sa bienveillance à mon égard. Elle a été un important soutien durant la réalisation de ce travail, tant du point de vue scientifique qu'humain.

Je tiens à consacrer au moins ce paragraphe entier au Docteur Pierrick GANDOLFO, Maître de Conférences à l'Université de Rouen, qui m'a encadré durant toutes ces années. Je tiens à le remercier avec la plus grande sincérité, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour sa rigueur scientifique qui a été une aide précieuse, pour sa patience que j'ai maintes fois mise à rude épreuve, aussi et surtout pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Je mesure pleinement la chance d'avoir pu travailler avec lui et je tiens également à lui exprimer mon profond respect. Merci.

Je souhaite également remercier le Docteur Hélène CASTEL, Chargé de Recherche à l'Inserm, qui tout au long de cette thèse, a été présente lorsque j'en avais besoin.

Je voudrais remercier aussi le Docteur Hubert VAUDRY, Directeur de Recherche à l'Inserm, qui m'a accueilli au sein de son unité durant mon master et le début de ma thèse. Je le remercie pour le soutien qu'il m'a accordé.

La réalisation de ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide que m'ont apportée les travailleurs astrocytaires. Le travail d'équipe a pris tout son sens avec eux, et pour

cela je souhaite remercier chaleureusement Laurence DESRUES, Vincent « Doug Ross » COMPERE, Fabrice MORIN, Marie-Thérèse SCHOUFT, Olfa MASMOUDI-KOUKI, Raya HACHEM, Thomas LEFEBVRE, Céline LECOINTRE, Vadim Le JONCOUR et Nicolas LAPINTE.

Un grand merci aussi aux personnes qui ont participé à cette thèse : Jérôme LEPRINCE, David CHATENET, Aurélia RAVNI, Anthony HERNANDEZ, David COSQUER, Christophe DUBESSY.

Durant mon « séjour », j'ai eu l'occasion de participer à la formation de « jeunes » (gens le temps d'un stage...). Ces expériences ont été riches et je les remercie de m'avoir tant apporté. Merci à Yasmina MOMIN (les plus beaux cheveux), Oriana ROSSI (una italiana vera), John LOUIS (le plus musclé), Pierrick PAITRY (Poireau-Fry), ma petite Ma(man)rie JARRY (ma vraie Poireau) et Meryem SAFY (garde ton sourire quoi qu'il arrive).

Ici je tiens à saluer mes « frères », ceux qui sont partis déjà et qui me manquent, Tursonjan TOKAY, Juanito LUQUE MORUNO (hermano), Naiara AGUIRREGOITIA (mi guapa), Benoit LECTEZ, Ester GUTTIEREZ; et ceux qui vont bientôt me manquer, Olivier LEMAREC et Damien LANFRAY.

Pour leur gentillesse et l'aide qu'ils m'ont toujours fournies, je tiens à remercier Mesdames (et Mesdemoiselles) Huguette LEMONNIER, Marjorie GRAS, Magalie DUGAY, Colette PIARD, Nathalie HELLOIN ainsi que Messieurs Sébastien ARTHAUD et Gérard CAUCHOIS (qui a essayé plusieurs fois de me couper les cheveux).

J'ai remercié également Mesdames Catherine BEAU, Laurence MATEO et Sabrina MOREAU pour leur aide et leur disponibilité.

Cette thèse fut l'occasion d'heureuses rencontres, je voudrais notamment remercier pour leur bonne humeur et leur amitié Carmen, Ruby, Jessica, Jullyie, Steve, Olga, Aga, ma petite Nahla, Estelle, Béa, Emilie(s), Lourdes, Hafidah, Magda, Mounira, Djida, Flavie, Nathalie, Valérie, Aurélie, Marlène, Olivier W, Alex, Cindy, Mohammed, Fatima, Benjamin, Tommy et les petites dernières arrivées Yosra et Hademi.

Même si durant ces années je ne leur ai pas accordés le temps qu'ils méritent, je souhaite dire à mes amis que je ne les oublie pas et qu'ils m'ont aidé à tenir bon. Merci à Hervé (my tripmate), Garry (sans démagogie), Eric, Néblié, Chouette, les Loulous, Max (l'autre Poireau), le groupe Biriba Brasil et les autres capoeiristas, Ivi, Tarek, Marcos, Annchen et les superpotes, Ximena, Manar y Jose... de manière générale, mes amis sans-frontières que j'ai connus durant ces riches années.

Je sais que j'en oublie, pour ceux qui me connaissent bien, ça ne les étonnera pas, mais je m'en excuse déjà.

Ce dernier paragraphe, je souhaite le dédier à ma famille; en particulier ma mère et mes sœurs, j'espère vous avoir rendues fières; mes grands-parents, merci d'avoir toujours été là; Néné, n'diarama. Papa, je sais que tu veilles toujours sur moi. A vous tous, je vous aime.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le laboratoire de « Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine » (DC2N) dirigé par le Dr Youssef Anouar, au sein de l'équipe 3 « Astrocytes et niche vasculaire dans la différenciation et la tumorigenèse gliale » coordonnée par le Dr Hélène Castel.

Durant la préparation de ma thèse, j'ai bénéficié d'une bourse du Conseil Régional de Haute-Normandie dans le cadre du Réseau Larc-Neurosciences. Je tiens à les remercier.

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*
- L'Université de Rouen*
- L'Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement*
- L'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides*
- La Plate-Forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie*
- Le Conseil Régional de Haute-Normandie*

- *Le Réseau Larc-Neurosciences*

Sommaire

Liste des articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale	3
Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations	9
Résumé	13
<i>Summary</i>	17
INTRODUCTION	21
1. Le système urotensinergique	25
1.1. Structure de l'urophyse	25
1.2. Urotensine II et <i>urotensin II-related peptide</i>	26
1.2.1. Les gènes de l'UII et de l'URP	27
1.2.2. Structures de l'UII, de l'URP et de leur précurseur	28
1.2.3. Localisations périphérique et centrale de l'UII et de l'URP	31
1.2.3.1. Localisation périphérique	31
1.2.3.2. Localisation dans le SNC	33
1.3. Le récepteur UT	36
1.3.1. Caractérisation de l'UT	36
1.3.2. Localisation de l'UT	38
1.3.2.1. Localisation périphérique	38
1.3.2.2. Localisation dans le SNC	40
1.3.3. Voies de transduction associées à l'UT	41
1.3.4. Structure et pharmacologie de l'UT	44
1.3.4.1. Structure	44
1.3.4.2. Pharmacologie	45
1.4. Activités biologiques de l'UII	47
1.4.1. Effets cardiovasculaires de l'UII	47
1.4.1.1. Effets <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i>	48
1.4.1.2. Effets <i>in vivo</i>	49
1.4.1.3. UII et maladies vasculaires	50
1.4.1.4. UII et maladies du myocarde	51
1.4.2. Effets sur le système immunitaire	52
1.4.3. Effets sur le rein	53
1.4.4. Effets sur le système endocrine	54
1.4.5. Effets comportementaux	56
2. Les astrocytes	58
2.1. Rôles des astrocytes en conditions physiologiques	59
2.1.1. Rôles dans la neurogenèse	59
2.1.2. Rôles dans la mise en place et le maintien de la barrière hématoencéphalique	61
2.1.3. Rôles dans le contrôle du micro-environnement neuronal	62
2.1.4. Rôles dans le soutien métabolique des neurones	63
2.1.5. Rôles dans la communication cellulaire	64
2.2. Rôles des astrocytes en conditions pathologiques	67
2.2.1. Notion d'astrogliose réactionnelle	67

2.2.2. Rôles dans les maladies neurodégénératives	68
2.2.3. Rôles dans l'ischémie cérébrale	69
2.2.4. Astrocytes et tumeurs cérébrales d'origine gliale	70
3. Objectifs de l'étude	72
MATERIELS ET METHODES	75
1. Cultures d'astrocytes corticaux de Rat	77
2. Etudes de liaison	79
2.1. Protocoles	79
2.2. Analyse des données	80
3. Mesure du métabolisme des polyphosphoinositides	81
4. Mesure de la concentration cytosolique de calcium	81
5. Mesure des niveaux d'expression des gènes codant l'U11, l'URP et le récepteur UT	83
6. Mesure de la prolifération cellulaire	85
7. Immunohistochimie	85
8. Analyses statistiques	86
RESULTATS	87
1. Article I : Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptor in rat cortical astrocytes	89
2. Article II : [Orn ⁵]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptor in rat cortical astrocytes	105
3. Article III : Effects of GABA _A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes	115
4. Article IV : The vasoactive peptides U11 and URP regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms. Involvement in cell proliferation	125
DISCUSSION	169
1. Caractérisation de sites de liaison spécifiques et fonctionnels de l'U11 et de l'URP sur les astrocytes	171
2. Caractérisation d'un antagoniste peptidique de l'UT sur les astrocytes	179
3. Rôle(s) éventuel(s) du système urotensinergique dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la tumorigénèse cérébrale	181
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199

Liste des articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale

Publications originales dans des revues à comité de lecture

1. Castel H, **Diallo M**, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihrmann I, Scalbert E, Malagon MM, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* **99**: 582-595.
2. **Diallo M**, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P (2008) [Orn⁵]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides* **29**: 813-819.
3. Desrues L, Lefebvre T, **Diallo M**, Gandolfo P, Leprince J, Chatenet D, Vaudry H, Tonon MC, Castel H (2008) Effect GABA_A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes. *Peptides* **29**: 727-734.
4. **Diallo M**, Jarry M, Desrues L, Tokay Y, Chatenet D, Leprince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon MC, Castel H, Gandolfo P (soumis) The vasoactive peptides UII and URP regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms. Involvement in cell proliferation.

Actes de congrès (*extended abstracts*)

1. Leprince J, Cavelier F, Gandolfo P, **Diallo M**, Castel H, Desrues L, Martinez J, Vaudry H, Tonon MC (2006) Synthesis and biological activity of silaprolin-containing ODN analogs. *J Pept Sci* **12**: 177.

2. Desrues L, Lefebvre T, **Diallo M**, Gandolfo P, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC, Castel H (2007) Bi-directional functional interaction between the urotensin II receptor and the ligand-gated ion channel receptor GABA_A in rat cortical astrocytes. *Neuron Glia Biology* **2**: S167.
3. **Diallo M**, Castel H, Jarry H, Desrues L, Lefebvre T, Leprince J, Ouafik L, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P (2007) Urotensin II and urotensin II-related peptide regulate normal astrocyte activity. Potential involvement in glioma proliferation. *Neuron Glia Biology* **2**: S161-S162.

Liste des figures

<u>Figure 1</u>	: Schéma du système neurosécréteur caudal des poissons téléostéens	p. 24
<u>Figure 2</u>	: Processus évolutif à l'origine des gènes des familles de l'urotensine II et de la somatostatine	p. 28
<u>Figure 3</u>	: Structure de l'UII, de l'URP, de la somatostatine 1 et de la cortistatine	p. 30
<u>Figure 4</u>	: Voies de transduction associées au système urotensinergique dans différents types cellulaires	p. 43
<u>Figure 5</u>	: Représentation schématique de la structure du récepteur UT humain	p. 44
<u>Figure 6</u>	: Schématisation d'une synapse tripartite	p. 60
<u>Figure 7</u>	: Schéma représentant les interactions entre les différentes populations cellulaires du SNC	p. 61
<u>Figure 8</u>	: Protocole de purification des cultures primaires de cellules gliales corticales de Rat par agitation orbitale	p. 78
<u>Figure 9</u>	: Principe de la mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ à l'aide d'une Flexstation	p. 82
<u>Figure 10</u>	: Principe de la PCR quantitative en temps réel	p. 84
<u>Figure 11</u>	: Effet théorique du Gpp(NH)p sur la liaison de l'UII sur les sites de liaison exprimés par les astrocytes corticaux de Rat en culture	p.174
<u>Figure 12</u>	: Effet du mibéfradil, un bloqueur sélectif des canaux calciques de type T, sur la prolifération basale des astrocytes corticaux de Rat en culture	p.177
<u>Figure 13</u>	: Mesure par RT-PCR quantitative des niveaux d'expression des ARNm codant l'UII, l'UT et l'URP dans les lignées cellulaires issues d'astrocytomes (SW1088 et SW1783) et de glioblastomes humains (U138 et U87), ainsi que dans la xénogreffe issue de cellules U87	p.184
<u>Figure 14</u>	: Niveaux d'expression des ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT dans des extraits de glioblastomes humains	p.185
<u>Figure 15</u>	: Recherche de corrélation entre les niveaux d'expression de l'UII et de l'UT, de l'UII et de l'URP, et de l'URP et de l'UT dans des extraits de glioblastomes humains	p.186
<u>Figure 16</u>	: Schéma récapitulatif des voies de transduction sous-tendues par l'activation de l'UT par l'UII et de l'URP dans les astrocytes corticaux de Rat en culture	p.192
<u>Figure 17</u>	: Effet de l'UII sur la migration des cellules tumorales	p.193
<u>Figure 18</u>	: Effet de l'UII sur la phosphorylation de ERK _{1/2} dans la lignée SW1088	p.195
<u>Figure 19</u>	: Effet de l'UII sur le développement de neurosphères tumorales issues de la lignée SW1088	p.196

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u>	: Séquence de l'UII et de l'URP chez différentes espèces	p. 29
<u>Tableau 2</u>	: Pourcentage d'identité entre les séquences peptidiques de la préproUII et du préproURP	p. 31
<u>Tableau 3</u>	: Localisation de l'UII et de l'URP chez les mammifères	p. 35
<u>Tableau 4</u>	: Localisation périphérique de l'UT chez les mammifères	p. 39
<u>Tableau 5</u>	: Localisation centrale de l'UT chez les mammifères	p. 41
<u>Tableau 6</u>	: Effets périphériques de l'UII chez les mammifères	p. 55
<u>Tableau 7</u>	: Effets centraux de l'UII chez les rongeurs	p. 57
<u>Tableau 8</u>	: Récepteurs exprimés par les astrocytes	p. 66
<u>Tableau 9</u>	: Ensemencement des cellules et choix des supports selon le type d'expériences	p. 79
<u>Tableau 10</u>	: Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par RT-PCR des gènes codant l'UII humaine, l'URP, l'UT humain et la glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase humaine	p. 83

Liste des abréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
Ang	Angiotensine II
a.	Artère
a.a.	Acide aminé
AC	Adénylyl cyclase
ACh	Acétylcholine
ADM	Adrénomédulline
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNF	<i>Activity-dependent neurotrophic factor</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BHE	Barrière hématoencéphalique
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
[Ca ²⁺] _c	Concentration cytosolique de calcium
CaM	Calmoduline
CCD	<i>Cool Camera Digital</i>
CCK	Cholécystokinine
CC-L, -N ou -T	Canal calcique de type L, N ou T
CHO	<i>Chinese hamster ovary cell</i>
CLCN2	<i>Chloride channel 2</i>
CLCN6	<i>Chloride channel 6</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i> ou corticolibérine
CST	Cortistatine
CSTs	Cellules souches tumorales
CO ₂	Dioxyde de carbone
DA	Dopamine
DAG	Diacyl glycérol
DMEM	<i>Dubelcco's modified Eagle medium</i>
EDTA	2-[2-(Bis(carboxyméthyl)amino)éthyl-(carboxyméthyl)amino]acetic acid
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	<i>Ethylen glycol bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetratacetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
ET-1	Endothéline-1
ETB	Récepteur de l'endothéline de type B
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GABA _A	Récepteur de l'acide γ-aminobutyrique de type A
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
GC	Guanylyl cyclase
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Glt-1	Transporteur du glutamate de type 1
Glu	Glutamate

GLUT-1	Transporteur du glucose de type 1
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormone</i> ou gonadolibérine
Gpp(NH)p	<i>5'-guanylyl imido diphosphate</i>
GPR ou GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HEK-293	<i>Human embryonic kidney 293 cell</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
i.c.v.	Intracérébroventriculaire
i.d.	Intradermique
IFN- γ	Interféron- γ
IL-1 β	Interleukine-1 β
IL-6	Interleukine-6
IP ₃	Inositol 3,4,5-triphosphate
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITV	Indice de taille des vaisseaux
i.v.	Intraveineuse
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K _i	Constante de dissociation
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
μ .i.	Microinjection
m.	Muscle
mAChR	<i>Muscarinic acetylcholin receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MASP1,2	<i>Mannose-associated serine proteases 1 and 2</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLC20	<i>Myosin light chain 20</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
NA	Noradrénaline
NArq	Noyau arqué
nAChR	<i>Nicotinic acetylcholin receptor</i>
NE	Norépinéphrine
NEC	<i>Neuromicrovascular endothelial cell</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
n _H	Coefficient de Hill
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
NPV	Noyau paraventriculaire
NPY	Neuropeptide Y
NT	Neurotensine
ODN	Octadécaneuropeptide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P. zèbre	Poisson zèbre
PA	Potentiel d'action
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>

PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIPs	Polyphosphoinositides
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
PPSE	Potentiel postsynaptique excitateur
PPSI	Potentiel postsynaptique inhibiteur
pQ	Pyroglutamine
PRL	Prolactine
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
PTX	Toxine pertussique
r	Coefficient de Pearson
R	Récepteur
RE	Réticulum endoplasmique
RhoA	<i>Ras homologue gene family, member A</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Rotations par minute
RT-PCR	<i>Real time- polymerase chain reaction</i>
SBF	Sérum bovin fœtal
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SENR	<i>Sensory epithelium neuropeptide-like-receptor</i>
SH3	<i>src homology 3</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNC	Système nerveux central
SS1	Somatostatine 1
SS2 ou CST	Somatostatine 2 ou corticostatine
sst-1, 2, 4, 5	Récepteur de la somatostatine de type 1, 2, 4, 5
T	Transporteur
TCA	Acide trichloroacétique
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i> ou thyrolibérine
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i> ou thyroestimuline
TM	Domaine transmembranaire
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TP73	<i>Tumor protein p73</i>
TP73L	<i>Tumor protein p73-like</i>
UCE	<i>Urotensin-converting enzyme</i>
UI	Urotensine I
UII	Urotensine II
URP	<i>Urotensin II-related peptide</i>
UT	<i>Urotensin II receptor</i>
UV	Ultraviolet
v.	Veine
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal polypeptide</i>
VPAC2	Récepteur du VIP/PACAP, sous-type 2
VT	Vasotocine

Résumé

L'urotensine II (UII) et son paralogue l'*urotensin II-related peptide* (URP) sont deux neuropeptides cycliques considérés comme les facteurs endogènes vasoactifs les plus puissants caractérisés à ce jour. L'UII et l'URP interagissent avec le récepteur UT, classiquement couplé à une phospholipase C. Les effets périphériques, notamment cardiovasculaires de l'UII et de l'URP sont bien caractérisés. En revanche, le rôle du système urotensinergique au niveau cérébral reste très mal connu. L'UT est fortement exprimé dans les motoneurones de la moelle épinière mais également dans une sous-population astrocytaire de certaines aires cérébrales comme l'hippocampe et le thalamus. Plusieurs groupes ont mis en évidence des effets mitogènes de l'UII sur des cellules transfectées par l'ADNc codant l'UT, ou des cellules normales natives connues pour exprimer le récepteur. De plus, l'expression de l'UII et de l'UT a été mise en évidence dans différentes lignées tumorales dont certaines sont issues de glioblastomes. La prolifération des astrocytes peut être observée *in vivo* au cours de l'ontogenèse cérébrale, de maladies neurodégénératives ou du développement de tumeurs cérébrales. L'ensemble de ces données nous a conduit à étudier le rôle de l'UII et de l'URP dans le contrôle de l'activité astrocytaire en conditions physiologiques et physiopathologiques. Le projet de recherche a consisté à *i)* caractériser les sites de liaison de l'UII et l'URP sur les astrocytes et déterminer les voies de transduction associées à leur activation, *ii)* valider un éventuel antagoniste peptidique de l'UT dans notre modèle et *iii)* rechercher un rôle potentiel de l'UII *in vivo* dans certaines pathologies associées à une prolifération astrocytaire.

Plusieurs approches complémentaires ont permis de mettre en évidence la présence des ARNm codant l'UT (RT-PCR), et de la protéine (*western blot*, cytométrie en flux) dans les astrocytes corticaux de Rat en culture. L'UII interagit avec des sites de très haute et haute affinités tandis que l'URP fixe un unique récepteur. Les deux peptides sont capables de stimuler le métabolisme des PIPs. Seules la liaison (site de très haute affinité) et l'activité stimulante de l'UII sur le métabolisme des PIP sont sensibles à la toxine pertussique (PTX), un bloqueur des protéines G_i/G_o . L'UII et l'URP entraînent une élévation dose-dépendante de la $[Ca^{2+}]_c$ dont le profil se caractérise par une phase aiguë suivie d'une phase plateau. Cependant, seule la courbe dose-réponse de l'UII est biphasique avec une activité biologique observée dès 10^{-11} M. La réponse des astrocytes à l'UII et l'URP est supprimée en présence d'U73122, un inhibiteur de phospholipase C, et le blocage des récepteurs-canaux de l' IP_3 par le 2-APB réduit considérablement les deux phases calciques. La chélation du calcium extracellulaire par l'EGTA inhibe partiellement la première phase et supprime la phase plateau. L'utilisation de bloqueurs sélectifs de canaux calciques montre que l'influx de calcium met majoritairement en jeu des canaux de type T. Ces résultats montrent que l'UII et l'URP, en activant l'UT exprimé par les astrocytes, mobilisent le calcium à partir des pools intra- et extracellulaires principalement *via* le recrutement des canaux calciques de type T.

Les chercheurs du laboratoire ont synthétisé plusieurs dizaines d'analogues de l'UII et de l'URP, dont le $[D-Trp^4]URP$, l' $[Orn^5]URP$ et le $[D-Tyr^6]URP$, qui sont capables de bloquer les effets spasmogènes de l'UII sur des anneaux d'aortes de Rat. Appliqués au voisinage d'astrocytes, le $[D-Trp^4]URP$ et le $[D-Tyr^6]URP$ entraînent une

élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ semblable à celle observée avec l'URP, tandis que l'[Orn⁵]URP est dépourvu d'activité intrinsèque. Ce composé inhibe de façon dose-dépendante la mobilisation calcique induite par l'UII et l'URP et provoque un décalage vers la droite des courbes doses-réponses associé à une diminution de leur efficacité. Ces résultats constituent la première caractérisation d'un puissant antagoniste urotensinergique sur un modèle de cellules nerveuses natives et font de l'[Orn⁵]URP un outil particulièrement intéressant pour le développement de nouveaux antagonistes sélectifs de l'UT.

La dernière partie de mes travaux de thèse porte sur l'étude du rôle potentiel du système urotensinergique sur le contrôle de la prolifération cellulaire et le développement de tumeurs d'origine astrocytaire. Nos résultats montrent que seule l'application de concentrations croissantes d'UII sur des astrocytes entraîne une élévation de la densité cellulaire. En collaboration avec le Pr L'Houcine Ouafik (EMI-0359, Marseille), nous avons mesuré les taux d'ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT dans des extraits de lignées tumorales, de xénogreffes et de glioblastomes humains. Les quatre lignées tumorales testées, issues d'astrocytomes (SW1088 et SW1783) et de glioblastomes (U87 et U138), expriment les gènes codant l'UII, l'URP et l'UT. Les xénogreffes, obtenues par injection de cellules U87 chez des souris immunodéprimées, présentent des taux d'UII et d'UT nettement supérieurs à ceux observés dans la lignée. Par ailleurs, tous les échantillons de glioblastomes humains testés expriment les ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT. Cependant, l'analyse statistique des données a révélé que seuls les taux d'ARNm de l'UII sont corrélés à ceux de l'UT. Ces résultats

suggèrent que le système urotensinergique pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la tumorigenèse cérébrale.

L'ensemble de ces données indique qu'en dépit de leurs analogies structurales, l'UII et l'URP n'ont pas strictement le même profil pharmacologique et pourraient donc exercer des rôles physiologiques distincts. En particulier, l'UII pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération de ces cellules, notamment dans le cas de tumeurs cérébrales d'origine gliale. Ces travaux ouvrent ainsi de nouvelles perspectives de recherche dans le traitement des tumeurs cérébrales d'origine astrocytaire.

Summary

Urotensin II (UII) and its paralog urotensin II-related peptide (URP) are two cyclic neuropeptides considered as the most potent endogenic vasoactive factors characterized so far. UII and URP interact with the UT receptor, classically coupled to a phospholipase C. Peripheral effects of both UII and URP, especially in the cardiovascular system, are well characterized. In contrast, the role in the central nervous system remains unclear. UT is strongly expressed in motoneurons from the spinal cord, but also in a subpopulation of astrocytes localized in some brain areas such as hippocampus and thalamus. Several groups showed that UII exhibits mitogenic effect on UT-transfected cells as well as on native cells which naturally express the receptor. The UII and UT expression has been reported in different tumoral cell lines, including ones derived from glioblastoma. *In vivo*, astrocyte proliferation is observed during cerebral ontogenesis, neurodegenerative diseases and brain tumorigenesis. Taken together, these data led us to examine the role of UII and URP in astroglial activity in physiological and pathophysiological conditions. This project aimed at *i*) characterizing UII and URP binding sites expressed by astrocytes and determining the transduction pathways involved, *ii*) testing a potent peptidic antagonist of UT in our model and *iii*) investigating a putative role of UII in pathologies associated with astrocyte proliferation.

Several complementary methods allowed us to find the presence of mRNA encoding UT (RT-PCR), and of its protein (western blot, flow cytometry) in cultured rat cortical astrocytes. UII interacts with a very high- and high-affinity binding sites

coupled to a phospholipase C whereas URP binds a single receptor. Both peptides stimulate the polyphosphoinositide (PIP) metabolism. Only very high-affinity binding and

UII-induced PIP metabolism increase are sensitive to pertussis toxin (PTX), a specific G_i/G_o protein blocker. Both UII and URP evoked a dose-dependent $[Ca^{2+}]_c$ elevation with an acute phase following by a plateau. However, sole the UII dose-response curve is biphasic with a biological activity observed at very low concentrations (10^{-11} M). Astrocyte response to UII and URP is abolished in the presence of U73122, a phospholipase C inhibitor, and the specific blockade of IP_3 receptor-channels by 2-APB strongly reduced both the peak and the plateau. Extracellular calcium chelation by EGTA partially inhibited the first phase and suppressed the plateau. The use of specific calcium channel blockers showed that the calcium influx mostly involves T-type channels. These results indicate that both UII and URP, by activating UT expressed by astrocytes, recruit calcium from intra- and extracellular pools *via* T-type channels.

Researchers from the lab designed several UII and URP analogs, such as [D-Trp⁴]URP, [Orn⁵]URP and [D-Tyr⁶]URP, which are able to block spasmogenic effects of UII on rat aortic rings. Administered in the vicinity of astrocytes, [D-Trp⁴]URP and [D-Tyr⁶]URP provoke a $[Ca^{2+}]_c$ increase similar to that observed with URP, whereas [Orn⁵]URP is devoid of any intrinsic activity. This compound induced a dose-dependent inhibition of the calcium mobilization evoked by both UII and URP, with rightward-shift of the dose-response curves accompanied by a decrease of efficiency. These results are the first characterization of a potent urotensinergic

antagonist in a nervous native model, suggesting that [Orn⁵]URP is an interesting tool for the development of new selective UT antagonists.

The last part of my Ph.D work concerns the study of the potential role of urotensineric system on astrocyte proliferation and astroglial tumor development. Our results showed that only the application of graded concentrations of UII on astrocytes increases cell density. In collaboration with Pr L'Houcine Ouafik (EMI-0359, Marseille), we measured mRNA levels of UII, URP and UT in tumoral cell lines, xenografts and human glioblastoma extracts. The four tumoral cell lines tested, derived from astrocytoma (SW1088 and SW1783) and glioblastoma (U87 and U138), express the genes encoding UII, URP and UT. A xenograft, resulting the U87 cell injection in Nude mice, exhibits much greater levels of UII and UT mRNA than ones measured from cultured cell lines. However, all human glioblastoma samples tested expressed UII, URP and UT mRNA. Nevertheless, statistical analysis of our data revealed that only the UII and the UT gene expression levels are positively correlated. These results strongly suggest that the urotensineric system may play an important role in the control of glial tumorigenesis.

Taken together, these data indicate that, despite of their structural analogies, UII and URP do not strictly share the same pharmacological profile and may exert distinct physiological functions. In particular, UII might be involved in the control of cell proliferation, especially during tumorigenesis of glial cells. This work opens some new perspectives for astroglial tumor treatment.

Introduction

Pressenti dès le milieu du XIX^{ème} siècle par Claude Bernard, le concept de neurotransmission mit plusieurs décennies pour s'imposer. Après les travaux de Charles Scott Sherrington (1897) qui proposa le terme de synapse (du grec *syn* = ensemble et *haptein* = toucher, saisir) pour définir la jonction entre deux neurones, le pharmacologue autrichien Otto Loewi fût le premier à démontrer la nature chimique de la communication nerveuse. Il réalisa une expérience restée célèbre sur des cœurs isolés de Grenouille (Loewi, 1921) qui lui permit de caractériser les effets d'une substance libérée par le nerf vague qu'il appela « vagustoff ». Quelques années plus tard, Henri Dale montra qu'il s'agissait de l'acétylcholine (ACh) (Dale and Dudley, 1929). Depuis ces travaux fondateurs qui valurent à Loewi et Dale de partager le Prix Nobel de Physiologie en 1936, le nombre de neurotransmetteurs identifiés a suivi une progression exponentielle. Selon leur nature chimique, on considère les neurotransmetteurs « classiques » ou de petite taille comme le glutamate, l'acide γ -amino butyrique (GABA) ou la dopamine, et les neuropeptides constitués d'un faible nombre d'acides aminés (a.a.) comme la *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) et la *corticotropin-releasing hormone* (CRH) qui en possèdent 3 et 40, respectivement. A ce jour, une centaine de neuropeptides a été caractérisée et on estime qu'il en resterait plusieurs dizaines à découvrir. Selon leur mécanisme d'action, les neuropeptides agissent comme des neurotransmetteurs, des neurohormones et/ou des neuromodulateurs. Par ailleurs, les nombreuses données accumulées durant ces deux dernières décennies ont clairement démontré que les astrocytes participent activement au contrôle de la communication cellulaire dans le système nerveux central (SNC), notamment en produisant eux-mêmes certains médiateurs chimiques.

L'urotensine II et son paralogue l'*urotensine II-related peptide* sont deux neuropeptides récemment découverts chez les mammifères. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux effets de ces peptides sur la fonction astrocytaire en conditions physiologiques et physiopathologiques.

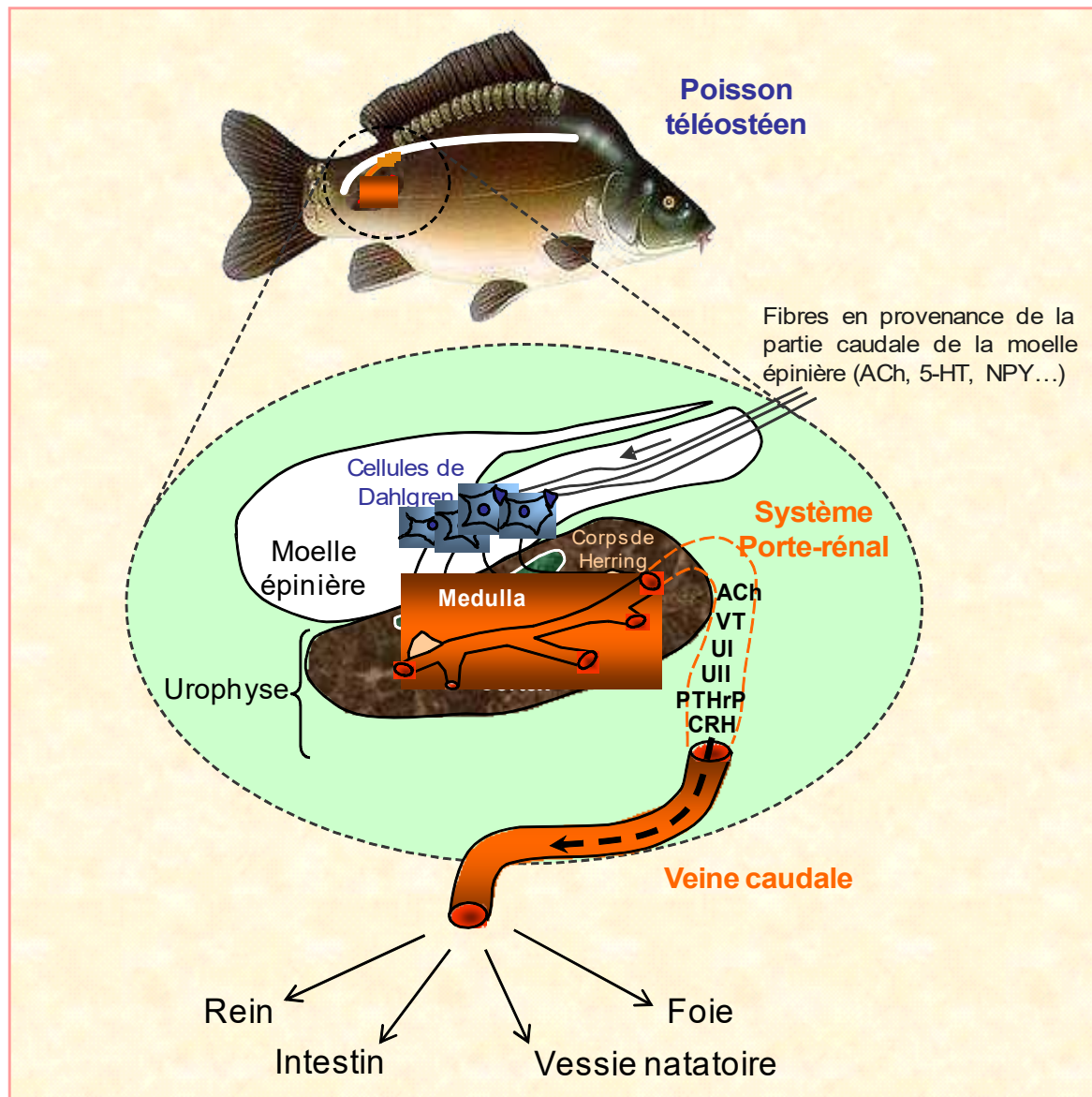


Figure 1: Schéma du système neurosécréteur caudal des poissons téléostéens. 5-HT, 5-hydroxytryptamine ou sérotonine; ACh, acétylcholine; CRH, *corticotropin-releasing hormone*, corticolibérine; NPY, neuropeptide Y; PTHrP, *parathyroid hormone-related protein*; UI et UII, urotensine I et II; VT, vasotocine (adapté de Bern *et al.*, 1985).

1. Le système urotensinergique

1.1. Structure de l'urophyse

Les poissons téléostéens (Baudroie, Carpe, Gobie,...) possèdent dans la partie caudale de leur moelle épinière un système neurosécréteur richement vascularisé, qui assure un lien entre le SNC et la circulation périphérique. Décrit pour la première fois par Dahlgren (1914), il est constitué d'une population particulière de neurones magnocellulaires ou cellules de Dahlgren (Speidel, 1922). Initialement appelée hypophyse caudale (Favaro, 1926) en raison de ses analogies anatomiques avec la neurohypophyse des mammifères, cette structure a ensuite été baptisée urophyse (Enami, 1959). D'un point de vue histologique, l'urophyse est constituée d'une zone centrale, la médulla, et d'une zone périphérique, le cortex (Figure 1). La médulla, en étroit contact avec la face ventrale de la moelle épinière, contient les afférences des cellules de Dahlgren. Le cortex renferme quant à lui un réseau de capillaires sanguins au niveau desquels se projettent les terminaisons des cellules de Dahlgren sous forme de renflements appelés corps de Herring (Pandey, 1981). Parmi les produits de sécrétion libérés dans le réseau veineux de l'urophyse, on compte ACh (Ichikawa, 1978) et divers peptides comme la vasotocine (Goossens, 1976), l'urotensine I (UI) (Lederis *et al.*, 1982), l'urotensine II (UII) (Pearson *et al.*, 1980), l'urocortine (Lovejoy et Balment, 1999), la *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) (Ingleton *et al.*, 2002) et la CRH (Lu *et al.*, 2004). Une fois libérées, ces neurohormones gagnent le système porte-rénal puis la veine caudale qui irrigue notamment les reins et la vessie (Bern *et al.*, 1985).

Des études immunocytochimiques ont révélé que les cellules de Dahlgren reçoivent de nombreuses afférences émanant de la partie caudale de la moelle épinière, de natures cholinergique (Ichikawa, 1978), monoaminergique (Audet et Chevalier, 1981; McKeon *et al.*, 1988), sérotoninergique (Cohen et Kriebel, 1989) et peptidergique. Parmi ces dernières, on compte des fibres à gonadolibérine (GnRH) (Miller et Kriebel, 1986), à Met-enképhaline (Yamada *et al.*, 1988) et à neuropeptide Y (NPY) (Oka *et al.*, 1997). L'activité sécrétrice des cellules de Dahlgren est régulée positivement par l'ACh (Brierley *et al.*, 2001; 2003) ou négativement par l'adrénaline, la noradrénaline et la sérotonine (Hubbard *et al.*, 1996; 1997).

1.2. L'urotensine II et l'*urotensin II-related peptide*

Initialement caractérisée à partir d'urophyses du Gobie *Gyllichthys mirabilis* (Pearson *et al.*, 1980), l'UII a par la suite été identifiée chez d'autres espèces comme le Poisson ventouse *Catostomus commersoni* (McMaster et Lederis, 1983), la Carpe *Cyprinus carpio* (Ichikawa *et al.*, 1984) et le Flétan *Platichthys flesus* (Conlon *et al.*, 1990). L'UII a également été purifiée à partir d'extraits de moelle épinière de Roussette *Scyliorhinus canicula* (Conlon *et al.*, 1992a) et d'Esturgeon *Acipenser ruthenus* (McMaster *et al.*, 1992). Bien qu'il fût longtemps admis que l'expression de l'UII se limitait aux poissons, plusieurs observations plaidaient en faveur de la présence du peptide chez d'autres espèces. En effet, l'UII de Gobie est capable de provoquer la vasodilatation d'anneaux d'aortes de Perdrix (Muramatsu et Kobayashi, 1979) et de Rat (Gibson, 1987), ou la relaxation du muscle anococcygien de Souris (Gibson *et al.*, 1984). Quelques années plus tard, les travaux de Conlon *et al.* (1992b)

ont démontré la présence de l'UII dans le cerveau d'un tétrapode, la Grenouille verte *Rana ridibunda*. Depuis, l'UII a été clonée chez plusieurs espèces de mammifères dont l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998; Ames *et al.*, 1999), la Souris (Coulouarn *et al.*, 1999), le Rat (Coulouarn *et al.*, 1999), le Porc (Mori *et al.*, 1999) et le Singe (Elshourbagy *et al.*, 2002). Plus récemment, en recherchant la forme mature de l'UII dans le cerveau de Rat, Sugo *et al.* (2003) ont isolé un paralogue de l'UII qu'ils ont nommé *UII-related peptide* (URP) (Sugo *et al.*, 2003). Le préproURP a été cloné chez l'Homme, la Souris (Sugo *et al.*, 2003) et le Poulet (Tostivint *et al.*, 2006).

1.2.1. Les gènes de l'UII et de l'URP

Chez l'Homme, le gène codant la préproUII est localisé dans la région p36 du chromosome 1, celui du préproURP occupant la région q28 du chromosome 3 (Sugo *et al.*, 2003). Les gènes des deux formes de somatostatine, SS1 et SS2, sont présents dans les mêmes régions chromosomiques : le gène de la SS1 est situé à proximité de celui de l'URP tandis que le gène de la SS2, aussi appelée cortistatine (CST), est localisé sur le même locus que celui de l'UII. L'hypothèse selon laquelle les deux tandems *URP/SS1* et *UII/SS2* dériveraient de deux gènes ancestraux, *protoUII* et *protoSS1*, eux-mêmes placés en tandem, est renforcée par des études de synténie montrant que plusieurs autres gènes, *MASP2*, *CLCN6* et *TP73* de la région 1p36 possèdent un paralogue dans la région 3q28, *i.e.* *MASP1*, *CLCN2* et *TP73L*, respectivement (Tostivint *et al.*, 2006) (Figure 2). De fait, les régions 1p36 et 3q28

sont considérées comme des paralogons, *i.e.* des régions ayant subi des duplications à grande échelle (Popovici *et al.*, 2001).

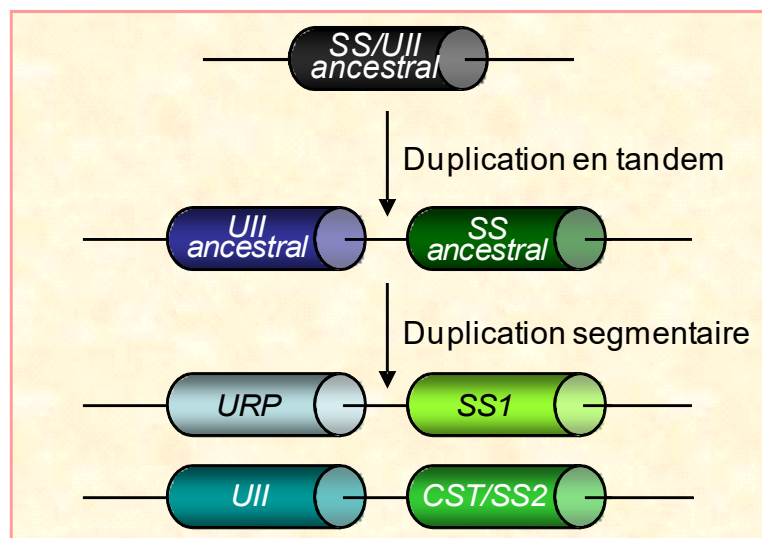


Figure 2: Processus évolutifs à l'origine des gènes des familles de l'urotensine II et de la somatostatine. CST, cortistatine; UII, urotensine II; URP, *UII-related peptide*; SS, somatostatine (d'après Tostivint *et al.*, 2006).

1.2.2. Structures de l'UII, de l'URP et de leur précurseur

Selon les espèces, l'UII est constituée d'un nombre variable d'a.a., compris entre 11 chez l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998) et 17 chez la Souris (Coulouarn *et al.*, 1999) (Tableau 1). Jusqu'à présent, la caractérisation de la séquence de l'URP se limite à l'Homme, la Souris, le Rat (Sugo *et al.*, 2003) et le Poulet (Tostivint *et al.*, 2006). Sa séquence est strictement conservée chez les mammifères et correspond à l'Ala¹-UII₄₋₁₁ humaine (Sugo *et al.*, 2003). Chez le Poulet, seule la valine en position 8 est substituée par une isoleucine (Tostivint *et al.*, 2006, Tableau 1).

Peptide	Espèce	Séquence	Nombre d'a.a.
UII	Gobie	AGTADCFWKYCV	12
	Grenouille	AGNLSECFWKYCV	13
	Rat	pQHGTAPECFWKYCI	14
	Souris	pQHKQHGAAPCFWKYCI	17
	Porc	GP ^P /TSECFWKYCV	12
	Homme	ETPD ^P CFWKYCV	11
URP	Rat, Souris, Homme	ACFWKYCV	8
	Poulet	ACFWKYCI	8

Tableau 1: Séquence de l'UII et de l'URP chez différentes espèces. Les résidus notés en vert forment la portion cyclique commune à l'urotensine II (UII) et à l'urotensin II-related peptide (URP) chez toutes les espèces. Les pointillés représentent le pont dissulfure entre les deux résidus cystéines de la chaîne peptidique. a.a., acide aminé, pQ, pyroglutamine.

Les formes matures de l'UII et de l'URP possèdent dans leur région C-terminale une séquence cyclique de 6 a.a. (CFWKYC) strictement conservée des poissons jusqu'aux mammifères (Douglas *et al.*, 2004). La triade FWK, également présente dans la partie cyclique de la SS1 et de la CST (Figure 3), est indispensable à l'activité biologique. En effet, la substitution d'un des a.a. de cette triade par son énantiomère de la série D ou par tout autre résidu, génère des analogues inactifs de l'UII (Camarda *et al.*, 2002b; Flohr *et al.*, 2002; Kinney *et al.*, 2002; Labarrère *et al.*, 2003; Guerrini *et al.*, 2005) et de l'URP (Chatenet *et al.*, 2004). La présence d'un coude γ -inversé, mis en évidence par résonance magnétique nucléaire (RMN) dans la structure de l'URP, serait indispensable à la liaison des peptides sur leur récepteur (Chatenet *et al.*, 2004).

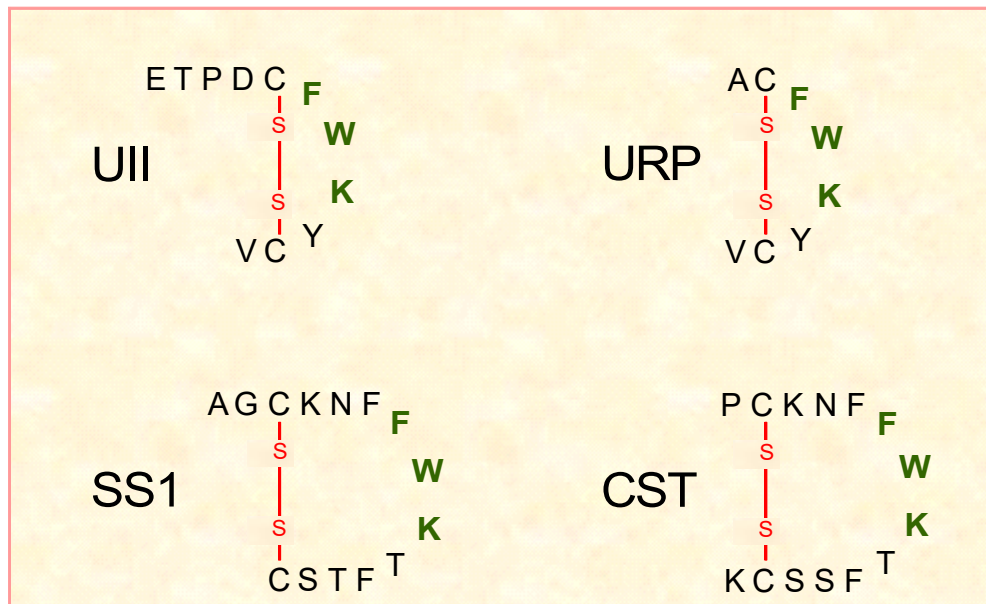


Figure 3: Structure de l'urotensine II (UII), de l'*UII-related peptide* (URP), de la somatostatine 1 (SS1) et de la cortistatine (CST) matures chez l'Homme. Les résidus notés en vert sont communs aux 4 peptides (d'après Tostivint *et al.*, 2006).

Contrairement à la région C-terminale, la portion N-terminale est très variable d'une espèce à l'autre, tant sur le nombre que sur la nature des résidus. A titre d'exemple, l'UII de Souris contient 10 a.a. en amont du cycle, contre 5 et 4 résidus chez le Rat et l'Homme, respectivement (Coulouarn *et al.*, 1998; 1999) (Tableau 1).

La proUII (Coulouarn *et al.*, 1998) et le proURP (Sugo *et al.*, 2003) sont des précurseurs monofonctionnels, *i.e.* ils possèdent une seule copie du peptide actif situé dans la région C-terminale. Comme la quasi-totalité des précurseurs neuropeptidiques, la préproUII et le préproURP sont flanqués en position N-terminale d'un peptide signal d'une vingtaine de résidus. Contrairement aux séquences de l'UII et de l'URP qui sont très conservées, celles de leur précurseur sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre (Tableau 2). En effet, la préproUII humaine ne partage que 50 et 61% d'identité avec ses homologues murin (Coulouarn *et al.*, 1999) et porcin (Mori *et al.*, 1999). De plus, chez la Souris et le Rat, deux espèces pourtant proches phylogénétiquement, les précurseurs présentent seulement 84% d'identité entre eux

(Coulouarn *et al.*, 1999) (Tableau 2A). De même, le préproURP humain ne partage que 40 à 55% d'identité avec les précurseurs de Rat, de Souris et de Poulet (Tableau 2B) (Tostivint *et al.*, 2006) (d'après le logiciel ClustalW sur le site <http://www2.ebi.ac.uk>).

