Résumé en français

# La protéine à sept domaines transmembranaires (7TM) GPR50 : Un nouveau régulateur de la voie de signalisation TGFβ

## -Introduction-

Un élément essentiel de la vie est la communication cellulaire permettant aux organismes de percevoir, de s'adapter et de répondre à différentes circonstances environnementales. La base de la communication cellulaire est la transduction du signal passant par des différentes voies de signalisation. L'étape primordial est la perception des stimuli par la cellule, ce qui est accomplie par des protéines membranaires spécialisées dans la réception des signaux formant ainsi un médiateur entre l'extra- et intracellulaire.

Parmi ces protéines membranaires on trouve les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG) composés de 800 membres et codant pour 3-4% du génome. Les RCPG peuvent lier une énorme variété de ligands : des petites molécules comme des ions et photons aux larges peptides et protéines, expliquant ainsi leur implication dans un grand nombre des processus physiologiques comme la perception des sens et le métabolisme et de nombreuses activités dans le système nerveux centrale et le cerveau. Dans ce groupe de protéines à sept domaines transmembranaires (7TM), il y a encore environ 100 membres dont le ligand naturel n'a pas pu être identifié, expliquant leur classement comme RCPG orphelins ou protéines orphelines à 7TM. Bien que le but majeur reste de déterminer leur ligand naturel, de plus en plus d'études montrent que les protéines à 7TM peuvent avoir des fonctions indépendantes de la liaison d'un ligand.

Une de ces protéines orphelines à 7TM est GPR50. GPR50 appartient à la sous-famille des RCPG des récepteurs à la mélatonine. A l'inverse des autres membres des récepteurs de la mélatonine. GPR50 a perdu, avec l'évolution, la capacité de lier la mélatonine. Plusieurs recherches visant à identifier des autres ligands de ce récepteur ont été vaines. La caractéristique de GPR50 est sa longue queue C-terminal cytosolique, qui existe chez l'homme sous forme de variantes : il y a une délétion nommé ΔTTGH et deux substitutions d'acides aminées ayant une fréquence de 40% dans la population. Pour sa fonction, différentes approches comme des études d'associations génétiques et l'exploration des souris sans un GPR50 fonctionnel ont montré une implication de GPR50 dans le métabolisme, la thermogénèse et le développement des désordres

mentaux ainsi que la réponse au stress. Un autre axe de recherche se basant sur l'identification de ses fonctions au niveau cellulaire et moléculaire, notamment celles indépendant de l'existence de ligand a été montré que GPR50 inhibe les fonctions du récepteur de la mélatonine $MT_1$ en interagissant directement avec lui. Cette étude a mené au concept que GPR50 agirait comme une protéine qui module l'activité d'autres protéines par interaction directe. Ceci a été aussi montré pour le régulateur de la croissance des neurites Nogo-A et le facteur de transcription TIP60. Notre laboratoire a également cherché à identifier d'autres partenaires associés à GPR50 en appliquant la technique de purification par affinité en tandem (TAP). Ces résultats proposent une interaction avec le récepteur du facteur de croissance transformant TGFβ (*Transforming Growth Factor ß*) de type I (TβRI).

Le TβRI fait partie de le voie de signalisation TGFβ qui est composé de deux types de récepteurs transmembranaires (TβRI et le TβRII) possédant une activité kinase serine/thréonine, le, qui lient la cytokine TGFβ. La liaison se fait au TβRII, qui recrute ensuite le TβRI dans le complexe et exerce son activité constitutive sur le TβRI en le phosphory7lant dans son GS domain et l'active. Le TβRI activé recrute et phosphoryle subséquemment les médiateurs de la signalisation de la voie TGFβ, les Smads. Les Smads forment après des complexes, qui transloquent dans le noyau où ils se lient aux régions spécifiques de l'ADN pour réguler positive- ou négativement la transcription de certains gènes cible. On observe notamment ici un flux direct du signal de l'extracellulaire aux récepteurs vers le noyau et l'ADN via les Smads. Les signaux du ligand TGFβ peuvent également passer par d'autres protéines que les Smads, comme par l'activation des MAP Kinases ERK, p38 et JNK.