A	Singe	Porc	Souris	Rat	Poulet	Grenouille	Carpe α	Carpe β	P. zèbre α	P. zèbre β	
	92	61	50	50	47	30	19	21	21	25	Homme
		60	52	52	41	30	9	17	20	26	Singe
			47	43	37	29	23	23	24	10	Porc
				84	39	20	22	26	14	21	Souris
					39	28	22	26	21	22	Rat
						41	23	23	24	35	Poulet
							14	23	19	19	Grenouille
								89	75	40	Carpe α
									73	40	Carpe β
										37	P. zèbre α
B	Rat										
		29									
	Souris	33		76							
	Homme	40		55	50						
			Poulet	Rat	Souris						

Tableau 2: Pourcentages d'identité entre les séquences peptidiques de la préproUII (A) et du préproURP (B). Les formes α et β identifiées chez la Carpe et le Poisson zèbre (P. zèbre) correspondent à des variants (d'après le logiciel ClustalW).

1.2.3. Localisations périphérique et centrale de l'UII et de l'URP

1.2.3.1. Localisation périphérique

L'UII et l'URP sont largement distribués en périphérie, particulièrement dans les systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrine (Tableau 3). Dans le cœur, les ARNm et les peptides sont présents dans les oreillettes et les ventricules chez l'Homme (Totsune *et al.*, 2001; Matsushita *et al.*, 2001; Dschietzig *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2002; Tzanidis *et al.*, 2003; Maguire *et al.*, 2004) et le Singe (Elshourbagy *et al.*, 2002). L'UII est également détectée dans le cœur de Rat (Ames *et al.*, 1999; Sugo *et al.*, 2003) et de Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002).

Au niveau vasculaire, le réseau artériel présente des taux élevés d'ARNm codant l'UII, notamment dans l'aorte thoracique, les artères pulmonaires et les artérioles (Matsushita *et al.*, 2001; Dietschzig *et al.*, 2002; Maguire *et al.*, 2004). En revanche, à l'exception des veines saphènes et ombilicales, le réseau veineux n'exprime pas le peptide (Matsushita *et al.*, 2001; Dschietzig *et al.*, 2002; Maguire *et al.*, 2004). Dans tous ces tissus, l'UII est localisée à la fois dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires vasculaires lisses (Douglas *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont montré la présence de quantités significatives d'UII circulante chez l'Homme (Totsune *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2003). L'existence d'une protéase plasmatique capable de générer l'UII à partir de son précurseur (Russell *et al.*, 2004), suggère que l'UII circulante serait le résultat d'une maturation extracellulaire. L'*urotensin-converting enzyme* ou UCE, qui possède une activité de type furine, n'est pas à ce jour clairement caractérisée (Russell *et al.*, 2004).

Plusieurs travaux tendent à montrer que les reins constituent un site majeur de production d'UII chez l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998; Nothacker *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001; 2003; Sugo *et al.*, 2003). Le peptide est particulièrement abondant dans les cellules épithéliales des glomérules, des tubes contournés et des tubes collecteurs rénaux (Shenouda *et al.*, 2002; Maguire *et al.*, 2004). Toutefois l'expression de l'UII dans le rein est très faible chez le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002) voire inexistante chez le Rat (Sugo *et al.*, 2003).

L'UII est exprimée dans plusieurs glandes endocrines chez l'Homme et le Rat, en particulier dans l'hypophyse, le pancréas et la glande surrénale (Coulouarn *et al.*,

1998; Totsune *et al.*, 2001; Sugo *et al.*, 2003). Le préproURP est quant à lui essentiellement présent dans le testicule, ainsi que dans l'ovaire et le placenta chez l'Homme (Sugo *et al.*, 2003). Les niveaux d'expression observés chez le Rat sont significatifs dans l'hypophyse, le pancréas et la surrénale pour l'UII, et dans le testicule pour l'URP (Sugo *et al.*, 2003). En revanche, les ARNm codant l'UII sont indétectables dans les glandes endocrines chez le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002). La distribution de l'UII et l'URP s'étend à d'autres tissus comme la rate, le thymus, le foie, l'estomac, l'intestin grêle, le colon et le poumon (Coulouarn *et al.*, 1998; 1999; Totsune *et al.*, 2001; 2003; Elshourbagy *et al.*, 2002; Sugo *et al.*, 2003; Maguire *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données montre que l'UII et l'URP sont largement distribués en périphérie, mais qu'il existe une grande variabilité inter-espèces, même pour des espèces phylogénétiquement proches.

1.2.3.2. Localisation dans le SNC

Dès les années 80, la présence de l'UII et de son précurseur a été mise en évidence dans le SNC de poissons téléostéens, au niveau de la moelle épinière pour le Gobie (Bern *et al.*, 1985) et du tronc cérébral pour le Meunier (Yulis et Lederis, 1986). C'est également dans ces régions que des taux élevés d'UII sont retrouvés chez des espèces dites supérieures, *i.e.* la Grenouille (Chartrel *et al.*, 1996; Conlon *et al.*, 1996; Coulouarn *et al.*, 1998) et les mammifères (Coulouarn *et al.*, 1998; 1999; Dun *et al.*, 2001) (Tableau 3). Plus précisément, le gène codant l'UII est essentiellement exprimé dans des motoneurones des noyaux des nerfs crâniens abducens, facial, trijumeau et

hypoglosse chez le Rat (Coulouarn *et al.*, 1999; Dun *et al.*, 2001) et ceux de la partie caudale de la moelle épinière chez la Souris (Coulouarn *et al.*, 1999; Elshourbagy *et al.*, 2002; Egginger *et al.*, 2006), le Rat (Coulouarn *et al.*, 1999) et l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998; Ames *et al.*, 1999; Chartrel *et al.*, 2004). De façon inattendue, l'UII n'est pas présente dans le tronc cérébral de Singe (Ames *et al.*, 1999; Elshourbagy *et al.*, 2002) indiquant qu'il existe des variations d'expression inter-espèces importantes. Même si les concentrations sont relativement faibles, l'UII est également retrouvée dans le liquide céphalorachidien chez l'Homme (Thompson *et al.*, 2003; Cowley *et al.*, 2005).

Bien que l'URP ait été caractérisé en 2003 (Sugo *et al.*, 2003), sa distribution dans le cerveau demeure mal connue. Les données disponibles à ce jour indiquent que les ARNm codant l'URP sont localisés dans la moelle épinière chez l'Homme et le Rat, avec des niveaux d'expression largement inférieurs à ceux de l'UII (Sugo *et al.*, 2003). Chez la Souris, les précurseurs des deux peptides sont co-localisés dans les motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière (Pelletier *et al.*, 2005). Des composés immunologiquement apparentés à l'URP seraient présents dans les somas neuronaux de l'aire préoptique et au niveau des fibres de l'organe vasculaire de la lame terminale et de l'éminence médiane (Egginger et Calas, 2005).

1.3. Le récepteur UT

Chez les mammifères, tous les récepteurs peptidergiques identifiés à ce jour appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR),

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Système nerveux central				
Cerveau	1,24	11		11
Hypothalamus				9
Tronc cérébral	1,3,14,22,24		4,8	10
Moelle épinière	1,3,22	1,11	4,8,22,22	4,10,16
Cervelet	22,24	11		4
Liquide céphalorachidien	5,23			
Système cardiovasculaire				
Cœur	1,24,25	1,4,22	1,4,22	4,11
Myocarde	6		4,8	
Oreillette	6,7,12,13,24,25	11	4,8,22	
Ventricule	6,7,12,24,25,26	11		
Auricule droit	13			
Aorte thoracique	13	1,11		11
Artère mammaire	7			
Veine saphène	7,12,13			4
Plasma	14,17,19,24			
Système endocrinien				
Hypophyse	3,24	22	22	4
Pancréas	3,24	3	3	4
Surrénale	3,24	3	3	4
Testicule	22	22	22,22	4
Ovaire	22			4
Placenta	22			4
Systèmes urogénital et gastrointestinal				
Rein	2,12,13,14,15,22,24,25	11	4,22	4,11
Tube contourné	12,20			
Glomérule	12,20			
Tube colecteur	12,20			
Vessie	2	11	22	11
Prostate	2,22		22	
Œsophage		11	22	11
Estomac	3,22	11,22	22	
Intestin	3,22,24,22	11,22	22	4,11
Foie	3,22,25,22	11,22	4,22	11
Autres tissus				
Thymus	3,22,22		22,22	4
Rate	3,22	11,22	4,22,22	4,11
Poumon	12,22,22	11,22	4,22	4,11
Muscle squelettique	22	11	22	11

Tableau 3: Localisation de l'UII (en noir) et de l'URP (en rouge) chez les mammifères. 1, Ames *et al.*, 1999; 2, Chartrel *et al.*, 2004; 3, Coulouarn *et al.*, 1998; 4, Coulouarn *et al.*, 1999; 5, Cowley *et al.*, 2005; 6, Douglas *et al.*, 2002; 7, Dschietzig *et al.*, 2002; 8, Dun *et al.*, 2001; 9, Egginger et Calas, 2005; 10, Egginger *et al.*, 2006; 11, Elshourbagy *et al.*, 2002; 12, Maguire *et al.*, 2000; 13, Matsushita *et al.*, 2001; 14, Ng *et al.*, 2002; 15, Nothacker *et al.*, 1999; 16, Pelletier *et al.*, 2005; 17, Richards *et al.*, 2002; 18, Russell *et al.*, 2003; 19, Russell *et al.*, 2004; 20, Shenouda *et al.*, 2002; 21, Silvestre *et al.*, 2004; 22, Sugo *et al.*, 2003; 23, Thompson *et al.*, 2003; 24, Totsune *et al.*, 2001; 25, Totsune *et al.*, 2003; 26, Tzanidis *et al.*, 2003.

dont les membres partagent des caractéristiques structurales, *i.e.* la présence de sept domaines transmembranaires, une extension N-terminale extracellulaire et une extension C-terminale intracellulaire (Probst *et al.*, 1992).

Dans les années 90, le développement de nouveaux outils moléculaires a permis d'identifier des GPCR orphelins, dont les ligands naturels restaient à découvrir. Les récepteurs dont un ligand naturel au moins a été identifié sont dits « désorphanisés », comme c'est le cas pour les GPR 7 et 8 qui lient les neuropeptides B et W (Fujii *et al.*, 2002; Shimomura *et al.*, 2002; Brezillon *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003), le GPR103 dont le ligand endogène est le 26RFa (Chartrel *et al.*, 2003; Fukusumi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003), ou encore le GPR54 reconnu par le peptide *KiSS-1* (Ohtaki *et al.*, 2001).

1.3.1. Caractérisation de l'UT

Par des approches différentes, deux groupes ont isolé l'ADNc codant un récepteur orphelin nommé GPR14. La première s'appuyait sur les caractéristiques structurales communes à tous les GPCR et sur des banques de données génomiques (Marchese *et al.*, 1995) et la seconde sur les mécanismes de transduction des signaux sensoriels tels que les odeurs, la lumière et le goût, relayés par des GPCR (Tal *et al.*, 1995). Le GPR14 partage des analogies structurales avec des récepteurs somatostatinerigiques et opioïdes et présentent 27% et 25% d'homologie avec les récepteurs sst-4 (Xu *et al.*, 1993) et κ (Mansson *et al.*, 1994), respectivement.

Initialement identifié à partir de tissus sensoriels de Rat, le GPR14 a été renommé *sensory epithelium neuropeptide-like-receptor* ou SENR (Tal *et al.*, 1995).

La stratégie de pharmacologie inverse consiste à tester une série de ligands potentiels pour leur capacité à stimuler une activité biologique associée à un récepteur d'intérêt (Stadel *et al.*, 1997). Après transfection des formes humaine et murine du GPR14 dans la lignée HEK-293, Ames *et al.* (1999) ont testé plus de 700 composés parmi lesquels l'UII de Gobie, qui s'est révélé être un puissant agoniste du récepteur. La même année, à l'aide de différents modèles biologiques, trois autres équipes ont confirmé que l'UII est un ligand naturel du GPR14 (Liu *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999). Une fois « désorphanisé », ce récepteur a été définitivement rebaptisé UT (Douglas et Ohlstein, 2000). Compte tenu des analogies structurales de l'UII avec d'autres peptides cycliques (SS1 et CST), la spécificité du couple UII/UT pouvait être sujette à controverse. Cependant, seules des concentrations très élevées de SS1 et de CST sont capables d'activer l'UT (Liu *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999), permettant ainsi de confirmer que l'UII est le ligand endogène de l'UT. Cloné chez l'Homme (Maguire *et al.*, 2000), le Macaque (Elshourbagy *et al.*, 2002), la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002) et le Chat (Aiyar *et al.*, 2005), l'UT présente respectivement 95, 74 et 74% d'identité avec la forme humaine (d'après le logiciel ClustalW sur le site <http://www2.ebi.ac.uk>).

1.3.2. Localisation de l'UT

1.3.2.1. Localisation périphérique

Les propriétés vasoactives de l'UII, établies dès les années 80 chez les rongeurs (Gibson *et al.*, 1984; Gibson, 1987), suggéraient la présence de l'UT dans le système cardiovasculaire. Chez les hominidés, des niveaux élevés d'ARNm ont été mesurés dans le myocarde (Maguire *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes (Ames *et al.*, 1999; Totsune *et al.*, 2001; Matsushita *et al.*, 2001; Elshourbagy *et al.*, 2002) et les ventricules (Ames *et al.*, 1999; Totsune *et al.*, 2001, 2003; Elshourbagy *et al.*, 2002) (Tableau 4). Chez les rongeurs, l'UT est majoritairement exprimé dans le cœur (Nothacker *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2000; Gartlon *et al.*, 2001; Elshourbagy *et al.*, 2002), notamment dans le ventricule gauche chez le Rat (Gong *et al.*, 2004) et le myocarde chez la Souris (Liu *et al.*, 1999). Au niveau vasculaire, l'UT est présent dans l'aorte thoracique (Ames *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 2001; Elshourbagy *et al.*, 2002), les artères pulmonaires et coronaires (Maguire *et al.*, 2000), mais absent des veines caves (Ames *et al.*, 1999) ou des veines saphènes (Matsushita *et al.*, 2001). Au niveau cellulaire, l'UT est exprimé dans les cellules endothéliales et musculaires vasculaires lisses (Ames *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2002; Totsune *et al.*, 2003) (Tableau 4).

En accord avec la distribution de l'UII chez l'Homme (Watson et May, 2004), l'UT est fortement exprimé dans les reins (Maguire *et al.*, 2000; Totsune *et al.*, 2001; Matsushita *et al.*, 2001), plus particulièrement dans la medulla (Disa *et al.*, 2006). Toutefois, les niveaux d'expression sont faibles chez le Singe (Elshourbagy *et al.*, 2002) et la co-localisation UII/UT n'est pas retrouvée chez les rongeurs (Maguire *et al.*, 2000; Gartlon *et al.*, 2001; Elshourbagy *et al.*, 2002) (Tableau 4).

Les tissus endocrines constituent également des sites d'expression de l'UT, avec de fortes densités du récepteur dans l'hypophyse, le pancréas et la glande surrénale chez l'Homme (Ames *et al.*, 1999).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Système cardiovasculaire				
Cœur	1,9	5	6,12	5
Myocarde	4,10		7,15	
Oreillette	1,11,13	5		
Ventricule	1,4,7,10,13,14,16	5	7	
Auricule droit		5		
Aorte thoracique	1,11	5	10,12	5
Artère pulmonaire	10		12	
Veine saphène	11			
Veine cave	1	5		
Système endocrinien				
Hypophyse	13		8	
Pancréas	1	5		5
Surrénale	12	5	8	5
Testicule		5	6	
Thyroïde				
Systèmes urogénital et gastrointestinal				
Rein	10,11,13,14	5	6	5
Medulla	3			
Vessie	9	5		5
Prostate				
Œsophage		5		5
Estomac		5		5
Intestin	13	5		5
Foie	1,14	5	6	5
Autres				
Thymus				5
Rate		5	6	5
Poumon	1	5	6	5
Muscle squelettique	1,9,10	5		

Tableau 4: Localisation périphérique de l'UT chez les mammifères. **1**, Ames *et al.*, 1999; **2**, Clark *et al.*, 2001; **3**, Disa *et al.*, 2006; **4**, Douglas *et al.*, 2002; **5**, Elshourbagy *et al.*, 2002; **6**, Gartlon *et al.*, 2001; **7**, Gong *et al.*, 2004; **8**, Jégou *et al.*, 2006; **9**, Liu *et al.*, 1999; **10**, Maguire *et al.*, 2000; **11**, Matsushita *et al.*, 2001; **12**, Nothacker *et al.*, 1999; **13**, Totsune *et al.*, 2001; **14**, Totsune *et al.*, 2003; **15**, Tzanidis *et al.*, 2003; **16**, Zhang *et al.*, 2002.

De faibles taux d'ARNm sont aussi détectés dans le testicule (Gartlon *et al.*, 2001) et l'hypophyse (Jégou *et al.*, 2006) de Rat. Dans le cas du Singe et de la Souris, le pancréas et la surrénale expriment l'UT mais pas l'UII (Elshourbagy *et al.*, 2002),

confirmant que les expressions du récepteur et de son ligand ne sont pas forcément superposables (Tableau 4).

De nombreux autres tissus périphériques présentent des niveaux d'expression significatifs d'UT, variant selon les espèces. Il s'agit du tractus gastrointestinal (Gartlon *et al.*, 2001), des muscles squelettiques (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2000; Elshourbagy *et al.*, 2002), des poumons (Ames *et al.*, 1999; Gartlon *et al.*, 2001; Elshourbagy *et al.*, 2002), des tissus lymphoïdes (Elshourbagy *et al.*, 2002), de la vessie (Liu *et al.*, 1999) et du foie (Totsune *et al.*, 2003) (Tableau 4).

[1.3.2.2. Localisation dans le SNC](#)

Les données disponibles à ce jour indiquent que le gène de l'UT est largement exprimé dans le SNC des mammifères (Tableau 5). Le tronc cérébral est particulièrement riche en UT chez l'Homme et le Rat mais seule la moelle épinière humaine présente des taux élevés d'ARNm (Gartlon *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001; 2003; Jégou *et al.*, 2006). Dans le cerveau, une forte densité d'ARNm codant le récepteur est détectée dans la région mésopontine tegmentale, notamment dans les neurones cholinergiques des aires pedunculopontine et latérodorsale (Clark *et al.*, 2001). Les autres régions du SNC présentent des niveaux d'expression relativement faibles avec une variabilité inter-espèces. A titre d'exemple, dans la moelle épinière de Singe (Elshourbagy *et al.*, 2002) et de Souris (Liu *et al.*, 1999; Elshourbagy *et al.*, 2002) l'UT est très faiblement exprimé comparativement à ce qui est observé chez l'Homme (Totsune *et al.*, 2003). L'UT est également présent dans les vaisseaux sanguins cérébraux, plus particulièrement au niveau des cellules endothéliales des

microvaisseaux (Spinazzi *et al.*, 2006). Enfin, Lin *et al.* (2003b) ont démontré que l'immunoréactivité liée à l'UT dans le tronc cérébral et l'hypothalamus est exclusivement localisée dans une sous-population de cellules gliales de type astrocytaire.

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Cerveau	8		3	2
Amygdale			8	
Bulbe olfactif	7		3	
Cortex	8		3,8	
Hippocampe (glie)			3,4,5,8	
Hypothalamus (glie)	8		3,4,5	
Thalamus (glie)			4,5,8	
Moelle épinière	9	2	3,4	6
Cervelet		2	3,4,8	
Tronc cérébral (glie)	8		3,4,5,8	
Noyaux du pons			4,8	
Neurones cholinergiques mésopontins			1	
Noyau du nerf abducens			7	
Noyaux du septum latéral			1,8	
Noyaux interpedunculaire			1	
Aire tegmentale latérodorsale			1	
Noyau habénulaire médian			1	
Aire tegmentale pédonculopontine			1	

Tableau 5: Localisation centrale de l'UT chez les mammifères. 1, Clark *et al.*, 2001; 2, Elshourbagy *et al.*, 2002; 3, Gartlon *et al.*, 2001; 4, Jégou *et al.*, 2006; 5, Lin *et al.*, 2003b; 6, Liu *et al.*, 1999; 7, Maguire *et al.*, 2000; 8, Maguire *et al.*, 2008.

1.3.3. Voies de transduction associées à l'UT

A partir de cellules transfectées par l'ARNm codant l'UT (Nothacker *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Rossowski *et al.*, 2002; Elshourbagy *et al.*, 2002) ou d'anneaux d'aortes thoraciques (Saetrum Opgaard *et al.*, 2000), plusieurs groupes ont montré que la voie de la phospholipase C constitue le mécanisme majeur de transduction de l'UT (Figure 4). La liaison de l'UII à son récepteur entraîne donc le recrutement des pools calciques intracellulaires *via* la production d'inositol 3,4,5-trisphosphate (IP₃). Bien

avant la caractérisation de l'UT, plusieurs travaux avaient déjà établi un lien entre l'activité contractile de l'UII et d'autres voies intracellulaires comme celle de la phospholipase A₂ (Gibson, 1987; Gibson *et al.*, 1988; Itoh *et al.*, 1988). Le rôle de l'acide arachidonique fût par la suite confirmé sur un modèle de muscles lisses de Grenouille (Yano *et al.*, 1995). La phosphorylation préalable de la *myosin light chain* 20 (MLC20) *via* l'activation d'une *MLC kinase* serait en outre nécessaire à l'activité contractile de l'UII (Tasaki *et al.*, 2004). La vasodilatation des artères coronaires de Rat induite par l'UII implique quant à elle la production de monoxyde d'azote (NO) et l'activation de la cyclooxygénase (Katano *et al.*, 2000) (Figure 5).

Le rôle de la voie de Erk/phosphoErk dans les processus liés à la prolifération cellulaire est bien établi (Eguchi *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 2000). Or, les effets mitogènes de l'UII observés sur des lignées transfectées avec l'ADNc codant l'UT humain (Ziltener *et al.*, 2002) et sur des cellules natives comme les cellules épithéliales rénales (Matsushita *et al.*, 2003) ou musculaires lisses (Tamura *et al.*, 2003), sont relayés par cette voie. La calmoduline, la protéine kinase C (PKC) et la *mitogen-activated protein kinase* ou MAP kinase (MEK) sont aussi impliquées dans ce processus mitogène et pourrait dépendre, comme cela a été observé sur des cellules transfectées avec l'UT humain, d'une protéine G sensible à la toxine pertussique (Ziltener *et al.*, 2002). Enfin, dans les cellules vasculaires lisses, l'action mitogène de l'UII est sous-tendue par l'activation de la voie RhoA/Rho kinase (Sauzeau *et al.*, 2001).

Comme Filipeanu *et al.* (2002) l'ont démontré sur des neurones de moelle épinière de Souris, l'UII entraîne une mobilisation du calcium extracellulaire. Dans ce

cas précis, l'influx calcique est relayé par des canaux de type N dont l'ouverture est sous-tendue par l'activation d'une protéine kinase A (PKA) et d'une PKC.

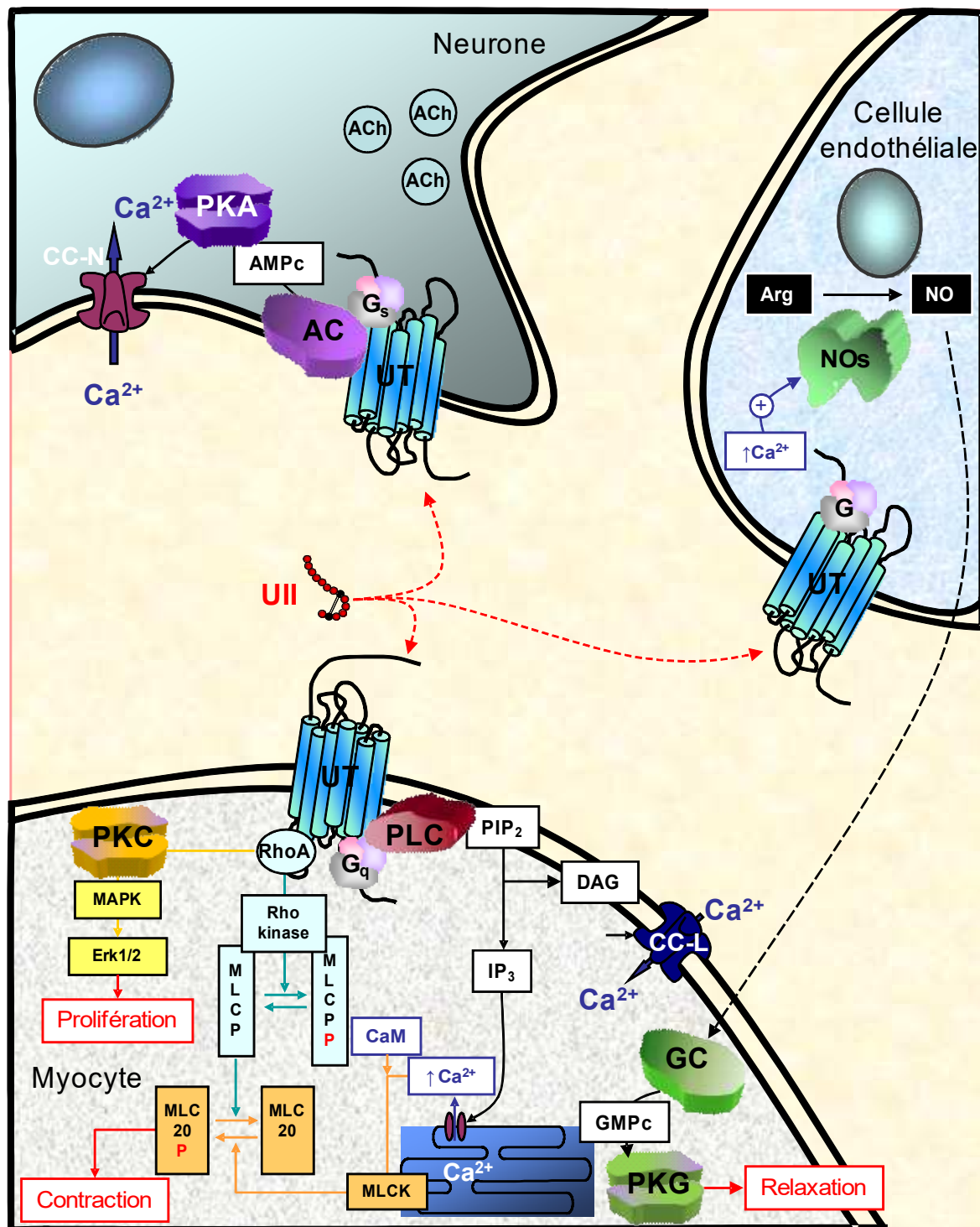


Figure 4: Voies de transduction associées au récepteur UT dans différents types cellulaires. AC; adénylyl cyclase; ACh, acétylcholine; CaM, calmoduline; CC-L ou -N, canal calcique de type L ou N; DAG, diacylglycérol; Erk, *extracellular signal-regulated kinase*; GC, guanylyl cyclase; IP₃, inositol 3,4,5 triphosphate; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MLC20, *myosin light chain 20*; MLCK, *myosin light chain kinase*; MLCP, *myosin light chain phosphatase*; NO, monoxyde d'azote; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-diphosphate; PKA, protéine kinase A; PKC, protéine kinase C; PKG, protéine kinase G; PLC, phospholipase C; Rho, *ras homologue gene family*.

1.3.4. Structure et pharmacologie de l'UT

1.3.4.1. Structure

Le récepteur UT possède deux sites de N-glycosylation dans la région N-terminale, un pont dissulfure entre la 1^{ère} et la 2^{ème} boucle extracellulaire, un site de palmitoylation (Cys), un motif NPXXY dans le 7^{ème} domaine transmembranaire (TM7), quatre résidus proline dans le TM4, et des sites potentiels de phosphorylation

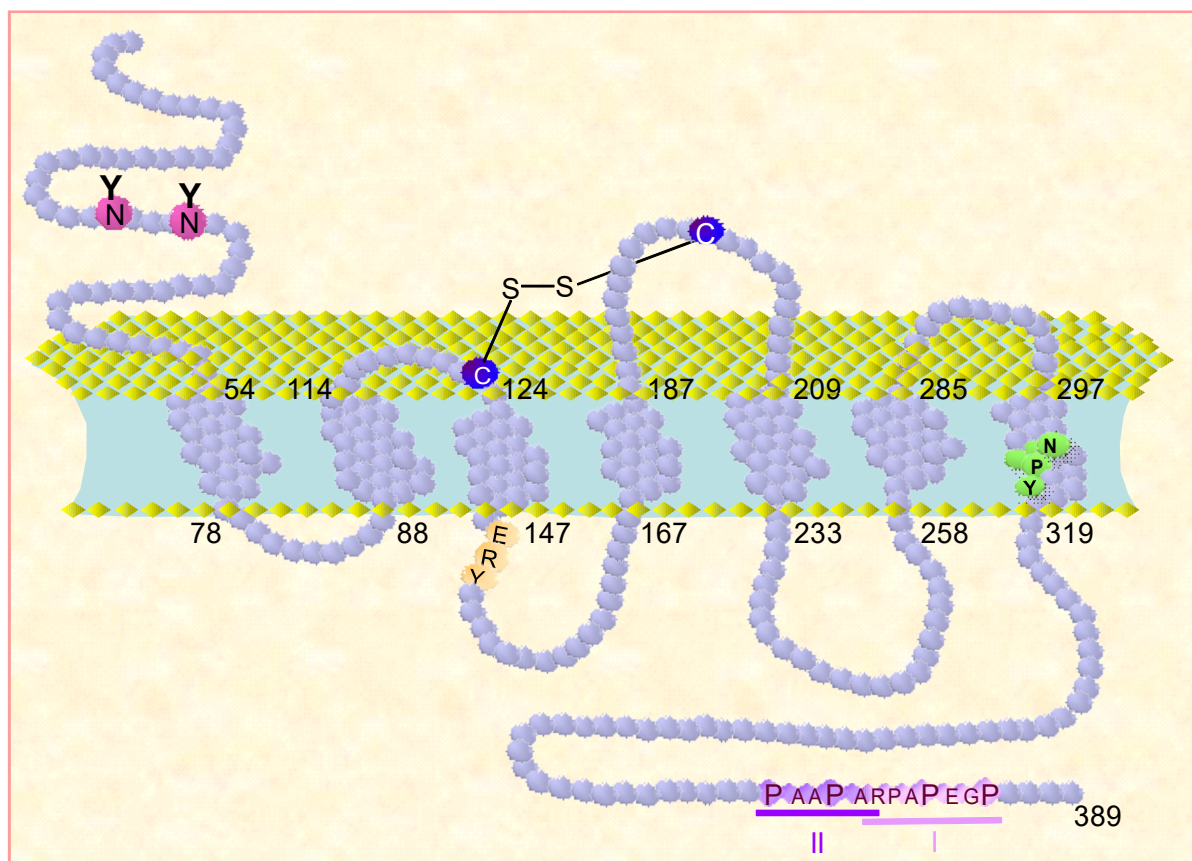


Figure 5: Représentation schématique de la structure du récepteur UT humain. Les sites de N-glycosylation sont en rose, le pont disulfure en bleu, un motif ERY en orange, un motif NPXXY en vert et les motifs polyproline de type I et II en mauve.

par des protéines kinases A et C, la *casein kinase 1* et la *glycogen synthase kinase 3* au niveau des 2^{ème} et 3^{ème} boucles intracellulaires (Tal *et al.*, 1995; Marchese *et al.*, 1995) (Figure 5).

Une étude récente réalisée sur des segments synthétiques de l'UT, a démontré que seules les boucles extracellulaires 2 et 3 du récepteur adoptent une conformation

en hélice- α capable d'interagir avec l'UII et l'URP (Boivin *et al.*, 2006). La première boucle qui ne présente pas cette structure tridimensionnelle particulière ne peut pas constituer un site de liaison pour les peptides, indiquant que la conformation en hélice- α est indispensable à l'interaction ligand/récepteur. La comparaison des séquences de l'UT humain et murin met en évidence d'importantes différences dans la boucle C-terminale. En effet, seul le récepteur humain possède un site poly-prolines qui permet d'interagir avec des protéines contenant des domaines de type SH3 (d'après le site www.scansit.mit.edu/motifscan). Ces données impliquent une extrême prudence dans la transposition de résultats de l'animal à l'Homme.

1.3.4.2. Pharmacologie

Les propriétés vasoactives de l'UII observées dès les années 80 sur des anneaux d'aortes de Rat (Gibson, 1987), ont naturellement conduit plusieurs groupes à développer des analogues de l'UII et de l'URP à visée thérapeutique dans le traitement de pathologies du système cardiovasculaire. Les premiers travaux ont consisté à étudier les relations structure/activité des peptides. La délétion des résidus N-terminaux de l'UII humaine (hUII) a révélé que l'hUII₄₋₁₁ correspond à la séquence minimale recouvrant la pleine activité biologique, alors que l'hUII₅₋₁₁ est selon les études, 200 à 1000 fois moins efficace que le peptide natif (Perkins *et al.*, 1990; Flohr *et al.*, 2002; Labarrère *et al.*, 2003). Le remplacement de chacun des trois résidus N-terminaux par une alanine (Ala-scan) ou par son énantiomère dextrogyre (D-scan) est sans conséquence sur l'activité biologique (Flohr *et al.*, 2002; Kinney *et al.*, 2002; Brkovic *et al.*, 2003; Labarrère *et al.*, 2003). Bien que l'[Ala¹¹]hUII et la [D-Val¹¹]hUII

conservent des propriétés vasoactives modérées, le premier est deux fois plus puissant que le second, révélant que l'orientation de la chaîne latérale du résidu C-terminal est essentielle pour l'activité biologique (Labarrère *et al.*, 2003).

Toute modification de la portion cyclique perturbe considérablement l'efficacité du couplage ligand/récepteur. En effet, le remplacement par une alanine ou leur énanthiomère dextrogyre de Phe⁶, Trp⁷, Lys⁸ ou Tyr⁹ pour l'UII et de Phe³, Lys⁵ et Tyr⁶ pour l'URP, génère des analogues inactifs sur la contraction d'anneaux d'aortes de Rat (Labarrère *et al.*, 2003; Chatenet *et al.*, 2004). La présence des résidus cystéine responsables de la formation d'un pont dissulfure, est également indispensable puisque leur remplacement par deux résidus sérine dans la séquence de l'hUII (Labarrère *et al.*, 2003) ou par leur énanthiomère dextrogyre dans celle de l'URP (Chatenet *et al.*, 2004) diminue fortement l'activité vasoactive. De plus, la réduction de la taille du cycle contrarie la liaison de l'UII sur l'UT (Kinney *et al.*, 2002). De façon intéressante, la greffe d'un groupement iodé sur le résidu Tyr⁶ de l'UII génère un super agoniste de l'UT cinq fois plus puissant que le peptide naturel (Labarrère *et al.*, 2003).

La substitution par une ornithine de la Lys⁸ pour l'hUII et Lys⁵ pour l'URP a permis de générer les premiers antagonistes peptidiques de l'UT. L'[Orn⁸]hUII se comporte comme un véritable antagoniste compétitif sur la contraction d'anneaux d'aortes de Rat (Camarda *et al.*, 2002a; 2002b; Vergura *et al.*, 2004), tandis que l'[Orn⁵]URP, qui présente pourtant des propriétés antagonistes, conserve une faible activité agoniste (Chatenet *et al.*, 2004). Ces résultats ont ensuite permis d'élaborer d'autres composés tels que l'urantide ([Pen⁵,D-Trp⁷,Orn⁸]UII₄₋₁₁), un antagoniste totalement dépourvu d'activité intrinsèque sur le modèle d'anneaux d'aortes de Rat

(Patacchini *et al.*, 2003; Camarda *et al.*, 2004). Cependant, dans la mesure où ce composé mime les effets stimulants de l'hUII sur la concentration cytosolique de calcium ($[Ca^{2+}]_c$) dans des cellules CHO transfectées avec l'hUT (Camarda *et al.*, 2004), il se pourrait que les singularités structurales de l'UT humain (cf § 1.3.3.1.) soient à l'origine de résultats décevants chez l'Homme.

D'autres antagonistes, de nature non-peptidique ont également été développés (Behm *et al.*, 2004; Douglas *et al.*, 2005). Parmi eux, le Palosuran, a suscité un vif intérêt puisqu'il se comporte comme un puissant antagoniste sur un test de mobilisation calcique dans des cellules transfectées par l'UT humain et sur un test de contraction d'aortes de Rat (Clozel *et al.*, 2004). Administré chez des patients diabétiques présentant une macroalbuminurie, ce composé diminue sensiblement les troubles rénaux (Sidharta *et al.*, 2006). Cependant, des études complémentaires n'ont pas confirmé ces résultats (http://www.actelion.com/uninet/www/www_main_p.nsf/Content/).

1.4. Activités biologiques de l'UII

1.4.1. Effets cardiovasculaires de l'UII

1.4.1.1. Effets *ex vivo* et *in vitro*

Bien avant la première purification de l'UII (Pearson *et al.*, 1980), plusieurs groupes avaient montré que des extraits d'urophyses contiennent des composés capables d'augmenter l'activité contractile de muscles lisses vasculaires de poissons (Lederis, 1969; 1970a; 1970b; Chan et Bern, 1976; Berlind, 1972). En accord avec ces expériences pilotes, il a ensuite été montré que l'application d'UII sur des anneaux

d'aortes thoraciques dépourvus d'endothélium, entraîne une vasoconstriction chez le Rat (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Chatenet *et al.*, 2004), le Singe (Ames *et al.*, 1999), le Lapin (Saetrum-Opgaard *et al.*, 2000) et l'Homme (Maguire *et al.*, 2000; MacLean *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2001; Camarda *et al.*, 2002a) (Tableau 6). Des résultats similaires ont été obtenus sur ce modèle avec l'URP (Chatenet *et al.*, 2004). Toutefois, sur des vaisseaux intacts, l'UII provoque une vasodilatation, notamment sur les artères pulmonaires, mésentériques et fémorales chez le Rat (Ames *et al.*, 1999), le Chat (Behm *et al.*, 2004) et l'Homme (MacLean *et al.*, 2000). Ces derniers effets seraient relayés par la libération de NO connu pour ses propriétés myorelaxante (Bottrill *et al.*, 2000; Katano *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2001; Prosser *et al.*, 2006) (Tableau 6). La présence de l'UT dans les cellules musculaires vasculaires lisses (Ames *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2004; Maguire *et al.*, 2008) (Tableau 6) et dans les cellules endothéliales (Ames *et al.*, 1999; Bottrill *et al.*, 2000) suppose donc que les propriétés vasoactives de l'UII reflètent une composante directe (vasoconstrictrice) et indirecte (vasodilatatrice). Les effets de l'UII sur le réseau veineux semblent quant à eux se limiter à quelques vaisseaux comme les veines saphènes et ombilicales chez l'Homme (Maguire *et al.*, 2000) ou la veine jugulaire chez le Lapin (Camarda *et al.*, 2002a). Le fait que l'invalidation du gène *UT* chez la Souris entraîne la perte des activités contractiles de l'UII, confirme que les propriétés vasoactives du peptide sont bien relayées par ce récepteur (Behm *et al.*, 2003).

En marge du contrôle du tonus vasculaire, le système urotensinergique jouerait également un rôle dans la régulation de l'activité cardiaque. Perfusée sur des cœurs isolés de Rat, l'UII provoque une élévation de la pression coronarienne (Gray *et al.*,

2001) et exerce un effet inotrope positif chez l'Homme plus puissant que celui observé avec l'endothéline-1 (ET-1), la sérotonine (5-HT) ou la noradrénaline (NA) (Russell *et al.*, 2001). Sur des myocytes vasculaires humains (Sauzeau *et al.*, 2001) et de Lapin (Watanabe *et al.*, 2001), l'UII stimule la prolifération cellulaire. Dans le premier cas, cet effet mitogène s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette avec formation de fibres d'actine de stress (Sauzeau *et al.*, 2001).

1.4.1.2. Effets *in vivo*

Compte tenu du potentiel thérapeutique de ligands de l'UT dans le traitement de pathologies cardiovasculaires, la littérature scientifique dans ce domaine est particulièrement étoffée (Tableau 6). Les données obtenues chez l'animal ont démontré que l'injection périphérique en bolus par voie intraveineuse (i.v.) d'UII (Gibson *et al.*, 1986; Gardiner *et al.*, 2001; Abdelrahman et Pang, 2002) ou d'URP (Sugo *et al.*, 2003) chez des rats anesthésiés entraîne une diminution lente et prolongée de la pression artérielle. Cependant, administrée de manière chronique, l'UII provoque une augmentation de la résistance vasculaire accompagnée d'une élévation de la pression artérielle (Bennett *et al.*, 2004) (Tableau 6). Chez des macaques non vigiles, l'UII est tellement efficace qu'elle entraîne la mort de l'animal par collapsus et arrêt cardiaque. En dépit de la proximité phylogénétique, les rares données physiologiques disponibles chez l'Homme, sont très différentes. En effet, selon les études, l'injection d'UII par voie intradermique (Leslie *et al.*, 2000) ou i.v. (Bohm et Pernow, 2002) (Tableau 6) ne provoque qu'une vasoconstriction locale, ou est sans aucune incidence apparente (Wilkinson *et al.*, 2002).

L'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'Ull induit une élévation du débit cardiaque et de la pression systémique chez le Rat (Lin *et al.*, 2003a; 2003b) (Tableau 7) et la Truite (Le Mével *et al.*, 1996; Lancien *et al.*, 2004). L'application directe d'Ull dans les noyaux paraventriculaire et arqué, ou dans l'aire A1, a permis de montrer que ces structures cérébrales sont en partie responsables des activités centrales du système urotensinergique dans le contrôle de l'activité cardiaque (Lu *et al.*, 2002) (Tableau 7). L'ensemble de ces travaux met en évidence un rôle du système urotensinergique dans le contrôle central et périphérique du système cardiovasculaire, dépendant de l'espèce étudiée et du mode de traitement.

1.4.1.3. Ull et maladies vasculaires

La présence d'Ull circulante associée aux propriétés vasoactives de l'Ull et de l'URP constituaient des éléments clés en faveur d'un rôle du système urotensinergique dans les processus liés à l'hypertension artérielle. De fait, les patients atteints d'une hypertension systémique présentent des taux plasmatiques (Cheung *et al.*, 2004) et urinaires (Matsushita *et al.*, 2001) d'Ull supérieurs à ceux retrouvés chez les sujets normo-tendus. Par ailleurs, une forte immunoréactivité liée à la présence d'Ull a été retrouvée dans les cellules endothéliales et les macrophages au niveau des coronaires de patients atteints d'athérosclérose (Ames *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2004). Ainsi, l'Ull pourrait notamment participer aux processus de remodelage tissulaire liés à l'athérosclérose, en stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses (Sauzeau *et al.*, 2001), qui permettrait ainsi une augmentation du diamètre de la paroi des vaisseaux. De plus, l'activité mitogène de l'Ull est potentialisée par la forme oxydée

de la *low-density lipoprotein* (LDL) libérée par les cellules endothéliales (Watanabe *et al.*, 2001). Enfin, l'extravasation que peut induire l'UII au niveau de l'aorte thoracique chez le Rat (Gendron *et al.*, 2004) pourrait favoriser l'infiltration de cellules inflammatoires activées, elles-mêmes susceptibles d'exacerber la pathogénicité de l'athérosclérose.

1.4.1.4. UII et maladies du myocarde

Bien que les maladies cardiaques soient souvent intimement liées aux processus physiopathologiques vasculaires, il semble que l'UII puisse être directement impliquée dans certaines pathologies cardiaques, dont l'infarctus du myocarde. D'après une étude menée par Richards *et al.* (2002), les concentrations plasmatiques d'UII sont positivement corrélées avec la sévérité de la maladie. Très récemment, une autre équipe a montré, à l'aide d'un modèle animal d'insuffisance cardiaque congestive, que l'UII, l'URP et l'UT sont surexprimés dans le tissu cardiaque (Richards *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que le niveau d'expression de l'URP est dix fois supérieur à celui de l'UII, suggérant ainsi que l'URP pourrait jouer un rôle important dans cette pathologie (Nakayama *et al.*, 2008).

La capacité de l'UII à induire la prolifération de fibroblastes cardiaques (Tzanidis *et al.*, 2003; He *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004), l'hypertrophie de cardiomyocytes (Zou *et al.*, 2001), et la surexpression de collagène dans les fibroblastes cardiaques (Tzanidis *et al.*, 2003) et les cellules endothéliales (Wang *et al.*, 2004), suggère que le peptide pourrait être à l'origine d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi cardiaque elle-même responsable d'une réduction de l'élasticité

tissulaire et de la contractilité. Le fait que l'U-II et l'UT soient co-exprimés dans les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, suggère que le peptide agirait de façon autocrine/paracrine (Douglas *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces travaux indique que le système urotensinergique est susceptible de jouer un rôle central dans l'induction et/ou le développement de certaines pathologies cardiovasculaires.

1.4.2. Effets sur le système immunitaire

Plusieurs travaux ont révélé que le récepteur UT est exprimé à la surface de certaines cellules immunitaires telles que les macrophages et les lymphocytes B (Bousette *et al.*, 2004). De plus, les zones d'infiltration des macrophages présentent une immunoréactivité spécifique pour l'U-II (Maguire *et al.*, 2004) et ce peptide provoque une extravasation plasmatique chez la Souris (Vergura *et al.*, 2004) et le Rat (Gendron *et al.*, 2004), suggérant que le système urotensinergique participerait aux processus de l'inflammation en favorisant le passage de cellules infiltrantes. Plus récemment, une étude menée par Segain *et al.* (2007) sur des monocytes humains permet de considérer l'U-II comme un véritable facteur chémo-attractant. Il est à noter que l'expression du gène *UT* est elle-même régulée par des facteurs proinflammatoires tels que l'interleukine-1 β (IL-1 β), le *tumor necrosis factor*- α (TNF- α) et l'interféron- γ (IFN- γ), mais également par d'autres stimuli comme le lipopolysaccharide (LPS) *via* l'activation des voies NF- κ B et RhoA/Rho kinase (Segain *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces résultats indique que le système urotensinergique interviendrait dans la réponse immunitaire en favorisant notamment le recrutement de monocytes dans la zone inflammée.

1.4.3. Effets rénaux de l'UII

La présence de quantités particulièrement élevées d'UII et d'UT au niveau rénal suggérait un rôle crucial de l'UII dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral (Tableau 6). Dès 1981, Marshall et Bern ont montré, sur un modèle de vessie de Gobie, que l'UII favorise la recapture de sodium. Administrée chez le Rat de façon prolongée par voie i.c.v., l'UII augmente le taux de filtration glomérulaire (Zhang *et al.*, 2003). Cependant, des effets radicalement opposés sont observés quand le peptide est injecté en bolus (Balment *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006). Le fait que l'urantide, un antagoniste de l'UT (Patacchini *et al.*, 2003), soit capable d'entraîner une élévation de la filtration glomérulaire, de la diurèse et de la natriurèse (Song *et al.*, 2006), plaide en faveur de l'implication de ce récepteur dans les effets stimulants de l'UII.

Chez des patients atteints d'une néphropathie consécutive au *diabetes mellitus*, les quantités d'UII mesurées dans le plasma (Totsune *et al.*, 2001) et dans les urines (Langham *et al.*, 2004) sont considérablement augmentées. Particulièrement élevés chez les malades souffrant d'une néphropathie en stade final, les taux circulants d'UII sont inversement proportionnels au débit cardiaque (Mallamaci *et al.*, 2005), suggérant que l'UII jouerait, dans ce cas précis, un rôle cardioprotecteur. Cependant, dans un modèle d'ischémie rénale, le blocage de l'UT prévient la diminution du flux rénal sanguin responsable de lésions tubulo-interstitielles (Clozel *et al.*, 2004), laissant

penser que dans cette pathologie, le système urotensinergique aurait une action néfaste. Ces deux exemples apparemment contradictoires, illustrent la complexité de l'action du système urotensinergique dans un contexte pathologique rénal.

1.4.4. Effets sur le système endocrine

Les premières études réalisées chez des poissons ont montré que l'UII inhibe la libération de prolactine (PRL) (Grau *et al.*, 1982; Rivas *et al.*, 1986) et augmente le taux plasmatique de cortisol (Arnold-Reed et Balment, 1994; Kelsall et Balment, 1998) (Tableau 6). A l'inverse, l'UII entraîne une hausse des quantités circulantes de TRH et de PRL chez le Rat (Gartlon *et al.*, 2001). Chez cette même espèce, l'application d'UII sur des cellules corticosurréaliennes en culture diminue de façon dose-dépendante la sécrétion basale de corticostérone mais ne modifie pas la sécrétion stimulée par l'hormone corticotrope (Albertin *et al.*, 2006) (Tableau 6). Par ailleurs, l'UII inhibe la libération d'insuline induite par le glucose (Silvestre *et al.*, 2001; 2004), inhibition levée en présence de palosuran ou d'urantide (Marco *et al.*, 2008), deux antagonistes de l'UT. L'implication potentielle du système urotensinergique dans le contrôle de la glycémie est confortée par deux études qui rapportent la présence de concentrations d'UII plasmatiques élevées chez des patients souffrant d'un diabète de type II (Totsune *et al.*, 2003; Suguro *et al.*, 2008). Enfin, des travaux menés chez des sujets présentant le polymorphisme 89N du gène de l'UII montrent l'existence d'une corrélation avec les taux plasmatiques de glucose et d'insuline, indiquant une possible résistance à l'insuline (Sun *et al.*, 2002; Wenyi *et al.*, 2003).

	Homme	Singe	Rat	Souris
Système vasculaire				
In vitro				
anneaux d'aorte	Constriction ^{9,20,21,23}	Constriction ⁴	Constriction ^{4,8,9,10,11,19}	
a. fémorale	Dilatation ²⁰		Dilatation ⁴	
a. pulmonaire	Dilatation ²⁰		Constriction ²⁰ , Dilatation ⁴	
a. mésentérique	Dilatation ²⁰		Constriction ^{6,9} , Dilatation ^{4,8,13}	
a. de résistance			Dilatation ⁸	
v. saphène	Constriction ²¹			
v. ombilicale	Constriction ^{9,21}			
In vivo				
i.v. chronique	Vasoconstriction ⁷	Vasoconstriction ^{4,31}		
i.v. aiguë	Vasoconstriction ²¹	Arrêt cardiaque ^{4,31}	Dilatation ¹²	
i.d.	Vasoconstriction ¹⁹			
Système cardiaque				
In vitro				
a. coronaire	Constriction ²¹		↑Pression artérielle ¹⁷	
			Constriction ⁸ Dilatation ^{8,22}	
ventricule droit	↑Contractilité ²⁶		↑Contractilité ¹⁶	
oreillette droite	↑Contractilité ²⁴		↑Contractilité ²⁴ , Prolifération ²⁴	
m. papillaire			Hypertrophie ³²	
cardiomyocytes				
In vivo				
i.v. chronique			↓Pression artérielle ^{13,15}	
			↑Pression artérielle ⁶	
			↑Résistance vasculaire ⁶	
i.v. aiguë			↓Pression artérielle ^{1,13,15,18}	
			↑Rythme cardiaque ^{1,13,15,18}	
			Tachycardie ^{12,15}	
Système immunitaire				
In vivo				
i.v. chronique			Extravasation ¹⁴	Extravasation ²⁸
In vitro				
culture PBMC	Chémo-attraction ²⁵			
Système rénal				
i.v. chronique			Filtration glomérulaire (↓) ² , (↑) ³⁰	
			Excrétion de Na ⁺ (↓) ² , (↑) ³⁰	
			Débit urinaire (↓) ² , (↑) ²⁹ , Flux sanguin (↓) ² , (↑) ³⁰	
i.v. aiguë			↓Filtration glomérulaire ^{5,28}	
			↓Excrétion de Na ⁺ ^{5,28}	
			↓Débit urinaire ^{5,27} , ↓Flux sanguin ⁵	
Système endocrine				
Perfusion pancréatique			↓Libération d'insuline ^{26,27}	
Cellules cortico-surrénales			↓Libération basale de corticostérone ³	

Tableau 6: Effets périphériques de l'UII chez les mammifères. 1, Abdelrahman et Pang, 2002; 2, Abdel-razik et al., 2008; 3, Albertin et al., 2006; 4, Ames et al., 1999; 5, Balment et al., 2005; 6, Bennett et al., 2004; 7, Böhm et Pernow, 2002; 8, Bottrill et al., 2000; 9, Camarda et al., 2002a; 10, Camarda et al., 2002b; 11, Chatenet et al., 2004; 12, Gardiner et al., 2001; 13, Gardiner et al., 2004; 14, Gendron et al., 2004; 15, Gibson et al., 1986; 16, Gong et al., 2004; 17, Gray et al., 2001; 18, Hassan et al., 2003; 19, Leslie et al., 2000; 20, MacLean et al., 2000; 21, Maguire et al., 2000; 22, Prosser et al., 2006; 23, Russell et al., 2001; 24, Sauzeau et al., 2001; 25, Segain et al., 2007; 26, Silvestre et al., 2001; 27, Silvestre et al., 2004; 28, Song et al., 2006; 29, Vergura et al., 2003; 30, Zhang et al., 2003; 31, Zhu et al., 2004; 32, Zou et al., 2003. a., artère; i.d., intradermique; .v. intraveineuse; m., muscle; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; v., veine.

1.4.5. Effets comportementaux

La distribution de l'Ull et de l'UT dans le SNC laissait présager un rôle du système urotensinergique dans le contrôle des processus liés au comportement (Tableau 7). Même si les données disponibles à ce jour sont relativement limitées, il est acquis que l'injection d'Ull par voie i.c.v. augmente l'activité motrice de façon dose-dépendante et prolongée chez le Rat (Gartlon *et al.*, 2001), la Souris (Do Rego *et al.*, 2005) (Tableau 7) et la Truite (Lancien *et al.*, 2004). Ces résultats sont en adéquation avec la présence de l'UT dans le striatum, le noyau accumbens, le cortex cérébral ou la moelle épinière (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Coulouarn *et al.*, 1998; 1999; 2001; Gartlon *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2001).

Plusieurs tests comme le labyrinthe en croix surélevé, la chambre à compartiments sombre/clair, la planche à trous et la suspension par la queue, ont permis de mettre en évidence des propriétés anxiogènes et dépressives de l'Ull chez la Souris (Matsumoto *et al.*, 2004; Do Rego *et al.*, 2005) (Tableau 7), suggérant fortement que le système urotensinergique interviendrait dans l'apparition de certains troubles de l'humeur. L'expression du récepteur UT au niveau de l'hypothalamus (aire ventromédiane, noyaux arqué et supraoptique), du tronc cérébral (noyaux du tractus solitaire et parabrachial) suppose que l'Ull pourrait participer, à l'instar de nombreux autres neuropeptides, au contrôle de la prise alimentaire (Gartlon *et al.*, 2001; Jégou *et al.*, 2006). De fait, l'Ull présente chez la Souris des propriétés orexigènes (Do Rego *et al.*, 2005) (Tableau 7), laissant entrevoir de nouvelles applications thérapeutiques potentielles pour ce peptide dans le traitement des troubles de l'alimentation.

	Rat	Souris
Système nerveux central		
μ.i. <i>Aire tegmentale ventrale</i>	↑[DA] _{extracellulaire} ²	
infusion <i>Tranche cortex cérébral</i>	↑[NE] ¹⁰ , ↑[DA] ¹⁰ , ↑[5-HT] ¹⁰ , ↑[Histamine] ¹⁰	
NEC	↑Angiogenèse ¹¹	
Effets comportementaux		
μ.i. <i>tegmentum</i>	↑Sommeil paradoxal ⁵	
i.c.v.	↑Activité motrice ^{2,4}	↑Activité motrice ^{2,3} Anxiogène ^{3,9} Prodépressif ^{3,9} Orexigène ³
Système cardiovasculaire		
μ.i. <i>NPV</i>	Hypertension systémique ⁸	
<i>NA</i>	Hypertension systémique ⁸	
<i>Aire A₁ (forte dose)</i>	↓ Débit cardiaque ⁸	
<i>Aire A₁ (faible dose)</i>	↓ Pression artérielle ⁸	
i.c.v.	Dilatation ¹ ↑Flux sanguin cérébral ¹ ↑Pression artérielle ^{6,7} ↑Débit cardiaque ^{6,7}	
Système endocrine		
i.c.v.	↑Libération de TSH et PRL ⁴	

Tableau 7: Effets centraux de l'Ull chez les rongeurs. **1**, Chuquet *et al.*, 2008; **2**, Clark *et al.*, 2005; **3**, Do Rego *et al.*, 2005; **4**, Gartlon *et al.*, 2001; **5**, Huitron-Resendiz *et al.*, 2005; **6**, Lin *et al.*, 2003a; **7**, Lin *et al.*, 2003b; **8**, Lu *et al.*, 2002; **9**, Matsumoto *et al.*, 2004; **10**, Ono *et al.*, 2008; **11**, Spinazzi *et al.*, 2006; **12**, Watson *et al.*, 2008. 5-HT, sérotonine; DA, dopamine; i.c.v., intracérébroventriculaire; μ.i., microinjection; NA_q, noyau arqué; NE, norépinéphrine; NEC, *Neuromicrovascular endothelial cell*; NPV, noyau paraventriculaire; PRL, prolactine; TSH, *thyroid stimulating hormone*, thyroïdostimuline.

Le sommeil est classiquement divisé en trois phases, *i.e.* sommeils léger, profond et paradoxal. Ce dernier s'accompagne de mouvements rapides des yeux (*rapid eye movements*) contrôlés par des neurones cholinergiques localisés dans l'aire tegmentale (Monaco *et al.*, 1984; Webster et Jones, 1988; Baghdoyan *et al.*, 1989; Quattrochi *et al.*, 1989; Steriade *et al.*, 1990). Or, le tegmentum est particulièrement

riche en ARNm codant l'UT (Clark *et al.*, 2001) et une microinjection d'UII dans cette zone se traduit chez le Rat par une augmentation du nombre et de la durée des phases de sommeil paradoxal (Huitron-Resendiz *et al.*, 2005) (Tableau 7).

Il convient de noter que contrairement à ce qui est communément observé pour d'autres peptides impliqués dans la régulation du sommeil tels que l'hypocrétine 1 (Xi *et al.*, 2001), les deux autres phases ne sont pas modifiées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'hypocrétine agit à la fois sur les systèmes cholinergique et glutamatergique, alors que l'UII ne mobiliserait que les neurones cholinergiques (Burlet *et al.*, 2002).

2. Les astrocytes

Dès la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, Rudolf Virchow apportait la preuve de l'existence d'une population cellulaire non neuronale dans le SNC, appelée *nerve glue* ou névroglie, et apparemment responsable du maintien de la cohésion des structures nerveuses (Virchow, 1846). Contrairement aux neurones, les cellules gliales ne génèrent pas de potentiels d'action et n'établissent pas de contact de nature synaptique. Sur des critères morphologiques et fonctionnels, on distingue trois grands types de cellules gliales, *i.e.* les oligodendrocytes, la microglie et les astrocytes. Ces derniers tirent leur nom de leur structure étoilée et constituent la population gliale majoritaire (70% environ). Ils possèdent de nombreux prolongements dont les extrémités renflées, appelées pieds astrocytaires, sont en étroit contact avec d'autres cellules (neurones, astrocytes, oligodendrocytes, cellules endothéliales). Il est possible de révéler la présence des astrocytes par immunohistochimie à l'aide d'anticorps

dirigés contre des marqueurs cellulaires tels que la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) ou la glutamine synthase (Eng *et al.*, 2000; Suárez *et al.*, 2002).

2.1. Rôles des astrocytes en conditions physiologiques

Longtemps reléguée comme simple tissu de soutien, la glie en général et les astrocytes en particulier ont fait l'objet d'intenses recherches au cours des trois dernières décennies. Il est dorénavant clairement établi que les astrocytes remplissent des fonctions nobles dans le cerveau en participant à la migration des précurseurs neuronaux, à la mise en place et au maintien de la barrière hématoencéphalique, à l'homéostasie potassique et acido-basique du microenvironnement des neurones et à leur soutien métabolique. Ces cellules participent également aux processus liés à la communication nerveuse et le schéma bipartite de la synapse, qui a longtemps fait référence dans les ouvrages scientifiques, est dorénavant obsolète. Il laisse dorénavant place à une organisation tripartite constituée des éléments neuronaux pré- et post-synaptiques et d'un astrocyte (Figure 6) à laquelle il devient classique d'ajouter une cellule endothéliale en étroit contact avec les pieds astrocytaires.

2.1.1. Rôles dans la neurogenèse

La migration des neuroblastes au cours de l'ontogenèse du SNC implique la présence d'une population particulière d'astrocytes appelée glie radiaire. Grâce à leurs longs prolongements, ces cellules assurent le guidage des précurseurs neuronaux jusqu'à leur destination finale (Rakic, 1995; McDermott *et al.*, 2005). Cultivées sur une monocouche d'astrocytes, les cellules souches issues de la région subventriculaire

(Lim et Alvarez-Buylla, 1999) ou de l'hippocampe (Song *et al.*, 2002) s'orientent vers le lignage neuronal, suggérant fortement que les cellules astrogliales participent également aux processus de différenciation cellulaire.

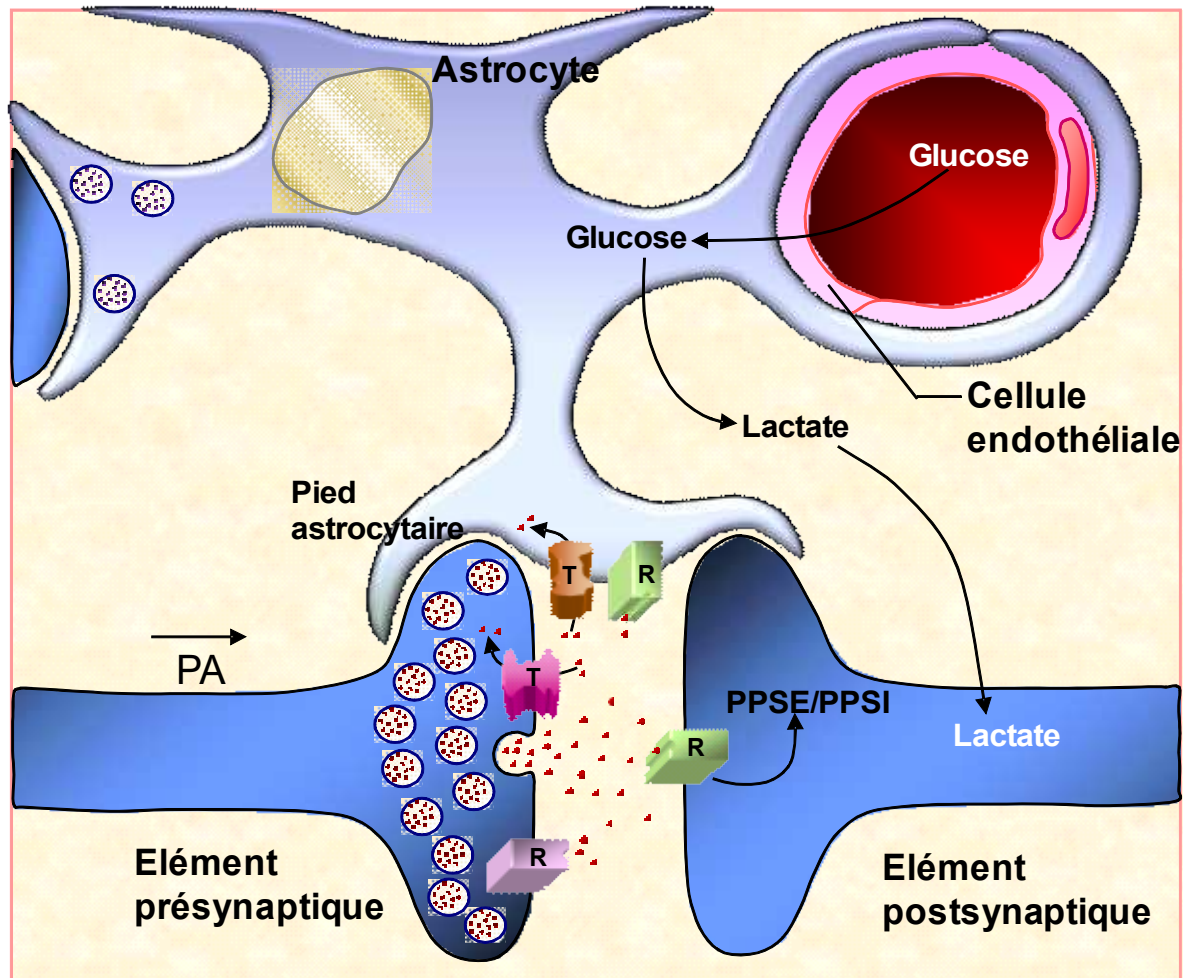


Figure 6: Représentation schématique d'une synapse tripartite. Les astrocytes (■) établissent des relations étroites avec les neurones (■) et les cellules endothéliales (■) et participent ainsi au contrôle de la neurotransmission. PA, potentiel d'action; PPSE, potentiel postsynaptique excitateur; PPSI, potentiel postsynaptique inhibiteur, R, récepteur; T, transporteur.

Par ailleurs, dans des co-cultures astrocytes/neurones, la population neuronale présente cinq fois plus de synapses qu'en monoculture, révélant ainsi que les astrocytes interviendraient également dans la synaptogenèse (Ullian *et al.*, 2001; Slezak et Pfrieder, 2003), *via* la libération de cholestérol dans le milieu extracellulaire (Mauch *et al.*, 2001; Slezak et Pfrieder, 2003). En stimulant l'expression de récepteurs

neuronaux post-synaptiques, le $\text{TNF-}\alpha$ (Beattie *et al.*, 2002) et/ou l'*activity-dependent neurotrophic factor* (ADNF) (Blondel *et al.*, 2000), seraient deux autres facteurs libérés par les astrocytes et impliqués dans la synaptogenèse.

2.1.2. Rôles dans la mise en place et le maintien de la barrière hématoencéphalique

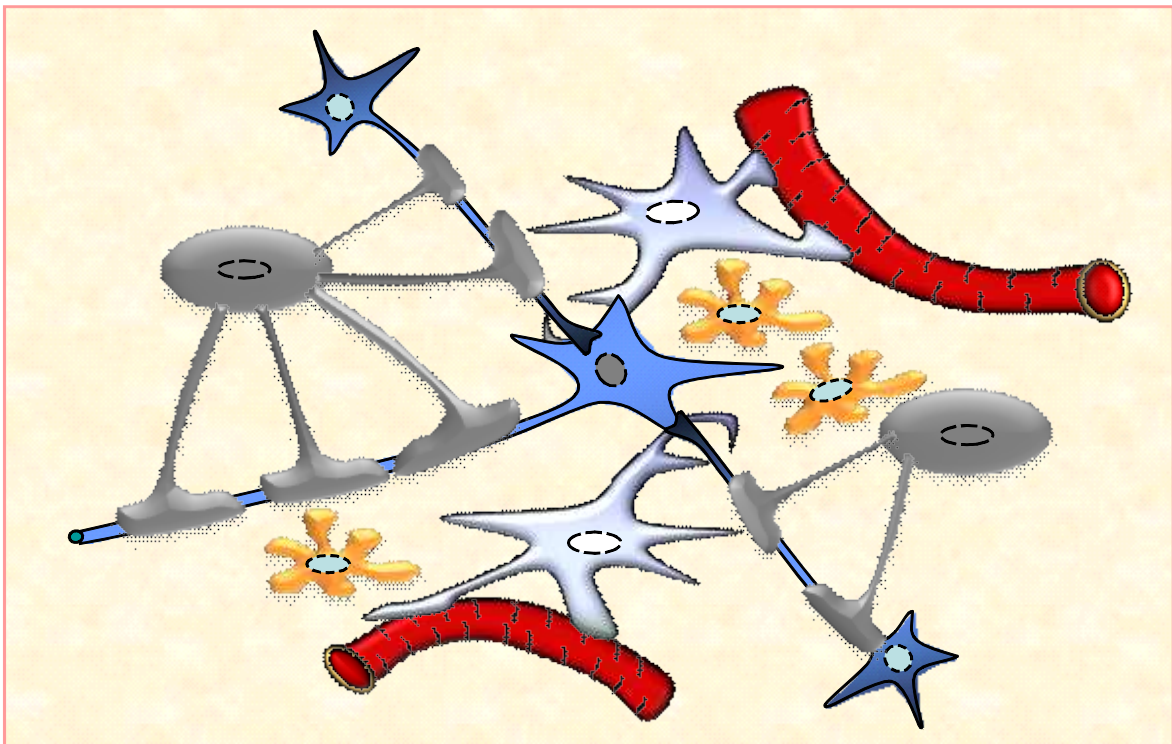


Figure 7: Schéma représentant les interactions entre les différentes populations cellulaires du SNC: **neurones** (■), **oligodendrocytes** (◐), **microglie** (◑) et **astrocytes** (◒). Les oligodendrocytes constituent la gaine de myéline. La microglie assure la fonction immunitaire localement. Les astrocytes régulent la fonction synaptique et établissent un lien entre le SNC et la vascularisation (◓).

La barrière hématoencéphalique (BHE) qui sépare le tissu sanguin et le parenchyme nerveux, est une structure quasi imperméable qui résulte de l'organisation particulière des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux qui produisent une lame basale et établissent entre elles des jonctions serrées ou *tight junctions*

(Wolburg et Lippoldt, 2002; Hawkins et Davis, 2005). Il est important de préciser que les astrocytes constituent eux-mêmes *in vivo* une sorte de barrière appelée *glia limitans*, différente de la BHE, qui correspond au recouvrement des cellules endothéliales par les pieds astrocytaires (Figure 7). Des études *in vitro* ont montré que le nombre de jonctions serrées diminue considérablement lorsque les cellules endothéliales cérébrales sont cultivées seules (Abbott, 2002). Cependant, en présence de surnageants de culture d'astrocytes, ces cellules établissent à nouveau d'étroits contacts entre elles, indiquant que les astrocytes libèrent des facteurs stimulant la mise en place de la BHE. On sait aujourd'hui qu'il s'agit notamment du *transforming growth factor- β* (TGF- β), du *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) et du *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Igarashi *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Abbott, 2002). La BHE n'est pas totalement étanche et les astrocytes, qui constituent un passage incontournable entre le sang et les neurones, permettent des échanges sélectifs, contribuant ainsi à la régulation de l'approvisionnement énergétique des cellules neuronales.

2.1.3. Rôles dans le contrôle du micro-environnement neuronal

L'activité neuronale entraîne des modifications de la composition ionique de l'espace synaptique qu'il est important de rétablir pour optimiser la neurotransmission. Le pH extracellulaire (pH_e) et la concentration extracellulaire de potassium ([K⁺]_e) sont deux paramètres particulièrement importants.

Les valeurs physiologiques du pH dans le micro-environnement neuronal oscillent entre 7,1 et 7,35. De nombreux récepteurs et canaux, *e.g.* les récepteurs

NMDA et GABA_A, et les canaux calciques voltage-dépendants, sont extrêmement sensibles aux variations du pH_e. Or, une intense activité neuronale s'accompagne d'une acidification du compartiment extracellulaire. Celle-ci est rapidement compensée par les astrocytes grâce aux co-transporteurs Na⁺/HCO₃⁻ et Cl⁻/HCO₃⁻ présents au niveau de leur membrane plasmique (Katsura *et al.*, 1994; Deitmer et Rose, 1996).

En cas de dépolarisation neuronale, les ions K⁺ libérés dans le milieu extracellulaire sont en grande partie captés par les astrocytes, soit passivement grâce à un co-transporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (Newman, 1999), soit activement *via* une pompe Na⁺/K⁺ ATPase (Clausen, 1992; Silver et Erecinska, 1997). L'influx de K⁺ dans les astrocytes s'accompagne d'une entrée d'eau responsable d'un gonflement temporaire des cellules connu sous le terme d'*astrocyte swelling* (Katayama *et al.*, 1990; Bullock *et al.*, 1991; Kimelberg, 1992). L'excès de K⁺ dans les astrocytes est ensuite redistribué sur plusieurs centaines de µm par l'intermédiaire des nombreuses *gap-junctions* qui relient les astrocytes entre eux (Rose et Ransom, 1997).

2.1.4. Rôles dans le soutien métabolique des neurones

Le transfert du glucose du sang jusqu'au parenchyme nerveux s'effectue grâce à des transporteurs actifs, comme GLUT-1 (Morgello *et al.*, 1995) qui est principalement exprimés par les cellules endothéliales et les astrocytes (Yu *et al.*, 1995; Kacem *et al.*, 1998; Regina *et al.*, 2001). Dans les astrocytes, le glucose est métabolisé en lactate, substrat libéré dans le milieu interstitiel et directement assimilable par les neurones (Dringen *et al.*, 1993a; Deitmer, 2001). Les astrocytes

sont en outre capables de stocker les sucres sous forme de glycogène (Dringen *et al.*, 1993b; Dienel et Cruz, 2003) qui peut, en cas de nécessité, être métabolisé en lactate. Cette source énergétique peut s'avérer cruciale à court terme, notamment en cas d'hypoglycémie ou d'ischémie cérébrale (Wender *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003).

2.1.5. Rôle dans la communication cellulaire

Les astrocytes expriment naturellement des transporteurs sélectifs de neurotransmetteurs, notamment ceux du glutamate, du GABA et des monoamines (Chatton *et al.*, 2003; Inazu *et al.*, 2003). Ces protéines membranaires permettent de réguler la concentration de ces substances dans l'espace synaptique, contrôlant et protégeant ainsi l'activité neuronale (Inazu *et al.*, 2003). Ceci constitue la fonction la plus anciennement caractérisée et la plus étudiée des astrocytes dans la communication cellulaire.

S'il est clairement admis que les astrocytes participent au contrôle de la neurotransmission, des études récentes montrent que ces cellules sont elles-mêmes capables de produire et libérer des substances neuroactives, appelées gliotransmetteurs (Martin, 1992; Wolosker *et al.*, 2002; Boehning et Snyder, 2003; Ubink *et al.*, 2003; Do *et al.*, 2004). Parmi ces composés figurent des neurotransmetteurs classiques, des neuropeptides et des neurostéroïdes, tous susceptibles de moduler l'activité neuronale. Des travaux menés *in vitro* (Parpura *et al.*, 1994; Hassinger *et al.*, 1995) et *in situ* (Pasti *et al.*, 1997; Parri *et al.*, 2001) ont notamment démontré que le glutamate d'origine astrocytaire active les récepteurs neuronaux post-synaptiques de type AMPA et NMDA. Parmi les autres gliotransmetteurs importants, on retrouve la D-sérine, qui

est exclusivement produite par les astrocytes (Martineau *et al.*, 2006). La D-sérine joue un rôle important dans la régulation de l'activation des récepteurs à NMDA (Mothet *et al.*, 2000). En effet, en agissant en tant que co-agoniste du glutamate, cet a.a. intervient dans la neurotoxicité (Katsuki *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Shleper *et al.*, 2005; Kartvelishvily *et al.*, 2006; Katsuki *et al.*, 2007; Sasabe *et al.*, 2007), la migration cellulaire (Mustafa *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005) et la plasticité synaptique (Mothet *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Junjaud *et al.*, 2006; Panatier *et al.*, 2006; Gustafson *et al.*, 2007). Son implication dans la plasticité synaptique se traduit par le processus de potentialisation à long terme ou LTP (*long-term potentiation*), notamment au niveau de l'hippocampe, permettant ainsi d'illustrer le rôle des astrocytes dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Mothet *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003).

D'autres composés sont considérés comme de véritables gliotransmetteurs. Il s'agit des stéroïdes neuroactifs d'origine gliale (Lambert *et al.*, 1995; 2003) et des endozépines (Lamacz *et al.*, 1996; Patte *et al.*, 1999; Masmoudi *et al.*, 2003; 2005), connus pour leur capacité à moduler positivement ou négativement la fonction GABAergique par l'intermédiaire du récepteur GABA_A (Tonon *et al.*, 1989; Louiset *et al.*, 1993). Au niveau cérébral, les endozépines seraient impliquées dans l'induction de certains troubles de l'humeur (Costa *et al.*, 1983; Guidotti *et al.*, 1983; Ferrero *et al.*, 1986; Kavaliers et Hirst, 1986; Slobodyansky *et al.*, 1989; De Mateos-Verchère *et al.*, 1998), dans le contrôle de la prise alimentaire (De Mateos-Verchère *et al.*, 2001) et de la prolifération astrocytaire (Gandolfo *et al.*, 1999; 2001).

Ligands	Récepteurs	Références
Neurotransmetteurs		
ACh	mAChR ₁₋₅ ; nAChR(α) ₇ (β) ₂	6,13,28,30,35,40
GABA	A; B _{1A,1B,2}	7,19,58
Glutamate	AMPA/Kainate (GluR _{2/3} /GluR _{6/7}); NMDA, mGluR _{3,5}	1,5,49,66,67,68
Histamine	H1; H2	21,38,39,42
Noradrénaline	α_1 ; α_2 ; β_1 ; β_2	14,41,56
Purines	P2X _{1-5,7} ; P2Y _{1,2,4,6,12,14} ; A1; A2; A3	3, 8, 20,22,30,59
Sérotonine	5-HT _{1A,B,D,F} ; 5-HT _{2A,B,C} ; 5-HT _{5B} ; 5-HT ₆ ; 5-HT ₇	9,25,31,50,64
Peptides		
Angiotensine	AT _{1a,b} ; AT ₂	18,26,73
β -amyloïde	FPRL1; RAGE ; SR _{BI}	36, 43, 59, 72
Bombésine	BB2	33,49
Bradykinine	B2	37
Cholécystokinine	CCK _B	34,54
CGRP	A-CGRP; K-CGRP	33,52,53,62
Endothélines	ET _A ; ET _B	4,11,45,46,65,70,76
Endozépines	CBR; PBR, R métabotrope	23,24,44,57
Mélanocortines	Y1	63,85
Neuropeptide Y	NT2; NT3	27,69
Neurotensine	ER _{α} ; ER _{β}	55,78
Ocytocine		12
Œstrogènes	ER _{α} ; ER _{β}	34,35,61
Peptides natriurétiques	ANPR _A ; ANPR _B ; ANPR _C	73,81,82
Peptides opioïdes	μ ; δ ; κ	15,71,77
Somatostatine	SST1; SST2; SST4	17,29,47
Thrombine	PAR1; PAR3; PAR4	10,79,80
Vasopressine	V1a	83,84
VIP/PACAP	PAC1; VPAC1; VPAC2	2,16,48,74,75

Tableau 8: Récepteurs exprimés par les astrocytes. 1, Aronica *et al.*, 2003; 2, Arshur-Fabian *et al.*, 1997; 3, Biber *et al.*, 1997; 4, Blomstrand *et al.*, 1999; 5, Brand-Schieber et Werner, 2003; 6, Catlin *et al.*, 2000; 7, Charles *et al.*, 2003; 8, Chen *et al.*, 2001; 9, Cohen *et al.*, 1999; 10, Debeir *et al.*, 1996; 11, Desagher *et al.*, 1997; 12, Di Scala-Guenot *et al.*, 1994; 13, Elhusseiny *et al.*, 1999; 14, Enkvist *et al.*, 1996; 15, Eriksson *et al.*, 1990; 16, Fatatis *et al.*, 1994; 17, Feindt *et al.*, 1995; 18, Fogary *et al.*, 2002; 19, Fraser *et al.*, 1995; 20, Fumagalli *et al.*, 2003; 21, Fukui *et al.*, 1991; 22, Gallagher et Salter, 2003; 23, Gandolfo *et al.*, 1997; 24, Gandolfo *et al.*, 2001; 25, Garcia *et al.*, 1997; 26, Gebke *et al.*, 1998; 27, Gimpl *et al.*, 1993; 28, Graham *et al.*, 2002; 29, Grimaldi *et al.*, 1997; 30, Gustavsson *et al.*, 1993; 31, Hirst *et al.*, 1998; 32, Haas *et al.*, 1991; 33, Hosli et Hosli, 1994; 34, Hosli *et al.*, 2000; 35, Hosli *et al.*, 2001; 36, Husemann et Silverstein, 2001; 37, Ikeda *et al.*, 2000; 38, Inagaki et Wada, 1994; 39, Kondou *et al.*, 1991; 40, Kondou *et al.*, 1994; 41, Kotter et Klein, 1999; 42, Kubo *et al.*, 1991; 43, Le *et al.*, 2000; 44, Leprince *et al.*, 1998; 45, Lin et Chuang, 1992; 46, Marin *et al.*, 1991a; 47, Marin *et al.*, 1991b; 48, Martin *et al.*, 1992; 49, Mason *et al.*, 2002; 50, Maxishima *et al.*, 2001; 51, Moldrich *et al.*, 2002; 52, Morara *et al.*, 1998; 53, Moreno *et al.*, 1999; 54, Muller *et al.*, 1997; 55, Nouel *et al.*, 1999; 56, Oliva *et al.*, 1997; 57, Patte *et al.*, 1995; 58, Patte *et al.*, 1999; 59, Park *et al.*, 2004; 60, Peakman et Hill, 1994; 61, Platania *et al.*, 2003; 62, Priller *et al.*, 1998; 63, Salomon *et al.*, 1993; 64, Sanden *et al.*, 2000; 65, Schinelli *et al.*, 2001; 66, Schipke *et al.*, 2001; 67, Seifert *et al.*, 2003; 68, Servitja *et al.*, 2003; 69, St-Pierre *et al.*, 2000; 70, Stanimirovic *et al.*, 1995; 71, Stiene-Martin *et al.*, 2001; 72, Stix et Reiser, 1998; 73, Sumner *et al.*, 1994; 74, Tatsuno *et al.*, 1996; 75, Tatsuno et Arimura, 1994; 76, Tence *et al.*, 1992; 77, Thorlin *et al.*, 1998; 78, Trudeau *et al.*, 2000; 79, Wang *et al.*, 2002a; 80, Wang *et al.*, 2002b; 81, Yeung *et al.*, 1996a; 82, Yeung *et al.*, 1996b; 83, Zhao et Brinton, 2002; 84, Zhao et Brinton, 2003; 85, Zohar et Salomon, 1993.

Les relations entre les neurones et les astrocytes ne sont pas unidirectionnelles.

En effet, les astrocytes expriment eux-mêmes de nombreux récepteurs (Tableau 8)

(Porter et McCarthy, 1997; Deschepper, 1998). Dans certains cas, ces cellules

expriment à la fois le ligand et le récepteur, ce qui sous-tend une régulation de leur activité de type autocrine/paracrine. A titre d'exemple, la somatostatine, libérée par les astrocytes, inhibe la sécrétion d'IL-6 par ces cellules (Grimaldi *et al.*, 1997).

2.2. Rôles des astrocytes en conditions pathologiques

2.2.1. Notion d'astrogliose réactionnelle

Lors d'une atteinte du SNC, d'ordre traumatique ou neurodégénératif, la perte de neurones provoque une activation des astrocytes, appelée astrogliose réactionnelle. Il s'agit d'un profond changement phénotypique de ces cellules (Fitch et Silver, 1997) qui se traduit par une multiplication et un gonflement cellulaire associé à une forte augmentation de l'expression de la GFAP. Ces cellules réactives interviennent dans la restauration de l'homéostasie cérébrale (Fitch et Silver, 1997), la limitation de la zone atteinte et la régénération de tissus lésés (Stichel et Müller, 1998; Sofroniew, 2005). Pour cela, elles migrent à partir de régions saines pour cloisonner la zone lésée du reste du SNC (Hatten *et al.*, 1991; Eddleston et Mucke, 1993; Norenberg et Bender, 1994; Ridet *et al.*, 1997; McGraw *et al.*, 2001). Lors de ce phénomène, les progéniteurs cellulaires qui expriment la nestine, un marqueur spécifique de ces cellules, peuvent se différencier en astrocytes (Frisen *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1999), qui participent alors à la mise en place de la glie cicatricielle.

2.2.2. Rôles dans les maladies neurodégénératives

Comme en témoignent les nombreuses données bibliographiques des vingt dernières années, les astrocytes sont impliqués dans la mécanistique de la quasi-totalité

des maladies neurodégénératives, soit dans le processus pathologique lui-même, soit dans les processus de réparation déclenchés à la suite de la perte neuronale. Le phénomène d'astrogliose réactionnelle est d'ailleurs considéré comme une constante dans les attaques aiguës et chroniques du SNC (Marchetti *et al.*, 2005; Marchetti et Abbracchio, 2005). Mise à part la mise en place de la glie cicatricielle, le rôle des astrocytes est dépendant du type de pathologie concernée.

La chorée de Huntington est une maladie génétique létale à caractère dominant, caractérisée par l'apparition de mouvements brusques incontrôlés, d'un état dépressif et d'une diminution des capacités intellectuelles. Le mécanisme pathologique met en jeu une mutation du gène codant la huntingtine (Singhrao *et al.*, 1998; Hebb *et al.*, 1999), la protéine mutée présentant une répétition (> 36) du résidu glutamine (Menalled, 2005; Gil et Rego, 2008). Lors de la progression de la maladie, certaines fonctions astrocytaires sont altérées, notamment la recapture du glutamate synaptique qui résulte de la réduction du nombre de transporteurs (Arzberger *et al.*, 1997). Une étude réalisée sur des co-cultures astrocytes/neurones a révélé que lorsque les neurones expriment la forme mutée de la huntingtine, les astrocytes exercent une action protectrice. En revanche, si ce sont les astrocytes qui expriment la protéine mutée, une augmentation de la mort neuronale est observée (Shin *et al.*, 2005).

Avec le vieillissement de la population, le nombre de personnes atteintes d'une pathologie neurodégénérative augmente considérablement dans les pays développés. C'est tout particulièrement vrai pour la maladie d'Alzheimer qui est à la quatrième cause de décès en occident. Elle se caractérise par des troubles cognitifs importants associés à une perte de repères dans le temps et dans l'espace. Ces symptômes

résultent d'une perte neuronale, notamment dans les zones corticales associatives et l'hippocampe, due à l'accumulation de peptide β -amyloïde sous forme de plaques séniles (Jellinger et Hattens, 2006) qui stimulent une réponse de type inflammatoire orchestrée par l'action combinée des astrocytes et des cellules de la microglie. Les astrocytes produisent également la butyrylcholinestérase dont les niveaux d'expression sont considérablement augmentés chez les malades atteints de la maladie d'Alzheimer (Jellinger et Hattens, 2006)

2.2.3. Rôles dans l'ischémie cérébrale

L'ischémie cérébrale se caractérise par une chute du débit sanguin dans un territoire donné, responsable d'une mort neuronale. Cette dernière entraîne une astrogliose réactionnelle aboutissant à la formation d'une glie cicatricielle, qui limite la zone infarctée, induite par la libération massive de facteurs tels que des cytokines, des facteurs trophiques et des médiateurs de l'inflammation (Yong *et al.*, 1991; McMillan et Hong, 1994; Norenberg et Bender, 1994; Fawcett, 1997; Campbell, 2001; Schwartz *et al.*, 2001). Parallèlement, les astrocytes sécrètent des facteurs proangiogènes, pouvant initier la néoformation de tissus vasculaires, illustrant ainsi une des caractéristiques les plus importantes du SNC, la plasticité cérébrale. Parmi ces substances, les astrocytes réactifs expriment notamment le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Salhia *et al.*, 2000), facteur majeur dans la prise en charge de la néovascularisation physiologique (embryogenèse) ou physiopathologique (tumorigenèse, ischémie) (Folkman, 1995; Ferrara et Bunting, 1996). Le fait que le récepteur VEGF-R1 soit surexprimé en cas d'agression et tout particulièrement dans

les astrocytes suggère une fois encore, l'existence d'un processus de type autocrine (Krum et Rosenstein, 1998; 1999; Lennmyr *et al.*, 1998; Krum et Khaibullina, 2003; Rosenstein [et](#) Krum, 2004). Cependant, les effets de l'astrogliose peuvent s'avérer délétères, en particulier la glie cicatricielle inhibe la croissance neuritique, et donc la régénération du tissu cérébral (Davies *et al.*, 1996).

2.2.4. Astrocytes et tumeurs cérébrales d'origine gliale

Les tumeurs du SNC peuvent provenir de différents lignages cellulaires dont les lignages astrocytaire et oligodendrocytaire. Dans le cas des tumeurs gliales astrocytaires, trois grades malins sont répertoriés par l'organisation mondiale de la santé, *i.e.* l'astrocytome fibrillaire de grade II, l'astrocytome anaplasique de grade III et le glioblastome multiforme de grade IV. Les tumeurs gliales de grades III et IV, sujettes à de fréquentes récurrences après exérèse chirurgicale, radio- et/ou chimiothérapie(s), sont difficilement curables. La probabilité élevée de récurrence s'explique par une extraordinaire capacité d'invasion des cellules tumorales dans le tissu sain adjacent, rendant ainsi quasiment impossible une complète exérèse. Les glioblastomes sécrètent de nombreuses substances intervenant dans le recrutement des cellules inflammatoires telles que des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines (Hoelzinger *et al.*, 2007). Au voisinage des cellules tumorales, ces cellules inflammatoires initient différents processus, notamment la néoangiogenèse, la lymphangiogenèse, la prolifération et l'invasion cellulaires (Pollard, 2004), indiquant que le développement des astrocytomes met en jeu des mécanismes de type paracrine (Hoelzinger *et al.*, 2007). Une des constantes dans la formation de glioblastomes est

l'augmentation exacerbée de la signalisation de type *epidermal growth factor* (EGF/EGFR) et *platelet-derived growth factor* (PDGF/PDGFR) (Hoelzinger *et al.*, 2007). L'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif intervient dans la prolifération tumorale et l'angiogenèse (Lamszus *et al.*, 2004; Shih et Holland, 2006), mais il a été également montré que le PDGF joue un rôle dans l'invasion tumorale (Cattaneo *et al.*, 2006; Natarajan *et al.*, 2006). Comme ces facteurs sont exprimés à la fois par les glioblastomes, les neurones et les astrocytes, l'ensemble de ces données constitue une preuve supplémentaire d'une action paracrine/autocrine dans le mécanisme de tumorigenèse (Shih et Holland, 2006).

Plusieurs groupes se sont attachés à étudier le rôle de peptides vasoactifs dans les processus de tumorigenèse cérébrale. Dès les années 80, une équipe a montré que la neurotensine (NT) est produite au sein des astrocytomes (Bateman *et al.*, 1986). Par la suite, l'expression d'autres neuropeptides comme la cholécystokinine (CCK), le NPY, la SS (Przedborski *et al.*, 1988), l'adrénomédulline (ADM) (Takahashi *et al.*, 1997), l'endothéline-1 (Sone *et al.*, 2000) et l'Ull (Takahashi *et al.*, 2001) a été montrée. Parallèlement, la présence des récepteurs pour le *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) et le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) (Vertongen *et al.*, 1995), l'insuline, l'*insulin-like factor 3* (Fabry *et al.*, 2000) ou de l'endothéline (Sone *et al.*, 2000) a été caractérisée dans des lignées cellulaires issues de tumeurs astrocytaires de haut grade. Parmi ces peptides, nombreux sont ceux qui se révèlent actifs dans la prolifération des cellules tumorales. En effet, les peptides VIP et PACAP inhibent la prolifération des cellules T98G, lignée tumorale issue de glioblastome humain (Vertongen *et al.*, 1996). A l'inverse d'autres peptides présentent

des propriétés mitogènes tels que l'endothéline-1 (Takahashi *et al.*, 2002). L'expression de peptides vasoactifs et dans certains cas de leurs récepteurs corrobore la composante autocrine dans le développement tumoral.

L'ADM est une hormone peptidique initialement isolée à partir de tissu tumoral humain (Kitamura *et al.*, 1993). Plusieurs fonctions ont été attribuées à l'ADM, telles que la vasodilatation (Nuki *et al.*, 1993) et la régulation du système endocrine (Yamaguchi *et al.*, 1995). Par ailleurs, des travaux *in vitro* ont révélé que l'ADM induit la prolifération cellulaire dans des lignées tumorales humaines (Miller *et al.*, 1996; Rocchi *et al.*, 2001). Ouafik *et al.* (2002) ont démontré, d'une part que des cellules issues de gliomes expriment à la fois l'ADM et ses récepteurs de façon corrélée avec le grade de la tumeur, et d'autre part que l'immunoneutralisation du peptide chez des souris *Nude* transplantées avec des cellules tumorales humaines, entraîne une forte diminution de la tumorigenèse. Dernièrement, cette équipe a montré que l'effet mitogène de l'ADM est relayé par la phosphorylation du facteur c-Jun *via* l'activation de la voie de la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) (Ouafik *et al.*, 2009).

3. Objectifs de l'étude

Considérés comme les peptides naturels vasoactifs les plus puissants identifiés à ce jour, l'UUI et l'URP ont fait l'objet d'intenses recherches visant à mieux comprendre leurs rôles et mécanismes d'action sur le contrôle du système cardiovasculaire en conditions physiologiques et physiopathologiques (Kompa *et al.*, 2004; Russell, 2004; Ashton, 2006). Bien que l'UUI et l'URP soient d'authentiques neuropeptides, le rôle du système urotensinergique au niveau cérébral reste à ce jour

très mal connu. L'UT est fortement exprimé dans des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral (Jégou *et al.*, 2006), mais il est également présent dans d'autres structures nerveuses comme le thalamus et l'hippocampe dans lesquelles il est exclusivement associé à une sous-population d'astrocytes (Lin *et al.*, 2003b). Par ailleurs, les ARNm codant l'UT sont détectés dans différentes lignées tumorales, dont certaines sont issues de glioblastomes (Takahashi *et al.*, 2001). Enfin, plusieurs groupes ont mis en évidence des effets mitogènes de l'UII sur des cellules transfectées par l'ADNc codant l'UT et des cellules natives connues pour exprimer le récepteur (Sauzeau *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Ziltener *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008).

Compte tenu de l'ensemble de ces données, le présent travail s'attache à *i)* démontrer la présence de sites de liaison spécifiques pour l'UII et l'URP dans les astrocytes, *ii)* déterminer les voies de transduction associées à leur activation en comparant les effets de l'UII et l'URP, *iii)* identifier un éventuel antagoniste peptidique de l'UT dans notre modèle, et *iv)* rechercher l'implication potentielle du système urotensinergique dans le contrôle de la tumorigenèse cérébrale.

Matériels et Méthodes

1. Cultures d'astrocytes corticaux de Rat

Le modèle de cultures purifiées d'astrocytes est constitué d'une population homogène de cellules natives dont le transcriptome est proche de celui des astrocytes *in vivo* (Nakagawa *et al.*, 2005). Les cultures primaires de cellules gliales sont réalisées selon un protocole inspiré de celui de Boohar et Sensenbrenner (1972). Après décapitation des rats Wistar (Depré, Saint-Doulchard, France) âgés de 24 h, le cortex est prélevé puis placé dans un milieu de culture constitué d'un mélange DMEM/HAM-F12 (2/1, v/v) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) complété par une solution d'antibiotiques-antifongique (1%, Sigma-Aldrich), de glutamine (2 mM, Sigma-Aldrich), d'insuline (1%, Sigma-Aldrich), de D(+)-glucose (0,4%, Sigma-Aldrich) et d'HEPES (5 mM, Sigma-Aldrich). Une fois les méninges éliminées, les cellules sont dissociées de façon mécanique par passages lents et successifs au travers d'une aiguille creuse (10 cm X 1,2 mm). La suspension cellulaire est centrifugée (100 X g, 5 min), puis le culot est resuspendu et filtré sur un tamis de nylon (maillage de 100 µm). Les cellules sontensemencées dans des flasques (150 cm²) à raison de 25 X 10⁶ cellules/flasque dans un milieu complet additionné de sérum bovin foetal (SBF; 10%, Eurobio, Les Ullis, France). Les cultures sont placées dans un incubateur en atmosphère humide et maintenu à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les trois jours.