La voie TGFβ est au niveau cellulaire responsable de l'induction de la cytostase, de l'apoptose et de la migration cellulaire. Dans l'organisme on a besoin du fonctionnement de la voie TGFβ pour un développement adéquat, dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire et dans des processus régénératives comme la cicatrisation, soulignant son rôle important dans le cancer et des désordres développementaux.

Pour établir cette variété de réponses, en plus de ces principaux composants de la voie TGFβ, un nombre important de protéines qui régulent leur activité ont été découvert ces dernières années. Ces molécules sont essentielles pour la génération d'une activité de signalisation régulée et pour fournir des réponses adaptées au contexte cellulaire et environnemental. Ayant identifiée GPR50 comme potentiel interacteur er régulateur du TβRI et de la voie TGFβ, l'objective de ce projet de thèse était de définir le rôle de GPR50 dans la signalisation TGFβ.

# -Résultats-

***Formation d'un complexe protéique entre GPR50 et TβRI***

Après avoir obtenu par le *TAP assay* les résultats préliminaires montrant que GPR50 forme probablement un complexe avec le TβRI obtenu, un premier axe des travaux de thèse a été de se focaliser sur la vérification de cette interaction. La mise en évidence de cette interaction par d'autres techniques a été réalisée dans des cellules HEK293T par les techniques de co-Immunoprécipitation (Co-IP) et *Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET),* basée sur le transfert d'énergie. En utilisant ces deux techniques, nous avons pu confirmer la formation d'un complexe entre le récepteur TβRI et les deux formes fréquentes du GPR50, le GPR50wt et le GPR50Δ4 au niveau de la membrane plasmique. L'interaction a aussi été confirmée dans un contexte plus endogène dans des cellules dérivées d'un cancer du sein, les MDA-MB-231, surexprimant de manière stable le GPR50.

D'autres Co-IP nous ont permis de mieux caractériser l'interaction entre TβRI et GPR50. Nous avons par exemple montré que le complexe persiste aussi après une stimulation des cellules avec le ligand TGFβ et se forme également entre GPR50 et une forme constitutivement active du TβRI. L'utilisation du modèle cellulaire SNU638, déficient en TβRII, le partenaire d'hétéromèrisation avec le TβRI, a montré que l'interaction se forme indépendamment de la présence du TβRII. L'utilisation des différentes constructions de GPR50, la protéine entière, les parties transmembranaires à 7TM uniquement ou la partie cytosolique seule a révélé que les parties transmembranaires de GPR50 sont suffisantes pour l'interaction avec le TβRI.

***GPR50 induit une activité constitutive de la voie TGFβ indépendante de la stimulation avec TGFβ***

Après la caractérisation du complexe entre GPR50 et le TβRI, un autre but de ces travaux de thèse a consisté à rechercher l'influence de GPR50 sur l'activité de la voie de signalisation induite par TGFβ. En utilisant différents techniques comme le Western Blot, la Co-IP, le fractionnement nucléaire et les gènes rapporteurs nous avons étudié l'effet d'une surexpression de GPR50 dans les cellules HEK 293T et HeLa sur l'activation de la voie TGFβ. De manière systématique, la présence de GPR50 a pour conséquence l'induction d'une activité de la voie de signalisation même en absence du ligand TGFβ. Une activité élevée a aussi été détectée après stimulation avec TGFβ en présence de GPR50. Cette activité constitutive se traduit par la

phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3, mesurée par Western Blot, leur intégration dans un complexe avec Smad4 révélé par Co-IP entre Smad2/3 et Smad4, la translocation de ce complexe dans le noyau démontré par l'enrichissement des Smad2 et 3 dans des fractions nucléaires, et finalement l'activation de la transcription de leurs gènes-cibles étudiée avec la technique du gène rapporteur.

Pour examiner, si GPR50 affecte aussi ou non la signalisation non-canonique de la voie TGFβ, nous avons analysé l'effet de GPR50 sur l'activation de la MAP Kinase p38. La présence de GPR50 entraine aussi une phosphorylation constitutive de p38, suggérant ainsi une influence de GPR50 sur les voies non-canoniques.