Après 6 à 8 jours de culture (90% de confluence), les cultures primaires sont purifiées en utilisant les capacités d'adhésion de chacun des types cellulaires (astrocytes, microglie, oligodendrocytes) présents dans les cultures (Brown et Mohn, 1999). Les flasques sont soumises à deux cycles successifs d'agitation orbitale (2 h puis 18 h) et les cellules adhérentes (astrocytes) sont détachées par une solution de trypsine (0,05%, Sigma-Aldrich), puis centrifugées (100 X g, 8 min, Figure 8). La suspension cellulaire est laissée 2 min dans une flasque de 150 cm² pour permettre

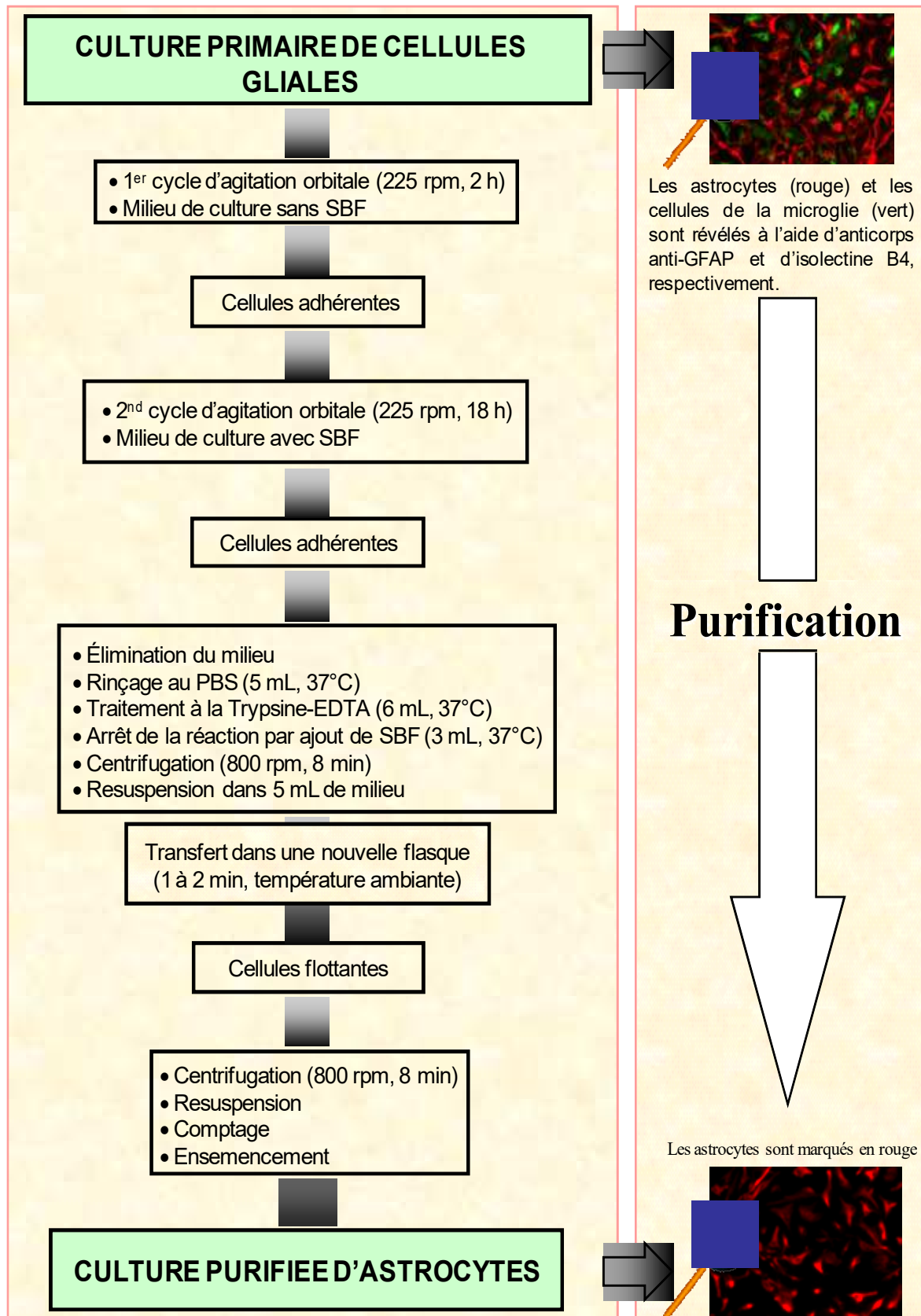


Figure 8: Protocole de purification de cultures primaires de cellules gliales corticales de Rat par agitation orbitale. Obtention d'une culture secondaire d'astrocytes. GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; PBS, *phosphate buffer saline*; SBF, *serum bovin foetal*.

d'éliminer la microglie résiduelle qui adhère rapidement au support. Les cellules flottantes (astrocytes) sont récupérées et resuspendues dans du milieu de culture supplémenté de SBF (10%) puis ensemencées sur un support et à une densité variant selon le type d'expérimentation (Tableau 9). Après 2 jours de culture, les cellules présentent les caractéristiques morphologiques des astrocytes de type I et plus de 99% d'entre elles expriment un marqueur astrocytaire, la GFAP (Figure 8).

Type d'expérience	Support	Densité cellulaire
Etude de liaison	Plaque Costar 24 puits	120000 (saturation) 80000 (compétition, association/dissociation)
Mesure du métabolisme des PIPs	Boîte Falcon 35 mm	400000
Mesure de la $[Ca^{2+}]_c$	Plaque Falcon 96 puits (bord noir/fond blanc)	30000
Immuno-histochimie	Plaque Costar 24 puits (sur lamelle de verre)	15000
Prolifération cellulaire	Plaque Costar 96 puits Plaque Costar 12 puits	15000 80000

Tableau 9: Ensemencement des cellules et choix des supports selon le type d'expérience. $[Ca^{2+}]_c$, concentration cytosolique de calcium.

2. Etudes de liaison

2.1. Protocoles

Les cultures secondaires à confluence sont rincées trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS, 150 mM, pH=7,4), séchées sous un courant d'air froid puis stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour chaque type d'expériences, les cellules sont décongelées puis incubées dans un tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) contenant de l'albumine sérique bovine (BSA, 0,5%), du $MnCl_2$ (5 mM) et le radioligand, *i.e.* $1'[^{125}I]UUI$ (0,2 nM) ou $1'[^{125}I-Tyr^0,D-Trp^8]somatostatine-14$ (0,4 nM), obtenus par iodation des peptides selon des protocoles mis au point au laboratoire (Chatenet *et al.*,

2004). Les cellules sont ensuite rincées avec le tampon Tris-HCl/BSA/MnCl₂ puis lysées avec une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS, 1%) et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (LKB Wallac, Rockville, MD). La liaison non-spécifique est déterminée par l'ajout de 1 µM de peptide non radiomarké.

Pour les expériences d'association, les cellules sont incubées pour des temps (1 min à 2h) et des températures variables (22° ou 37°C). La cinétique de dissociation (1 min – 3 h) est mesurée grâce à l'ajout à l'équilibre d'un excès de peptide non marqué (1 µM final).

Pour les expériences de saturation, les cellules sont incubées (2 h, 22°C) dans du tampon Tris HCl/BSA/MnCl₂ contenant des concentrations croissantes d'[¹²⁵I]UII (0,01 à 4 nM).

Pour les expériences de compétition, les cellules sont incubées (2 h, 22°C) dans du tampon Tris HCl/BSA/MnCl₂ en présence d'[¹²⁵I]UII (0,2 nM) ou d'[¹²⁵I-Tyr⁰, D-Trp⁸]somatostatine-14 (0,4 nM) et de concentrations croissantes d'UII, d'URP, de leurs analogues ou de somatostatine-14.

2.2. Analyse des données

Le coefficient de Hill (n_H) est calculé à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software version 4, San Diego, CA, USA) à partir de la régression non-linéaire des courbes de compétition obtenues par l'équation de Hill. Les données sont ensuite analysées pour déterminer si le radioligand interagit avec un ou deux sites de liaison. Le logiciel s'appuie sur le test statistique de Fisher qui valide l'une ou l'autre hypothèse ($P < 0,05$) en comparant la superposition des courbes (équation pour un site vs équation pour deux sites) autour des valeurs reportées sur le graphe.

L'IC₅₀, qui correspond à la concentration du ligand non marqué déplaçant 50% de la liaison spécifique du radioligand, permet de calculer les constantes de dissociation

(K_i) de haute (K_1) et de basse (K_2) affinités selon la formule définie par Cheng et Prusoff (1973) :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [L]/K_d}$$

où

[L] = concentration de radioligand libre

K_d = constante de dissociation à l'équilibre pour le radioligand

3. Mesure du métabolisme des polyphosphoinositides

L'effet de l'UII sur le métabolisme des polyphosphoinositides est mesuré en utilisant un protocole mis au point au laboratoire (Desrues *et al.*, 1990). Les cultures secondaires à confluence sont rincées trois fois avec du PBS (150 mM, pH = 7,4) et incubées (2 h, 37°C, 5% CO₂) en l'absence ou présence d'UII ou d'URP (100 nM, chacun) dans un milieu dépourvu de SBF, d'insuline et de glucose, et contenant du *myo*-[³H]inositol (10 µCi/mL, PerkinElmer, Boston, MA, USA). Les cellules sont ensuite récupérées à l'aide d'un grattoir dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA, 10%, 4°C) et homogénéisées par sonication. Les inositols phosphates (IPs) sont séparés de la fraction membranaire par centrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C). Les polyphosphoinositides (PIPs) sont extraits par un mélange chloroforme/éthanol (2:1, v/v; 4°C) et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur LKB 1217 Rack Beta, (EG et G Wallac, Evry, France).

4. Mesure de la concentration cytosolique de calcium

La concentration cytosolique de calcium ($[Ca^{2+}]_c$) est mesurée à l'aide d'une technique microfluorimétrique sur des astrocytes cultivés en plaque 96 puits (Black/white Costar 96 wells; 30 X 10³ cellules/puits), à l'aide d'une sonde calcique

fluorescente, le Fluo-4 ($\lambda_{\text{excitation}} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 525 \text{ nm}$). Après rinçage des cellules avec un tampon (pH = 7,4) contenant du NaCl (135 mM), du KCl (5 mM), du CaCl_2 (1 mM), du MgCl_2 (1 mM), de l'HEPES (10 mM), du D(+)-Glucose et de la probénécide (2,5 mM), la valeur de la fluorescence naturellement émise par les cellules et le plastique est mesurée. Les astrocytes sont ensuite incubés (40 μL , 40 min, 37°C, 5% CO_2) dans le même tampon contenant du Fluo-4 (2 μM) et de l'acide pluronique (20%). Les plaques contenant les cellules et les composés sont placées dans le lecteur de plaques *Flexstation II* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (Figure 9) piloté par le logiciel Softmax Pro (Molecular Devices) qui enregistre durant 300 s (intervalle 1,52 s) les variations de la fluorescence dans les cellules. Les composés testés sont éjectés (50 μL) après 17 s de lecture.

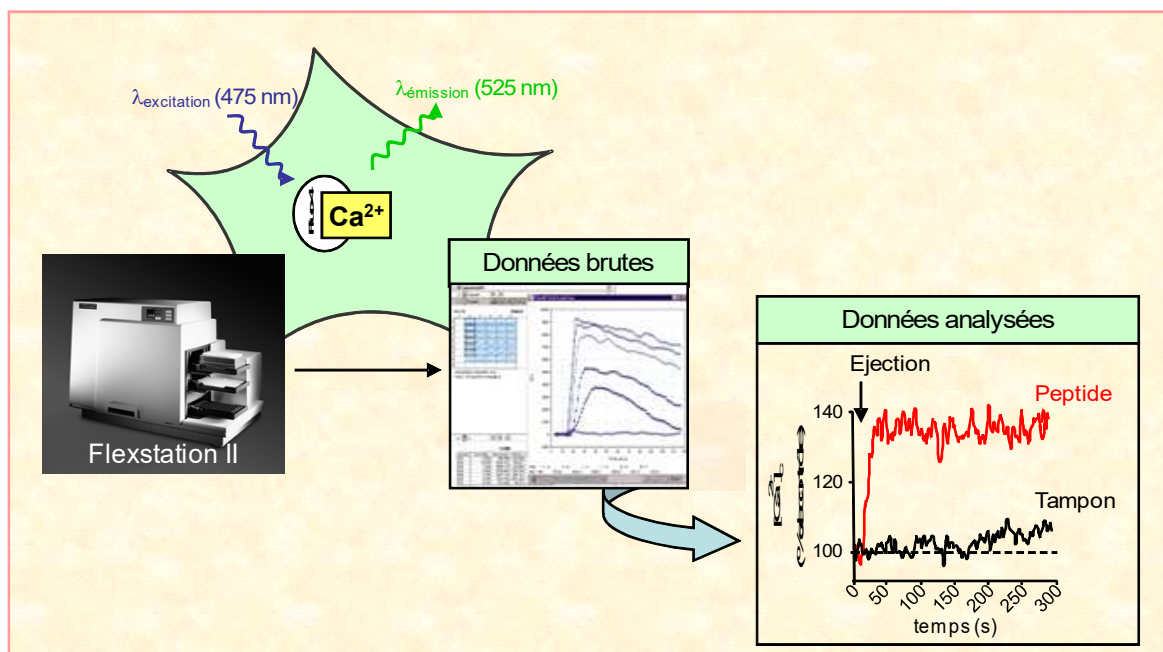


Figure 9 : Principe de la mesure de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ à l'aide d'une Flexstation. Les cellules sont incubées avec la sonde calcique ratiométrique Fluo 4 et l'éjection du tampon seul (⚪, 50 μL) ou de la substance d'intérêt (⚫, 50 μL) est effectuée au voisinage des cellules 17 s après le début de la lecture de la fluorescence. La normalisation des résultats est réalisée grâce à une macro programmée sous le logiciel Excel.

Les niveaux de fluorescence, proportionnels à la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, sont exportés sous Excel et sont analysés à l'aide d'une macro qui permet de soustraire le signal basal de

fluorescence puis de calculer l'amplitude de la réponse induite par les composés testés en prenant comme référence l'effet d'une éjection de tampon seul. Les valeurs obtenues sont ensuite exploitées sous le logiciel GraphPad Prism.

5. Mesure des niveaux d'expression des gènes codant l'UII, l'URP et le récepteur UT

L'expression des gènes est mesurée par la technique de RT-PCR en temps réel sur des lignées dérivées d'astrocytomes et de glioblastomes et des extraits de glioblastomes humains fournis par le Pr L'Houcine Ouafik (UMR 911, Marseille). Les amorces ribonucléiques (Promega, Madison, WI, USA) ont été conçues à l'aide du logiciel Primer Express (Tableau 10).

Gène	Séquences des amorces ribonucléiques	Nombre de nucléotides
hGAPDH	sens: GAGCCAAAAGGGTCATCATC	20
	antisens: CCATCCACAGTCTTCTGGGT	20
hUII	sens: CCTCTCTTATCTCTTCCTCTTCCTGA	26
	antisens: AGCGCGCGTCTTCATGA	17
URP	sens: ACACAGTATTTCCAAAAGCAAGCTC	25
	antisens: CCTAACAACTGGAAGAACTTAACCA	26
hUT	sens: TCTTCGGCCTGGACTTCCT	19
	antisens: GCGCTCGCTGCTCATGA	17

Tableau 10: Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par RT-PCR des gènes codant l'UII humaine (hUII), l'URP, l'UT humain (hUT) et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humaine (hGAPDH).

Pour chaque échantillon, 1 µg d'ARN totaux est transcrit en ADNc par la *Superscript II* (50 U/µL) en utilisant comme amorces des hexamères aléatoires (50 µM). L'ADNc obtenu (15 ng) est dilué dans une solution commerciale (Applied Biosystem, Courtabœuf, France) contenant la sonde fluorescente *SYBR Green*, des nucléotides, l'enzyme Taq polymérase et les amorces sens et antisens spécifiques de

l'UII, de l'URP ou de l'UT humains. Le gène codant la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), une protéine ubiquiste dont l'expression n'est pas régulée, est utilisée comme référence. La PCR quantitative est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (ABI Prism 7000 *Sequence Detection*, Applied Biosystem, Courtabœuf, France) selon un programme constitué de 40 cycles comprenant une phase de

dénaturation (95°C, 15 s) et une phase d'hybridation/élongation (60°C, 1 min).

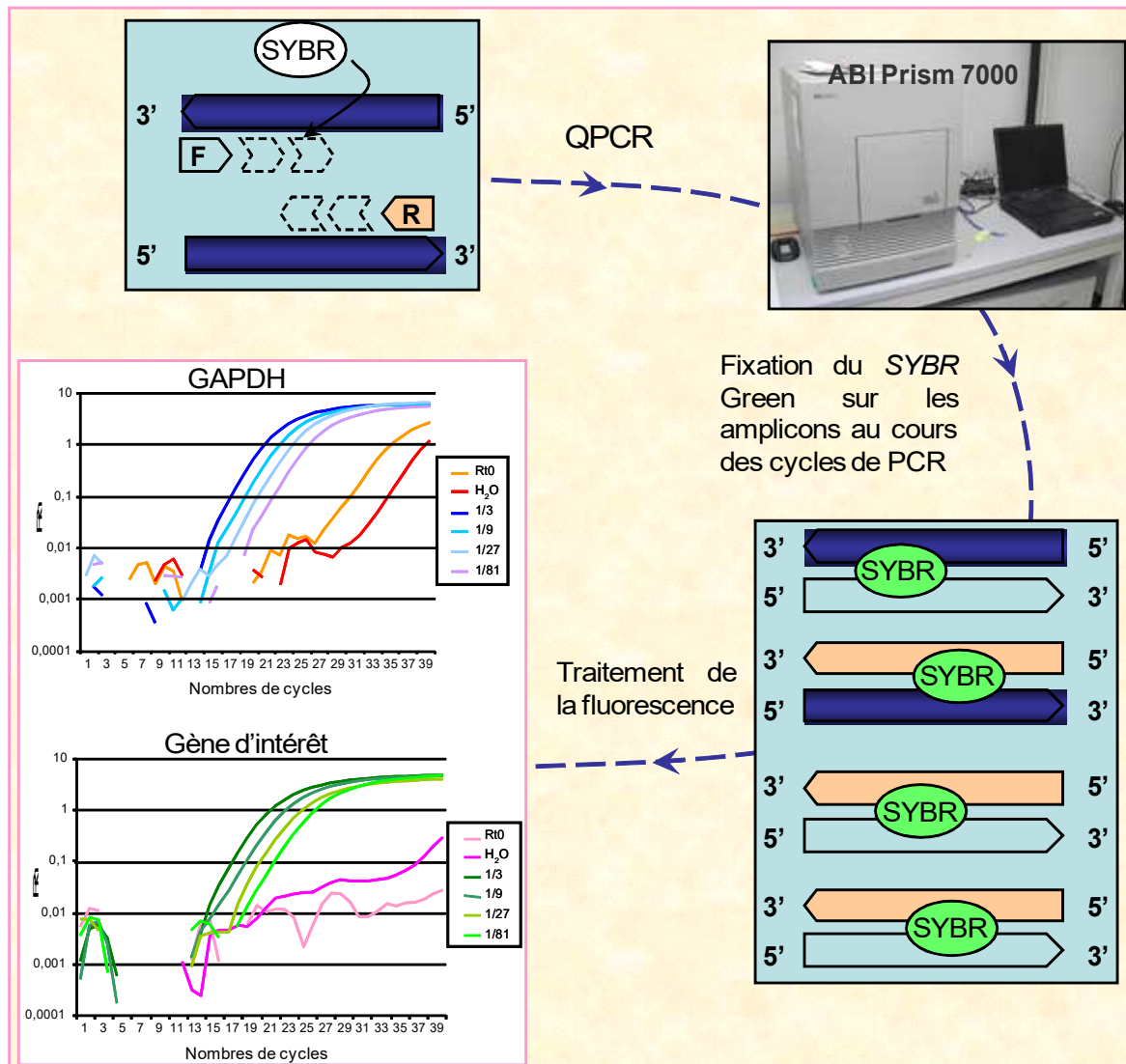


Figure 10: Principe de la PCR quantitative en temps réel (RT-PCR). SYBR: sonde SYBR Green libre (SYBR) ou fluorescente (SYBR) combinées aux amplicons.

La quantité d'amplicons formés dans chaque échantillon est déterminée en utilisant la formule $2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$, dans laquelle Ct désigne le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence atteint une valeur seuil. Le ΔCt correspond à $Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ pour chaque échantillon et le $\Delta\Delta Ct$ représente la différence entre le ΔCt d'un échantillon et la moyenne des ΔCt des échantillons utilisés comme contrôle (Figure 10).

6. Mesure de la prolifération cellulaire

Les effets mitogènes des peptides sont mesurés par l'utilisation d'un marqueur de prolifération cellulaire, le WST-1 (Roche Diagnostic, Meylan, France) et par comptage direct des cellules. Les astrocytes sont ensemencés dans des plaques 96 puits (15×10^3 cellules/puits, WST-1) ou des plaques 12 puits (60×10^3 cellules/puits, comptage). Après 2 jours de culture, les cellules sont synchronisées dans un milieu dépourvu de SBF (24 h, comptage) ou non (WST-1), puis incubées en l'absence ou présence d'UII, d'URP, de PACAP, d'IL-1 β ou d'ET-1. Après 24 h, les cellules sont incubées en présence de WST-1 (2 h, 37°C) et le signal est mesuré (450 nm et 750 nm) à l'aide d'un lecteur de plaques (FL600 BioTek, Winooski, Vermont) piloté par le logiciel KC4 (BioTek). La densité cellulaire est mesurée après 48 h d'incubation en présence d'UII ou d'URP grâce à un compteur de cellules (Z2, Coulter Beckmann, Miami, FL, USA).

7. Immunohistochimie

Les cellules sont ensemencées sur lamelles en verre déposées dans des plaques 24 puits (20×10^3 cellules/puits). Après 2 jours de culture, les cellules sont rincées avec du PBS (pH = 7,4, 37°C) puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA 4%, 20 min, 4°C). Après 3 rinçages (10 min) avec du PBS contenant du triton X-100 (0,3%), les cellules sont incubées (1 h, 22°C, obscurité) avec l'isolectine B4 couplée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) pour révéler la microglie, ou avec un premier anticorps anti-GFAP (développé chez le Lapin) ou anti- β -galactosidase (développé chez la Souris) pour marquer les astrocytes et les oligodendrocytes, respectivement. Les complexes antigènes-anticorps sont révélés en incubant les cellules (16 h, 4°C, obscurité) avec un second anticorps développé chez la Chèvre et dirigé contre les γ -globulines de Lapin (couplage à l'Alexa 568) ou de Souris

(couplage à l'Alexa 488). Après 3 rinçages, les lamelles sont prélevées, montées sur lame puis séchées.

L'immunoréactivité est observée à l'aide d'un microscope inversé DMIRBE (Leica, Heidelberg, Allemagne), équipé d'une lampe UV et d'une *Cool Camera Digital* (CCD, cool snap fx, Princeton Instrument, France) et piloté par le logiciel MetamorphTM (Roper Scientific, Evry, France). Un filtre bleu (bandes passantes d'excitation 440-520 nm et d'émission 497-557 nm) et un filtre vert (bandes passantes d'excitation 515-560 nm et d'émission à partir de 590 nm) permettent de révéler la fluorescence émise par l'Alexa 488 et l'Alexa 568, respectivement.

8. Analyses statistiques

Toutes les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel InStat GraphPad 3.05 (GraphPad Software). Selon les expériences, différents tests statistiques sont utilisés, *i.e.* test *t* de Student, test ANOVA (*one-way*) suivi des *post-hoc* de Dunnett ou de Tukey ou tests non-paramétrique de Mann et Whitney, ou de Friedman.

Résultats

Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes

Hélène Castel, **Mickaël Diallo**, David Chatenet, Jérôme Leprince, Laurence Desrues, Marie-Thérèse Schouft, Marc Fontaine, Christophe Dubessy, Isabelle Lihrmann, Elizabeth Scalbert, Maria Malagon, Hubert Vaudry, Marie-Christine Tonon and Pierrick Gandolfo.

Les résultats publiés dans cet article portent sur la caractérisation de sites de liaison spécifiques et fonctionnels pour l'U^{II}, de très haute et de haute affinités, dans les astrocytes corticaux de Rat en culture. L'un des deux sites au moins correspondrait au récepteur UT.

J. Neurochem. (2006) **99**: 582-595.

[Orn⁵]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes

Mickaël Diallo, Marie Jarry, Laurence Desrues, Hélène Castel, David Chatenet, Jérôme Leprince, Hubert Vaudry, Marie-Christine Tonon and Pierrick Gandolfo.

Les résultats publiés dans cet article montrent que l'[Orn⁵]URP, dépourvu d'activité agoniste intrinsèque, se comporte comme un puissant antagoniste non-compétitif / insurmontable de l'UT exprimé dans les astrocytes corticaux de Rat en culture.

Peptides (2008) **29**: 813-819.

Effects of GABA_A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes

Laurence Desrues, Thomas Lefebvre, **Mickaël Diallo**, Pierrick Gandolfo, Jérôme Leprince, David Chatenet, Hubert Vaudry, Marie-Christine Tonon and Hélène Castel

Les résultats publiés dans cet article montrent l'existence d'un changement de couplage du récepteur UT, de la protéine G_s vers la protéine G_i, régulé par le système GABAergique dans les astrocytes corticaux de Rat en culture.

Peptides (2008) **29**: 727-734.

The vasoactive peptides UII and URP regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms. Involvement in cell proliferation

Mickaël Diallo, Marie Jarry, Laurence Desrues, Tursonjan Tokay, David Chatenet, Jérôme Leprince, Oriana Rossi, Hubert Vaudry, Marie-Christine Tonon, Hélène Castel and Pierrick Gandolfo.

Les résultats présentés dans cet article montrent certaines divergences fonctionnelles entre l'UII et l'URP sur les astrocytes corticaux de Rat en culture. Seule l'UII interagit avec un site de très haute affinité, couplé à une protéine G sensible à la toxine pertussique, et vraisemblablement impliqué dans les effets pro-mitogènes de l'UII.

(soumis).

The Vasoactive Peptides UII and URP Regulate Astrocyte Activity through Common and Distinct Mechanisms. Involvement in Cell Proliferation

MICKAEL DIALLO^{*1}, MARIE JARRY^{*1}, LAURENCE DESRUES¹,
TURSONJAN TOKAY¹, DAVID CHATENET^{1,2}, JEROME LEPRINCE¹,
ORIANA ROSSI¹, HUBERT VAUDRY¹, MARIE-CHRISTINE TONON¹,
HELENE CASTEL¹ AND PIERRICK GANDOLFO¹

¹EA4310, INSERM U413, « DC2N », Laboratory of Neuroendocrine and Neuronal Cell Differentiation and Communication, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), Regional Platform for Cell Imaging PRIMACEN, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, Normandy, France

²Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Canada H9R1G6

* Authors who equally contributed to this work.

Address correspondence and reprint requests to Pierrick Gandolfo, INSERM U413, EA4310, « DC2N », Laboratory of Neuroendocrine and Neuronal Cell Differentiation and Communication, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France, Tel. (33) 235-14-66-11; Fax. (33) 235-14-69-46; E-mail: pierrick.gandolfo@univ-rouen.fr

Abbreviations used : 2-APB, 2-Aminoethoxydiphenylborane; $[Ca^{2+}]_c$, cytosolic calcium concentration; ω -CgTx GVIA, ω -conotoxin GVIA; DBI, diazepam-binding inhibitor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; ET-1, endothelin-1; FBS, fetal bovine serum; GPCR, G protein-coupled receptor; IL-1 β , interleukin-1 β ; ODN, octadecaneuropeptide; PBS, phosphate buffered saline; PIP, polyphosphoinositides; PLC, phospholipase C; PTX, pertussis toxin; UII, urotensin II; URP, urotensin II-related peptide; UT, UII receptor.

KEYWORDS: UT receptor, calcium, proliferation, G protein

ABSTRACT

Urotensin II (UII) and its paralog urotensin II-related peptide (URP) are two vasoactive neuropeptides whose respective central actions are currently unknown. Here, we have compared the mechanism of action of URP and UII on cultured astrocytes. Competition experiments performed with [¹²⁵I]UII showed the presence of very high- and high-affinity binding sites for UII, and a single high-affinity site for URP. Both UII and URP provoked a membrane depolarization accompanied by a decrease of input resistance, stimulated the release of endozepines, neuropeptides specifically produced by astroglial cells, and generated an increase in cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$). The UII/URP-induced $[Ca^{2+}]_c$ elevation was pertussis toxin (PTX)-insensitive, and could be blocked by the PLC inhibitor U73122 or the IP₃ channel blocker 2-APB. The addition of Ca²⁺ chelator EGTA reduced the peak and abolished the plateau phase whereas the T-type calcium channel blocker mibefradil totally inhibited the calcium response evoked by both peptides. However, URP and UII induced a mono- and biphasic dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_c$ and provoked short- and long-lasting Ca²⁺ mobilization, respectively. Similar mono- and biphasic dose-dependent increase in [³H]inositol incorporation into polyphosphoinositides (PIP) in astrocytes was obtained but sole the effect of UII was specifically reduced by PTX. Finally, UII exerted a dose-dependent mitogenic activity on astrocytes, but not URP. Therefore, we described that URP and UII exert not only similar but also divergent actions on astrocyte activity, UII exhibiting a broader range of activities at physiological peptide concentrations.

RUNNING TITLE: Differential Effects of URP and UII on Astrocyte Activity.

INTRODUCTION

Urotensin II (UII) is a cyclic neuropeptide that has been initially isolated from the urophysis, a neurosecretory organ located in the caudal portion of the spinal cord of

teleost fish (Pearson et al., 1980). Orthologs of UII have been subsequently characterized in the brain and spinal cord of various species of tetrapods including frog (Chartrel et al., 1996; Conlon et al., 1992), mouse (Coulouarn et al., 1999), rat (Coulouarn et al., 1999), pig (Mori et al., 1999) and human (Ames et al., 1999; Chartrel et al., 2004; Coulouarn et al., 1998). A paralog of UII called UII-related peptide (URP) has been recently identified in rat and human (Sugo et al., 2003). UII and URP share a fully conserved C-terminal cyclic hexapeptide CFWKYC core that plays a major role for the biological activity of the peptides (Leprince et al., 2008). The cyclic region of UII and URP exhibits some structural similarities to that of somatostatin (Fig. 1) and it has recently been found that the genes encoding these three neuropeptides originate from a common ancestor (Tostivint et al., 2006).

The mRNAs encoding the UII and URP precursors have been localized both in the brain and in peripheral organs (Sugo et al., 2003). In the rat and mouse central nervous system (CNS), the UII and URP genes are primarily expressed in subpopulations of motoneurons located in discrete brainstem nuclei and in the ventral horn of the spinal cord (Coulouarn et al., 2001; Dun et al., 2001; Pelletier et al., 2002; 2005). In the human brain, high levels of URP mRNA are also present in the hippocampus and thalamus (Sugo et al., 2003).

The biological action of UII and URP are mediated through activation of a common G protein-coupled receptor originally called GPR14 (Ames et al., 1999; Liu et al., 1999; Mori et al., 1999; Nothacker et al., 1999; Sugo et al., 2003) and now renamed UT (Douglas and Ohlstein, 2000). In UT-transfected CHO and HEK293 cells, UII stimulates the phospholipase C pathway and causes an increase in cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) (Elshourbagy et al., 2002; Liu et al., 1999; Ziltener et al., 2002). UII also exerts mitogenic activity in UT-transfected cells and in vascular smooth muscle cells expressing native UT (Sauzeau et al., 2001; Watanabe et al., 2001; Ziltener et al., 2002).

In the CNS, UT mRNA has been detected in motoneurons of the spinal cord in mouse (Liu et al., 1999) and rat (Jégou et al., 2006) as well as in the thalamus, superior occipital gyrus and substantia nigra in human (Ames et al., 1999). Previous studies have shown that central administration of UII modulates cardiovascular, locomotor, behavioral and

endocrine functions (for review, Do Rego et al., 2008; Nothacker and Clark, 2005). Although URP has been proposed as the sole endogenous ligand for urotensinergic receptors in the brain (Mori and Fujino, 2004; Sugo et al., 2003), little is known regarding the central activities of URP.

It is now clearly established that astroglial cells release various neuroactive compounds (Volterra and Meldolesi, 2005) including the gliopeptides endozepines (Malagon et al., 1993; Patte et al., 1999). Endozepines were originally characterized as endogenous ligands for benzodiazepine receptors (Guidotti et al., 1983). All endozepines characterized so far derive from an 86-amino-acid precursor called diazepam-binding inhibitor (DBI) which generates several biologically active fragments, notably the octadecaneuropeptide (ODN, DBI₃₃₋₅₀) (Ferrero et al., 1986; Gandolfo et al., 1999). The release of endozepines from astrocytes is regulated by several neuropeptides such as pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and somatostatin (Masmoudi et al., 2003; 2005).

The expression of UII and its receptor has been previously reported in a human glioblastoma cell line (Takahashi et al., 2001) and the presence of functional UT has been demonstrated in astrocytes (Castel et al., 2006; Lin et al., 2003). In astroglial cells, UII specifically binds two affinity sites, stimulates PIP metabolism and causes a robust increase in cytosolic calcium concentration (Castel et al., 2006; Desrues et al., 2008). Up to now, nothing is known regarding the mechanism of action of URP on native cells, and the relevance for the existence of a redundant peptide for a unique UT receptor remains unexplored. In the present study, we have characterized functional binding sites for URP on rat cortical astrocytes and compared the effects of URP with those of UII electrophysiological activity, endozepine release, Ca²⁺, PIP turn-over and cell proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

URP (ACFWKYCV), rat UII (UII, pQHGTAPECFWKYCI) and rat octadecaneuropeptide ODN (diazepam-binding inhibitor 33-50, DBI₃₃₋₅₀) were synthesized by the solid phase methodology on a Pioneer PerSeptive Biosystem

peptide synthesizer (Applera France, Courtaboeuf, France) using the standard manufacturer's procedures as previously described (Leprince et al., 1998, Chatenet et al., 2004). All peptides were purified (> 98%) on a 2.2 X 25-cm Vydac C₁₈ column (Alltech, France) and characterized by MALDI-TOF MS on a Voyager DE-PRO mass spectrometer (Applera-France). Glutamine, N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES), the antibiotic-antimycotic solution and bovine γ -globulins were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Ham-F12 culture medium, insulin, D(+)-glucose, mibefradil, nifedipine, ω -conotoxine GVIA, pertussis toxin (PTX), endothelin-1 (ET-1), bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Fetal bovine serum (FBS) and interleukin-1 β (IL-1 β)) were from Eurobio (Les Ulis, France). Fluo-4 AM and Fura-2 AM were from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). Somatostatin-14 and [Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14 were purchased from NeoMPs (Strasbourg, France). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) was generously provided by Dr Alain Fournier (INRS, Pointe-Claire, Canada).

Cell Culture

Purified cultures of astrocytes were prepared as previously described (Gandolfo et al., 2001; Diallo et al., 2008). Briefly, cerebral hemispheres from newborn Wistar rats were collected in DMEM/Ham-F12 (2:1, v/v) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1% insulin, 5 mM HEPES, 0.4% glucose and 1% of the antibiotic-antimycotic solution. The tissues were disaggregated mechanically with a syringe equipped with a 1-mm gauge needle, and filtered through a 100- μ m pore size mesh filter (Falcon, Becton Dickinson, Grenoble, France). Dissociated cells were resuspended in culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and seeded in 150-cm² culture flasks (Falcon) at the density of 2×10^7 cells per flask. The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂) and the medium was changed twice a week. When cultures were confluent, the flasks were gently shaken on an orbital shaker at 250 rpm for 2 h. Dislodged cells were discarded and a second step of purification was performed at 250 rpm for 14-16 h. Remaining adhesive

cells were collected by trypsination, centrifuged (100 g, 10 min) and plated in 150-cm² flasks. Suspended astrocytes were harvested and seeded in 96-well plates (for calcium studies), 24-well plates (for binding studies), 14-mm glass coverslips (for electrophysiological experiments and calcium measurements), 35-mm dishes (for measurement of polyphosphoinositide turnover) and in 60-mm dishes (for measurement of endozepine release). The purity of the cultures was assessed by GFAP immunostaining which showed that enriched cultures contained > 98% astrocytes (Castel et al., 2006).

Binding Studies

Three µg of UII or [Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14, in phosphate buffer (0.375 mM, pH 7.4), were labeled with 0.5 mCi Na¹²⁵I (Amersham Biosciences) by the lactoperoxidase method as previously described (Chatenet et al., 2004; Leroux et al., 1988). Mono-iodinated [¹²⁵I]UII or [¹²⁵I-Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14 used for the radioligand binding assays were purified by reversed-phase HPLC on an Adsorbosphere C₁₈ column (0.46 X 25-cm, Alltech) using a linear gradient (25-65% over 40 min) of acetonitrile/trifluoro acetic acid (99.9 : 0.1, v/v) at a flow rate of 1 mL/min, and stored at 4°C. The specific radioactivity of each radioiodinated peptide was approximately 2000 Ci/mmol.

Cultured astrocytes were rinsed three times with phosphate buffered saline (PBS), dried under a cold air stream and stored at -80°C until binding experiments. Frozen cells were washed twice with assay buffer (50 mM Tris buffer, 1 mM MnCl₂ and 0.5% BSA) and incubated at 22°C in the same buffer in the presence of radiolabeled peptide. At the end of the incubation, cells were washed three times with assay buffer, solubilized with 1% SDS and the radioactivity was counted in a gamma counter (LKB Wallac, Evry, France). For competition experiments, cells were incubated for 3 h with [¹²⁵I]UII (0.2 nM) or [¹²⁵I-Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14 (0.4 nM) in the presence of graded concentrations of unlabeled UII, URP or somatostatin-14. Non-specific binding was determined by addition of 1 µM unlabeled UII or [Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14.

Measurement of Cytosolic Ca²⁺ Concentration

Purified astrocytes were plated into 96-well plates at 30,000 cells/well or in 14-mm glass coverslips in complete medium added with FBS (10%). After 2 days in culture, astrocytes were rinsed twice with a modified Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 135 NaCl; 5 KCl; 1 MgCl₂; 1 CaCl₂; 10 HEPES, 3 glucose; 2.5 probenidicid (pH 7.3). Cells were incubated at 37 °C with 40 µL of 2 µM fluo-4 AM or Fura-2 AM dye containing 20% pluronic acid for 40 min in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were washed twice with modified HBSS, and the effects of graded concentrations of URP and UII on [Ca²⁺]_c were measured with a fluorometric imaging plate reader FlexStation II (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Agonist-induced changes in [Ca²⁺]_c were also measured (fluorescence at 510 nm following excitation at 340/380 nm from a 300 W xenon lamp) in individual cells from a single visual field using an integrating CCD camera coupled to a Leica DMLFSA microscope. Cell calcium imaging and fluorescence quantification were carried-out using the Metafluor Imaging System (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Measurement of Polyphosphoinositide Metabolism

Two to four-day-old (2-4 DIV) cultured astrocytes were incubated at 37°C with 10 µCi/mL myo-[³H]inositol in glucose- and serum-free medium, in the absence or presence of URP or UII as previously described (Desrues et al., 1990). The incubation was stopped by removing the medium and adding ice-cold 10% trichloroacetic acid. The cells were homogenized and centrifuged (14,000 rpm, 4°C, 10 min). The pellet was washed with 500 µL chilled water and [³H]-labeled polyphosphoinositides ([³H]PIP) were extracted with 500 µL of chloroform/ethanol (2:1, v/v). The radioactivity was counted in a beta counter (LKB 1217 Rack Beta, EG and G Wallac, Evry, France).

Electrophysiological Experiments

Electrophysiological recordings were performed at room temperature (22°C) on 2-4 DIV cultured astrocytes seeded on glass coverslips using the standard amphotericin B-perforated configuration of the patch-clamp technique. The patch pipettes were fabricated from 1.5-µm (outer diameter) soft glass tubes on a two-step vertical pipette

puller (List-Medical, L/M-3P-A, Darmstadt, Germany). Patch electrodes had a final resistance of 5-7 M Ω . The internal pipette solution contained 130 mM KMeSO₄; 20 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES (adjusted at pH 7.4 with KOH). Before each experiment, the medium was replaced by a bath solution: 145 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 1.8 mM CaCl₂; 0.8 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM glucose (pH 7.4 adjusted with NaOH). Cells were transferred to the stage of an upright microscope (DMLFSA, Leica, Heidelberg, Germany). Voltage signals were recorded from an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and filtered at 2 kHz (3 db, four-pole, Low-pass Bessel filter). Cell input resistance was monitored by applying hyperpolarizing pulses (2 pA, 10 ms, 0.125 Hz) to the cell under study. Data acquisition and analysis were performed through a digidata 1200 interface using the pClamp 8 suite programs (Axon Instruments) and the Origin 4.1 analysis software (Microcal Software, Northampton, MA, USA).

Measurement of Endozepine Release

5-DIV astrocytes were incubated for 60 min at 37°C with fresh serum-free medium in the absence or presence of test substances. Peptides contained in culture media were concentrated on Sep-Pak C₁₈ cartridges (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France). Bound material was eluted with 50% (v/v) acetonitrile/water containing 0.1% TFA (v/v) and dried by vacuum centrifugation (Speed Vac concentrator, Savant, Hicksville, NY, USA) until radioimmunoassay (RIA).

The concentrations of ODN-like immunoreactivity (ODN-LI) in the Sep-Pak-prepurified samples were quantified by RIA using an antiserum raised against synthetic rat ODN ([Tonon et al., 1990](#)). The analog [Tyr⁰]-ODN was iodinated using the chloramine-T procedure ([Vaudry et al., 1978](#)) and purified on a Sep-Pak C₁₈ cartridge. The final dilution of the ODN antiserum was 1:30,000 and the total amount of tracer was 6,000 cpm/tube. The antibody-bound ODN fraction was precipitated by addition of 100 μ L bovine γ -globulins (1%, w/w) and 2 mL polyethylene glycol 8000 (20%, w/v). After centrifugation, the pellet containing the bound fraction was counted in a gamma counter (LKB Wallac, Rockville, MI, USA).

Cell Proliferation

To determine cell survival and proliferation, 2-DIV cultured astrocytes were grown in the complete culture medium supplemented with 10% FBS. Cells were either incubated in the absence or presence of URP, UII, endothelin-1, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) or interleukin-1 β (IL-1 β) for 24 h in the same complete medium (WST-1 assay, 2 h) or rinsed twice in FBS-free medium and incubated in the absence or presence of URP or UII for 48 h (cell counting). Astrocytes were rinsed three times in PBS (37°C) and proliferation was measured by fluorescence measurement with a FL600 microplate reader (450/750 nm) or by counting the cell number with an electronic cell counter (Z2, Beckman Coulter, Roissy, France).

Data Analysis

To calculate the Hill coefficient (n_H), competition curves were first fitted to the Hill equation *via* a nonlinear regression using the computerized curve-fitting package GraphPad Prism version 4 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The data were then re-fitted using equation for displacement of radioligand by competitors to one or two binding sites. A two-site curve-fitting model was retained when this model fitted the data significantly better than a one-site model, as determined by a *F*-test at a significance level of $p < 0.05$. IC₅₀ values derived from these latter fits were converted to apparent competition-receptor dissociation equilibrium constants K_1 for the very high affinity and K_2 for the high-affinity binding sites. For biological activities, values presented in the figures are means $\pm$ S.E.M. Statistical significance of differences was determined by using the one-way ANOVA followed by a Dunnett's or a Tukey's post hoc test or the non-parametric Friedman's test.

RESULTS

Binding Characteristics of URP on Cultured Rat Astrocytes

Competition experiments performed with [125 I]UII (0.2 nM) as a tracer and unlabelled UII (1 pM–1 μ M) generated a biphasic curve with a Hill coefficient of 0.81 ± 0.06 (Fig. 2A). In contrast, graded concentrations of unlabeled URP (1 pM–1 μ M) generated a monophasic displacement curve with a Hill coefficient close to 1. Statistical analysis of the competition experiments using the *F*-test showed that data best fitted with a two-site model ($p < 0.05$) and the calculated dissociation constants for the high- (K_1) and low-affinity (K_2) sites were 0.31 ± 0.12 and 32.9 ± 18.7 nM for UII and with a one-site model ($p < 0.05$) yielding a dissociation constant for a high-affinity (K) site of 1.62 ± 0.12 nM, respectively (Fig. 2A, inset). We have already shown that somatostatin-14, which exhibits sequence similarities with UII and URP in their cyclic portion, displaced [125 I]UII only at micromolar concentrations (Castel et al., 2006). In Fig. 2B, competition experiments performed with [125 I-Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14 (0.4 nM) and graded concentrations of unlabeled URP (1 pM–1 μ M) showed a biphasic competition curve with a Hill coefficient of 0.32 ± 0.09 (inset) and dissociation constants for high (K_1)- and low (K_2)-affinity sites of 9.16 ± 5.32 nM and 4.42 ± 1.72 μ M, respectively.

Similar Effects of URP and UII on Resting Membrane Potential and Endozepine Release from Cultured Rat Astrocytes

To investigate the action of URP and UII on the electrical activity of cultured astrocytes, amphotericin-perforated patch-clamp recordings were performed. Under current-clamp conditions (holding potential at -52.12 ± 3.08 mV; $n = 32$), focal application of URP (Fig. 3A, *upper*; 100 nM; 2 min) or UII (Fig. 3A, *lower*; 100 nM; 2 min) elicited a membrane depolarization in 69% of astrocytes (20/29) accompanied by a decrease of the input resistance. The majority of responding astrocytes remained in a depolarized state during the washout period (Fig. 3A). The amplitudes of membrane depolarization induced by URP at concentrations of 10 nM (9.6 ± 2.6 mV, $n = 5$) and 100 nM (16.6 ± 4.3 mV, $n = 8$) were very similar to those evoked by UII (10 nM, 9 ± 4 mV, $n = 3$; 100 nM, 15.5 ± 2.8 mV, $n = 12$, Fig. 3B).

Graded concentrations of URP (1 pM–10 μ M, 1 h) induced a dose-related increase in the release of ODN-LI with an EC_{50} value of 3.95 ± 1.52 nM and a maximum effect at a concentration of 1 μ M (*data not shown*). Incubation of cells with 0.1 nM, 10 nM and 1 μ M URP or UII provoked a concentration-dependent increase in ODN-LI release, non significantly different between URP and UII (Fig. 3C).

Similar Mechanism of URP and UII on $[Ca^{2+}]_c$ Mobilization in Cultured Rat Astrocytes

URP and UII (0.1 μ M, each) induced a rapide $[Ca^{2+}]_c$ increase (peak) followed by a sustained response (plateau) (Castel et al., 2006). Preincubation of astrocytes with the $G_{i/o}$ protein inhibitor pertussis toxine (PTX, 0.2 μ g/ml, 18 h) did not affect the Ca^{2+} responses induced by both peptides (Fig. 4A). In contrast, the URP- and UII-induced Ca^{2+} mobilization were completely blocked by the PLC inhibitor U73122 (10 μ M, 20 min) and were strongly reduced by the IP_3 -induced Ca^{2+} release and store-operated Ca^{2+} channels blocker 2-APB (50 μ M, 20 min), by 83 and 80%, respectively (Fig. 4B, C). In order to gain insight into the Ca^{2+} pools recruited by UII and URP, $[Ca^{2+}]_c$ were measured in the absence or presence of the extracellular Ca^{2+} chelator EGTA (1 mM, 20 min). Peak responses were partially attenuated by 53% (URP) and 58% (UII) and plateau phases were totally blocked in the presence of both peptides (Fig. 4D). The $[Ca^{2+}]_c$ increase evoked by UII and URP was also suppressed in the presence of the voltage-dependent T-type Ca^{2+} channel mibefradil (1 μ M, Fig. 4E, 20 min), whereas the specific L- and N-type Ca^{2+} channel blockers, nifedipine and ω -conotoxin GVIA (1 μ M, each, 20 min), respectively, did not significantly affect the peptide-evoked elevation of $[Ca^{2+}]_c$ in astrocytes (Fig. 4F, G).

Divergent Actions of URP and UII on $[Ca^{2+}]_c$ Mobilization and PIP Turnover in Cultured Rat Astrocytes

As shown in Fig. 5A, exposure of astrocytes to increasing concentrations of URP and UII (1 pM–10 μ M, each) provoked a robust and sustained increase in $[Ca^{2+}]_c$, followed by a plateau phase. The dose-response study of the effects of URP and UII on $[Ca^{2+}]_c$ mobilization revealed that URP and UII induced a mono- and biphasic dose-dependent $[Ca^{2+}]_c$ increase (Fig. 5A). The maximum stimulations (URP, 157%; UII, 151%) were obtained at 1 μ M for both peptides. The peptide-induced Ca^{2+} response were also investigated at a single astrocyte level using a digital imaging system. Application of 10 nM URP resulted in a rapid and transient increase in $[Ca^{2+}]_c$ levels ($136.9 \pm 3.5\%$), in a subset of 59% astrocytes (16/24, [Fig. 5B](#)). Surprisingly, the UII-evoked $[Ca^{2+}]_c$ response was characterized by a rapid increase followed by a sustained or developing increase of the $[Ca^{2+}]_c$ level, reaching $137.1 \pm 5.2\%$ stimulation after 400 sec of recording, in 70% of cell (21/26, [Fig. 5C](#)).

As observed on Ca^{2+} levels, exposure of astrocytes to graded concentrations of URP (1 pM–1 μ M) induced a dose-dependent increase in $[^3H]$ inositol incorporation into PIP with an EC_{50} value of 2.19 ± 1.42 nM ([Fig. 6A](#)). In contrast, UII (1 pM–1 μ M) evoked a biphasic dose-dependent stimulation of PIP turnover yielding an EC_{50}^1 of 9.1 ± 4.6 pM and an EC_{50}^2 of 11.0 ± 4.6 nM ([Fig. 6A](#)). The amplitude of the stimulatory effect of URP (10 nM; $141.5 \pm 8.6\%$ of control) on PIP metabolism was not significantly different from that obtained with UII (10 nM; $154.4 \pm 12.8\%$ of control). Co-application of URP (10 nM) with a saturating concentration of UII (10 nM) induced an increase in $[^3H]$ inositol incorporation into PIP ($160 \pm 12.8\%$) that did not significantly exceed the effect of each peptide administered alone ([Fig. 6B](#)). Preincubation of astrocytes with PTX (0.2 μ g/mL; 18 h) did not significantly affect the incorporation of $[^3H]$ inositol into PIP induced by URP, whereas PTX significantly inhibited (-56%) the stimulatory effect of UII ([Fig. 6C](#)).

Effect of URP and UII on Cell Viability/Proliferation in Cultured Rat Astrocytes

2-DIV cells were cultured in complete medium additionned with FBS (non synchronized) and then incubated in a FBS-free medium containing URP or UII (100 nM, each). Cell viability was measured 24 h later by using WST-1 assay, allowing detection of mitochondrial activity related to the number of viable cells. Fig. 7A showed that URP failed to affect the cell viability whereas UII stimulated by 132.7% the astrocyte growth. PACAP (10 nM), interleukin-1 (IL-1 β , 10 ng/ μ L) and endothelin-1 (ET-1, 10 nM) were also tested as positive controls and gave rise respectively to 126.3, 169.3 and 171.1% increase (Fig. 7A). The dose-response mechanisms of URP and UII on cell growth was also investigated in non-synchronized (WST-1) and synchronized (18 h of harvesting, counting) astrocytes. A 24 h (Fig. 7B) or 48 h-treatment (Fig. 7C) with graded concentrations of URP failed to significantly modify the rate of cell growth. In contrast, UII induced a dose-dependent cell growth, yielding an EC₅₀ value of 2.37 ± 0.02 nM, and a maximum stimulatory effect of $132.9 \pm 7.0\%$ at 1 μ M (Fig. 7B) in non-synchronized cultures, and evoked a significant cell number increase ($120.1 \pm 2.9\%$) at 0.1 μ M in synchronized conditions (Fig. 7C).

DISCUSSION

Although the cardiovascular effects of the urotensinergic system are now well characterized, little is known concerning the roles of UII and URP in the CNS. Immunohistochemical studies have shown the presence, in the rat brain, of UT-like immunoreactivity in GFAP-positive cells within the brainstem, hypothalamus and thalamus (Lin et al., 2003). In agreement with these observations, we have recently demonstrated that rat cortical astrocytes express UT mRNA, contain the UT protein, and exhibit very high- and high-affinity UII binding sites (Castel et al., 2006). In these cells, UII specifically activates a PLC/PIP/Ca²⁺ transduction pathway, *via* both PTX-sensitive and -insensitive G proteins (Castel et al., 2006). The identification of a UII analog, URP, which apparently exhibits the same pharmacological characteristics as UII (Sugo et al., 2003), raises the question as to whether URP functions as a UII backup in the brain. In the present study, we have looked for the existence of URP binding sites in cultured rat astrocytes and we have compared the mechanism of action of URP and UII on astroglial cell activity.

Competition experiments revealed that URP could displace [¹²⁵I]UII at nanomolar concentrations ($K = 1.62$ nM) with a Hill coefficient close to 1, suggesting the existence of an homogeneous population of URP binding sites in astrocytes. However, the occurrence of two affinity binding sites for UII has been previously described in CHO cells expressing recombinant human UT (Clozel et al., 2004) and in rat cortical astrocytes (Castel et al., 2006). In our model, URP is ten fold less potent in competing for the very high affinity UII binding site and ten fold more potent than the UII high-affinity site, indicating that UII and URP exhibit different binding characteristics in astrocytes. Interestingly, URP and the C-terminal octapeptide of human UII, UII₄₋₁₁, were 10 times more potent than human UII in competing with [¹²⁵I]UII at recombinant UT (Song et al., 2006; Sugo et al., 2003), suggesting that the N-terminal segment of UII decreases the affinity of the peptide for its receptor. It has previously been shown that cultured rat astrocytes express UT mRNA and that UT-like immunoreactivity is located at the plasma membrane of astroglial cells (Castel et al., 2006; Lin et al., 2003). Thus, the present study suggests that the high affinity site bound by URP actually correspond to UT. The cyclic hexapeptide core of UII and URP exhibits

substantial similarities with the biologically active region of somatostatin-14 (Conlon et al., 1997; Spier and De Lecea, 2000; Fig. 1) and UT shares sequence identity with somatostatin receptors (sst) (Marchese et al., 1995). In spite of these relatively high degree of sequence homologies, UII exhibits very low affinity for somatostatin receptors (sst1, sst2 and sst4) either transfected in cell lines (Nothacker et al., 1999) or naturally expressed in astrocytes (Castel et al., 2006; Feindt et al., 1995; Masmoudi et al., 2005). The present data show that URP could displace [125 I-Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14 binding to both high- and low-affinity sites. This observation indicates that, unlike rat UII that selectively binds to UT, URP can interact with both UT and somatostatin receptors expressed in rat cortical astrocytes. In agreement with these data, a recent comparative genomic study has established the existence of a close evolutionary relationship between urotensinergic and somatostatinergic gene families, particularly between URP and somatostatin-14 peptides (Tostivint et al., 2006). Moreover, Malagon et al. (2008) have demonstrated that high concentration of URP stimulates $[Ca^{2+}]_c$ levels and proliferation of recombinant sst-2 expressing CHO cells. Together, it is suggested that shorter urotensinergic peptides in their N-terminal sequence (Fig. 1; human UII and URP) were most potent than longer UII (rat UII) in competing for the high affinity UII binding site UT, and also acquired the ability to bind sst.

Astrocytes have long been considered as non-excitable support of neuronal cells in the brain. It is now well established that astroglial cells express functional channels and receptors enable to sense synaptic transmission (Verkhratsky and Steinhaüser, 2000). In addition, astrocytes participate in neuronal functioning not only *via* feeding and structural support, but also through release of gliotransmitters such as glutamate, D-serine, ATP, cytokines or endozepines (Haydon and Carmignoto, 2006; Lamacz et al., 1996; Volterra and Meldolesi, 2005). Application of URP or UII in the vicinity of astrocytes in culture induced a slow in onset membrane depolarization accompanied by a decrease of the input resistance. It has also been demonstrated that UII depolarizes nervous cells on brainstem cholinergic neurons and evokes a membrane conductance decrease (Clark et al., 2005; Huitron-Resendiz et al., 2005). Astrocytes in culture or acutely dissociated from different brain regions, may express various ion channels

including both T- and L-type Ca^{2+} channels (Barres et al., 1990; MacVicar, 1984), different K^+ channels and also store-operated Ca^{2+} channels (MacVicar and Tse, 1988). Thus, URP as well as UII may inhibit K^+ channel activity and/or stimulate voltage-activated Ca^{2+} channel opening either directly or upon depolarizing stimulus. Astrocytes are able to synthesize, store and release endozepines *via* a Ca^{2+} -dependent and/or cAMP/PKA-dependent ways (Lamacz et al., 1996; Masmoudi et al., 2003). It is likely that depolarization of glial cells evoked by both peptides subserves neurotransmitter secretion (Tritsch and Bergles, 2007), transcription (West et al., 2001) or proliferation (Del Bigio et al., 1994; MacFarlane and Sontheimer, 2000).

It is now clearly established that activation of UII receptor expressed in native cells or in transfected-cell lines, is associated with an increase in PIP turnover causing mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores (Castel et al., 2006; Elshourbagy et al., 2002; Saetrum Opgaard et al., 2000). Exposure of astrocytes to URP and UII was associated with $[\text{Ca}^{2+}]$ mobilization, *i.e.* a rapid peak response followed by a plateau phase. Peptide-induced $[\text{Ca}^{2+}]_c$ increase was PLC-dependent (U73122 sensitive) and resulted from activation of IP_3 -receptor pools (2-APB sensitive). These data are in a good agreement with previous observations made in sartorius muscle, vascular tissues, or in rhabdomyosarcoma cell lines (Brailoiu et al., 2003; Douglas et al., 2004; Saetrum Opgaard et al., 2000; Watanabe et al., 2002). Since PLC-inducing Ca^{2+} mobilization is typically mediated *via* G_q and/or $\text{G}_{i/o}$ protein, and UII receptor sites might be linked to $\text{G}_{i/o}$ protein types (Castel et al., 2006; Douglas et al., 2004; Sugo et al., 2003), the ability of URP *versus* UII was tested in PTX-pretreated astrocytes. PTX, which catalyses ADP-ribosylation of $\text{G}_{i/o}$ -type G proteins and consequently inactivates their transduction mechanisms (Hermans, 2003), did not affect the Ca^{2+} response evoked by both peptides, indicating that URP and UII tested at micromolar range activate a receptor coupled to a PLC/ IP_3 / Ca^{2+} pathway in a $\text{G}_{i/o}$ independent manner. The involvement of the extracellular Ca^{2+} pool was also tested by means of experiments in the presence of EGTA, and voltage-gated Ca^{2+} channel blockers. It is thus demonstrated that extracellular chelation of Ca^{2+} attenuated the peak, and totally blocked the plateau responses, indicating that the transient Ca^{2+} peak is partially attributable to Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum, whereas the sustained

plateau phase is due to Ca^{2+} influx. Surprisingly, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mobilization induced by both peptides was completely abolished by the specific inhibition of the T-type calcium channel (mibefradil) and appeared insensitive to both blockage of L- and N-type channels by nifedipine and ω -conotoxine GVIA, respectively. These observations suggest that high level of UT activation leads to the recruitment of both extra- and intracellular Ca^{2+} pools and to a cross-talk between IP_3 receptors and voltage-dependent T-type channels. T-type channels are represented by three different Ca^{2+} channels, *i.e.* $\alpha 1\text{G}$ or Cav3.1, $\alpha 1\text{H}$ or Cav3.2 and $\alpha 1\text{I}$ or Cav3.3 (Perez-Reyes, 2003) and mRNA transcripts encoding the functional $\alpha 1\text{G}$ T-type subunit channels have been found in cultured astrocytes (Latour et al., 2003). An interesting property of T-type Ca^{2+} channels is their ability to sustain a continuous Ca^{2+} influx in glia at rest by a window current mechanism (Fern et al., 1998). Interestingly, changes in membrane potential and intracellular Ca^{2+} may affect Gq-protein coupled IP_3 production itself (Hirose et al., 1999; Itoh et al., 1992). The components of the basic $\text{G}_q\text{PCR}/\text{IP}_3$ production pathway would be located in or associated with the plasma membrane, making them potentially susceptible to changes in membrane potential lipid in the inner leaflet of the plasma membrane (McLaughlin et al., 2002). These observations may unveil a similar UT- G_q associated mechanisms in astrocytes, where blockage of T-type Ca^{2+} channels may hyperpolarize astrocytes and inhibit IP_3 -induced Ca^{2+} release.

The dose-response curves of URP and UII on $[\text{Ca}^{2+}]$ mobilization show mono- and bi-phasic profiles, respectively. The agonist potency of URP ($\text{EC}_{50} \sim 0.7 \text{ nM}$) is similar to that one of the two sites of UII ($\text{EC}_{50} \sim 0.7 \text{ nM}$), and in close agreement with the binding characteristic at the common high affinity sites of URP and UII, positively coupled to a PLC- G_q protein pathway. It thus appears that the very high affinity binding site of UII, is not activated by URP and is functionally coupled to $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Single-cell digital imaging techniques demonstrated that a majority of cells responded to URP and UII, even if the cell-cell variations in shape and amplitude can be observed. More surprisingly, URP ($0.1 \mu\text{M}$) evoked a transient and reversible increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ whereas a single UII ($0.1 \mu\text{M}$) infusion induced a Ca^{2+} response that remained stable during more than 400 sec of recording. This last effect may be attributable to the

slow dissociation rate of UII, as already described for rat and human UII on UT-transfected cells, skeletal muscle myoblasts and astrocytes (Castel et al., 2006; Clozel et al., 2004, Douglas, 2004; Qi et al., 2005). Thus, the slow dissociation might be specific of UII and would likely accounts for the sustained and washout-resistant contractile responses induced by UII on primate arteries and $[Ca^{2+}]_c$ increase in rat cortical astrocytes.

As observed for Ca^{2+} responses, $[^3H]$ inositol incorporation in PIP show mono- and biphasic profiles for URP and UII, respectively. Accordingly, we had already demonstrated that binding of UII and UII-induced PIP formation partially involved a PTX-sensitive G protein. Here, we observed that both the binding and the stimulatory effect of URP on the PIP metabolism were not affected by a pre-treatment with PTX, indicating that URP is not promiscuously linked to the PTX-sensitive binding site in astrocytes. The percentage increase in PIP metabolism produced by a concomitant administration of URP and UII at their maximum effective concentrations was not significantly different from the effects of both peptides individually tested. Thus, at high concentrations, URP and UII would act on the same PLC-coupled and PTX-insensitive receptor site whereas UII may specifically recruit a PLC-dependent PTX-sensitive site, the identity of both sites remaining to be characterized.

Pathological processes in the brain is usually accompagnied by a significant astrocyte proliferation referred as to astrogliosis. Here, we demonstrated that UII, but not URP, significantly stimulated rat cortical astrocyte proliferation. Numerous studies have demonstrated that vasoactive peptides or interleukins play important roles in astrogliosis. Thus, we demonstrated that in the same set of experiments, PACAP and ET-1 tested at the same concentration than URP and UII, as well as IL1- β , also markedly increase cell growth. Moreover, graded concentrations of URP and UII were tested on either non synchronized or synchronized cells, and the data demonstrate the existence of a UII-specific dose-dependent increase of cell viability. A similar activity for UII has already been observed on rat vascular smooth muscle cells (Sauzeau et al., 2001; Watanabe et al., 2001), on human endothelial cells (Shi et al., 2006), and on UT transfected CHO cells (Ziltener et al., 2002). In this latter case, it is reported that UII recruits MAPK but also Ca^{2+} from extracellular origin *via* voltage-activated Ca^{2+}

channels in UT transfected CHO cell lines (Ziltener et al., 2002). Therefore, UII activates intracellular Ca^{2+} increase *via* a URP-independent cascade, that may sustain astrocyte proliferation. This particular transduction pathway is suspected to be mediated through the PTX-sensitive G protein UT coupled.

In conclusion, the present study has demonstrated for the first time that URP and UII activate functional receptors in native rat cortical astrocytes, exhibiting similar and distinct ways of action. URP and UII bind a high affinity binding site that exhibits the pharmacological characteristics of UT, mediating cell depolarization, endozepine release and $[\text{Ca}^{2+}]$ mobilization through intra- $(\text{IP}_3 \text{ receptor})$ and extracellular pools (T-type Ca^{2+} channels). Ca^{2+} entry through T-type channels appears essential for IP_3 -induced Ca^{2+} increase whereas Ca^{2+} release from intra-cellular stores induces Ca^{2+} release. In addition, UII is able to activate a higher affinity site coupled to a PTX-sensitive G protein, that would be supposed to relay an important physiological astrocyte behavior, *i.e.* cell proliferation.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Mr Sébastien Arthaud, Mrs Huguette Lemonnier and Mr Gérard Cauchois for skillful technical assistance. This work was supported by INSERM (U413), the European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), the Lille-Amiens-Rouen-Caen Neuroscience network and the Conseil Régional de Haute-Normandie. M.D. was recipient of a fellowship from the Lille-Amiens-Rouen-Caen Neuroscience network and the Conseil Régional de Haute-Normandie. H.V. was recipient of the De Bétancourt-Perronet award for scientific cooperation between France and Spain. We thank Pr Alain Fournier (INRS, Pointe-Claire, Canada), who has generously provided PACAP.

REFERENCES

- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. 1999. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 401:282-286.
- Barres BA, Koroshetz WJ, Chun LL, Corey DP. 1990. Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron* 5:527-544.
- Brailoiu E, Brailoiu GC, Miyamoto MD, Dun NJ. 2003. The vasoactive peptide urotensin II stimulates spontaneous release from frog motor nerve terminals. *Br J Pharmacol* 138:1580-1588.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihrmann I, Scalbert E, Malagon MM, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P. 2006. Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 99:582-595.
- Chartrel N, Conlon JM, Collin F, Braun B, Waugh D, Vallarino M, Lahrichi SL, Rivier JE, Vaudry H. 1996. Urotensin II in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J Comp Neurol* 364:324-339.
- Chartrel N, Leprince J, Dujardin C, Chatenet D, Tollemer H, Baroncini M, Balment RJ, Beauvillain JC, Vaudry H. 2004. Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. *J Neurochem* 91:110-118.
- Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boularan C, Carlier L, Ségalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Davoust D, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Tonon MC, Lihrmann I, Pacaud P, Vaudry H. 2004. Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 25:1819-1830.

- Clark SD, Nothacker HP, Blaha CD, Tyler CJ, Duangdao DM, Grupke SL, Helton DR, Leonard CS, Civelli O. 2005. Urotensin II acts as a modulator of mesopontine cholinergic neurons. *Brain Res* 1059:139-148.
- Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Müller C, Müller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P. 2004. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxypiperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl) -urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* 311:204-212.
- Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC, 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 JM, Tostivint H, Vaudry H. 1997. Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul Pept* 69:95-103.
- Coulouarn Y, Lihrmann I, Jégou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, 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 USA* 95:15803-15808.
- Coulouarn Y, Jégou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihrmann I. 1999. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* 457:28-32.
- Coulouarn Y, Fernex C, Jégou S, Henderson CE, Vaudry H, Lihrmann I. 2001. Specific expression of the urotensin II gene in sacral motoneurons of developing rat spinal cord. *Mech Dev* 101:187-190.
- Del Bigio MR, Omara F, Fedoroff S. 1994. Astrocyte proliferation in culture following exposure to potassium ion. *Neuroreport* 5:639-641.
- Desrues L, Tonon MC, Vaudry H. 1990. Thyrotropin-releasing hormone stimulates polyphosphoinositide metabolism in the frog neurointermediate lobe. *J Mol Endocrinol* 5:129-136.

- Desrues L, Lefebvre T, Diallo M, Gandolfo P, Leprince J, Chatenet D, Vaudry H, Tonon MC, Castel H. 2008. Effects of GABA_A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes. *Peptides* 29:727-734.
- Diallo M, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P. 2008. [Orn⁵]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides* 29: 813-819.
- Do Rego JC, Leprince J, Scalbert E, Vaudry H, Costentin J. 2008. Behavioral actions of urotensin-II. *Peptides* 29:838-844.
- Douglas SA, Ohlstein EH. 2000. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 10:229-237.
- Douglas SA, Naselsky D, Ao Z, Disa J, Herold CL, Lynch F, Aiyar NV. 2004. Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br J Pharmacol* 142:921-932.
- Dun SL, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Dun NJ. 2001. Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* 305:9-12.
- Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U, Harrison S, Duddy G, Sechler JL, Ao Z, Maleeff BE, Naselsky D, Disa J, Aiyar NV. 2002. Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br J Pharmacol* 136:9-22.
- Feindt J, Becker I, Blömer U, Hugo HH, Mehdorn HM, Krisch B, Mentlein R. 1995. Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and gliomas. *J Neurochem* 65:1997-2005.
- Fern R. 1998. Intracellular calcium and cell death during ischemia in neonatal rat white matter astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 18:7232-7243.
- Ferrero P, Santi MR, Conti-Tronconi B, Costa E, Guidotti A. 1986. Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:827-831.

- Gandolfo P, Patte C, Thoumas JL, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC. 1999. The endozepine (ODN) stimulates [3h]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology* 38:725-732.
- Gandolfo P, Louiset E, Patte C, Leprince J, Masmoudi O, Malagon MM, Gracia-Navarro F, Vaudry H, Tonon MC. 2001. The triakontatetrapeptide TTN increases $[Ca^{2+}]_i$ in rat astrocytes through activation of peripheral-type benzodiazepine receptors. *Glia* 35:90-100.
- Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, Costa E. 1983. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3531-3535.
- Haydon PG, Carmignoto G. 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.
- Hermans E. 2003. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 99:25-44.
- Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, Takeshima H, Iino M. 1999. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns. *Science* 284:1527-1530.
- Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sanchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, Suzuki C, Nothacker HP, Civelli O, Criado JR, Henriksen SJ, Leonard CS, de Lecea L. 2005. Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci* 25:5465-5474.
- Itoh T, Seki N, Ito S, Kajikuri J, Kuriyama H. 1992. Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J Physiol* 451:307-328.
- Jégou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, Leprince J, Vaudry H, Lihmann I. 2006. Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 495:21-36.
- Lamacz M, Tonon MC, Smih-Rouet F, Patte C, Gasque P, Fontaine M, Vaudry H. 1996. The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Mol Brain Res* 37:290-296.

- Latour I, Hamid J, Beedle A. M, Zamponi GW, MacVicar BA. 2003. Expression of voltage-gated Ca^{2+} channel subtypes in cultures astrocytes. *Glia* 41:347-353.
- Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchère JL, Vaudry H, Tonon MC. 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, Chatenet D, Dubessy C, Fournier A, Pfeiffer B, Scalbert E, Renard P, Pacaud P, Oulyadi H, Ségalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Davoust D, Tonon MC, Vaudry H. 2008. Structure-activity relationships of urotensin II and urotensin II-related peptide. *Peptides* 29:658-673.
- Leroux P, Gonzalez BJ, Laquerrière A, Bodenant C, Vaudry H. 1988. Autoradiographic study of somatostatin receptors in the rat hypothalamus: validation of GTP-induced desaturation procedure. *Neuroendocrinology* 47:533-544.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, Iida M. 2003. Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 26:839-845.
- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL Jr, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT. 1999. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 266:174-178.
- MacFarlane SN, Sontheimer H. 2000. Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* 30:39-48.
- MacVicar BA. 1984. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.
- MacVicar BA, Tse FW. 1988. Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured rat astrocytes. *Glia* 1:359-365.
- Malagon MM, Vaudry H, Van Strien F, Pelletier G, Gracia-Navarro F, Tonon MC. 1993. Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57:777-786.

- Malagon MM, Molina M, Gahete MD, Duran-Prado M, Martinez-Fuentes AJ, Tonon MC, Leprince J, Vaudry H, Castaño JP, Vasquez-Martinez R. 2008. Urotensin II and urotensin II-related peptide activate somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Peptides* 29:711-720.
- Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P. 1995. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 29:335-344.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Fournier A, Patte-Mensah C, Vaudry H, Tonon MC. 2003. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes *via* a PKA-dependent mechanism. *Faseb J* 17:17-27.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Tokay T, Leprince J, Ravni A, Vaudry H, Tonon MC. 2005. Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes *via* distinct receptor subtypes. *J Neurochem* 94:561-571.
- McLaughlin S, Wang J, Gambhir A, Murray D. 2002. PIP₂ and proteins: interactions, organisation, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31:151-175.
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. 1999. Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* 265:123-129.
- Mori M, Fujino M. 2004. Urotensin II-related peptide, the endogenous ligand for the urotensin II receptor in the rat brain. *Peptides* 25:1815-1818.
- Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP, Civelli O. 1999. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* 1:383-385.
- Nothacker HP, Clark S. 2005. From heart to mind. The urotensin II system and its evolving neurophysiological role. *FEBS J* 272:5694-5702.

- Patte C, Gandolfo P, Leprince J, Thoumas JL, Fontaine M, Vaudry H, Tonon MC. 1999. GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia* 25:404-411.
- Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind, II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA. 1980. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5021-5024.
- Pelletier G, Lihrmann I, Vaudry H. 2002. Role of androgens in the regulation of urotensin II precursor mRNA expression in the rat brainstem and spinal cord. *Neuroscience* 115:525-532.
- Pelletier G, Lihrmann I, Dubessy C, Luu-The V, Vaudry H, Labrie F. 2005. Androgenic down-regulation of urotensin II precursor, urotensin II-related peptide precursor and androgen receptor mRNA in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 132:689-696.
- Perez-Reyes E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- Qi JS, Minor LK, Smith C, Hu B, Yang J, Andrade-Gordon P, Damiano B. 2005. Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides* 26:683-690.
- Saetrum Opgaard O, Nothacker HP, Ehlert FJ, Krause DN. 2000. Human urotensin II mediates vasoconstriction *via* an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* 406:265-271.
- Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. 2001. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 88:1102-1104.
- Shi L, Ding W, Li D, Wang Z, Jiang H, Zhang J, Tang C. 2006. Proliferation and anti-apoptotic effects of human urotensin II on human endothelial cells. *Atherosclerosis* 188:260-264.
- Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, Thompson JP, Rowbotham DJ, Lambert DG. 2006. Cell and tissue responses of a range of urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 373:148-157.

- Spier AD, de Lecea L. 2000. Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Rev* 33:228-241.
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M, Fujino M. 2003. Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 310:860-868.
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S. 2001. Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* 22:1175-1179.
- Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G. 1990. Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides* 15:17-24.
- Tostivint H, Joly L, Lihrmann I, Parmentier C, Lebon A, Morisson M, Calas A, Ekker M, Vaudry H. 2006. Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2237-2242.
- Tritsch NX, Bergles DE. 2007. Defining the role of astrocytes in neuromodulation. *Neuron* 54:497-500.
- Vaudry H, Tonon MC, Delarue C, Vaillant R, Kraicer J. 1978. Biological and radioimmunological evidence for melanocyte stimulating hormones (MSH) of extrapituitary origin in the rat brain. *Neuroendocrinology* 27:9-24.
- Verkhatsky A, Steinhäuser C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev* 32:380-412.
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. 2001. Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens* 19:2191-2196.

- Watanabe T, Koba S, Katagiri T, Pakala R, Benedict CR. 2002. Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic effect of various vasoactive compounds on rabbit aortic smooth muscle cells. *Jpn Heart J* 43:409-416.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME. 2001. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11024-11031.
- Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O. 2002. Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* 22:155-168.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Comparison of the primary structures of rat and human urotensin II (UII), urotensin II-related peptide (URP) and somatostatin-14. Common residues are indicated in bold characters.

Fig. 2. Displacement curves and binding parameter tables comparing competition of [125 I]UII and [125 I-Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14 binding by UII, URP and somatostatin-14 on cultured rat astrocytes. (A) Cells were incubated for 3 h at 22°C with 0.2 nM of [125 I]UII in the absence or presence of graded concentrations (1 pM to 1 μ M) of URP (■) or UII (▒). (B) Cells were incubated for 3 h at 22°C with 0.4 nM of [125 I-Tyr⁰,D-Trp⁸]somatostatin-14 in the absence or presence of graded concentrations of URP (■, 10 pM to 31.6 μ M) or somatostatin-14 (□, 10 pM to 1 μ M). Data are mean of three to five independent experiments performed in triplicate. K , dissociation constant; n_H , Hill coefficient.

Fig. 3. Effects of URP and UII on the resting membrane potential and on the release of octadecaneuropeptide immunoreactivity (ODN-LI) from cultured rat astrocytes. (A) Typical voltage responses to URP and UII (100 nM, 2 min, each) obtained in the amphotericin B-perforated configuration with the current-clamp mode. Hyperpolarizing pulses (2 pA, 10 ms, 0.125 Hz) were applied to monitor the cell input resistance. (B) Quantitative analysis of URP- and UII-induced membrane depolarizations. (C) Cells were incubated for 1 h in the absence or presence of graded concentrations (0.1 nM, 10 nM, 1 μ M) of URP or UII. Data are mean $\pm$ S.E.M. of three to twelve independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; one way ANOVA followed by a Dunnett's *post-hoc* test.

Fig. 4. Mechanisms of URP- or UII-induced increase of [Ca^{2+}]_c in cultured rat astrocytes. Cells were loaded with fluo-4 AM (40 min) and exposed to URP or UII (0.3 μ M, each) in the absence or presence of PTX (0.2 μ g/ μ l, A), U73122 (10 μ M, B), 2-APB (50 μ M, C), EGTA (3 mM, D), mibefradil (1 μ M, E), nifedipine (1 μ M, F) or ω -conotoxin GVIA (1 μ M, G). Data are expressed as percentages of the corresponding

control values in the absence of peptides. Data are mean $\pm$ S.E.M. of at least 7 independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, non-significant; one way ANOVA followed by a Dunnett's *post-hoc* test.

Fig. 5. Divergent effects of URP and UII on $[Ca^{2+}]_c$ in cultured rat astrocytes. (A) Cells were loaded with fluo-4 AM (40 min) and exposed to graded concentrations of UII or URP (1 pM to 1 μ M, each). Representative recordings of cells exposed to URP (left) and UII (middle). Dose response curve of the mean of maximum amplitude of $[Ca^{2+}]_c$ transient induced by URP or UII of at least 10 independent experiments (right). The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of peptides. (B and C) Cells were loaded with fura-2 AM (30 min) and perfused ($\sim$ 100 sec) with URP (0.1 μ M, B) or UII (0.1 μ M, C). Galleries of images illustrate the time course change of fluorescence before perfusion (control), at the maximum amplitude (peak), at 300 sec and at 400 sec of recording. Bar graphs represent means of response at peak, at 300 and at 400 sec of recording. Curves show typical recordings of single astrocytes responding to URP (B) and UII (C). The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of peptide (control). UII or URP vs control, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; one way ANOVA followed by a Dunnett's *post-hoc* test. Mean values at 300 or 400 sec vs peak, $^{##}$, $p < 0.01$; NS, non-significant; non-parametric Friedman's test.

Fig. 6. Distinct activities of URP and UII on PIP metabolism in cultured rat astrocytes. Cells were incubated with $[^3H]$ inositol for 2 h in the absence or presence of test substances. (A) Effects of graded concentrations of URP and UII (1 pM to 1 μ M, each). (B) Comparison of the effect of URP (10 nM), UII (10 nM) or URP+UII (10 nM, each). (C) Effect of PTX (0.2 μ g/mL, 18 h) on URP- and UII- (10 nM, each) induced $[^3H]$ inositol incorporation. Data obtained with UII are extracted from Castel et al. (2006). Data are mean $\pm$ S.E.M. of four to five independent experiments performed in triplicate or quadruplicate. URP or UII vs control, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, not statistically different from the control; URP vs UII, $^{#}$ $p < 0.05$; $^{###}$ $p < 0.001$; PTX treated

vs UII or URP, $^{***}p < 0.001$; NS, not significant; one way ANOVA followed by a Dunnett' or Tukey's post-hoc test.

Fig. 7. Effects of UII and URP on cultured rat astrocyte viability. **(A)** Non-synchronized cells were incubated for 24 h in the absence or presence of URP (10 nM), UII (10 nM), PACAP (10 nM), IL-1 β (10 ng/mL) or ET-1 (10 nM). **(B)** Non-synchronized cells were incubated for 24 h in the absence or presence of graded concentrations of URP or UII. **(C)** Synchronized cells were incubated for 24 h in the absence or presence of graded concentrations of URP or UII (10 pM to 1 μ M). For **A** and **B**, viability was determined with WST-1; for **C**, the mitogenic activity was determined by counting cell number. The results are expressed as percentages of control values. Data are mean $\pm$ S.E.M of three independent experiments performed in quintuplicate. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; NS, not statistically different from the control; one way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test.

Fig. 8. Proposed model depicting distinct and common transduction pathways activated by URP and UII through UT on cultured rat astrocytes. At low concentrations, UII binds a very high affinity site and activates a PTX-sensitive $G_{i/o}$ protein-coupled UT signaling pathway relaying IP $_3$ production. This specific UII-activating transduction cascade may induce astroglial cell proliferation. At high concentrations, URP and UII recruit a high affinity site also attributable to UT that can be both associated to a G_q /PLC/IP $_3$ /Ca $^{2+}$ pathway and T-type voltage-dependent Ca $^{2+}$ channels. These extra- and intra-cellular Ca $^{2+}$ pools appear cross-dependent, and would be involved in astrocyte depolarization and endozepine release.

Peptides	Sequences		
rat Ull	Q H G T A P E C	F W K Y	C I
human Ull	E T P D C	F W K Y	C V
human Ull ₄₋₁₁	D C	F W K Y	C V
URP	A C	F W K Y	C V
Somatostatin-14	A G C K N F F W K T F T S C		

Figure 1
Diallo et al.

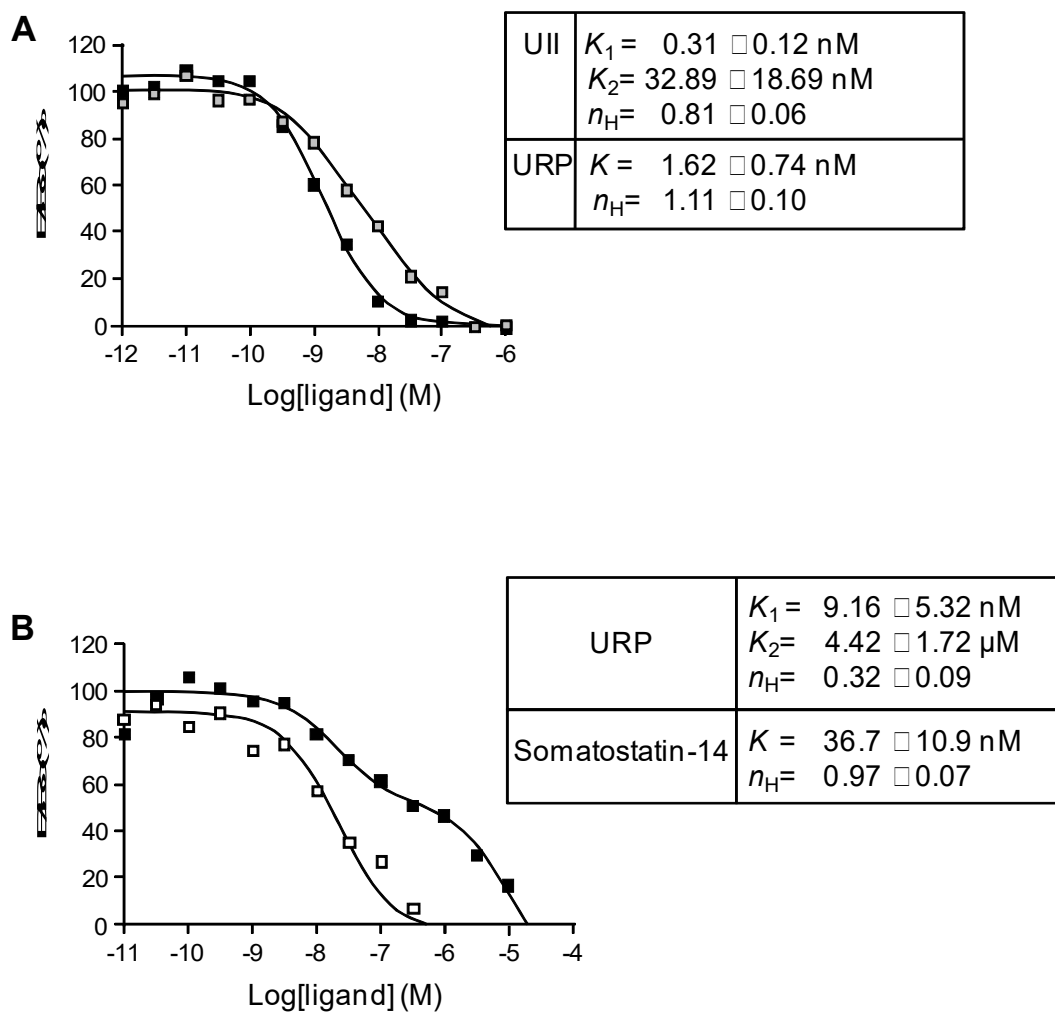


Figure 2
Diallo *et al.*

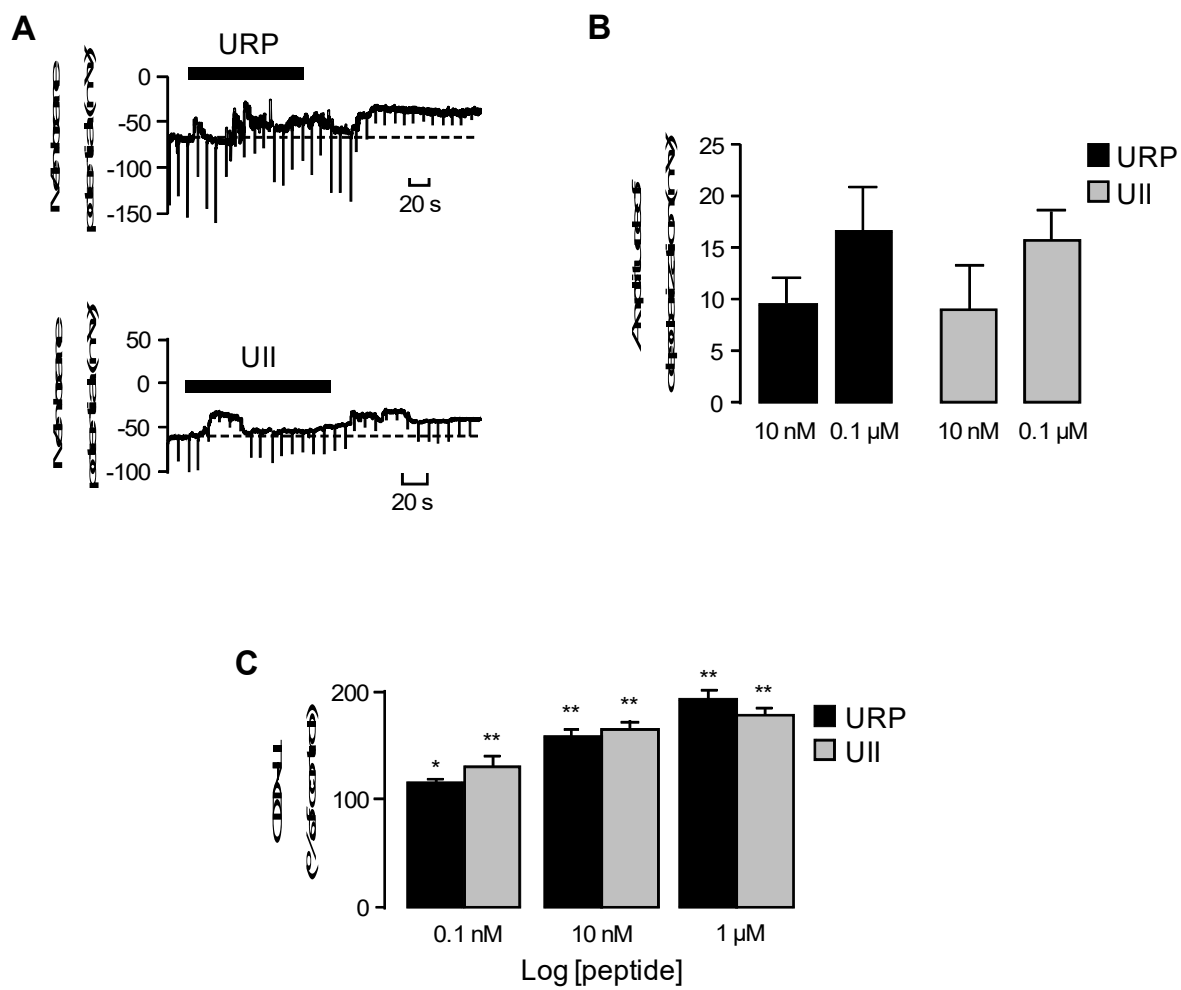


Figure 3
Diallo *et al.*

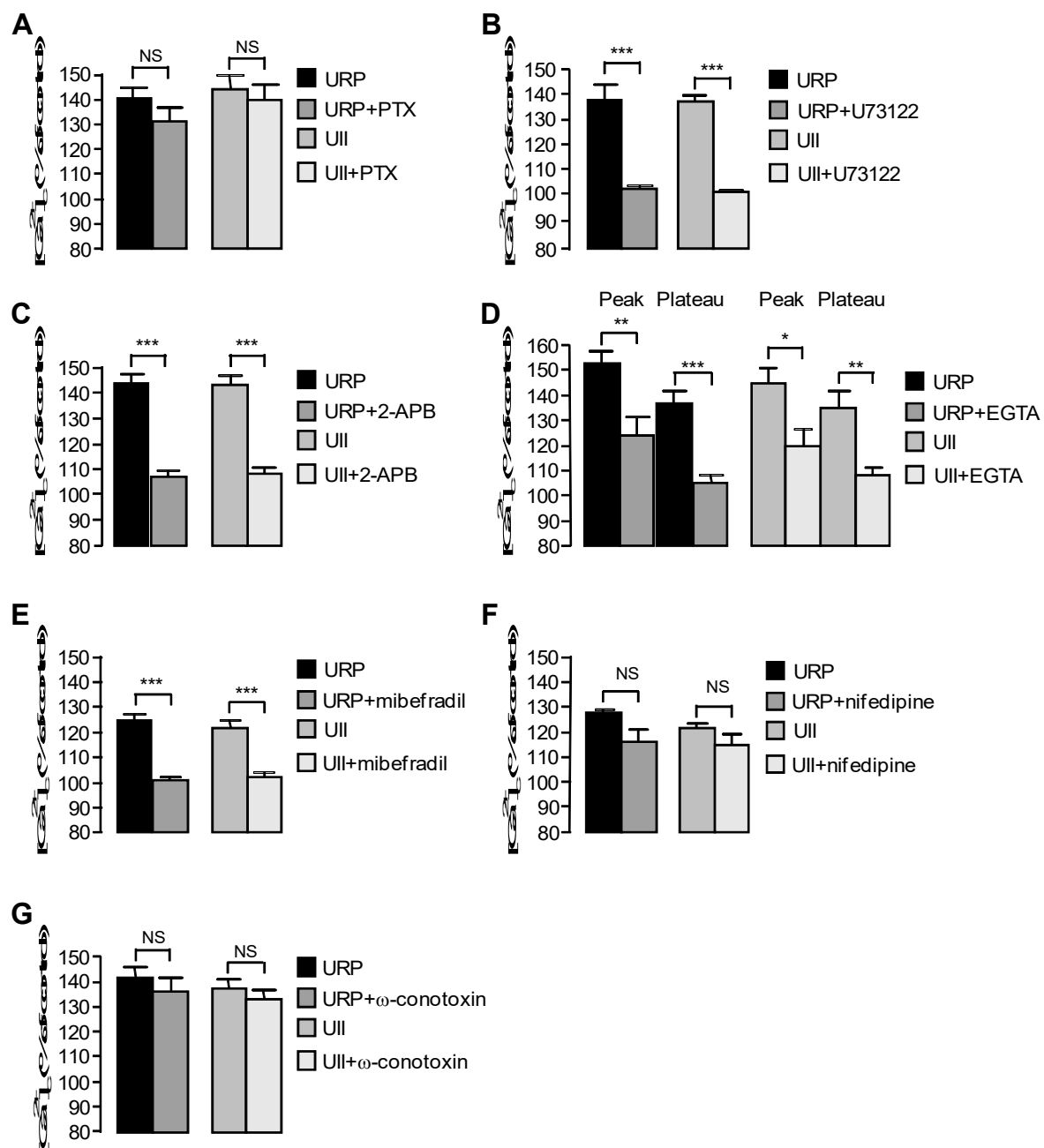


Figure 4
Diallo et al.

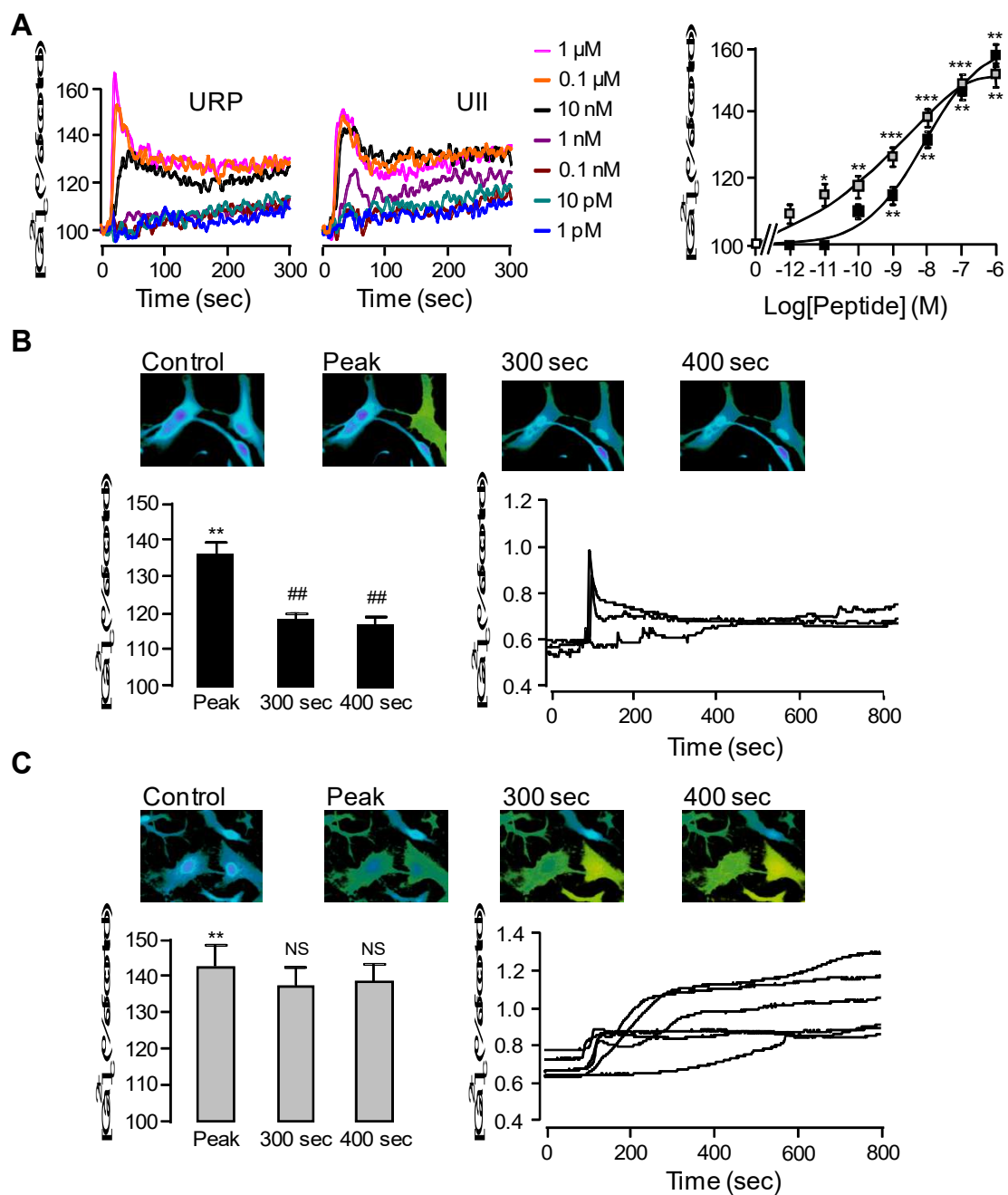


Figure 5
Diallo et al.