De manière générale, la comparaison des effets de deux variantes de GPR50 dans toutes les expériences nous a permis a montrer que le GPR50Δ4 a des effets plus importants sur l'induction de la signalisation TGFβ par rapport au GPR50wt avec une activité plus élevée de la signalisation en aval du TβRI.

Pour chercher l'importance de différentes parties de GPR50 et leurs effets sur la signalisation de la voie TGFβ nous avons également comparé les trois constructions de GPR50 en ce qui concerne leur nécessité pour les effets sur la signalisation. Contrairement à la Co-IP, une utilisation des différentes constructions de GPR50 en Western Blot pour la phosphorylation du Smad3 et le gène rapporteur ont montré le besoin de la partie C-terminale de GPR50 pour l'activation.

***Mécanisme de l'activation constitutive induit par GPR50***

Pour mieux comprendre ce phénomène d'activation constitutive du TβRI par GPR50, nous avons voulu décrypter les mécanismes moléculaires de cette activation.

D'abord, pour exclure la possibilité que GPR50 induit une production ou la sécrétion du ligand TGFβ, nous avons étudié l'effet du surnageant de cellules HEK293T surexprimant de manière transitoire GPR50, sur l'activation de la voie TGFβ. N'ayant pas observé de phosphorylation des Smad2 et Smad3, nous a mené à exclure l'hypothèse d'un effet direct de GPR50 sur le ligand TGFβ.

Pour voir si GPR50 affecte directement l'activation du TβRI, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activité kinase du TβRI. Nos expériences ont eu comme résultat une perte des effets de GPR50, indiquant ainsi que les effets de GPR50 passent par une induction de l'activité kinase du TβRI.

De même, la présence de GPR50 ne modifie non plus le nombre de récepteurs TβRI à la surface cellulaire, ni leur capacité de la liaison du TGFβ, comme nous avons démontré par des expériences de radioliaison dans des cellules MDA-MD-231 où la présence de GPR50 n'affecte pas la liaison du TGFβ radioactif aux cellules.
La possibilité d'un effet direct de GPR50 sur les Smads par une interaction directe a été également exclue grâce a des expériences de Co-IP.

***GPR50 compète avec le régulateur négative FKBP12 pour l'interaction avec le TβRI***

La molécule FKBP12 est un régulateur important de la voie de signalisation TGFβ en si liant à la forme inactive du TβRI. En stabilisant la conformation inactive du TβRI, FKBP12 bloque la phosphorylation aléatoire du TβRI par le TβRII et inhibe ainsi une signalisation basale de la voie TGFβ en absence de son ligand.
Une analyse de l'effet de la présence de GPR50 sur l'interaction entre TβRI et FKBP12 par Co-IP a mené à l'observation que GPR50 diminue celle-ci avec des effets plus importants pour la forme GPR50Δ4, indiquant que GPR50 entre en compétition avec FKBP12 pour l'interaction avec TβRI. Par contre, ces effets ne sont pas induits par une interaction directe entre GPR50 et FKBP12, comme démontré par Co-IP.
L'application de la substance immunosuppressive FK506, qui bloque l'interaction entre FKBP12 et le TβRI et induit une activité basal de la signalisation TGFβ en absence du ligand n'induit pas d'effets additives à GPR50, montrant que GPR50 et FK506 ont le même cible cellulaire. De la même façon, une surexpression de FKBP12 est capable de réduire les effets du GPR50, soulignant leur compétition.
De manière surprenante, un alignement des séquences de FKBP12 et GPR50 a révélé l'existence de motifs homologues entre FKBP12 et la partie intracytoplasmique de GPR50, qu'on y retrouve répétitivement quatre fois. Ce motif $^{84}$ATGHP$^{88}$ de FKBP12 est localisé dans l'extrémité C-terminale et joue un rôle important pour l'interaction avec le TβRI comme proposé par des données existantes de la structure cristallographique entre TβRI et FKBP12 dont nous avons démontré l'importance par la mutation des acides aminées H et P de ce motif. Une mutation identique du motif se retrouvant en proximité de la délétion ΔTTGH dans le GPR50Δ4, le $^{495}$ATSHP$^{499}$ a induit une diminution des effets de GPR50 sur l'interaction entre TGFβ et FKBP12, montrant que ces homologies de la séquence entre FKBP12 et GPR50 entrainent une compétition entre ces deux protéines pour le même site de liaison. Des effets réduits au niveau de

l'activation de la signalisation ont été également observé par des expériences de gène rapporteur. L'identification de ce motif HP en proximité de la délétion TTGH explique ainsi l'importance de la queue C-terminal pour l'induction de la signalisation et les différents effets des deux variantes GPR50 pour l'activation de la voie TGFβ.