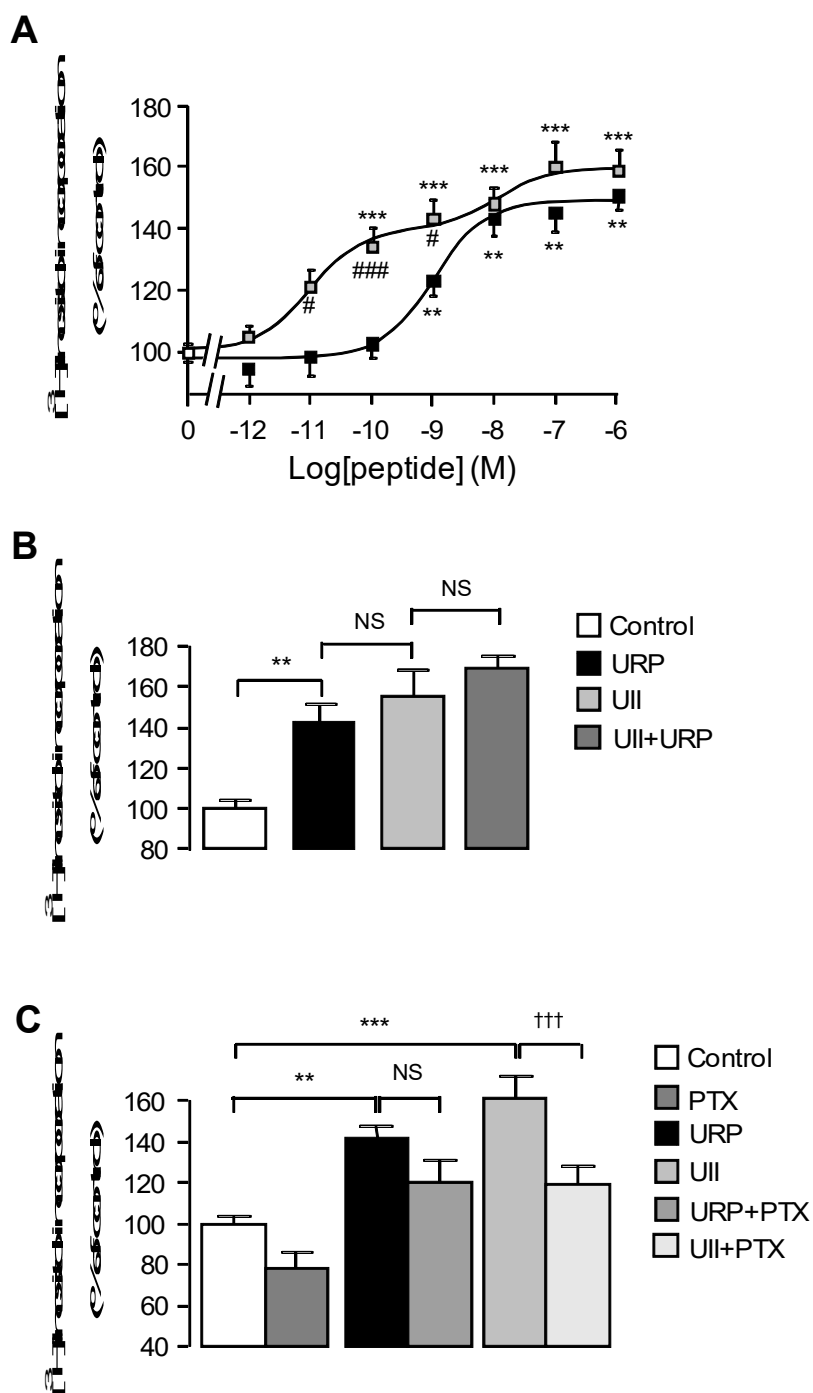


Figure 6
Diallo *et al.*

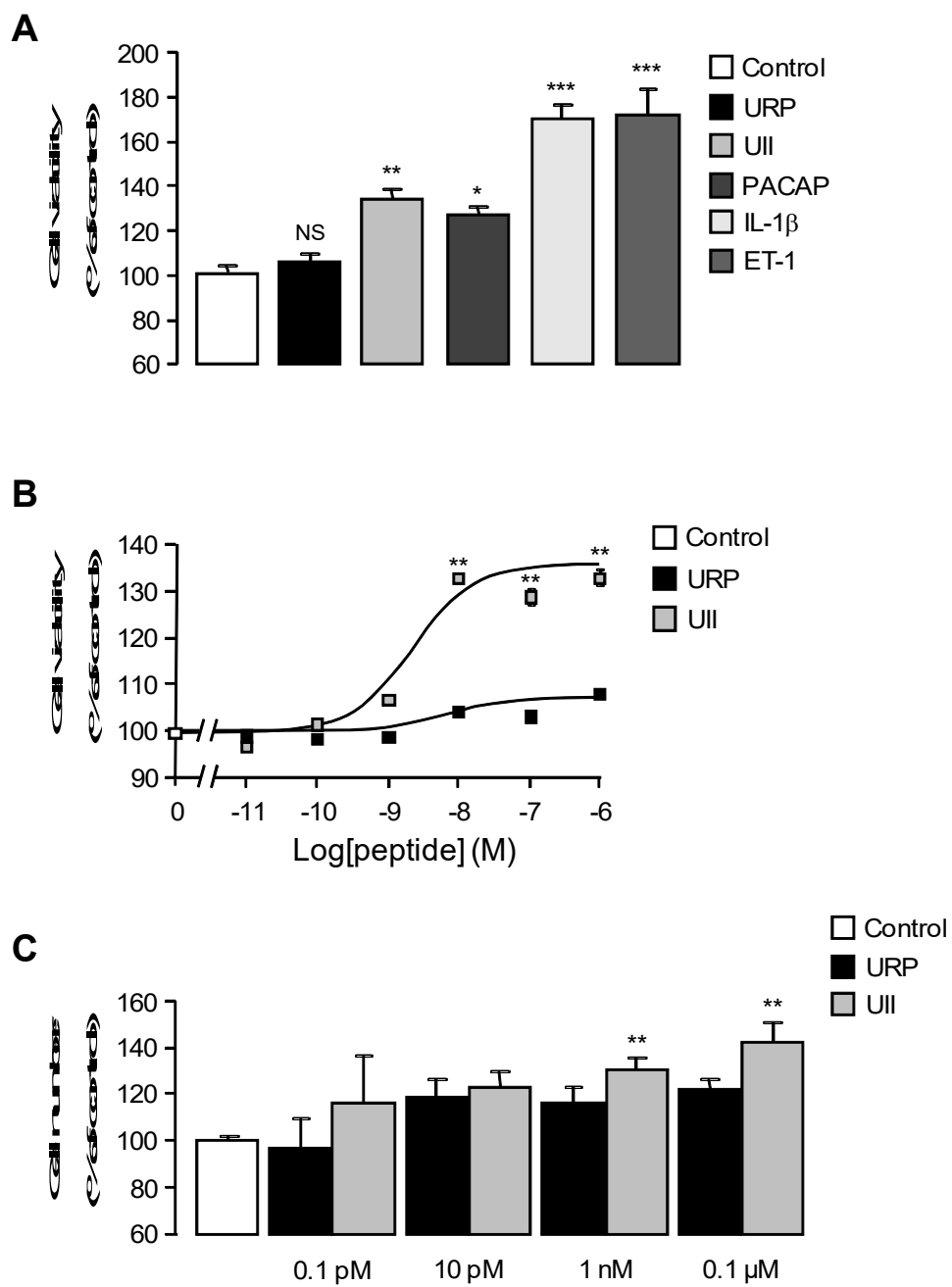


Figure 7
Diallo *et al.*

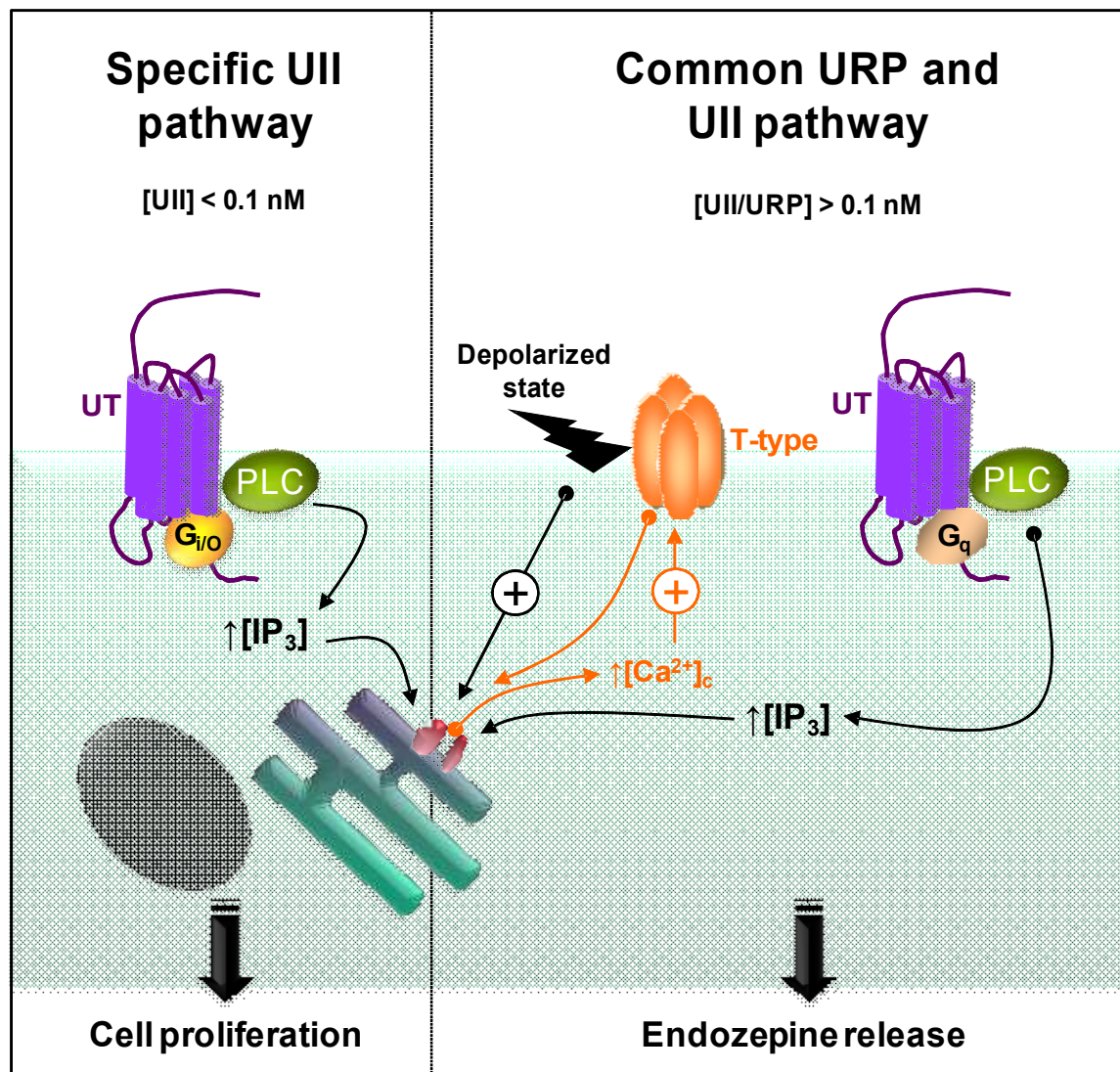


Figure 8
 Diallo et al.

Discussion

L'urotensine II ou UII est un peptide cyclique initialement isolé à partir d'extraits d'urophyses de Gobie pour ses propriétés spasmogènes (Pearson *et al.*, 1980). Longtemps cantonnés aux poissons, les travaux sur l'UII s'ouvrirent aux espèces supérieures grâce à Conlon *et al.* (1992b) qui démontrèrent pour la première fois la présence du peptide dans le cerveau d'un tétrapode, la Grenouille verte *Rana ridibunda*. Depuis, l'UII a été clonée chez plusieurs espèces de mammifères dont le Rat (Coulouarn *et al.*, 1999), la Souris (Coulouarn *et al.*, 1999) et l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998; Ames *et al.*, 1999). Plus récemment, en recherchant la forme mature de l'UII dans le cerveau de Rat, Sugo *et al.* (2003) ont isolé un paralogue de l'UII qu'ils ont nommé *urotensin II-related peptide* ou URP. L'UII et l'URP partagent dans leur extrémité C-terminale un hexapeptide cyclique, CFWKYC, extrêmement conservé au cours de l'évolution (Douglas *et al.*, 2004). Par une stratégie de pharmacologie inverse, il a été démontré que ces deux peptides sont les ligands naturels d'un GPCR appelé UT (Ames *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999; Sugo *et al.*, 2003).

L'UII, l'URP et l'UT sont fortement exprimés dans le système cardiovasculaire, et beaucoup de laboratoires académiques et privés se sont penchés sur l'implication potentielle du système urotensinergique dans certaines pathologies cardiaques et vasculaires; l'ensemble des travaux publiés sur ce sujet représente plus de 30 % des articles et revues sur l'UII référencés sur *Pubmed*. Néanmoins, l'UII, l'URP et leur récepteur sont également présents dans le SNC, mais leur rôle au niveau cérébral reste très mal connu. L'UT est largement distribué dans le parenchyme nerveux et une étude d'immunohistochimie a révélé sa présence dans une sous-population d'astrocytes,

notamment dans le thalamus et l'hippocampe (Lin *et al.*, 2003b), indiquant que l'UII et/ou l'URP pourrait participer au contrôle de la fonction astrocytaire. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont pour objectif de mieux comprendre le rôle et les mécanismes d'action de l'UII et de l'URP sur les astrocytes.

1. Caractérisation de sites de liaison spécifiques et fonctionnels de l'UII et de l'URP sur les astrocytes

A l'aide de plusieurs approches complémentaires (RT-PCR, *western blot* et immunohistochimie), nous avons pour la première fois mis en évidence la présence de l'UT dans un modèle d'astrocytes corticaux de Rat en culture. Le protocole de purification des astrocytes validé au laboratoire permet de s'affranchir de la présence de neurones, de la microglie et d'oligodendrocytes, mais également de cellules vasculaires lisses ou endothéliales connues pour exprimer l'UT (Ames *et al.*, 1999). Des expériences de double marquage réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre la GFAP ou contre l'UT ont démontré que le récepteur est bien exprimé dans les astrocytes, avec une localisation préférentielle au niveau de la membrane plasmique. L'analyse des expériences de saturation par la méthode de Scatchard a révélé la présence d'une population hétérogène de sites, de très haute et haute affinités. Ces résultats ont été confirmés par le profil biphasique des courbes de compétition ainsi que par la valeur du coefficient de Hill nettement inférieure à 1. Bien que l'UT soit le seul récepteur urotensinergique identifié à ce jour, nos résultats suggéraient l'existence d'un second récepteur urotensinergique encore inconnu. Cependant, Clozel *et al.*, (2004) ont également observé deux sites de liaison sur des cellules CHO transfectées

avec l'ADNc codant l'UT. En accord avec nos études d'association/dissociation, l'un des deux sites présente une constante de dissociation extrêmement basse, suggérant que la liaison de l'UII sur l'UT peut être quasi irréversible. Cette particularité, étayée par d'autres études *ex vivo*, serait à l'origine de la persistance de certains effets vaso-actifs de l'UII (Douglas *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2005).

La comparaison des séquences de l'UII et de l'URP avec d'autres neuropeptides révèle d'importantes homologies de structure avec la SS (Conlon *et al.*, 1997), dont on sait qu'elle peut interagir avec les récepteurs sst-1, sst-2 et sst-4 exprimés par les astrocytes (Feindt *et al.*, 1995; Masmoudi *et al.*, 2005). Dans ce contexte, il était pertinent d'envisager que le site de haute affinité corresponde à un récepteur somatostatinergique. En accord avec cette hypothèse, les récents travaux de Malagon *et al.* (2008) ont révélé qu'*in vitro*, l'UII et l'URP sont capables d'activer les récepteurs sst-2 et sst-5 sur des lignées transfectées. Cependant, nous avons clairement montré que la SS est incapable de déplacer la liaison de l'[¹²⁵I]-UII dans notre modèle, permettant de conclure que l'UII interagit avec des récepteurs spécifiques.

Dans la mesure où l'UT appartient à la superfamille des GPCR, le profil biphasique pouvait également traduire la présence du récepteur sous une forme couplée ou découplée à une protéine G (Suman-Chauhan *et al.*, 1996; Alves-Rodrigues *et al.*, 1998; Rinken *et al.*, 2001). Le fait que le Gpp(NH)p, un analogue non hydrolysable du GTP qui permet de dissocier l'ensemble des complexes récepteur/protéine(s) G, ne modifie pas le profil des courbes de compétition (Figure 11), permet d'écarter définitivement cette éventualité.

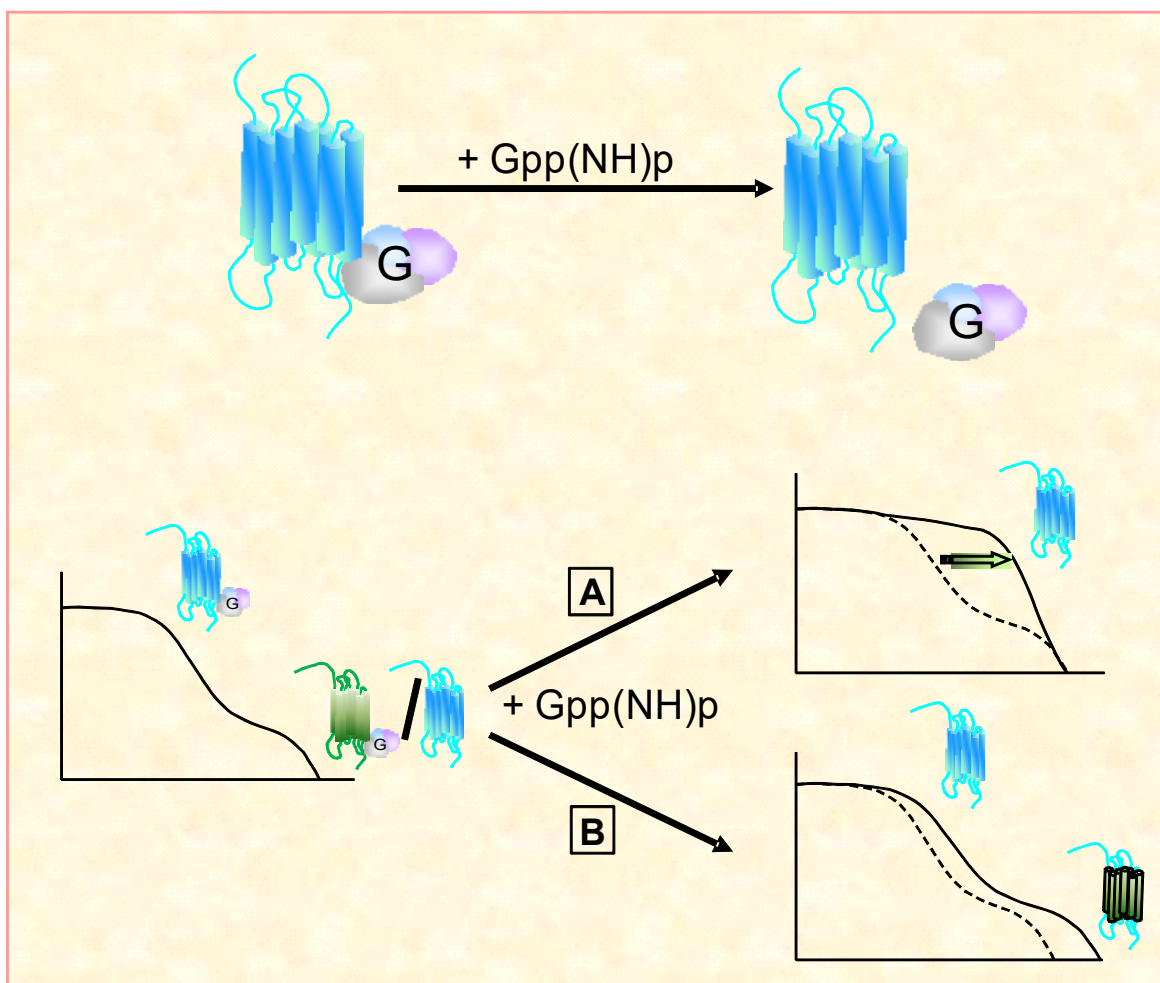


Figure 11: Effet théorique du Gpp(NH)p sur la liaison de l'UII sur les sites de liaison exprimés par les astrocytes corticaux de Rat en culture. Le couplage des GPCR induit par le Gpp(NH)p, un analogue non hydrolysable du GTP, permet de déterminer si l'UII interagit avec un **(A)** ou deux **(B)** GPCR.

La capacité de l'UT à former des homo- et/ou hétérodimères, dont les propriétés de liaison seraient différentes (Bai, 2004) constitue une autre hypothèse qui a retenu notre attention. Les connaissances dans ce domaine se sont nettement étoffées et il est aujourd'hui acquis que bon nombre de récepteurs forment des homodimères, *e.g.* les récepteurs dopaminergiques D_2 (Lee *et al.*, 2003), muscariniques M_3 (Zeng & Wess, 2000) et adrénergiques β_2 (Angers *et al.*, 2000), ou des hétérodimères, *e.g.* les récepteurs sst-5 et D_2 (Rocheville *et al.*, 2000). Les résultats de Sawada et Ichinose (1999), obtenus sur des neurones d'Aplysie, sont particulièrement intéressants puisqu'ils révèlent que l'UII potentialise le courant chlore induit par le GABA,

suggérant l'existence d'une interaction entre l'UT et le R-GABA_A. Dans ce sens, nous avons montré que le GABA et l'isoguvacine, un agoniste des R-GABA_A, inhibent l'effet stimulant de l'UII sur le métabolisme des PIPs dans les astrocytes en culture. De même, l'activation de l'adénylyl cyclase (AC) par l'UII est sous le contrôle GABAergique, puisque le GABA et l'isoguvacine réduisent la stimulation de l'AC induite par l'UII. Ces données, qui montrent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre l'UT et le R-GABA_A, permettent d'envisager des phénomènes de dimérisation entre ces deux récepteurs. Les chercheurs de notre équipe s'attachent actuellement à vérifier cette hypothèse.

Depuis une dizaine d'années, plusieurs groupes se sont intéressés aux relations structure/activité de l'UII et de l'URP (Leprince *et al.*, 2008). L'importance de la portion C-terminale et du pont dissulfure dans l'interaction ligand/récepteur a été clairement établie, que ce soit dans un modèle d'anneaux d'aortes de Rat (Flohr *et al.*, 2002; Labarrère *et al.*, 2003) ou sur des cellules transfectées par l'UT (Kinney *et al.*, 2002; Chatenet *et al.*, 2004). En accord avec ces observations, nous avons montré que l'UII₄₋₁₁ humaine (hUII₄₋₁₁) est aussi puissante que l'hUII pour déplacer l'['¹²⁵I]UII alors que le [Ser^{5,10}]hUII₄₋₁₁, dépourvu de structure cyclique, est quasiment inactif.

L'ensemble des travaux menés à la fois sur des modèles *in vitro* (Liu *et al.*, 1999; Elshourbagy *et al.*, 2002; Ziltener *et al.*, 2002) et *ex vivo* (Saetrum Opgaard *et al.*, 2000), a permis d'établir que l'UT est positivement couplé à une PLC. De fait, l'administration de concentrations croissantes d'UII ou d'URP sur des astrocytes en culture se traduit par une augmentation dose-dépendante du métabolisme des PIPs associée à une élévation de [Ca²⁺]_c. A l'instar des données obtenues grâce aux études

de liaison, seule la courbe dose-réponse de l'UII est strictement biphasique. Par conséquent, ce peptide serait le seul capable d'interagir avec deux sites de liaison distincts sur les astrocytes corticaux de Rat en culture. Plusieurs arguments plaident en faveur de cette hypothèse : 1) la courbe de compétition obtenue entre l'['¹²⁵I]UII et l'URP est strictement monophasique, 2) seule l'augmentation du métabolisme des PIPs induite par l'UII est partiellement sensible à la toxine pertussique (PTX), et 3) cette sensibilité est retrouvée dans les études de compétition puisque le site de très haute affinité subit un décalage vers la droite en présence de la toxine. Une sensibilité partielle à la PTX a également été rapportée sur des cellules CHO transfectées avec l'UT humain (Song *et al.*, 2006). L'ensemble de ces travaux nous permettent de conclure que l'URP interagirait avec le site de haute affinité de l'UII, couplé à une protéine G insensible à la PTX.

L'UII et l'URP présentent des profils pharmacologiques distincts et pourraient donc, en dépit de leurs analogies structurales, exercer des rôles physiologiques différents. Même si les données relatives aux activités biologiques de l'URP restent très fragmentaires, les travaux de Prosser *et al.* (2006) supportent cette hypothèse. En effet, appliqués sur des artères coronaires de Rat, l'UII et l'URP induisent tous les deux une vasodilatation des artères coronaires de Rat, mais l'URP, qui est incapable de maintenir son effet, est de surcroît environ 10 fois moins puissant que l'UII. De plus, après ischémie, seule l'UII est capable de réduire la contractilité ventriculaire et la sécrétion de l'*atrial natriuretic peptide* (Prosser *et al.*, 2008).

Dans le prolongement de ces travaux, nous avons étudié les mécanismes intracellulaires sous-tendus par l'activation de l'UT dans les astrocytes.

Nos résultats montrent que l'UII et l'URP entraînent une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ *via* le recrutement de pools intra- et extracellulaires de calcium. L'utilisation de bloqueurs sélectifs de canaux calciques a permis de démontrer que l'influx de calcium est relayé par les canaux de type T. Ces canaux présentent la particularité d'être activés pour de faibles dépolarisations membranaires, et sur le plan fonctionnel, ils jouent notamment un rôle dans le contrôle de l'activité cardiaque (Vassort *et al.*, 2006), de la sécrétion

d'hormones (Carbone *et al.*, 2006) et de la prolifération cellulaire (Lory *et al.*, 2006).

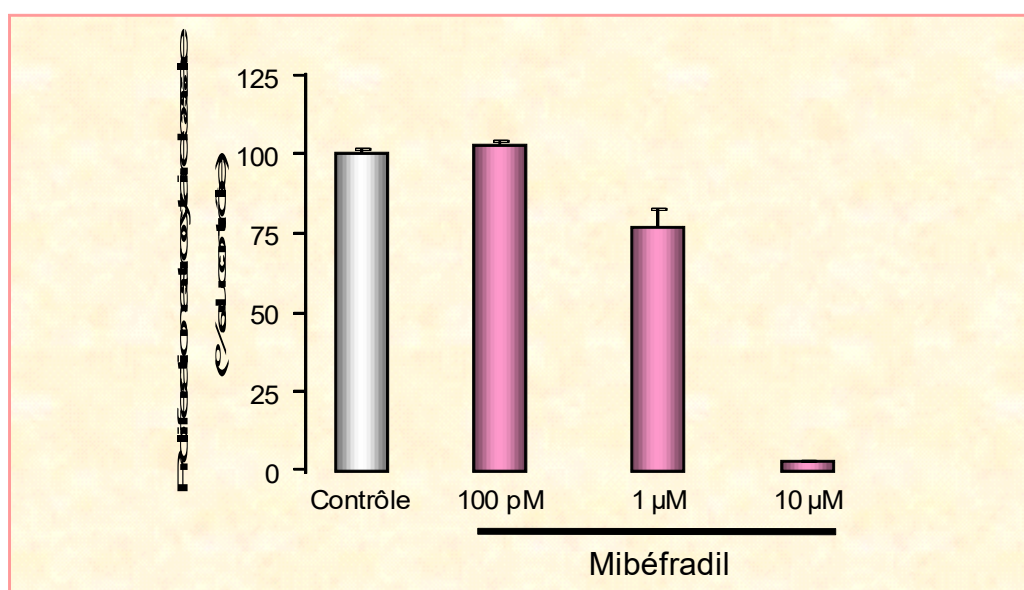


Figure 12: Effet du mibéfradil, un bloqueur sélectif des canaux calciques de type T, sur la prolifération basale d'astrocytes corticaux de Rat en culture. Les résultats sont exprimés en % du contrôle et correspondent à la moyenne des valeurs obtenues à partir de trois expériences indépendantes de six échantillons chacune.

Si l'on considère ce dernier point, il est donc (très) vraisemblable que les effets mitogènes de l'UII sur les astrocytes soient conditionnés, du moins en partie, par

l'ouverture des canaux T. A l'appui de cette hypothèse, Panner *et al.* (2005) ont montré que le mibéfradil, un bloqueur des canaux T utilisé dans notre modèle, inhibe de façon drastique la prolifération de cellules tumorales. Les auteurs envisagent même que ces canaux constitueraient de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de certains cancers, et notamment les tumeurs cérébrales (Panner et Wurster, 2006). De fait, comme l'illustre la figure 12, l'application de concentrations croissantes de mibéfradil sur les astrocytes en culture provoque une chute de la densité cellulaire.

De façon moins attendue, l'incubation des astrocytes en présence d'UII augmente de façon dose-dépendante la production d'AMPc. Le recrutement simultané d'une PLC et d'une AC a déjà été observé sur les astrocytes pour d'autres composés comme le PACAP (Masmoudi *et al.*, 2003) et les anaphylatoxines C3a et C5a (Sayah *et al.*, 2003). La courbe dose-réponse est gaussienne avec un effet maximal obtenu à des concentrations picomolaires. Le fait que le SQ22536, un bloqueur de l'AC, supprime cette activité stimulante, confirment l'existence d'un couplage positif entre l'UT et une AC. Cependant, pour des concentrations supérieures à 10 nM, l'activation de l'AC par l'UII diminue progressivement. Ce phénomène pourrait être lié à un transfert de couplage PKA-dépendant du récepteur d'une protéine G_s vers une protéine G_i . En effet, nous montrons que l'H89, un inhibiteur de PKA, prévient l'atténuation de la formation d'AMPc observée en présence de fortes concentrations d'UII. Comme Song *et al.* (2006) l'ont rapporté, l'UII est également capable d'inhiber la formation d'AMPc induite par la forskoline sur des cellules transfectées avec l'UT. Un mécanisme de double couplage protéines G_s/G_i a déjà été mis en évidence pour

d'autres GPCR comme les récepteurs β_2 adrénergiques (Kilts *et al.*, 2000; Xiao, 2001). La PKA pourrait exercer son effet en phosphorylant des sites consensus de phosphorylation présents dans la région C-terminale de l'UT. En conclusion, l'interaction de l'UII avec l'UT exprimé par les astrocytes corticaux de Rat stimule les voies G_q/PLC et G_s/PKA , et l'activation de la PKA entraînerait une baisse d'affinité de l'UT pour la protéine G_s au profit de la protéine G_i .

2. Caractérisation d'un antagoniste peptidique de l'UT sur les astrocytes

L'ensemble des études des relations structure-activité de l'UII et de l'URP a notamment permis de souligner l'importance du cycle, et en particulier de la triade FWK. La présence d'un coude γ -inversé dans la structure de l'URP, mise en évidence par RMN, serait indispensable à la liaison du peptide sur son récepteur (Chatenet *et al.*, 2004). D'autres travaux ont démontré que la substitution de la lysine en position 8 par une ornithine dans la forme humaine de l'UII génère un antagoniste capable de bloquer les effets vasoconstricteurs du peptide natif (Camarda *et al.*, 2002b; Vergura *et al.*, 2004). Sur la base de ces données, les chercheurs du laboratoire ont synthétisé plusieurs dizaines d'analogues de l'UII et de l'URP, dont le [D-Trp⁴]URP, l'[Orn⁵]URP et le [D-Tyr⁶]URP, tous les trois capables de bloquer les effets vasoactifs de l'UII sur des anneaux d'aortes de Rat (Chatenet *et al.*, 2004). Appliqués au voisinage des astrocytes, le [D-Trp⁴]URP et le [D-Tyr⁶]URP entraînent une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ comparable à celle observée avec l'URP, tandis que l'[Orn⁵]URP est dépourvu d'activité agoniste intrinsèque. L'[Orn⁵]URP inhibe de façon dose-

dépendante la mobilisation de calcium induite par l'UII et l'URP et entraîne un décalage vers la droite des courbes doses-réponses des agonistes, associé à une diminution de leur efficacité. L'ensemble de ces résultats montre que l'[Orn⁵]URP se comporte comme un antagoniste non compétitif/insurmontable de l'UT dans notre modèle. L'[Orn⁵]URP représente donc un outil particulièrement intéressant pour le développement de nouveaux antagonistes sélectifs de l'UT.

D'autres antagonistes peptidiques ont été développés dont l'urantide ([Pen⁵,D-Trp⁷,Orn⁸]UII₄₋₁₁) qui est totalement dépourvu d'activité agoniste lorsqu'il est testé sur des anneaux d'aortes de Rat (Patacchini *et al.*, 2003; Camarda *et al.*, 2004). Toutefois, appliqué sur des cellules CHO transfectées avec l'UT humain, l'urantide entraîne une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ (Camarda *et al.*, 2004), indiquant l'existence d'une variabilité inter-espèces. La présence de motifs polyprolines de type I, connus pour interagir avec des protéines à domaine SH3 (Li, 2005), constitue une spécificité de l'UT humain qui pourrait être à l'origine de ces discordances. Une extrême prudence est donc de rigueur lorsque l'on souhaite transposer toutes formes de résultats de l'animal à l'Homme.

Des antagonistes non-peptidiques ont également été caractérisés, notamment le palosuran (Clozel *et al.*, 2004) et le SB-657510 (Douglas *et al.*, 2005). Développé par la Société Actelion, le palosuran a donné lieu à des résultats prometteurs, obtenus *in vitro* (Marco *et al.*, 2008) et *in vivo* sur des modèles physiopathologiques murins (Clozel *et al.*, 2004; 2006). Administré chez des patients diabétiques présentant une macroalbuminurie, ce composé diminue sensiblement les troubles rénaux (Sidharta *et al.*, 2006). Cependant, trois autres études indépendantes, également menées par la

Société Actélion n'ont pas confirmé ces résultats (http://www.actelion.com/uninet/www/www_main_p.nsf/Content/). Plus récemment, des études de liaison ont révélé que l'affinité du palosuran pour l'UT varie considérablement selon le modèle utilisé (cellules intactes *versus* préparations membranaires), ce qui pourrait expliquer en partie les résultats cliniques relativement décevants obtenus avec ce composé (Behm *et al.*, 2008). D'autres antagonistes non-peptidiques ont été dernièrement proposés comme les aminométhylpipérazines (Hilfiker *et al.*, 2008) ou encore les 2-aminométhylpipéridines (Jin *et al.*, 2008). Bien que la plupart de ces molécules présentent une bonne affinité pour l'UT, leur pouvoir antagoniste reste toutefois limité.

3. Rôle(s) éventuel(s) du système urotensinergique dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la tumorigénèse cérébrale

In vivo, la prolifération des astrocytes est observée au cours de l'ontogénèse du SNC et dans certaines pathologies dont les maladies neurodégénératives et les tumeurs cérébrales. Il est aujourd'hui clairement établi que bon nombre de neuropeptides sont capables de moduler positivement la prolifération astrocytaire, *e.g.* l'ET-1 (Supattapone *et al.*, 1989), le VIP (Zupan *et al.*, 1998), le PACAP (Hashimoto *et al.*, 2003), les endozépines (Gandolfo *et al.*, 1999; 2000) ou encore l'angiotensine II (AII) (Clark *et al.*, 2008). Au cours de ma thèse, j'ai montré que l'incubation d'astrocytes corticaux quiescents en présence d'UII se traduit par une augmentation dose-dépendante du nombre de cellules. Compte tenu des concentrations auxquelles le peptide est efficace, il est probable que son effet soit relayé par l'UT. De fait, plusieurs

groupes ont également mis en évidence les propriétés mitogènes de l'UII dans différents modèles cellulaires exprimant l'UT (Sauzeau *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Ziltener *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). L'UII pourrait donc être impliquée *in vivo* dans les processus physiologiques et physiopathologiques au cours desquels se manifeste un accroissement de la prolifération astrocytaire, *i.e.* neurogenèse, maladies neurodégénératives, accidents vasculaires cérébraux et tumeurs cérébrales. Aucune donnée n'est cependant disponible à ce jour dans la littérature pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Parmi les différentes pathologies cérébrales sus-citées, associées à une intense prolifération astrocytaire, les tumeurs ont particulièrement retenu notre attention. En effet, les propriétés vasoactives de l'UII associées à ses effets sur la croissance astrocytaire laissent envisager un rôle du système utotensinergique dans la tumorigenèse cérébrale.

Il existe plusieurs catégories de tumeurs cérébrales parmi lesquelles on compte les oligodendrogliomes, les astrocytomes et les glioblastomes. Qu'elles soient bénignes ou malignes, les tumeurs cérébrales primitives sont le plus souvent d'évolution imprévisible. Leur classification actuelle repose sur des critères anatomopathologiques (classification de l'OMS) ou associés à l'imagerie (classification de S^{te} Anne), la première étant celle qui fait référence au niveau international. Selon leur agressivité, les tumeurs sont réparties en grades, de I à IV. Les tumeurs de grade I (astrocytomes pilocytiques) sont bénignes et peuvent être efficacement prises en charge chirurgicalement. Les tumeurs de grade II (astrocytomes fibrillaires) sont normalement considérées comme faiblement malignes mais seule la chirurgie permet de les traiter. Les gliomes de grade III (astrocytomes anaplasiques) et

IV (glioblastomes) sont malins, avec une néo-vascularisation tumorale particulièrement importante dans le cas des glioblastomes qui aggrave le processus de tumorigenèse. Les protocoles utilisés combinent une radiothérapie et une chimiothérapie mais le bénéfice de ces deux traitements reste modeste en terme de survie. Ainsi, la médiane de survie pour un glioblastome est de 8 à 11 mois, contre 28 pour les astrocytomes fibrillaires avec environ 30 à 35 % de survivants à 5 ans.

En 2001, Takahashi *et al.* ont rapporté la présence des ARNm codant l'UII et l'UT dans plusieurs types de cellules tumorales humaines, dont certaines sont issues de glioblastomes. Dans le cadre d'une collaboration menée avec le Pr L'Houcine Ouafik (UMR 911, Marseille), les niveaux d'ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT ont été mesurés dans des extraits de lignées tumorales, de xénogreffes et de glioblastomes humains. Les quatre lignées tumorales testées, issues d'astrocytomes anaplasiques (SW1088 et SW1783) et de glioblastomes (U138 et U87), expriment les gènes codant les peptides et leur récepteur (Figure 13). Les xénogreffes, obtenues par injection sous-cutanée de cellules du glioblastome humain U87 chez des souris *Nude*, présentent des taux d'ARNm codant l'UII et l'UT nettement supérieurs à ceux observés dans la lignée *in vitro*. En revanche, les niveaux d'expression du gène de l'URP dans la xénogreffe sont inchangés (Figure 13). Ces résultats suggèrent l'existence de processus distincts de régulation génique entre l'UII et l'URP. Toutefois, le nombre limité d'échantillons nous invite à une extrême prudence. De plus, comme l'UII et l'UT sont exprimés dans les cellules endothéliales et vasculaires musculaires lisses (Ames *et al.*, 1999), l'augmentation des quantités d'ARNm codant l'UII et l'UT dans

la xénogreffe pourrait refléter, du moins en partie, une intense néoangiogenèse intratumorale.

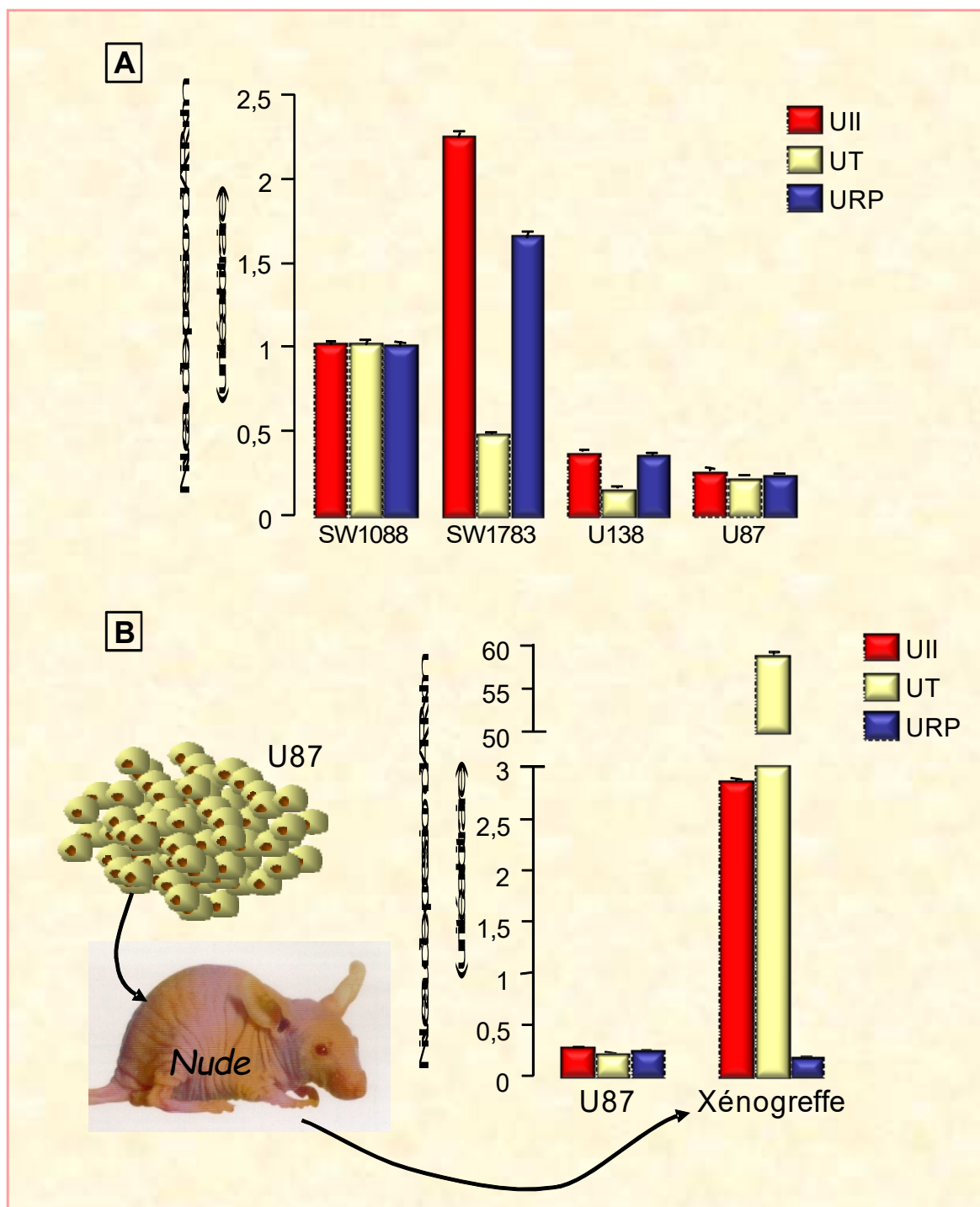


Figure 13: Mesure par RT-PCR quantitative des niveaux d'expression des ARNm codant l'UII, l'UT et l'URP dans des lignées cellulaires issues d'astrocytomes (SW 1088 et SW 1783) et de glioblastomes humains (U138 et U87) (A), ainsi que dans une xénogreffe résultant de l'injection de cellules U87 chez des souris Nude (B). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires, en utilisant comme référence égale à 1 l'expression mesurée dans la lignée SW1088.

De nombreux autres neuropeptides et/ou leurs récepteurs sont exprimés dans les tumeurs cérébrales et tout particulièrement ceux qui possèdent des propriétés

vasoactives. Il s'agit notamment du VIP et du PACAP (Vertongen *et al.*, 1996), de la SS (Przedborski *et al.*, 1988), de l'ADM (Takahashi *et al.*, 1997) ou de l'ET-1 (Sone *et al.*, 2000). Avec une approche plus fonctionnelle, d'autres travaux réalisés chez le Rat ont révélé que le Losartan, un antagoniste des récepteurs de type I de l'Angiotensine II, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle, réduit le volume de gliomes (Rivera *et al.*, 2001). Ouafik *et al.* (2002) ont quant à eux montré que l'administration d'anticorps dirigés contre l'ADM chez des souris *Nude* transplantées avec des cellules T98G issues d'un glioblastome humain, inhibe fortement la croissance tumorale.

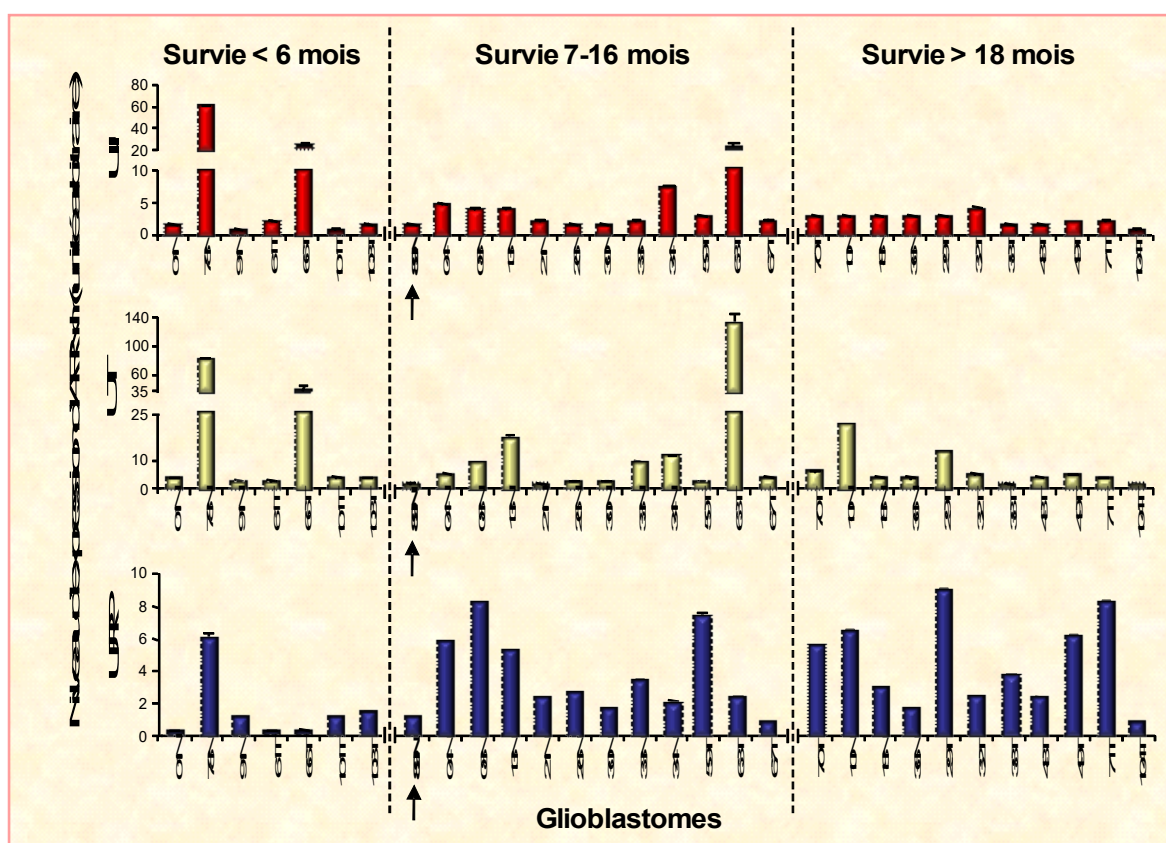


Figure 14: Niveaux d'expression des ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT dans des extraits de glioblastomes humains. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire en prenant comme références (valeurs égales à 1) l'échantillon 89N (flèche). Les données sont classées en 3 catégories (< 6 mois, entre 7-16 mois et > 18 mois).

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales parenchymateuses les plus invasives. Les 30 échantillons de glioblastomes humains testés expriment les ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT (Figure 14). On note encore une fois des différences

fondamentales entre l'UII et l'URP puisqu'il existe une corrélation entre les taux d'ARNm codant l'UII et l'UT qui n'est pas retrouvée entre l'URP et l'UT (Figure 15).

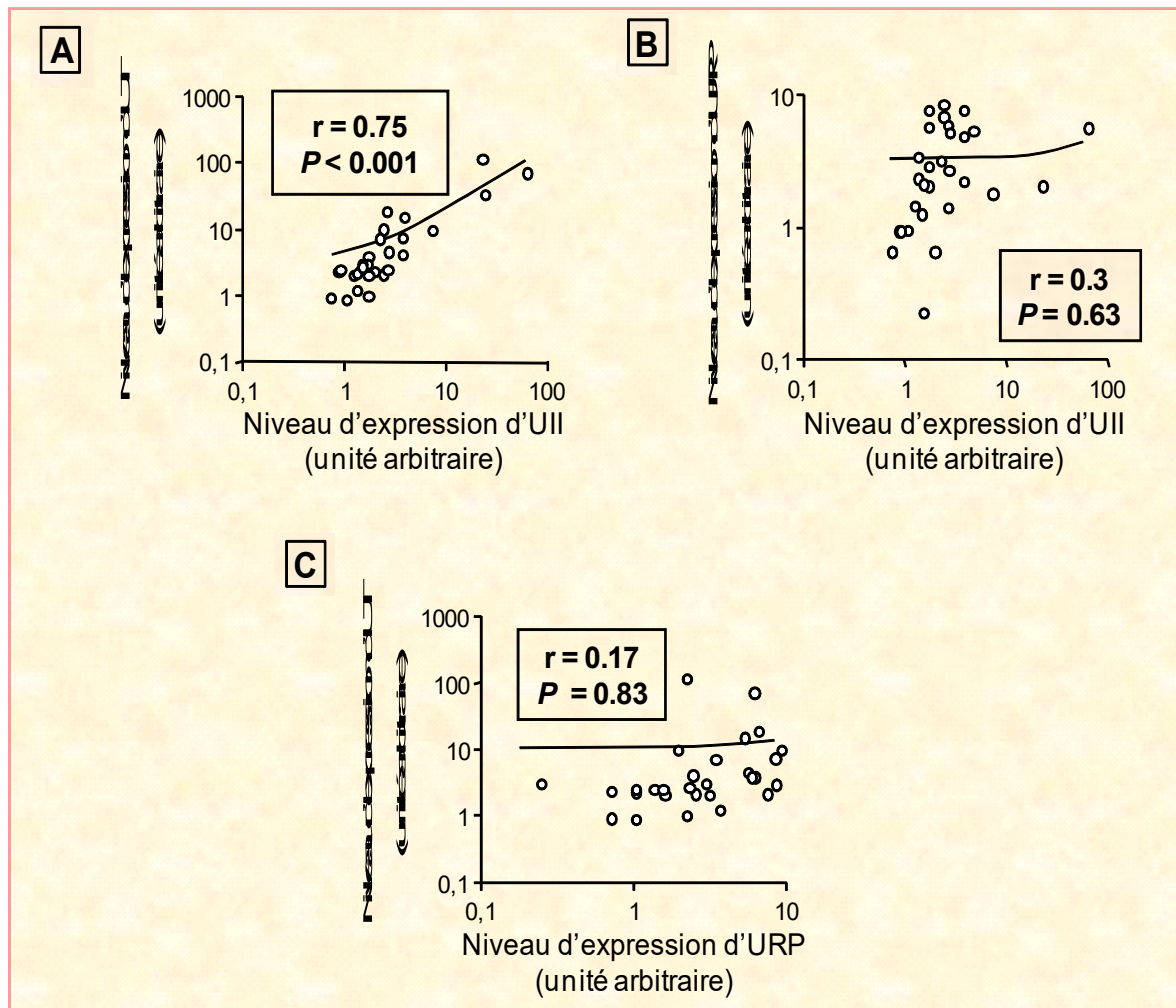


Figure 15: Recherche de corrélation entre les niveaux d'expression de l'UII et de l'UT (A), de l'UII et de l'URP (B) et de l'URP et de l'UT (C) dans des extraits de glioblastomes humains. Les analyses des données sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. r , coefficient de Pearson; P , p -value.

Par ailleurs, contrairement à ce qui est observé avec l'URP, les taux d'ARNm codant l'UII tendent à diminuer en fonction de la durée de survie des patients, *i.e.* les extraits provenant de malades ayant survécu plus de 18 mois après diagnostic de la pathologie sont moins riches en ARNm codant le peptide. Ces différences entre l'UII et l'URP viennent renforcer l'hypothèse selon laquelle ces deux peptides rempliraient des fonctions distinctes dans le SNC. Comme l'a récemment montré Spinazzi *et al.* (2006),

à partir de tissus vasculaires cérébraux, l'Ull exerce de puissants effets angiogènes. Par conséquent, ce peptide pourrait non seulement être impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales mais également participer de façon autocrine/paracrine à la mise en place de néovaisseaux intratumoraux.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le système urotensinergique jouerait un rôle central dans les mécanismes d'induction et/ou de développement de certaines tumeurs cérébrales.

Conclusion et Perspectives

Au terme de cette étude, nous avons montré que les astrocytes en culture expriment des sites de liaison spécifiques et fonctionnels pour l'Ull et l'URP.

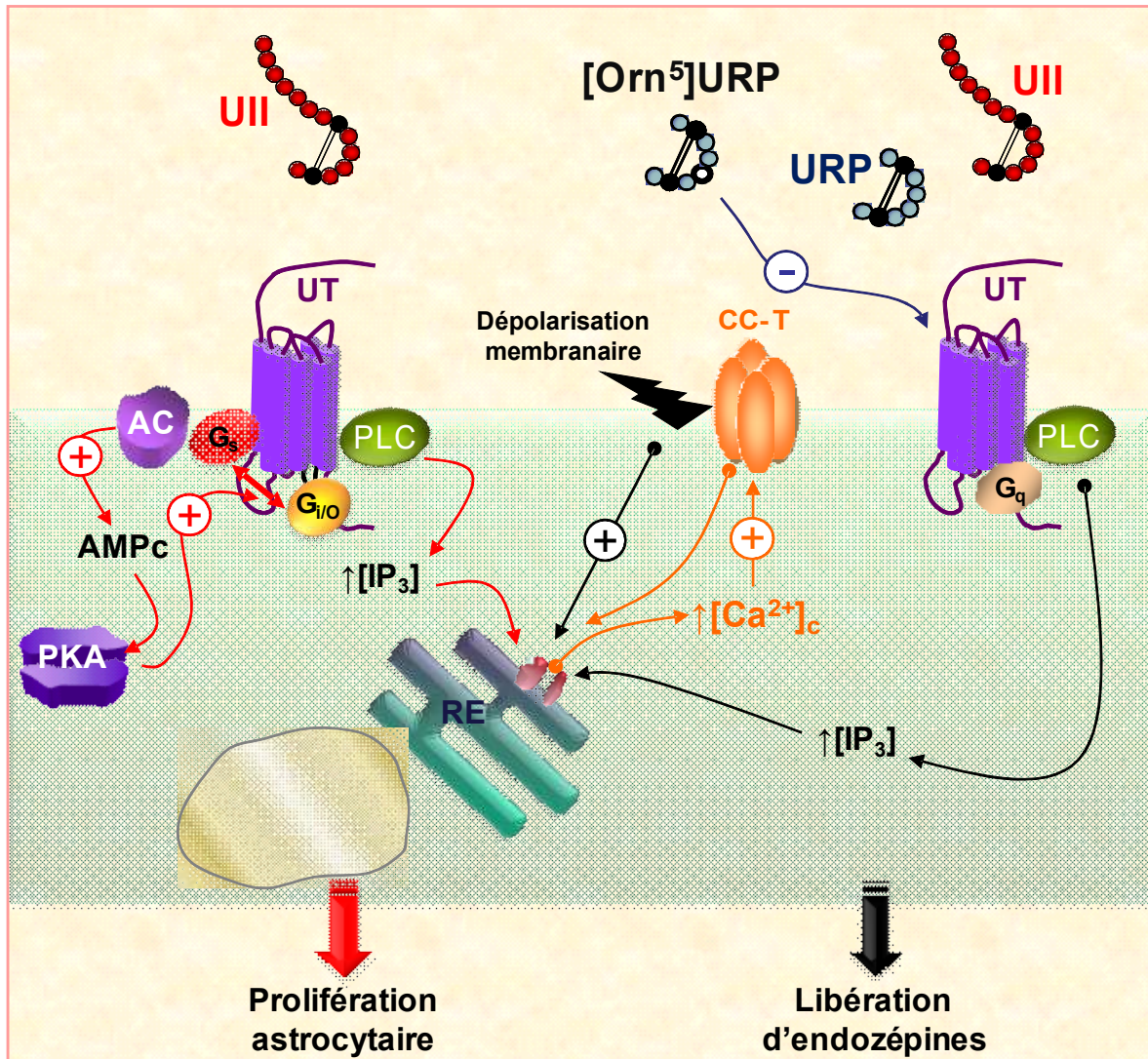


Figure 16: Schéma récapitulatif des voies de transduction sous-tenues par l'activation de l'UT par l'Ull et l'URP dans les astrocytes corticaux de Rat en culture. Le récepteur UT est positivement couplé à une phospholipase C (PLC) via une protéine G_q et à une adénylyl cyclase (AC) via une protéine G_s ou G_i. L'activation de la PLC entraîne la formation d'inositol triphosphate (IP₃) qui provoque à son tour le recrutement de calcium à partir du réticulum endoplasmique (RE). L'Ull et l'URP induisent un influx de calcium par l'intermédiaire de canaux de type T (CC-T). Parallèlement, l'activation de l'AC stimule l'activité de la protéine kinase A (PKA), elle-même responsable d'un transfert de couplage de l'UT d'une protéine G_s à une protéine G_i. A faibles concentrations, seule l'Ull stimule une PLC via une protéine G sensible à la PTX (G_{i/o}). Les différentes voies de transduction activées par l'URP et l'Ull conduisent à la libération d'endozépines par les astrocytes. Une voie spécifique de l'Ull stimule la prolifération cellulaire.

L'interaction des peptides avec le récepteur métabotrope UT stimule une phospholipase C et entraîne une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ en recrutant les pools intra- et

extracellulaires *via* les canaux de type T. Seule l'UII interagit avec un site de très haute affinité couplé à une protéine G sensible à la PTX, site vraisemblablement impliqué dans les effets pro-mitogènes de l'UII sur les astrocytes (Figure 16). Par ailleurs, à partir d'une série d'analogues synthétisés au laboratoire, nous avons montré que l'[Orn⁵]URP se comporte comme un puissant antagoniste dans notre modèle. Enfin, la présence d'ARNm codant les peptides et le récepteur a systématiquement été détectée dans des extraits de lignées tumorales cérébrales et de glioblastomes humains. L'ensemble de ces données indique que le système urotensinergique est impliqué dans le contrôle de la fonction astrocytaire en conditions physiologiques et physiopathologiques.

Des travaux récents menés sur des monocytes humains (Segain *et al.*, 2007) et des fibroblastes de Rat (Zhang *et al.*, 2008) ont révélé que l'UII se comporte comme un composé chémo-attractant susceptible de stimuler la migration cellulaire. Dans la mesure où l'invasion tumorale est une des caractéristiques des tumeurs cérébrales gliales (Martinez *et al.*, 2007), un protocole d'étude de migration cellulaire (système *Transwell*) a été mis point dans notre équipe par Céline Lecointre et Marie Jarry (doctorantes) pour déterminer si l'UII et/ou l'URP sont capables de moduler la migration de cellules tumorales cérébrales.

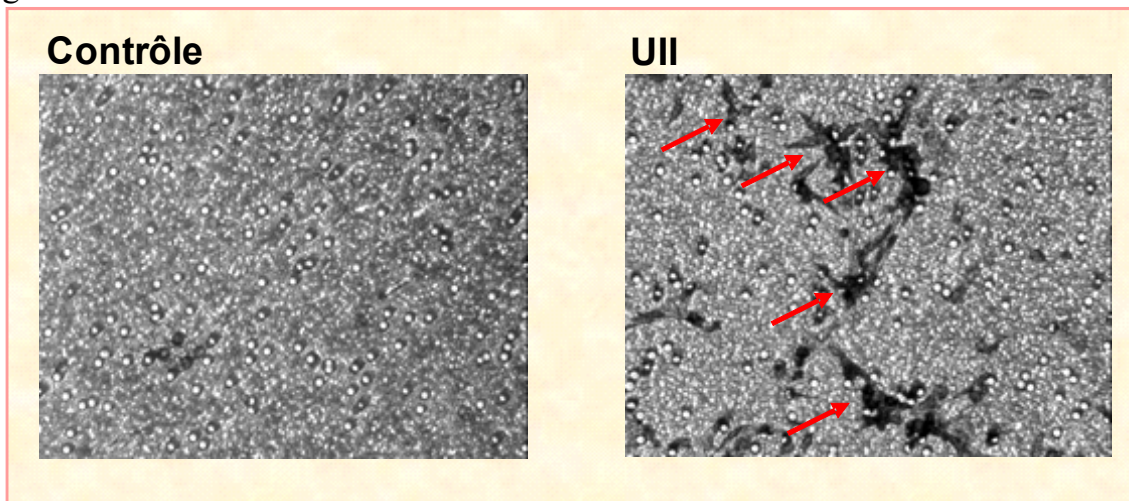


Figure 17: Effet de l'UII sur la migration de cellules tumorales. Les cellules SW1088, issues d'un astrocytome humain, sont déposées dans des inserts à fond poreux (*transwell*) dont la membrane est immergée dans du milieu de culture, en l'absence ou présence d'UII (10^{-9} M, 24 h). Les acquisitions réalisées en lumière transmise à l'aide d'un vidéomicroscope associé à une caméra CCD, montrent les cellules SW1088 ayant traversé la membrane poreuse du *transwell* (flèche rouge).

Les premiers résultats obtenus sur des cellules SW1088 montrent clairement que l'UII agit comme un puissant chémo-attractant (Figure 17), renforçant ainsi

l'hypothèse selon laquelle le système urotensinergique jouerait un rôle dans la tumorigénèse cérébrale.

La poursuite de cette étude consistera à déterminer les mécanismes intracellulaires mis en jeu dans ce processus. Nous nous intéresserons notamment à la voie ERK_{1/2} qui est impliquée dans les effets mitogènes de l'UUI sur des cellules transfectées avec l'UT (Ziltener *et al.*, 2002). Comme le montrent les premiers résultats représentés dans la figure 18, l'UUI provoque la phosphorylation de ERK_{1/2} dans des cellules SW1088. Parallèlement, nous tenterons de bloquer les effets stimulants de l'UUI à l'aide d'inhibiteurs de kinases (PKA, PKC et PKG), de bloqueurs de canaux calciques, d'antagonistes de l'UT ([Orn⁵]URP et palosuran) et de siRNA inhibant l'expression du récepteur. Comme les cellules SW1088 expriment l'UUI (ARNm et peptide, *données non publiées*), nous mesurerons l'activité de l'UUI endogène (immunoneutralisation, siRNA) sur la migration et/ou l'adhésion cellulaire(s) (système *transwell* et vidéomicroscopie).

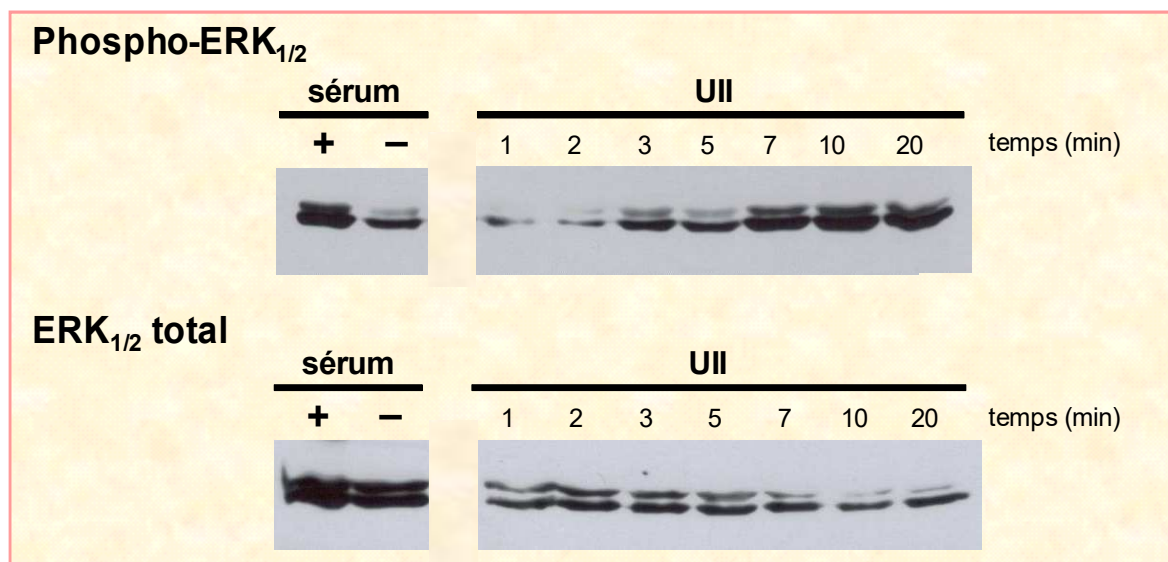


Figure 18: Effet de l'UII sur la phosphorylation de ERK_{1/2} dans la lignée SW1088. L'UII (10^{-7} M) stimule la voie des MAP kinases via la phosphorylation de ERK_{1/2}. L'effet maximum est obtenu après 10 minutes de traitement.

Les résultats obtenus sur les extraits de glioblastomes sont très encourageants et la corrélation positive observée entre les niveaux d'expression de l'UII et de l'UT suggère fortement que ce couple ligand/récepteur participerait à certains mécanismes liés à la tumorigenèse cérébrale. En poursuivant la collaboration avec le Pr L'Houcine Ouafik et dans le cadre d'un partenariat avec les neurochirurgiens (Pr Pierre Fréger et Dr Olivier Langlois) et les anatomopathologistes (Pr Annie Laquerrière) du CHU de Rouen, nous rechercherons, à partir d'extraits de tissus tumoraux, une potentielle

corrélation entre le grade de la tumeur et les niveaux d'ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT (QPCR), et les quantités d'UII et d'URP (RIA). Les cellules exprimant l'UII et l'UT seront identifiées par immunohistochimie dans des tumeurs de hauts grades. Sur des explants tumoraux cultivés sur matrigel, nous étudierons également les effets de l'UII sur la néoangiogenèse intratumorale. La cinétique d'expression intratumorale de l'UII et de l'UT (QPCR et immunohistochimie) sera étudiée sur des xénogreffes obtenues après injection orthotopique de cellules SW1088 dans des souris immunodéprimées *Nude*. En collaboration avec le Dr Myriam Bernaudin (CYCERON, Caen), nous mesurerons la croissance et le degré de vascularisation de la tumeur (imagerie par résonance magnétique, IRM), ainsi que la médiane de survie des souris après injection d'UII, d'antagonistes de l'UT, d'anticorps dirigés contre l'UII et de shRNA spécifiques de l'UII et de l'UT. L'IRM est une technique atraumatique qui permet de suivre un ensemble de paramètres tels que l'évolution de la tumeur, la perméabilité de la BHE ou la présence d'œdèmes. Avec le développement d'agents de contraste à forte rémanence vasculaire, l'IRM permet en outre d'accéder à des paramètres spécifiquement vasculaires comme le volume sanguin et la distribution des diamètres vasculaires (indice de taille des vaisseaux ou ITV). Au cours de cette étude, nous chercherons à déterminer l'évolution *i)* du volume de la tumeur au moyen de séquences de diffusion ou de séquences d'écho de spin, *ii)* des paramètres vasculaires (ITV) détectables par l'utilisation d'agents de contraste et *iii)* de la perfusion et de la perméabilité vasculaire.

Contrairement aux cellules astrocytaires tumorales qui composent en grande partie la masse tumorale (astrocytomes), les cellules souches tumorales (CSTs) sont étroitement associées aux cellules endothéliales (Calabrese *et al.*, 2007). Cultivées dans un milieu spécifique, les CSTs, comme les cellules souches neurales, prolifèrent et génèrent des macrosphères. Un protocole de genèse de neurosphère à partir de cellules SW1088 ou de tissus frais de gliomes de hauts grades vient d'être mis au point dans notre équipe (Figure 19). Nous pourrions ainsi étudier le rôle du système urotensinergique sur le développement et la croissance de ces neurosphères. L'effet d'un milieu conditionné issu de cultures de cellules endothéliales sera testé sur la croissance des sphères, en l'absence et en présence d'UII et/ou d'antagonistes de l'UT. Des travaux récents ont suggéré que la différenciation des cellules CD133⁺ dans les tumeurs cérébrales, diminuait fortement la capacité des cellules souches à former des sphères (Piccirillo *et al.*, 2006).

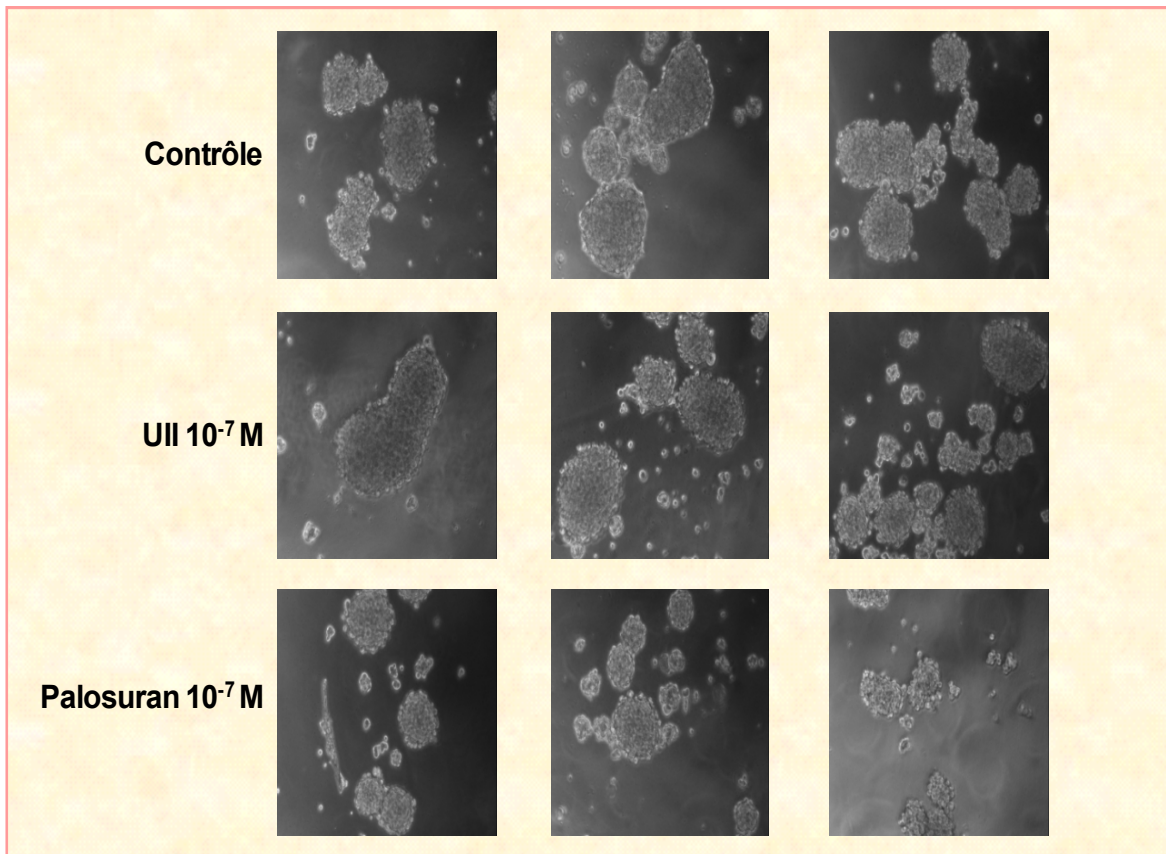


Figure 19: Effet de l'Ull sur le développement de neurosphères tumorales issues de la lignée SW1088. Les neurosphères sont incubées pendant 5 jours en absence (contrôle) ou présence d'Ull (10^{-7} M) ou de palosuran (10^{-7} M), un antagoniste de l'UT humain. Le palosuran inhibe la croissance des neurosphères et provoque l'adhésion cellulaire (différenciation).

La recherche du rôle du système urotensinergique sur la différenciation des cellules souches sera donc réalisée par mesure des niveaux d'expression du marqueur neuronal β III-tubuline et du marqueur astrocytaire GFAP dans les sphères, après administration d'Ull ou répression des voies de transduction associées à l'UT (antagonistes, siRNA, inhibiteurs).

A terme, les travaux initiés dans l'équipe serviront à affiner nos connaissances sur la fonction du système urotensinergique, notamment dans le contrôle de la tumorigenèse cérébrale et pourront contribuer au développement de nouveaux traitements thérapeutiques.

Références

-A-

- Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* **200**: 629-638.
- Abdel-Razik AE, Forty EJ, Balment RJ, Ashton N (2008) Renal haemodynamic and tubular actions of urotensin II in the rat. *J Endocrinol* **198**: 617-624.
- Abdelrahman AM, Pang CC (2002) Involvement of the nitric oxide/L-arginine and sympathetic nervous systems on the vasodepressor action of human urotensin II in anesthetized rats. *Life Sci* **71**: 819-825.
- Aiyar N, Johns DG, Ao Z, Disa J, Behm DJ, Foley JJ, Buckley PT, Sarau HM, van-der-Keyl HK, Elshourbagy NA, Douglas SA (2005) Cloning and pharmacological characterization of the cat urotensin-II receptor (UT). *Biochem Pharmacol* **69**: 1069-1079.
- Albertin G, Casale V, Ziolkowska A, Spinazzi R, Malendowicz LK, Rossi GP, Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and UII-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *Int J Mol Med* **17**: 1111-1115.
- Alves-Rodrigues A, Timmerman H, Willems E, Lemstra S, Zuiderveld OP, Leurs R (1998) Pharmacological characterisation of the histamine H₃ receptor in the rat hippocampus. *Brain Res* **788**: 179-186.
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**: 282-286.
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairt S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M (2000) Detection of β 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3684-3689.
- Arnold-Reed DE, Balment RJ (1994) Peptide hormones influence *in vitro* interrenal secretion of cortisol in the trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* **96**: 85-91.
- Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, Rozemullmer AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D (2003) Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci* **17**: 2106-2118.
- Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A (1997) Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease. An *in situ* hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 440-454.
- Ashton N (2006) Renal and vascular actions of urotensin II. *Kidney Int* **70**: 624-629.
- Ashur-Fabian O, Giladi E, Brenneman DE, Gozes I (1997) identification of VIP/PACAP receptors on rat astrocytes using antisense oligodeoxynucleotides. *J Mol Neurosci* **9**: 211-222.
- Audet C, Chevalier G (1981) Monoaminergic innervation of the caudal neurosecretory system of the brook trout *Salvelinus fontinalis* in relation to osmotic stimulation. *Gen Comp Endocrinol* **45**: 189-203.

-B-

- Baghdoyan HA, Lydic R, Callaway CW, Hobson JA (1989) The carbachol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose dependent and antagonized by centrally administered atropine. *Neuropsychopharmacology* **2**: 67-79.
- Bai M (2004) Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal* **16**: 175-186.
- Balment RJ, Song W, Ashton N (2005) Urotensin II: ancient hormone with new functions in vertebrate body fluid regulation. *Ann NY Acad Sci* **1040**: 66-73.
- Bateman DE, McDermott JR, Perry RH, Dimaline R, Biggins JA, Edwardson JA (1986) Neuropeptides in gliomas: identification of somatostatin 14 in a medulloblastoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **49**: 1074-1076.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF- α . *Science* **295**: 2282-2285.
- Behm DJ, Harrison SM, Ao Z, Maniscalco K, Pickering SJ, Grau EV, Woods TN, Coatney RW, Doe CP, Willette RN, Johns DG, Douglas SA (2003) Deletion of the UT receptor gene results in the selective loss of urotensin-II contractile activity in aorta isolated from UT receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* **139**: 464-472.
- Behm DJ, Herold CL, Camarda V, Aiyar NV, Douglas SA (2004) Differential agonistic and antagonistic effects of the urotensin-II ligand SB-710411 at rodent and primate UT receptors. *Eur J Pharmacol* **492**: 113-116.
- Behm DJ, McAtee JJ, Dodson JW, Neeb MJ, Fries HE, Evans CA, Hernandez RR, Hoffman KD, Harrison SM, Lai JM, Wu C, Aiyar NV, Ohlstein EH, Douglas SA (2008) Palosuran inhibits binding to primate UT receptors in cell membranes but demonstrates differential activity in intact cells and vascular tissues. *Br J Pharmacol* **155**: 374-386.
- Bennett RT, Jones RD, Morice AH, Smith CF, Cowen ME (2004) Vasoconstrictive effects of endothelin-1, endothelin-3, and urotensin II in isolated perfused human lungs and isolated human pulmonary arteries. *Thorax* **59**: 401-407.
- Berlind A (1972) Teleost caudal neurosecretory system: sperm duct contraction induced by urophysial material. *J Endocrinol* **52**: 567-574.
- Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS (1985) Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog Horm Res* **41**: 533-552.
- Biber K, Klotz KN, Berger M, Gebicke-Härter PJ, Van Calcar D (1997) Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci* **17**: 4956-4964.
- Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD (2000) A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci* **20**: 8012-8020.
- Blomstrand F, Giaume C, Hansson E, Rönnbäck L (1999) Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol* **277**: 616-627.

- Boehning D, Snyder SH (2003) Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* **26**: 105-131.
- Bohm F, Pernow J (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans *in vivo*. *Br J Pharmacol* **135**: 25-27.
- Boivin S, Guilhaudis L, Milazzo I, Oulyadi H, Davoust D, Fournier A (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry* **45**: 5993-6002.
- Booher J, Sensenbrenner M (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**: 97-105.
- Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R (2000) Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* **130**: 1865-1870.
- Bousette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* **176**: 117-123.
- Brand-Schieber E, Werner P (2003) AMPA/kainate receptors in mouse spinal cord cell-specific display of receptor subunits by oligodendrocytes and astrocytes and at the nodes of Ranvier. *Glia* **42**: 12-24.
- Brezillon S, Lannoy V, Franssen JD, Le Poul E, Dupriez V, Lucchetti J, Detheux M, Parmentier M (2003) Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* **278**: 776-783.
- Brierley MJ, Ashworth AJ, Craven TP, Woodburn M, Banks JR, Lu W, Riccardi D, Balment RJ, McCrohan CR (2003) Electrical activity of caudal neurosecretory neurons in seawater- and freshwater-adapted flounder: responses to cholinergic agonists. *J Exp Biol* **206**: 4011-4020.
- Brierley SM, Nichols K, Grasby DJ, Waterman SA (2001) Neural mechanisms underlying migrating motor complex formation in mouse isolated colon. *Br J Pharmacol* **132**: 507-517.
- Brkovic A, Hattenberger A, Kostenis E, Klabunde T, Flohr S, Kurz M, Bourgault S, Fournier A (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 1200-1209.
- Brown AM, Tekkok SB, Ransom BR (2003) Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol* **549**: 501-512.
- Brown DR, Mohn CM (1999) Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia* **25**: 282-292.
- Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, Teasdale GM, Adams JH (1991) Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**: 427-434.
- Burlet S, Tyler CJ, Leonard CS (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by hypocretin/orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* **22**: 2862-2872.

- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Giolbertson JR (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cell. *Cancer Cell* **11**: 3-5.
- Camarda V, Guerrini R, Kostenis E, Rizzi A, Calo G, Hattenberger A, Zucchini M, Salvadori S, Regoli D (2002a) A new ligand for the urotensin II receptor. *Br J Pharmacol* **137**: 311-314.
- Camarda V, Rizzi A, Calo G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F, Regoli D (2002b) Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**: 141-149.
- Camarda V, Song W, Marzola E, Spagnol M, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Thompson JP, Rowbotham DJ, Behm DJ, Douglas SA, Calo G, Lambert DG (2004) Urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *Eur J Pharmacol* **498**: 83-86.
- Campbell IL (2001) Cytokine-mediated inflammation and signaling in the intact central nervous system. *Prog Brain Res* **132**: 481-498.
- Carbone E, Marcantoni A, Giaccipoli A, Guido D, Carabelli V (2006) T-type channels-secretion coupling: evidence for a fast low-threshold exocytosis. *Pflugers Arch* **453**: 373-383.
- Catlin MC, Guizzetti M, Costa LG (2000) Effect of ethanol on muscarinic receptor-induced calcium responses in astroglia. *J Neurosci Res* **60**: 345-355.
- Cattaneo MG, Gentilini D, Vicentini LM (2006) Deregulated human glioma cell motility: inhibitory effect of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol* **256**: 34-39.
- Chan DK, Bern HA (1976) The caudal neurosecretory system. A critical evaluation of the two-hormone hypothesis. *Cell Tissue Res* **174**: 339-354.
- Charles KJ, Deuchars J, Davies CH, Pangalos MN (2003) GABA_B receptor subunit expression in glia. *Mol Cell Neurosci* **24**: 214-223.
- Chartrel N, Conlon JM, Collin F, Braun B, Waugh D, Vallarino M, Lahrichi SL, Rivier JE, Vaudry H (1996) Urotensin II in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J Comp Neurol* **364**: 324-339.
- Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Rego JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H (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, Leprince J, Dujardin C, Chatenet D, Tollemer H, Baroncini M, Balment RJ, Beauvillain JC, Vaudry H (2004) Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. *J Neurochem* **91**: 110-118.
- Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boullaran C, Carlier L, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Davoust D, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Tonon MC, Lihrmann I, Pacaud P, Vaudry H (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* **25**: 1819-1830.

- Chatton JY, Pellerin L, Magistretti PJ (2003) GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12456-12461.
- Chen Y, Rathbone MP, Hertz L (2001) Guanosine-induced increase in free cytosolic calcium concentration in mouse astrocytes in primary cultures: does it act on an A₃ adenosine receptor? *J Neurosci Res* **15**: 184-189.
- Chen YL, Liu JC, Loh SH, Chen CH, Hong CY, Chen JJ, Cheng TH (2008) Involvement of reactive oxygen species in urotensin II-induced proliferation of cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol* **593**: 24-29.
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-3108.
- Cheung BM, Leung R, Man YB, Wong LY (2004) Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* **22**: 1341-1344.
- Chuquet J, Lecrux C, Chatenet D, Leprince J, Chazalviel L, Roussel S, MacKenzie ET, Vaudry H, Touzani O (2008) Effects of urotensin-II on cerebral blood flow and ischemia in anesthetized rats. *Exp Neurol* **210**: 577-584.
- Clark MA, Guillaume G, Pierre-Louis HC (2008) Angiotensin II induces proliferation of cultured rat astrocytes through c-Jun N-terminal kinase. *Brain Res Bull* **75**: 101-106.
- Clark SD, Nothacker HP, Blaha CD, Tyler CJ, Duangdao DM, Grupke SL, Helton DR, Leonard CS, Civelli O (2005) Urotensin II acts as a modulator of mesopontine cholinergic neurons. *Brain Res* **1059**: 139-148.
- Clark SD, Nothacker HP, Wang Z, Saito Y, Leslie FM, Civelli O (2001) The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat. *Brain Res* **923**: 120-127.
- Clausen T (1992) Potassium and sodium transport and pH regulation. *Can J Physiol Pharmacol* **70 Suppl**: S219-222.
- Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Muller C, Muller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 204-212.
- Clozel M, Hess P, Qiu C, Ding SS, Rey M (2006) The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1115-1121.
- Cohen SL, Kriebel RM (1989) Brainstem location of serotonin neurons projecting to the caudal neurosecretory complex. *Brain Res Bull* **22**: 481-487.
- Cohen Z, Bouchelet I, Olivier A, Villemure JG, Ball R, Stanimirovic DB, Hamel E (1999) Multiple microvascular and astroglial 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human brain: molecular and pharmacologic characterization. *J cereb Blood Flow Metab* **19**: 908-917.
- Conlon JM, Arnold-Reed DE, Balment RJ (1990) Urotensin I and its N-terminal flanking peptide from the flounder, *Platichthys flesus*. *Peptides* **11**: 895-895.

- Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Balment RJ, Hazon N (1992a) Purification and characterization of urotensin II and parvalbumin from an elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish). *Neuroendocrinology* **55**: 230-235.
- Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC, Vaudry H (1992b) 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 JM, Tostivint H, Vaudry H (1997) Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul Pept* **69**: 95-103.
- Conlon JM, Yano K, Waugh D, Hazon N (1996) Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *J Exp Zool* **275**: 226-238.
- Costa E, Corda MG, Guidotti A (1983) On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and β -carboline derivatives. *Neuropharmacology* **22**: 1481-1492.
- Coulouarn Y, Fernex C, Jegou S, Henderson CE, Vaudry H, Lihmann I (2001) Specific expression of the urotensin II gene in sacral motoneurons of developing rat spinal cord. *Mech Dev* **101**: 187-190.
- Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihmann I (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* **457**: 28-32.
- Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, 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 USA* **95**: 15803-15808.
- Cowley E, Thompson JP, Sharpe P, Waugh J, Ali N, Lambert DG (2005) Effects of pre-eclampsia on maternal plasma, cerebrospinal fluid, and umbilical cord urotensin II concentrations: a pilot study. *Br J Anaesth* **95**: 495-499.

-D-

- Dahlgren U (1914) The electric motor nerve centers in the skates (*Rajidae*). *Science* **40**: 862-863.
- Dale HH and Dudley HW (1929) The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of ox and the horse. *J Physiol* **68**: 97-123.
- Davies SJ, Field PM, Raisman G (1996) Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp Neurol* **142**: 203-216.
- De Mateos-Verchère JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (1998) The octadecaneuropeptide ODN induces anxiety in rodents: possible involvement of a shorter biologically active fragment. *Peptides* **19**: 841-848.
- De Mateos-Verchère JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (2001) The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol* **414**: 225-231.

- De Vente J, Schipper J, Steinbusch HW (1989) Formaldehyde fixation of cGMP in distinct cellular pools and their recognition by different cGMP-antisera. An immunocytochemical study into the problem of serum specificity. *Histochemistry* **91**: 401-412.
- Debeir T, Gueugnon J, Vigé X, Benavides J (1996) Transduction mechanisms involved in thrombin receptor-induced nerve growth factor secretion and cell division in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem* **66**: 2320-2328.
- Deitmer JW (2001) Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol* **129**: 71-81.
- Deitmer JW, Rose CR (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* **48**: 73-103.
- Desagher S, Cordier J, Glowinski J, Tencé M (1997) Endothelin stimulates phospholipase D in striatal astrocytes. *J Neurochem* **68**: 78-87.
- Deschepper CF (1998) Peptide receptors on astrocytes. *Front Neuroendocrinol* **19**: 20-46.
- Desrues L, Tonon MC, Vaudry H (1990) Thyrotrophin-releasing hormone stimulates polyphosphoinositide metabolism in the frog neurointermediate lobe. *J Mol Endocrinol* **5**: 129-136.
- Di Scala-Guenot D, Mouginot D, Strosser MT (1994) Increase of intracellular calcium induced by oxytocin in hypothalamic cultured astrocytes. *Glia* **11**: 269-276.
- Dienel GA, Cruz NF (2003) Neighborly interactions of metabolically-activated astrocytes *in vivo*. *Neurochem Int* **43**: 339-354.
- Disa J, Floyd LE, Edwards RM, Douglas SA, Aiyar NV (2006) Identification and characterization of binding sites for human urotensin-II in Sprague-Dawley rat renal medulla using quantitative receptor autoradiography. *Peptides* **27**: 1532-1537.
- Do-Rego JC, Chatenet D, Orta MH, Naudin B, Le Cudennec C, Leprince J, Scalbert E, Vaudry H, Costentin J (2005) Behavioral effects of urotensin-II centrally administered in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **183**: 103-117.
- Do KQ, Benz B, Binns KE, Eaton SA, Salt TE (2004) Release of homocysteic acid from rat thalamus following stimulation of somatosensory afferents *in vivo*: feasibility of glial participation in synaptic transmission. *Neuroscience* **124**: 387-393.
- Douglas SA, Behm DJ, Aiyar NV, Naselsky D, Disa J, Brooks DP, Ohlstein EH, Gleason JG, Sarau HM, Foley JJ, Buckley PT, Schmidt DB, Wixted WE, Widdowson K, Riley G, Jin J, Gallagher TF, Schmidt SJ, Ridgers L, Christmann LT, Keenan RM, Knight SD, Dhanak D (2005) Nonpeptidic urotensin-II receptor antagonists I: *in vitro* pharmacological characterization of SB-706375. *Br J Pharmacol* **145**: 620-635.
- Douglas SA, Dhanak D, Johns DG (2004) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 76-85.
- Douglas SA, Ohlstein EH (2000) Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 229-237.

- Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH, Willette RN (2000) Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* **131**: 1262-1274.
 - Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* **359**: 1990-1997.
 - Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B (1993a) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* **623**: 208-214.
 - Dringen R, Schmoll D, Cesar M, Hamprecht B (1993b) Incorporation of radioactivity from [¹⁴C]lactate into the glycogen of cultured mouse astroglial cells. Evidence for gluconeogenesis in brain cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**: 343-347.
 - Dschietzig T, Bartsch C, Pregla R, Zurbrugg HR, Armbruster FP, Richter C, Laule M, Romeyke E, Neubert C, Voelter W, Baumann G, Stangl K (2002) Plasma levels and cardiovascular gene expression of urotensin-II in human heart failure. *Regul Pept* **110**: 33-38.
 - Dun SL, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Dun NJ (2001) Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* **305**: 9-12.
- E-
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes. Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54**: 15-36.
 - Egginger JG, Calas A (2005) A novel hypothalamic neuroendocrine peptide: URP (urotensin-II-related peptide)? *C R Biol* **328**: 724-731.
 - Egginger JG, Camus A, Calas A (2006) Urotensin-II expression in the mouse spinal cord. *J Chem Neuroanat* **31**: 146-154.
 - Eguchi S, Kawazoe Y, Sugiyama N, Kawashita Y, Fujioka H, Furui J, Sato M, Ishii T, Kanematsu T (2000) Effects of recombinant human hepatocyte growth factor on the proliferation and function of porcine hepatocytes. *Asaio J* **46**: 56-59.
 - Elhousseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirovic DB, Hamel E (1999) Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. *J Cereb blood Flow Metab* **19**: 794-802.
 - Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U, Harrison S, Duddy G, Sechler JL, Ao Z, Maleeff BE, Naselsky D, Disa J, Aiyar NV (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br J Pharmacol* **136**: 9-22.
 - Enami M (1959) The morphology and the functional significance of the caudal neurosecretory system of fishes. In *Comparative Endocrinology*, Gorbman A and Wiley J Eds, New York, pp, 697-724.
 - Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**: 1439-1451.

Enkvist MO, Hamalainen H, Jansson CC, Kukkonen JP, Hautala R, Courtney MJ, Akerman KE (1996) Coupling of astroglial α 2-adrenoreceptors to second messenger pathways. *J Neurochem* **66**: 2394-2401.

Eriksson PS, Hansson E, Ronnback L (1990) δ and κ opiate receptors in primary astroglial cultures from rat cerebral cortex. *Neurochem Res* **15**: 1123-1126.

-F-

Fabry M, Cabrele C, Hocker H, Beck-Sickinger AG (2000) Differently labeled peptide ligands for rapid investigation of receptor expression on a new human glioblastoma cell line. *Peptides* **21**: 1885-1893.

Fatatis A, Holtzclaw LA, Avidor R, Brenneman DE, Russell JT (1994) Vasoactive intestinal peptide increases intracellular calcium in astroglia: synergism with α -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2036-2040.

Favaro G (1926) Contributi allo studio morfologico dell'ipofisi caudale (rigonfiamento caudale della midolla spinale) dei teleostei. Atti. Reole. *Accad. Nazl. Lincei., Mem Class Sci Fis Mat Nat* **1**:30-72.

Fawcett JW (1997) Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res* **290**: 371-377.

Feindt J, Becker I, Blömer U, Hugo HH, Mehdorn HM, Krisch B, Mentlein R (1995) Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and gliomas. *J Neurochem* **65**: 1997-2005.

Ferrara N, Bunting S (1996) Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **5**: 35-44.

Ferrero P, Conti-Tronconi B, Guidotti A (1986) DBI, an anxiogenic neuropeptide found in human brain. *Adv Biochem Psychopharmacol* **41**: 177-185.

Filipeanu CM, Brailoiu E, Le Dun S, Dun NJ (2002) Urotensin-II regulates intracellular calcium in dissociated rat spinal cord neurons. *J Neurochem* **83**: 879-884.

Fitch MT, Silver J (1997) Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res* **290**: 379-384.

Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J Med Chem* **45**: 1799-1805.

Fogarty DJ, Sanchez-Gomez MV, Matute C (2002) Multiple angiotensin receptor subtypes in normal and tumor astrocytes *in vitro*. *Glia* **39**: 304-313.

Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**: 27-31.

Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA (1995) GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* **15**: 2720-2732.

- Frisen J, Johansson CB, Torok C, Risling M, Lendahl U (1995) Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* **131**: 453-464.
 - Fujii R, Yoshida H, Fukusumi S, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Yano T, Hinuma S, Kitada C, Asami T, Mori M, Fujisawa Y, Fujino M (2002) Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *J Biol Chem* **277**: 34010-34016.
 - Fukui H, Inagaki N, Ito S, Kubo A, Kondoh H, Yamatodani A, Wada H (1991) Histamine H1-receptors on astrocytes in primary cultures: a possible target for histaminergic neurones. *Agents Actions Suppl* **33**: 161-180.
 - Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M (2003) A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* **278**: 46387-46395.
 - Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* **43**: 218-203.
- G-
- Gallagher CJ, Salter MW (2003) Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J Neurosci* **23**: 6728-6739.
 - Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Thoumas JL, Vaudry H, Tonon MC (1997) The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca^{2+} in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* **322**: 275-281.
 - Gandolfo P, Patte C, Thoumas JL, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC (1999) The endozepine ODN stimulates [3H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology* **38**: 725-732.
 - Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Do rego JL, Mensah-Nyagan AG, Vaudry H, Tonon MC (2000) The triakontatetrapeptide (TTN) stimulates thymidine incorporation in rat astrocytes through peripheral-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem* **75**: 701-707.
 - Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Vaudry H, Tonon MC (2000) The triakontatetrapeptide (TTN) stimulates thymidine incorporation in rat astrocytes through peripheral-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem* **75**: 701-707.
 - Garcia MC, Kim KY, Hough C, Kim HY (1997) Effects of chronic ethanol on the mobilization of arachidonate and docosahexaenoate stimulated by the type 2A serotonin receptor agonist (+/-)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride in C6 glioma cells. *Alcohol Clin Exp Res* **21**: 1465-1470.
 - Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP, Bennett T (2001) Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* **132**: 1625-1629.
 - Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennett T (2004) Bolus injection of human UII in conscious rats evokes a biphasic haemodynamic response. *Br J Pharmacol* **143**: 422-430.

- Garlton J, Parker F, Harrison DC, Douglas SA, Ashmeade TE, Riley GJ, Hughes ZA, Taylor SG, Munton RP, Hagan JJ, Hunter JA, Jones DN (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **155**: 426-433.
- Gebke E, Muller AR, Jurzak M, Gerstberger R (1998) Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* **85**: 509-520.
- Gendron G, Simard B, Gobeil F, Jr., Sirois P, D'Orleans-Juste P, Regoli D (2004) Human urotensin-II enhances plasma extravasation in specific vascular districts in Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol* **82**: 16-21.
- Gibson A (1987) Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *Br J Pharmacol* **91**: 205-212.
- Gibson A, Bern HA, Ginsburg M, Botting JH (1984) Neuropeptide-induced contraction and relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 625-629.
- Gibson A, Conyers S, Bern HA (1988) The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta. *J Pharm Pharmacol* **40**: 893-895.
- Gibson A, Wallace P, Bern HA (1986) Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats. *Gen Comp Endocrinol* **64**: 435-439.
- Gil JM, Rego AC (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* **27**: 2803-2820.
- Gimpl G, Kirchhoff F, Lang RE, Kettenmann H (1993) Identification of neuropeptide Y receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain. *J Neurosci Res* **34**: 198-205.
- Gong H, Wang YX, Zhu YZ, Wang WW, Wang MJ, Yao T, Zhu YC (2004) Cellular distribution of GPR14 and the positive inotropic role of urotensin II in the myocardium in adult rat. *J Appl Physiol* **97**: 2228-2235.
- Goossens N (1976) Immunohistochemical evidence against the presence of vasotocin in the trout urophysis. *Gen Comp Endocrinol* **30**: 231-233.
- Grau EG, Nishioka RS, Bern HA (1982) Effects of somatostatin and urotensin II on tilapia pituitary prolactin release and interactions between somatostatin, osmotic pressure Ca^{2+} , and adenosine 3',5'-monophosphate in prolactin release *in vitro*. *Endocrinology* **110**: 910-915.
- Gray GA, Jones MR, Sharif I (2001) Human urotensin II increases coronary perfusion pressure in the isolated rat heart: potentiation by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition. *Life Sci* **69**: 175-180.
- Graham A, Court JA, Martin-Ruiz CM, Jaros E, Perry R, Volsen SG, Bose S, Evans N, Ince P, Kuryatov A, Lindstrom J, Gotti C, Perry EK (2002) Immunohistochemical localisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits in human cerebellum. *Neuroscience* **113**: 493-507.
- Grimaldi M, Florio T, Schettini G (1997) Somatostatin inhibits interleukin 6 release from rat cortical type I astrocytes via the inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 242-248.
- Guerrini R, Camarda V, Marzola E, Arduin M, Calo G, Spagnol M, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D (2005) Structure-activity relationship study on human urotensin II. *J Pept Sci* **11**: 85-90.

- Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, Costa E (1983) Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3531-3535.
- Gustafson EC, Stevens ER, Wolosker H, Miller RF (2007) Endogenous D-serine contributes to NMDA-receptor-mediated light-evoked responses in the vertebrate retina. *J Neurophysiol* **98**: 122-130.
- Gustavsson L, Lundqvist C, Hansson E (1993) Receptor-mediated phospholipase D activity in primary astroglial cultures. *Glia* **8**: 249-255.