***GPR50 active le TβRI même en absence du TβRII***

Des expériences dans le modèle cellulaire des cellules SNU638, déficient en TβRII ne répondent pas au TGFβ, ont montré que l'interaction entre GPR50 et le TβRI se passe en absence du TβRII. Nous avons ensuite voulu savoir si les effets de GPR50 sur la signalisation TGFβ surviennent également en absence du récepteur TßRII, qui est naturellement obligatoire pour l'activation de TβRI par phosphorylation. De ce fait, une déficience en FKBP12 évoque une activité de la signalisation basale que par une occurrence des phosphorylations activatrices aléatoire de TβRI par le TβRII. Ce modèle devrait nous indiquer si les effets de GPR50 passent uniquement par la compétition avec FKBP12 ou d'autres effets de GPR50 supposés.

Nos expériences ont montré qu'une surexpression de GPR50 dans les cellules SNU638 est capable de reconstituer la phosphorylation de Smad3 et l'activation des gènes cibles du TGFβ, qui dans ce modèle est normalement observable qu'après une surexpression ectopique du TβRII. Ces résultats indiquent donc que GPR50 seule peut mettre le TβRI dans sa conformation active sans passer par les phosphorylations activatrices du TβRII. Nous n'avons pas observé qu'une stimulation avec le ligand TGFβ était nécessaire pour les actions de GPR50 et ni avait des effets supplémentaires sur cette maintien de la signalisation TGFβ.

Le fait que l'utilisation de l'inhibiteur de l'activité kinase du TβRI bloque, alors qu'une surexpression de FKBP12 diminue les effets de GPR50, confirme les résultats obtenus auparavant dans les cellules HEK293T comme dans ce modèle.

***GPR50 a des effets similaires au TGFβ dans un modèle de cellules dérivées d'un cancer du sein***

Enfin, après la caractérisation de l'interaction entre GPR50 et le TβRI, l'étude des effets de GPR50 et la description du mécanisme des effets de GPR50 sur le TβRI, nous avons recherché des effets fonctionnels du complexe.

Pour chercher les conséquences fonctionnelles d'une activation constitutive de la voie TGFβ, on a généré un modèle dans la lignée MDA-MB-231, dérivée d'un cancer du sein en surexprimant

GPR50 de manière stable pour induire une activité constitutive de la voie TGFβ. Nos modèles d'étude des effets fonctionnels étaient basées sur des effets du TGFβ décrits pour ces cellules : une inhibition de la prolifération et une activation de la migration cellulaire.

Ainsi, nous avons pu observer dans ces cellules des effets pro-migratoires en présence de GPR50 dans un test de cicatrisation. En effet, la présence de GPR50 a mené à une clôture de l'espace intercellulaire similaire à la stimulation des cellules avec le TGFβ.

Pour étudier la prolifération cellulaire, nous avons choisi premièrement le modèle de l'agar mou qui permet d'observer la formation et la croissance des colonies cellulaires sans attachement. Les cellules MDA-MB-231, qui expriment stablement GPR50, ont montré un nombre réduit des colonies ainsi qu'une taille plus petite de manière significative pour la forme GPR50Δ4. Deuxièmement, nous avons étudié les effets *in vivo* de GPR50 en utilisant un modèle de xénogreffe. Brièvement, nous avons injectées les cellules sans et avec GPR50 dans les flancs des souris nues. Le suivi de la formation de tumeurs après injection a montré que la présence de GPR50 bloque la formation des grosses tumeurs. Les tumeurs d'un mois sont restées à une taille modérée, comme décrit dans la littérature pour les effets du TGFβ.

Les résultats préliminaires de nos analyses fonctionnelles montrent des effets pro-migratoires et antiprolifératifs de GPR50, similaires à ceux causés par une administration de TGFβ et suggérant ainsi un rôle de GPR50 dans le développement des formations cancéreux.

# -Conclusion-

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'identifier et caractériser le GPR50 comme un nouveau régulateur de la voie TGFβ. GPR50 interagit avec le TβRI et induit son activité constitutive ce qui a pour conséquence une activité permanente de la voie TGFβ indépendante de la stimulation avec le ligand et la présence du TβRII.

Avec ces résultats, nous démontrons pour la première fois la formation d'un complexe entre le TβRI et une protéine avec une structure à 7TM. Cette interaction a aussi pour conséquence un nouveau mode d'activation du récepteur TβRI en absence du TβRII, qui est normalement obligatoire pour induire l'activation du TβRI.

Ces travaux ont aussi identifie une nouvelle fonction indépendante d'un ligand pour le RCPG orphelin GPR50, élargissant aussi son spectre de partenaires d'interaction et ses fonctions biologiques. Par rapport aux variantes de GPR50 retrouvées chez l'homme, le GPR50wt et le GPR50Δ4, nous avons identifié pour la première fois des effets différents au niveau de leur capacité à induire une activité constitutive de la voie TGFβ. Les effets antiprolifératifs du GPR50 sur la voie TGFβ proposent aussi l'importance de GPR50 dans la formation des cancers.

## -Discussion et perspectives-

La description du complexe entre GPR50 et TβRI ouvre le champ pour de futurs recherches et applications au niveau moléculaire-cellulaire et physiologique.

Premièrement, il est de grand intérêt de détailler le mécanisme d'activation du TβRI par GPR50, notamment dans le but de distinguer encore mieux cette mode activation induit par GPR50 de l'activation classique par le TGFβ et le TβRII.

Pour l'instant cette activation était exclusivement étudiée dans des modèles cellulaires de surexpression. Dans le futur, il serait intéressant d'identifier des contextes endogènes pour étudier le complexe dans des conditions plus physiologiques. Ceci permettait de mieux comprendre le besoin d'une activité constitutive du TβRI et proposerait aussi la possibilité d'étudier de probables mécanismes de régulation de la formation et l'activité du complexe GPR50-TβRI. Pour cela, le GPR50, avec son profil d'expression limité et la possibilité d'un clivage de son queue cytosolique s'offre comme partie déterminante de l'activité du complexe.

D'ailleurs, le TβRI est membre d'une famille composée de sept récepteurs homologues tous avec la même structure et mode d'activation. Il sera intéressant, de voir si notre concept est aussi valable pour les autres membres de la famille des récepteurs de type I, élargissant et précisant à la fois le spectre d'activité de GPR50 sur la superfamille des récepteurs TGFβ.

Nos travaux sur les effets fonctionnels du complexe entre GPR50 et le TβRI proposent un rôle de GPR50 dans le cancer. Cette hypothèse peut être approfondie d'un côté par d'autres expériences comme par exemple d'étudier les effets sur le développement spontané des cancers dans un modèle de souris. D'un autre côté, une étude de la relevance de GPR50 dans des échantillons humains sera bénéfique, par exemple par l'étude des niveaux d'expression de GPR50 dans différents cancers ainsi qu'un séquençage pour analyser les influences des variantes humains de GPR50 sur le développements des cancers et la recherche de l'existence d'une prédisposition.

Pour d'autres conditions biologiques, dont une relevance de ce complexe est imaginable selon les données existantes y proposant à la fois l'importance de la voie TGFβ et du GPR50. Il y a par exemple comme pistes exploitables le contexte de la cicatrisation des plaies, du développement du cerveau et de sa plasticité dans le cerveau adulte ou encore le métabolisme et l'homéostasie énergétique.

Ces futures études permettront de placer nos travaux dans des contextes physiologiques pour, en terme de perspectives pharmaceutique, penser à la génération de composés interférant avec la formation ou l'activité de ce complexe.

L'ensemble de nos travaux ont révélé un nouveau régulateur de la voie de signalisation TGFβ qui pourrait faire partir de ce réseau de régulateurs responsables de l'obtention d'une spécificité et d'une adaptation au contexte cellulaire de la voie de signalisation directe du TGFβ.