-H-

- Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1991) Calcitonin Gene-related Peptide Stimulates the Induction of c-fos Gene Expression in Rat Astrocyte Cultures. *Eur J Neurosci* **3**: 708-712.
- Hashimoto H, Kunugi A, Arakawa N, Shintani N, Fujita T, Kasai A, Kawaguchi C, Morita Y, Hirose M, Sakai Y, Baba A (2003) Possible involvement of a cyclic AMP-dependent mechanism in PACAP-induced proliferation and ERK activation in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **311**: 337-343.
- Hassan GS, Chouiali F, Saito T, Hu F, Douglas SA, Ao Z, Willette RN, Ohlstein EH, Giaid A (2003) Effect of human urotensin-II infusion on hemodynamics and cardiac function. *Can J Physiol Pharmacol* **81**: 125-128.
- Hassinger TD, Atkinson PB, Strecker GJ, Whalen LR, Dudek FE, Kossel AH, Kater SB (1995) Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J Neurobiol* **28**: 159-170.
- Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* **4**: 233-243.
- Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**: 173-185.
- He YH, Hong JM, Guo HS, Wei JR, Chen H, Zuo HH, Li ZL (2004) Effects of urotensin II on cultured cardiac fibroblast proliferation and collagen type I mRNA expression. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **24**: 505-508.
- Hebb MO, Denovan-Wright EM, Robertson HA (1999) Expression of the Huntington's disease gene is regulated in astrocytes in the arcuate nucleus of the hypothalamus of postpartum rats. *FASEB J* **13**: 1099-1106.
- Hilfiker MA, Zhang D, Dowdell SE, Goodman KB, McAtee JJ, Dodson JW, Viet AQ, Wang GZ, Sehon CA, Behm DJ, Wu Z, Carballo LH, Douglas SA, Neeb MJ (2008) Aminomethylpiperazines as selective urotensin antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **18**: 4470-4473.
- Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP (1998) Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT1 receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* **61**: 90-99.
- Hoelzinger DB, Demuth T, Berens ME (2007) Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* **99**: 1583-1593.

- Hosli E, Hosli L (1994) Binding of cholecystokinin, bombesin and muscarine to neurons and astrocytes in explant cultures of rat central nervous system: autoradiographic and immunohistochemical studies. *Neuroscience* **61**: 63-72.
 - Hosli E, Jurasin K, Ruhl W, Luthy R, Hosli L (2001) Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured astrocytes of rat central nervous system. *Int J Dev Neurosci* **19**: 11-19.
 - Hosli E, Ruhl W, Hosli L (2000) Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors. *Int J Dev Neurosci* **18**: 101-111.
 - Hubbard PC, Balment RJ, McCrohan CR (1996) Adrenergic receptor activation hyperpolarizes the caudal neurosecretory cells of the flounder, *Platichthys flesus*. *J Neuroendocrinol* **8**: 153-159.
 - Hubbard PC, Balment RJ, McCrohan CR (1997) Inhibitory effect of 5-hydroxytryptamine receptor activation on caudal neurosecretory cells of the flounder, *Platichthys flesus*. *J Neuroendocrinol* **9**: 561-566.
 - Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sanchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, Suzuki C, Nothacker HP, Civelli O, Criado JR, Henriksen SJ, Leonard CS, de Lecea L (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci* **25**: 5465-5474.
 - Husemann J, Silverstein SC (2001) Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* **158**: 825-832.
- I-
- Ichikawa T (1978) Acetylcholine in the urophysis of several species of teleosts. *Gen Comp Endocrinol* **35**: 226-233.
 - Ichikawa T, Lederis K, Kobayashi H (1984) Primary structures of multiple forms of urotensin II in the urophysis of the carp, *Cyprinus carpio*. *Gen Comp Endocrinol* **55**: 133-141.
 - Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 108-112.
 - Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Matsuki N, Oh-Ishi S (2000) Intracellular Ca²⁺ increase in neuro-2A cells and rat astrocytes following stimulation of bradykinin B2 receptor. *Jpn J Pharmacol* **84**: 140-145.
 - Inazu M, Takeda H, Matsumiya T (2003) Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *J Neurochem* **84**: 43-52.
 - Ingleton PM, Bendell LA, Flanagan JA, Teitsma C, Balment RJ (2002) Calcium-sensing receptors and parathyroid hormone-related protein in the caudal neurosecretory system of flounder (*Platichthys flesus*). *J Anat* **200**: 487-497.
 - Itoh H, McMaster D, Lederis K (1988) Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries. *Eur J Pharmacol* **149**: 61-66.

-J-

- Jégou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, LePrince J, Vaudry H, Lihmann I (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **495**: 21-36.
- Jellinger KA, Attems J (2006) Prevalence and impact of cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease and parkinsonism. *Acta Neurol Scand* **114**: 38-46.
- Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Lavery M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz TM, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma F, Jr., Zhang FL (2003) Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* **278**: 27652-27657.
- Jin J, Wang Y, Wang F, Shi D, Erhard KF, Wu Z, Guida BF, Lawrence SK, Behm DJ, Disa J, Vaidya KS, Evans C, McMillan LJ, Rivero RA, Neeb MJ, Douglas SA (2008) 2-Aminomethyl piperidines as novel urotensin-II receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **18**: 2860-2864.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**: 25-34.
- Junjaud G, Rouaud E, Turpin F, Mothet JP, Billard JM (2006) Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat. *J Neurochem* **98**: 1159-1166.

-K-

- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* **23**: 1-10.
- Kartvelishvili E, Shleper M, Balan L, Dumin E, Wolosker H (2006) Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **281**: 14151-14162.
- Katano Y, Ishihata A, Aita T, Ogaki T, Horie T (2000) Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *Eur J Pharmacol* **402**: R5-7.
- Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Ikezaki K (1990) Early cellular swelling in experimental traumatic brain injury: a phenomenon mediated by excitatory amino acids. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **51**: 271-273.
- Katsuki H, Nonaka M, Shirakawa H, Kume T, Akaike A (2004) Endogenous D-serine is involved in induction of neuronal death by N-methyl-D-aspartate and simulated ischemia in rat cerebrocortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 836-844.
- Katsuki H, Watanabe Y, Fujimoto S, Kume T, Akaike A (2007) Contribution of endogenous glycine and D-serine to excitotoxic and ischemic cell death in rat cerebrocortical slice cultures. *Life Sci* **81**: 740-749.
- Katsura K, Kristian T, Nair R, Siesjö BK (1994) Regulation of intra- and extracellular pH in the rat brain in acute hypercapnia: a re-appraisal. *Brain Res* **651**: 47-56.

- Kavaliers M, Hirst M (1986) An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Res* **383**: 343-349.
- Kelsall CJ, Balment RJ (1998) Native urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *Platichthys flesus*. *Gen Comp Endocrinol* **112**: 210-219.
- Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM (2000) $\beta(2)$ -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circ Res* **87**: 705-709.
- Kim PM, Aizawa H, Kim PS, Huang AS, Wickramasinghe SR, Kashani AH, Barrow RK, Hugarir RL, Ghosh A, Snyder SH (2005) Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 2105-2110.
- Kimelberg HK (1992) Astrocytic edema in CNS trauma. *J Neurotrauma* **9 Suppl 1**: S71-81.
- Kinney WA, Almond Jr HR, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Cho DS, Everson AM, Feinstein MA, Leung PA, Maryanoff BE (2002) Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**: 2940-2944.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T (1993) Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 553-560.
- Kompa AR, Thomas WG, See F, Tzanidis A, Hannan RD, Krum H (2004) Cardiovascular role of urotensin II: effect of chronic infusion in the rat. *Peptides* **25**: 1783-1788.
- Kondou H, Inagaki N, Fukui H (1994) Formation of inositol phosphates mediated by M3 muscarinic receptors in type-1 and type-2 astrocytes from neonatal rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* **180**: 131-134.
- Kondou H, Inagaki N, Fukui H, Koyama Y, Kanamura A, Wada H (1991) Histamine-induced inositol phosphate accumulation in type-2 astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **177**: 734-738.
- Kotter K, Klein J (1999) Adrenergic modulation of astroglial phospholipase D activity and cell proliferation. *Brain Res* **830**: 138-145.
- Krum JM, Khaibullina A (2003) Inhibition of endogenous VEGF impedes revascularization and astroglial proliferation: roles for VEGF in brain repair. *Exp Neurol* **181**: 241-257.
- Krum JM, Rosenstein JM (1998) VEGF mRNA and its receptor flt-1 are expressed in reactive astrocytes following neural grafting and tumor cell implantation in the adult CNS. *Exp Neurol* **154**: 57-65.
- Krum JM, Rosenstein JM (1999) Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *Exp Neurol* **160**: 348-360.

Kubo A, Fukui H, Inagaki N, Kanamura A, Wada H (1991) Histamine-induced cyclic AMP accumulation in type-1 and type-2 astrocytes in primary culture. *Eur J Pharmacol* **208**: 249-253.

-L-

Labarrere P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon MC, Dubessy C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Calas B, Pacaud P, Vaudry H (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* **18**: 77-88.

Lamacz M, Tonon MC, Smih-Rouet F, Patte C, Gasque P, Fontaine M, Vaudry H (1996) The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* **37**: 290-296.

Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA (1995) Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 295-303.

Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA (2003) Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Prog Neurobiol* **71**: 67-80.

Lamszus K, Heese O, Westphal M (2004) Angiogenesis-related growth factors in brain tumors. *Cancer Treat Res* **117**: 169-190.

Lancien F, Leprince J, Mimassi N, Mabin D, Vaudry H, Le Mevel JC (2004) Central effects of native urotensin II on motor activity, ventilatory movements, and heart rate in the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res* **1023**: 167-174.

Langham RG, Kelly DJ, Gow RM, Zhang Y, Dowling JK, Thomson NM, Gilbert RE (2004) Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* **44**: 826-831.

Le Y, Hu J, Gong W, Shen W, Li B, Dunlop NM, Halverson DO, Blair DG, Wang JM (2000) Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines. *J Neuroimmunol* **111**: 102-108.

Le Mevel JC, Olson KR, Conklin D, Waugh D, Smith DD, Vaudry H, Conlon JM (1996) Cardiovascular actions of trout urotensin II in the conscious trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol* **271**: R1335-1343.

Lederis K (1969) Teleostean urophysis: stimulation of contractions of bladder of the trout *Salmo gairdnerii*. *Science* **163**: 1327-1328.

Lederis K (1970a) Teleost urophysis. 1. Bioassay of an active urophysial principle on the isolated urinary bladder of the Rainbow Trout, *Salmo gairdnerii*. *Gen Comp Endocrinol* **14**: 417-426.

Lederis K (1970b) Teleost urophysis. 2. Biological characterization of the bladder-contracting activity. *Gen Comp Endocrinol* **14**: 427-437.

Lederis K, Vale W, Rivier J, MacCannell KL, McMaster D, Kobayashi Y, Suess U, Lawrence J (1982) Urotensin I, a novel CRF-like peptide in *Catostomus commersoni* urophysis. *Proc West Pharmacol Soc* **25**: 223-227.

- Lee SP, O'Dowd BF, Rajaram RD, Nguyen T, George SR (2003a) D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* **42**: 11023-11031.
- Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW (2003b) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* **9**: 900-906.
- Lenmmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A (1998) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 874-882.
- Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchere JL, Vaudry H, Tonon MC (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, Chatenet D, Dubessy C, Fournier A, Pfeiffer B, Scalbert E, Renard P, Pacaud P, Oulyadi H, Ségalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Davoust D, Tonon MC, Vaudry H (2008) Structure-activity relationships of urotensin II and URP. *Peptides* **29**: 658-673.
- Leslie S, Denvir M, Webb DJ (2000) Human urotensin-II causes vasoconstriction in the human skin microcirculation. *Circulation* **102**:542.
- Li SS (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* **390**: 641-653.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7526-7531.
- Lin WW, Chuang DM (1992) Potentiation by Ca²⁺ ionophores and inhibition by extracellular KCl of endothelin-induced phosphoinositide turnover in C6 glioma cells. *Neurochem Int* **21**: 293-301.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Abe I, Iida M (2003a) Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J Hypertens* **21**: 159-165.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, Iida M (2003b) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* **26**: 839-845.
- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL, Jr., Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* **266**: 174-178.
- Loewi O (1921) Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. *Pflügers Arch ges Physiol* **189**:239-242.
- Lory P, Bidaud I, Chemin J (2006) T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* **40**: 135-146.
- Louiset E, Vaudry H, Cazin L (1993) Allosteric modulation of the GABA-induced chloride current in frog melanotrophs. *Ann NY Acad Sci* **680**: 564-566.
- Lovejoy DA, Balment RJ (1999) Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* **115**: 1-22.

- Lu W, Abdel-Razik AE, Ashton N, Balment RJ (2008) Urotensin II: lessons from comparative studies for general endocrinology. *Gen Comp Endocrinol* **157**: 14-20.
- Lu W, Dow L, Gumusgoz S, Brierley MJ, Warne JM, McCrohan CR, Balment RJ, Riccardi D (2004) Coexpression of corticotropin-releasing hormone and urotensin i precursor genes in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): a possible shared role in peripheral regulation. *Endocrinology* **145**: 5786-5797.
- Lu Y, Zou CJ, Huang DW, Tang CS (2002) Cardiovascular effects of urotensin II in different brain areas. *Peptides* **23**: 1631-1635.

-M-

- MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I, Pollard K (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* **130**: 201-204.
- Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* **131**: 441-446.
- Maguire JJ, Kuc RE, Klein MJ, Davenport AP (2008) Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* **29**: 735-742.
- Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Klein MJ, Davenport AP (2004) Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* **25**: 1767-1774.
- Malagon MM, Molina M, Gahete MD, Duran-Prado M, Martinez-Fuentes AJ, Alcain FJ, Tonon MC, Leprince J, Vaudry H, Castano JP, Vazquez-Martinez R (2008) Urotensin II and urotensin II-related peptide activate somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Peptides* **29**: 711-720.
- Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P, Tripepi G, Zoccali C (2005) Urotensin II in end-stage renal disease: an inverse correlate of sympathetic function and cardiac natriuretic peptides. *J Nephrol* **18**: 727-732.
- Mansson E, Bare L, Yang D (1994) Isolation of a human κ opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 1431-1437.
- Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P, et al. (1995) Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* **29**: 335-344.
- Marchetti B, Abbracchio MP (2005) To be or not to be (inflamed). Is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* **26**: 517-525.
- Marchetti B, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Cioni S, Gennuso F, Rocchitta G, Desole MS, Mazzarino MC, Miele E, Morale MC (2005) Hormones are key actors in gene x environment interactions programming the vulnerability to Parkinson's disease: glia as a common final pathway. *Ann NY Acad Sci* **1057**: 296-318.

- Marco J, Egido EM, Hernandez R, Silvestre RA (2008) Evidence for endogenous urotensin-II as an inhibitor of insulin secretion. Study in the perfused rat pancreas. *Peptides* **29**: 852-858.
- Marin P, Delumeau JC, Durieu-Trautmann O, Le Nguyen D, Premont J, Strosberg AD, Couraud PO (1991a) Are several G proteins involved in the different effects of endothelin-1 in mouse striatal astrocytes? *J Neurochem* **56**: 1270-1275.
- Marin P, Delumeau JC, Tence M, Cordier J, Glowinski J, Premont J (1991b) Somatostatin potentiates the α 1-adrenergic activation of phospholipase C in striatal astrocytes through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9016-9020.
- Marshall WS, Bern HA (1981) Active chloride transport by the skin of a marine teleost is stimulated by urotensin I and inhibited by urotensin II. *Gen Comp Endocrinol* **43**: 484-491.
- Martin DL (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* **5**: 81-94.
- Martin JL, Feinstein DL, Yu N, Sorg O, Rossier C, Magistretti PJ (1992) VIP receptor subtypes in mouse cerebral cortex: evidence for a differential localization in astrocytes, microvessels and synaptosomal membranes. *Brain Res* **587**: 1-12.
- Martineau M, Baux G, JP Mothet (2006) Gliotransmission at central glutamatergic synapses: D-serine on stage. *J Physiol* **99**: 103-110.
- Martinez R, Schackert G, esteller M (2007) Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioblastoma multiforme. *J neurooncol* **82**: 133-139.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Fournier A, Patte-Mensah C, Vaudry H, Tonon MC (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes *via* a PKA-dependent mechanism. *Faseb J* **17**: 17-27.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Tokay T, Leprince J, Ravni A, Vaudry H, Tonon MC (2005) Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes *via* distinct receptor subtypes. *J Neurochem* **94**: 561-571.
- Mason S, Smart D, Marshall IC, McKnight A, Skepper JN, McNulty S (2002) Identification and characterisation of functional bombesin receptors in human astrocytes. *Eur J Pharmacol* **438**: 25-34.
- Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, Sugo T, Mori M, Kitada C, Kurokawa T, Fujino M (2004) Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes angiogenic-like behaviors in rodents. *Neurosci Lett* **358**: 99-102.
- Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N, Hirata Y (2003) Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* **144**: 1825-1831.
- Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu N, Hirata Y (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J Hypertens* **19**: 2185-2190.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**: 1354-1357.

- Maxishima M, Shiga T, Shutoh F, Hamada S, Maeshima T, Okado N (2001) Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity is detected in astrocytes but not in oligodendrocytes of rat spinal cord. *Brain Res* **889**: 270-273.
- McDermott KW, Barry DS, McMahon SS (2005) Role of radial glia in cytotogenesis, patterning and boundary formation in the developing spinal cord. *J Anat* **207**: 241-250.
- McGraw J, Hiebert GW, Steeves JD (2001) Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res* **63**: 109-115.
- McKeon TW, Cohen SL, Black EE, Kriebel RM, Parsons RL (1988) Monoamines in the caudal neurosecretory complex: biochemistry and immunohistochemistry. *Brain Res Bull* **21**: 37-42.
- McMaster D, Belenky MA, Polenov AL, Lederis K (1992) Isolation and amino acid sequence of urotensin II from the sturgeon *Acipenser ruthenus*. *Gen Comp Endocrinol* **87**: 275-285.
- McMaster D, Lederis K (1983) Isolation and amino acid sequence of two urotensin II peptides from *Catostomus commersoni* urophyses. *Peptides* **4**: 367-373.
- McMillian MK, Hong JS (1994) Regulation of preproenkephalin expression in astrocytes: is there a role for glia-derived opioid peptides in reactive gliosis? *Crit Rev Neurobiol* **9**: 91-103.
- Menalled LB (2005) Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx* **2**: 465-470.
- Miller KE, Kriebel RM (1986) Peptidergic innervation of caudal neurosecretory neurons. *Gen Comp Endocrinol* **64**: 396-400.
- Miller MJ, Martinez A, Unsworth EJ, Thiele CJ, Moody TW, Elsasser T, Cuttitta F (1996) Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor. *J Biol Chem* **271**: 23345-23351.
- Moldrich RX, Aprico K, Diwakarla S, O'Shea RD, Beart PM (2002) Astrocyte mGlu(2/3)-mediated cAMP potentiation is calcium sensitive: studies in murine neuronal and astrocyte cultures. *Neuropharmacology* **43**: 189-203.
- Monaco AP, Baghdoyan HA, Nelson JP, Hobson JA (1984) Cortical wave amplitude and eye movement direction are correlated in REM sleep but not in waking. *Arch Ital Biol* **122**: 213-223.
- Morgello S, Uson RR, Schwartz EJ, Haber RS (1995) The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* **14**: 43-54.
- Morara S, Wimalawansa SJ, Rosina A (1998) Monoclonal antibodies reveal expression of the CGRP receptor in Purkinje cells, interneurons and astrocytes of rat cerebellar cortex. *Neuroreport* **9**: 3755-3759.
- Moreno MJ, Cohen Z, Stanimirovic DB, Hamel E (1999) Functional calcitonin gene-related peptide type 1 and adrenomedullin receptors in human trigeminal ganglia, brain vessels, and cerebrovascular or astroglial cells in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**: 1270-1278.
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* **265**: 123-129.

- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4926-4931.
- Muller W, Heinemann U, Berlin K (1997) Cholecystokinin activates CCKB-receptor-mediated Ca-signaling in hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol* **78**: 1997-2001.
- Muramatsu I, Kobayashi Y (1979) Effects of urotensins on the cardiovascular system of a teleost fish and a bird. *Gunma Symp Endocrinol* **16**:49-56.
- Mustafa AK, Kim PM, Snyder SH (2004) D-Serine as a putative glial neurotransmitter. *Neuron Glia Biol* **1**: 275-281.
- N-
- Nakagawa T, Yabe T, Schwartz JP (2005) Gene expression profiles of reactive astrocytes cultured from dopamine-depleted striatum. *Neurobiol Dis* **20**: 275-282.
- Nakayama T, Hirose T, Totsune K, Mori N, Maruyama Y, Maejima T, Minagawa K, Morimoto R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y (2008) Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides* **29**: 801-808.
- Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD, Wang W, Grammer JR, Gladson CL (2006) HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene* **25**: 1721-1732.
- Newman EA (1999) Sodium-bicarbonate cotransporter in retinal astrocytes and Müller cells of the rat. *Glia* **26**: 302-308.
- Ng LL, Loke I, O'Brien RJ, Squire IB, Davies JE (2002) Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* **106**: 2877-2880.
- Norenberg MD, Bender AS (1994) Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **60**: 24-27.
- Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP, Civelli O (1999) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* **1**: 383-385.
- Nouel D, Sarret P, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A (1999) Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience* **94**: 1189-1197.
- Nuki C, Kawasaki H, Kitamura K, Takenaga M, Kangawa K, Eto T, Wada A (1993) Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in rat mesenteric vascular beds. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 245-251.

-O-

- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411**: 613-617.

- Oka S, Chiba A, Honma Y (1997) Structures immunoreactive with porcine NPY in the caudal neurosecretory system of several fishes and cyclostomes. *Zool Sci* **14**:665-669.
- Oliva AM, Bas N, Garcia A (1997) Differences in the stimulation of the phosphoinositide cycle by amine neurotransmitters in cultured rat forebrain neurones and astrocytes. *Biochem Pharmacol* **54**: 1243-1251.
- Ono T, Kawaguchi Y, Kudo M, Kushikata T, Hashiba E, Yoshida H, Kudo T, Furukawa K, Douglas SA, Guerrini R, Calo G, Hirota K (2008) Urotensin II evokes neurotransmitter release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci Lett* **440**: 275-279.
- Ouafik L, Berenguer-Daize C, Berthois Y (2009) Adrenomedullin promotes cell cycle transit and up-regulates cyclin D₁ protein level in human glioblastoma cells through the activation of c-Jun/JNK/AP-1 signal transduction pathway. *Cell Signal* **21**: 597-608.
- Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, Vuaroqueaux V, Dussert C, Palmari J, Dufour H, Grisoli F, Casellas P, Brunner N, Martin PM (2002) Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines *in vitro* and suppresses tumor xenograft growth *in vivo*. *Am J Pathol* **160**: 1279-1292.
- P-
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* **125**: 775-784.
- Pandey AC (1981) Studies on the histomorphology of the caudal neurosecretory system and its neurohaemal organ of a freshwater teleost, *Colisa fasciatus* (Bloch and Schneider) (Anabantidae, Perciformes). *J Hirnforsch* **22**: 393-396.
- Panner A, Cribbs LL, Zainelli GM, Origiano TC, Singh S, Wurster RD (2005) Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium* **37**: 105-119.
- Panner A, Wurster RD (2006) T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* **40**: 253-259.
- Paolillo M, Barbieri A, Zanassi P, Schinelli S (2006) Expression of endothelins and their receptors in glioblastoma cell lines. *J Neurooncol* **79**: 1-7.
- Park IH, Yeon SI, Youn JH, Choi JE, Sasaki N, Choi IH, Shin JS (2004) Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol* **40**: 1203-1211.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**: 744-747.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations *in situ* drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* **4**: 803-812.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J Neurosci* **17**: 7817-7830.

- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA (2003) Urotensin II: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* **140**: 1155-1158.
- Patte C, Gandolfo P, Leprince J, Thoumas JL, Fontaine M, Vaudry H, Tonon MC (1999) GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia* **25**: 404-411.
- Patte C, Vaudry H, Desrues L, Gandolfo P, Strijdsvein I, Lamacz M, Tonon MC (1995) The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes. *FEBS Lett* **362**: 106-110.
- Peakman MC, Hill SJ (1994) Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol* **111**: 191-198.
- Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind, II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 5021-5024.
- Pelletier G, Lihmann I, Dubessy C, Luu-The V, Vaudry H, Labrie F (2005) Androgenic down-regulation of urotensin II precursor, urotensin II-related peptide precursor and androgen receptor mRNA in the mouse spinal cord. *Neuroscience* **132**: 689-696.
- Perkins TD, Bansal S, Barlow DJ (1990) Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone urotensin II. *Biochem Soc Trans* **18**: 918-919.
- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumor-initiating cells. *Nature* **444**: 761-765.
- Platania P, Laureanti F, Bellomo M, Giuffrida R, Giuffrida-Stella AM, Catania MV, Sortino MA (2003) Differential expression of estrogen receptors α and β in the spinal cord during postnatal development: localization in glial cells. *Neuroendocrinology* **77**: 334-340.
- Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**: 71-78.
- Popovici C, Leveugle M, Birnbaum D, Coulier F (2001) Coparalogy: physical and functional clusterings in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 362-370.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Prog Neurobiol* **51**: 439-455.
- Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1998) Cultured astrocytes express functional receptors for galanin. *Glia* **24**: 323-328.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* **11**: 1-20.
- Prosser HC, Forster ME, Richards AM, Pemberton CJ (2008) Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Peptides* **29**: 770-777.
- Prosser HC, Leprince J, Vaudry H, Richards AM, Forster ME, Pemberton CJ (2006) Cardiovascular effects of native and non-native urotensin II and urotensin II-related peptide on rat and salmon hearts. *Peptides* **27**: 3261-3268.

Przedborski S, Goldman S, Schiffmann SN, Vierendeels G, Depierreux M, Levivier M, Hildebrand J, Vanderhaeghen JJ (1988) Neuropeptide Y, somatostatin, and cholecystokinin neurone preservation in anaplastic astrocytomas. *Acta Neuropathol* **76**: 507-510.

-Q-

Qi JS, Minor LK, Smith C, Hu B, Yang J, Andrade-Gordon P, Damiano B (2005) Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides* **26**: 683-690.

Quattrochi JJ, Mamelak AN, Madison RD, Macklis JD, Hobson JA (1989) Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorescent microspheres. *Science* **245**: 984-986.

-R-

Rakic P (1995) Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11323-11327.

Regina A, Morchoisne S, Borson ND, McCall AL, Drewes LR, Roux F (2001) Factor(s) released by glucose-deprived astrocytes enhance glucose transporter expression and activity in rat brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1540**: 233-242.

Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, Fisher S, Yandle TG (2002) Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* **360**: 545-546.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* **20**: 570-577.

Rinken A, Terasmaa A, Raidaru G, Fuxe K (2001) D₂ dopamine receptor-G protein coupling. Cross-regulation of agonist and guanosine nucleotide binding sites. *Neurosci Lett* **302**: 5-8.

Rivas RJ, Nishioka RS, Bern HA (1986) *In vitro* effects of somatostatin and urotensin II on prolactin and growth hormone secretion in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol* **63**: 245-251.

Rivera E, Arrieta O, Guevara P, Duarte-Rojo A, Sotelo J (2001) AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma. *Br J Cancer* **85**: 1396-1399.

Rocchi P, Boudouresque F, Zamora AJ, Muracciole X, Lechevallier E, Martin PM, Ouafik L (2001) Expression of adrenomedullin and peptide amidation activity in human prostate cancer and in human prostate cancer cell lines. *Cancer Res* **61**: 1196-1206.

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**: 154-157.

Rose CR, Ransom BR (1997) Gap junctions equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes. *Glia* **20**: 299-307.

Rosenstein JM, Krum JM (2004) New roles for VEGF in nervous tissue. Beyond blood vessels. *Exp Neurol* **187**: 246-253.

- Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R, Coy DH (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* **438**: 159-170.
- Russell FD (2004) Emerging roles of urotensin-II in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* **103**: 223-243.
- Russell FD, Kearns P, Toth I, Molenaar P (2004) Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* **310**: 209-214.
- Russell FD, Meyers D, Galbraith AJ, Bett N, Toth I, Kearns P, Molenaar P (2003) Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H1576-1581.
- Russell FD, Molenaar P, O'Brien DM (2001) Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart *in vitro*. *Br J Pharmacol* **132**: 5-9.
- S-
- Saetrum Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction *via* an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* **406**: 265-271.
- Salhia B, Angelov L, Roncari L, Wu X, Shannon P, Guha A (2000) Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neoangiogenesis. *Brain Res* **883**: 87-97.
- Salomon Y, Zohar M, Dejordy JO, Eshel Y, Shafir I, Leiba H, Garty NB, Schmidt-Sole J, Azrad A, Shai E, et al. (1993) Signaling mechanisms controlled by melanocortins in melanoma, lacrimal, and brain astroglial cells. *Ann NY Acad Sci* **680**: 364-380
- Sanden N, Thorlin T, Blomstrand F, Persson PA, Hansson E (2000) 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptors stimulate Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int* **36**: 427-434.
- Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S (2007) D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* **26**: 4149-4159.
- Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* **88**: 1102-1104.
- Sawada M, Ichinose M (1999) Potentiation of GABA_A receptor-mediated Cl⁻ current by urotensin peptides in identified Aplysia neurons. *J Neurosci Res* **56**: 547-552.
- Sayah S, Jauneau AC, Patte C, Tonon MC, Vaudry H, Fontaine M (2003) Two different transduction pathways are activated by C3a and C5a anaphylatoxins on astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* **112**: 53-60.
- Schinelli S, Zanassi P, Paolillo M, Wang H, Feliciello A, Gallo V (2001) Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression *via* multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Neurosci* **21**: 8842-8853.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H (2002) Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J* **16**: 255-257.

- Schwartz RH (2001) Immunology. It takes more than two to tango. *Nature* **409**: 31-32.
- Segain JP, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Bletiere D, Loirand G, Pacaud P (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J Immunol* **179**: 901-909.
- Seifert G, Weber M, Schramm J, Steinhauser C (2003) Changes in splice variant expression and subunit assembly of AMPA receptors during maturation of hippocampal astrocytes. *Mol Cell Neurosci* **22**: 248-258.
- Servitja JM, Masgrau R, Pardo R, Sarri E, von Eichel-Streiber C, Gutkind JS, Picatoste F (2003) Metabotropic glutamate receptors activate phospholipase D in astrocytes through a protein kinase C-dependent and Rho-independent pathway. *Neuropharmacology* **44**: 171-180.
- Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2002) Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *J Histochem Cytochem* **50**: 885-889.
- Sherrington CS (1906) The Integrative Action of the Nervous System. New York: Charles Scribner's Sons.
- Shi L, Ding W, Li D, Wang Z, Jiang H, Zhang J, Tang C (2006) Proliferation and anti-apoptotic effects of human urotensin II on human endothelial cells. *Atherosclerosis* **188**: 260-264.
- Shih AH, Holland EC (2006) Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia* **8**: 1072-1082.
- Shimomura Y, Harada M, Goto M, Sugo T, Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Asami T, Kitada C, Mori M, Onda H, Fujino M (2002) Identification of neuropeptide W as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* **277**: 35826-35832.
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ (2005) Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* **171**: 1001-1012.
- Shleper M, Kartvelishvily E, Wolosker H (2005) D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci* **25**: 9413-9417.
- Sidharta PN, Wagner FD, Bohnemeier H, Jungnik A, Halabi A, Krahenbuhl S, Chadha-Boreham H, Dingemanse J (2006) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clin Pharmacol Ther* **80**: 246-256.
- Silver IA, Erecinska M (1997) Energetic demands of the Na⁺/K⁺ ATPase in mammalian astrocytes. *Glia* **21**: 35-45.
- Silvestre RA, Egido EM, Hernandez R, Leprince J, Chatenet D, Tollemere H, Chartrel N, Vaudry H, Marco J (2004) Urotensin-II is present in pancreatic extracts and inhibits insulin release in the perfused rat pancreas. *Eur J Endocrinol* **151**: 803-809
- Silvestre RA, Rodriguez-Gallardo J, Egido EM, Marco J (2001) Inhibition of insulin release by urotensin II. A study on the perfused rat pancreas. *Horm Metab Res* **33**: 379-381.
- Singhrao SK, Thomas P, Wood JD, MacMillan JC, Neal JW, Harper PS, Jones AL (1998) Huntingtin protein colocalizes with lesions of neurodegenerative diseases: an investigation in Huntington's, Alzheimer's, and Pick's diseases. *Exp Neurol* **150**: 213-222.

- Slezak M, Pfrieder FW (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* **26**: 531-535.
- Slobodyansky E, Guidotti A, Wambebe C, Berkovich A, Costa E (1989) Isolation and characterization of a rat brain triakontatetraneuropeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro 5-4864 recognition site. *J Neurochem* **53**: 1276-1284.
- Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* **11**: 400-407.
- Sone M, Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Satoh F, Mouri T, Shibahara S (2000) Expression of endothelin-1 and endothelin receptors in cultured human glioblastoma cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**: S390-392.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**: 39-44.
- Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, Thompson JP, Rowbotham DJ, Lambert DG (2006) Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **373**: 148-157.
- Speidel CC (1922). Further comparative studies in other fishes of cells that are homologous to the large irregular glandular cells in the spinal cord of the skates. *J Comp Neurol* **34**:303-317.
- Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D, Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Int J Mol Med* **18**: 1107-1112.
- St-Pierre JA, Nouel D, Dumont Y, Beaudet A, Quirion R (2000) Sub-population of cultured hippocampal astrocytes expresses neuropeptide Y Y(1) receptors. *Glia* **30**: 82-91.
- Stanimirovic DB, Ball R, Mealing G, Morley P, Durkin JP (1995) The role of intracellular calcium and protein kinase C in endothelin-stimulated proliferation of rat type I astrocytes. *Glia* **15**: 119-130.
- Stiene-Martin A, Knapp PE, Martin K, Gurwell JA, Ryan S, Thornton SR, Smith FL, Hauser KF (2001) Opioid system diversity in developing neurons, astroglia, and oligodendroglia in the subventricular zone and striatum: impact on gliogenesis *in vivo*. *Glia* **36**: 78-88.
- Stix B, Reiser G (1998) β -amyloid peptide 25-35 regulates basal and hormone-stimulated Ca^{2+} levels in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* **243**: 121-124.
- Stadel JM, Wilson S, Bergsma DJ (1997) Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 430-437.
- Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro Dossi RC (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* **10**: 2541-2559.
- Stevens ER, Esguerra M, Kim PM, Newman EA, Snyder SH, Zahs KR, Miller RF (2003) D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6789-6794.

- Stichel CC, Muller HW (1998) The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res* **294**: 1-9.
- Suarez I, Bodega G, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA, Rubio M, Fernandez B (2002) Reduced glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase expression in astrocytes and Bergmann glial cells in the rat cerebellum caused by delta(9)-tetrahydrocannabinol administration during development. *Dev Neurosci* **24**: 300-312.
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M, Fujino M (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 860-868.
- Suguro T, Watanabe T, Kodate S, Xu G, Hirano T, Adachi M, Miyazaki A (2008) Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* **115**: 327-334.
- Suman-Chauhan N, Meecham KG, Webdale L, Hunter JC, Pritchard MC, Woodruff GN, Hill DR (1996) The influence of guanyl nucleotide on agonist and antagonist affinity at guinea-pig CCK-B/gastrin receptors: binding studies using [³H]PD140376. *Regul Pept* **65**: 37-43.
- Sumners C, Tang W, Paulding W, Raizada MK (1994) Peptide receptors in astroglia: focus on angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *Glia* **11**: 110-116.
- Sun HX, Du WN, Zuo J, Wu GD, Shi GB, Shen Y, Qiang BQ, Yao ZJ, Hang JM, Wang H, Huang W, Chen Z, Fang FD (2002) The association of two single nucleotide polymorphisms in PRKCZ and UTS2 respectively with type 2 diabetes in Han people of northern China. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **24**: 223-227.
- Supattapone S, Simpson AW, Ashley CC (1989) Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* **165**: 1115-1122.

-T-

- Takahashi K, Satoh F, Hara E, Sone M, Murakami O, Kayama T, Yoshimoto T, Shibahara S (1997) Production and secretion of adrenomedullin from glial cell tumors and its effects on cAMP production. *Peptides* **18**: 1117-1124.
- Takahashi K, Totsune K, Kitamuro T, Sone M, Murakami O, Shibahara S (2002) Three vasoactive peptides, endothelin-1, adrenomedullin and urotensin-II, in human tumour cell lines of different origin: expression and effects on proliferation. *Clin Sci (Lond)* **103**: 35S-38S.
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S (2001) Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* **22**: 1175-1179.
- Tal M, Ammar DA, Karpuj M, Krizhanovsky V, Naim M, Thompson DA (1995) A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 752-759.

- Tamura K, Okazaki M, Tamura M, Isozumi K, Tasaki H, Nakashima Y (2003) Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: involvement of cell adhesion-mediated integrin signaling. *Life Sci* **72**: 1049-1060.
- Tanaka H, Yoshida T, Miyamoto N, Motoike T, Kurosu H, Shibata K, Yamanaka A, Williams SC, Richardson JA, Tsujino N, Garry MG, Lerner MR, King DS, O'Dowd BF, Sakurai T, Yanagisawa M (2003) Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6251-6256.
- Tasaki K, Hori M, Ozaki H, Karaki H, Wakabayashi I (2004) Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *J Pharmacol Sci* **94**: 376-383.
- Tatsuno I, Morio H, Tanaka T, Uchida D, Hirai A, Tamura Y, Saito Y (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a regulator of astrocytes: PACAP stimulates proliferation and production of interleukin 6 (IL-6), but not nerve growth factor (NGF), in cultured rat astrocyte. *Ann NY Acad Sci* **805**: 482-488.
- Tence M, Cordier J, Glowinski J, Premont J (1992) Endothelin-evoked Release of Arachidonic Acid from Mouse Astrocytes in Primary Culture. *Eur J Neurosci* **4**: 993-999.
- Thompson JP, Watt P, Sanghavi S, Strupish JW, Lambert DG (2003) A comparison of cerebrospinal fluid and plasma urotensin II concentrations in normotensive and hypertensive patients undergoing urological surgery during spinal anesthesia: a pilot study. *Anesth Analg* **97**: 1501-1503.
- Thorlin T, Eriksson PS, Persson PA, Aberg ND, Hansson E, Ronnback L (1998) δ -opioid receptors on astroglial cells in primary culture: mobilization of intracellular free calcium *via* a pertussis sensitive G protein. *Neuropharmacology* **37**: 299-311.
- Tonon MC, Adjeroud S, Lamacz M, Louiset E, Danger JM, Desrues L, Cazin L, Nicolas P, Vaudry H (1989) Central-type benzodiazepines and the octadecaneuropeptide modulate the effects of GABA on the release of α -melanocyte-stimulating hormone from frog neurointermediate lobe *in vitro*. *Neuroscience* **31**: 485-493.
- Tostivint H, Joly L, Lihrmann I, Parmentier C, Lebon A, Morisson M, Calas A, Ekker M, Vaudry H (2006) Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2237-2242.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, Murakami O (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with *diabetes mellitus*. *Clin Sci (Lond)* **104**: 1-5.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H, Murakami O (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* **358**: 810-811.
- Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE, Krum H (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* **93**: 246-253.

-U-

- Ubink R, Calza L, Hokfelt T (2003) 'Neuro'-peptides in glia: focus on NPY and galanin. *Trends Neurosci* **26**: 604-609.

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* **291**: 657-661.

-V-

Vassort G, Talavera K, Alvarez JL (2006) Role of T-type Ca^{2+} channels in the heart. *Cell Calcium* **40**: 205-220.

Veber DF, Holly FW, Nutt RF, Bergstrand SJ, Brady SF, Hirschmann R, Glitzer MS, Saperstein R (1979) Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size. *Nature* **280**: 512-514.

Vergura R, Camarda V, Rizzi A, Spagnol M, Guerrini R, Calo G, Salvadori S, Regoli D (2004) Urotensin II stimulates plasma extravasation in mice *via* UT receptor activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **370**: 347-352.

Vertongen P, Camby I, Darro F, Kiss R, Robberecht P (1996) VIP and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) have an antiproliferative effect on the T98G human glioblastoma cell line through interaction with VIP_2 receptor. *Neuropeptides* **30**: 491-496.

Vertongen P, d'Haens J, Michotte A, Velkeniers B, van Rampelbergh J, Svoboda M, Robberecht P (1995) Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and receptors in human brain tumors. *Peptides* **16**: 713-719.

Virchow R (1846) Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaften Medecin. *Hamm*. Frankfurt.

-W-

Wang H, Mehta JL, Chen K, Zhang X, Li D (2004) Human urotensin II modulates collagen synthesis and the expression of MMP-1 in human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **44**: 577-581.

Wang H, Ubl JJ, Reiser G (2002a) Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia* **37**(1): 53-63

Wang H, Ubl JJ, Stricker R, Reiser G (2002b) Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes *via* MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**: C1351-1364.

Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR (2001) Synergistic effect of urotensin II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* **104**: 16-18.

Watson AM, May CN (2004) Urotensin II, a novel peptide in central and peripheral cardiovascular control. *Peptides* **25**: 1759-1766.

Watson AM, McKinley MJ, May CN (2008) Effect of central urotensin II on heart rate, blood pressure and brain Fos immunoreactivity in conscious rats. *Neuroscience* **155**: 241-249.

Webster HH, Jones BE (1988) Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* **458**: 285-302.

Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, Ransom BR (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J Neurosci* **20**: 6804-6810.

- Wenji Z, Suzuki S, Hirai M, Hinokio Y, Tanizawa Y, Matsutani A, Satoh J, Oka Y (2003) Role of urotensin II gene in genetic susceptibility to Type 2 *diabetes mellitus* in Japanese subjects. *Diabetologia* **46**: 972-976.
- Wilkinson IB, Affolter JT, de Haas SL, Pellegrini MP, Boyd J, Winter MJ, Balment RJ, Webb DJ (2002) High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. *Cardiovasc Res* **53**: 341-347.
- Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* **38**: 323-337.
- Wolosker H, Panizzutti R, De Miranda J (2002) Neurobiology through the looking-glass: D-serine as a new glial-derived transmitter. *Neurochem Int* **41**: 327-332.
- Wu S, Barger SW, Sims TJ (2004) Schwann cell and epineural fibroblast expression of serine racemase. *Brain Res* **1020**: 161-166.

-X-

- Xi MC, Morales FR, Chase MH (2001) Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res* **901**: 259-264.
- Xiao RP (2001) β -adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the β 2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* **2001**: RE15.
- Xu Y, Song J, Bruno JF, Berelowitz M (1993) Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 648-652.

-Y-

- Yamada C, Mikami S, Kuraishi Y, Kobayashi H (1988) Immunoreactive methionine-enkephalin in the caudal neurosecretory system of the carp, *Cyprinus carpio*. *Cell Tissue Res* **253**: 485-487.
- Yamaguchi T, Baba K, Doi Y, Yano K (1995) Effect of adrenomedullin on aldosterone secretion by dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells. *Life Sci* **56**: 379-387.
- Yang S, Qiao H, Wen L, Zhou W, Zhang Y (2005) D-serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8. *Neurosci Lett* **379**: 7-12.
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15194-15199.
- Yano K, Hicks JW, Vaudry H, Conlon JM (1995) Cardiovascular actions of frog urotensin II in the frog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol* **97**: 103-110.
- Yeung VT, Ho SK, Nicholls MG, Cockram CS (1996a) Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP. *Peptides* **17**: 101-106.

- Yeung VT, Mak AS, Chui YL, Ho SK, Lai KN, Nicholls MG, Cockram CS (1996b) Identification of C-type natriuretic peptide gene transcripts in glial cells. *Neuroreport* **7**: 1709-1712.
- Yong VW, Moudjian R, Yong FP, Ruijs TC, Freedman MS, Cashman N, Antel JP (1991) γ -interferon promotes proliferation of adult human astrocytes *in vitro* and reactive gliosis in the adult mouse brain *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7016-7020.
- Yu S, Tooyama I, Ding WG, Kitasato H, Kimura H (1995) Immunohistochemical localization of glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) in the rat hypothalamus. *Obes Res* **3**: 753S-776S.
- Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* **275**: 37895-37901.
- Yulis CR, Lederis K (1986) Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7079-7083.
- Z-**
- Zeng F, Wess J (2000) Molecular aspects of muscarinic receptor dimerization. *Neuropsychopharmacology* **23**: S19-31.
- Zhao L, Brinton RD (2002) Vasopressin-induced cytoplasmic and nuclear calcium signaling in cultured cortical astrocytes. *Brain Res* **943**: 117-131.
- Zhao L, Brinton RD (2003) Vasopressin-induced cytoplasmic and nuclear calcium signaling in embryonic cortical astrocytes: dynamics of calcium and calcium-dependent kinase translocation. *J Neurosci* **23**: 4228-4239.
- Zhang AY, Chen YF, Zhang DX, Yi FX, Qi J, Andrade-Gordon P, de Garavilla L, Li PL, Zou AP (2003) Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**: F792-798.
- Zhang Y, Li Y, Wei R, Wang Z, Bu D, Zhao J, Pang Y, Tang C (2008) Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for aortic adventitia of rat. *Regul Pept* **151**: 88-94.
- Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O (2002) Urotensin II mediates ERK_{1/2} phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* **22**: 155-168.
- Zohar M, Salomon Y (1993) Mechanism of action of melanocortin peptides. Possible role in astrocyte regulation. *J Mol Neurosci* **4**: 55-62.
- Zou Y, Nagai R, Yamazaki T (2001) Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats. *FEBS Lett* **508**: 57-60.
- Zupan V, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Robberecht P, Evrard P, Gressens P (1998) Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide II vasoactive intestinal peptide 2 receptor in mouse neocortical astrocytogenesis. *J Neurochem* **70**: 2165-2173.

Résumé de thèse

L'urotensine II (UII) et son paralogue l'*urotensin II-related peptide* (URP) sont les ligands endogènes d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G, appelé UT. Le rôle du système urotensinergique au niveau cardiovasculaire a été largement étudié et l'UII est considérée comme le facteur naturel vasoactif le plus puissant identifié à ce jour. Bien que l'UII, l'URP et l'UT soient largement exprimés dans le système nerveux central, leur rôle à ce niveau reste encore mal connu. Le but de ce travail était de caractériser des sites de liaison de l'UII et l'URP sur les astrocytes corticaux et de rechercher un rôle du système urotensinergique sur la fonction astrocytaire dans des conditions physiologiques et physiopathologiques.

Dans un premier temps, nous avons montré que les astrocytes corticaux de Rat en culture expriment des sites de liaison spécifiques de très haute et haute affinités pour l'UII et de haute affinité pour l'URP, au moins l'un des sites correspondant à l'UT. Seules la liaison (site de très haute affinité) et l'activité stimulante de l'UII sur le métabolisme des PIPs sont sensibles à la toxine pertussique, un bloqueur des protéines G_i/G_o . L'UII et l'URP entraînent une élévation dose-dépendante de la $[Ca^{2+}]_c$ avec une réponse aiguë suivie d'une phase plateau. Seule la courbe dose-réponse de l'UII est biphasique avec une activité biologique observée dès 10^{-11} M. L'interaction de l'UII et de l'URP sur leurs sites de liaison stimule une phospholipase C et provoque le recrutement des pools intra- et extracellulaires de calcium, majoritairement *via* des canaux calciques de type T.

A partir d'une série d'analogues synthétisés au laboratoire, nous avons dans un deuxième temps démontré que le [D-Trp⁴]URP, le [D-Tyr⁶]URP et l'[Orn⁵]URP sont capables d'interagir avec des sites de liaison spécifiques sur les astrocytes. Alors que les deux premiers entraînent une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ semblable à celle observée avec l'URP, l'[Orn⁵]URP est totalement dépourvu d'activité intrinsèque. De plus, ce composé inhibe de façon dose-dépendante l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ induite par l'UII et l'URP en se comportant comme un puissant antagoniste de type non-compétitif/insurmontable.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons recherché un rôle potentiel du système urotensinergique dans le contrôle de la prolifération astrocytaire. Nous avons montré que l'application de concentrations croissantes d'UII sur des astrocytes entraîne une élévation de la densité cellulaire alors que l'URP est inactif. Parallèlement, nous avons mis en évidence la présence des ARNm codant l'UII, l'URP et l'UT dans des extraits de lignées tumorales humaines et dans des xénogreffes obtenues par injection de cellules tumorales U87 chez des souris immunodéprimées *Nude*. Dans ce dernier cas, les taux d'UII et d'UT sont nettement supérieurs à ceux observés dans la lignée. Par ailleurs, les ARNm codant les peptides et leur récepteur ont systématiquement été détectés dans les 30 échantillons de glioblastomes humains testés. Enfin, seuls les niveaux d'expression de l'UII sont corrélés à ceux de l'UT.

L'ensemble de ces travaux montre que les astrocytes corticaux de Rat expriment des sites spécifiques et fonctionnels pour l'UII et l'URP. En dépit de leurs analogies structurales, ces deux peptides auraient des activités biologiques distinctes sur la fonction astrocytaire. En particulier, l'UII pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération de ces cellules, notamment dans le cas de tumeurs cérébrales d'origine gliale. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives de recherche dans le traitement des tumeurs cérébrales d'origine astrocytaire.

Mots Clés : urotensine II, *urotensin-II related peptide*, récepteur UT, astrocytes, études de liaison, voies de transduction, calcium, prolifération, tumeurs cérébrales.